

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007-2008

課題番号：19890016

研究課題名（和文）

一酸化窒素合成酵素を標的とした筋萎縮性側索硬化症に対する治療法の開発

研究課題名（英文） Targeting neuronal nitric oxide synthase as a therapy for muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

鈴木 直輝（SUZUKI NAOKI）

東北大学・病院・医員

研究者番号：70451599

研究成果の概要：

本研究代表者の鈴木は一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 由来の NO が廃用性筋萎縮を促進することを初めて見出した。本研究では筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態を骨格筋側の視点で捉え直し nNOS を修飾することによる ALS の新規治療法開発の可能性について検討した。ALS 病態では atrogin1 など他の筋萎縮系と共通の分子が働くことが明らかになった。一方で iNOS も発現増強するため、病勢のコントロールのためには nNOS 以外の NOS の調整も必要であると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	402,000	3,072,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：一酸化窒素、筋萎縮性側索硬化症、筋萎縮、tail suspension、SOD1

1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い筋萎縮予防の重要性が増しており、筋萎縮の分子機構の解明が社会的にも急務である。筋萎縮が起こる原因には廃用性、癌の悪疫質、加齢など様々な要因が挙げられるが、近年の分子生物学・遺伝学

的手法により筋萎縮の病態が徐々に明らかになってきた。中心的な分子として Insulin-like growth factor (IGF)1 や calcineurin や筋萎縮の重要なシグナルである ubiquitin-proteasome 系などが研究されてきたが、2001年に筋萎縮系で遺伝子発現が

増加する E3-ubiquitin ligase である Muscle Ring Finger 1 (MuRF1) および MAFbx/atrogen-1 が報告されてから遺伝子改変マウスを用いた研究が飛躍的に進展した。これら E3-ubiquitin ligase を発現調節するシグナル伝達系として PI(3)k/Akt/Foxo pathway や NFκB pathway が知られてきている。Foxo は寿命や代謝にも関与する重要な転写因子として知られ、筋萎縮の研究分野はメタボリック症候群研究との接点を持ち更なる発展が期待される分野である。

本研究申請者の鈴木は筋細胞膜の構造上の強度維持に重要な分子複合体である dystrophin-glycoprotein complex (DGC) が廃用性筋萎縮モデルの一つである tail suspension 系の筋萎縮に関与する可能性に注目して研究を進めてきた。鈴木は DGC の各要素を調べ尾部懸垂による筋萎縮の過程で nNOS の発現は筋細胞膜から減少し、細胞質に移行することを見出した。nNOS 欠損マウスや nNOS 阻害剤投与群では萎縮耐性が観察された。一酸化窒素 (NO) の生体内での産生量を EPR spectrometry で定量した所、萎縮筋で nNOS 由来の NO 産生増加を認めた。さらに筋萎縮関連 E3-ubiquitin-ligase である MuRF1, atrogen1 の発現および Foxo3a の活性化は nNOS 欠損マウスで抑制された。尾部懸垂による nNOS の局在変化が NO の過剰産生を引き起こし、筋萎縮に繋がる新しい経路の存在を明らかにし、NO の産生過多を抑制することで筋萎縮を軽減できる可能性があることを示せた (Suzuki et al., J. Clin. Invest. 07)。

Tail suspension 以外の筋萎縮モデルでも同様の分子機構が働くかを調べるために、除神経モデルを作成した。マウスの坐骨神経切除を行った所、nNOS の局在変化および nNOS 欠損マウスや nNOS 阻害剤投与群での萎

縮耐性が観察された。これらは tail suspension の系と同様の結果であり筋萎縮における nNOS が多様な系で共通性を持つことが明らかとなった。

ALS は全身の運動神経が変性を来し呼吸筋麻痺・球麻痺などにより自然経過では数年で死亡する神経難病の一つである。10%が家族性でありその約 25%が superoxide dismutase 1 (SOD1) 遺伝子に異常を認める。ALS の病態・治療研究はこの SOD1 遺伝子に変異を持ったマウスを用いて進められてきた。共同研究者である青木らは SOD1 遺伝子異常を持つ家族性 ALS の家系の報告 (Aoki et al., 1993) を始めとし、脊髄や髄腔への治療的なアプローチを可能にする変異 SOD1 遺伝子導入ラットを開発し (Nagai et al, 2001), そのラットを用いて HGF などの成長因子による治療効果を検討するなど継続して先進的な成果を出している。

2. 研究の目的

(1) 筋萎縮性側索硬化症の病態に nNOS/NO の関与があるかどうか？

予備実験の結果からは Denervation による筋萎縮でも nNOS が重要な働きを持つと考えられる。SOD1 遺伝子変異マウスという病態モデルでも nNOS は筋萎縮促進的に働くという仮説の下、nNOS/NO とその下流の経路について SOD1 (H46R) 変異マウスモデルを用いて検討した。

(2) nNOS の NO 産生能を制御することで ALS の筋萎縮抑制・表現型改善は可能か？

nNOS 抑制剤を投与することにより ALS モデルマウスで筋萎縮を抑制し、寿命の延長や運動機能の改善が起こるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

坐骨神経切断モデルの場合、野生型と nNOS 欠損マウス間および nNOS 阻害剤投与下・非投与下を比較することで nNOS の影響を評価することができる。ALS モデルマウスの場合には nNOS 阻害剤投与下・非投与下での比較となる。投与薬剤は水溶性の nNOS 阻害剤である L-VNIO を過去の in vivo 投与での報告で使用された量(Yamayeva et al. 2007)を中心に適量を検討して用いた。ALS の治療研究で問題となるのは投与時期であるが、今回の研究では観察的研究で筋萎縮の開始時期を見極め、その時期から nNOS 阻害剤を効かせて筋萎縮抑制が起こるかを見る。薬効の評価は体重・発症時期・罹患期間・寿命を計測し、生理学的には握力計を用いた筋力評価や生化学的な CK などの測定、さらに各病期での骨格筋を採取し、real time PCR や Western blotting で各シグナル伝達系の変化を検討した。

4. 研究成果

本研究代表者の鈴木は一酸化窒素合成酵素 (nNOS)由来の NO が廃用性筋萎縮を促進することを初めて見出した。本研究では筋萎縮性側索硬化症 (ALS)の病態を骨格筋側の視点で捉え直し nNOS を修飾することによる ALS の新規治療法開発の可能性について検討する。以前の研究で DGC の各要素を調べ尾部懸垂による筋萎縮の過程で nNOS の発現は筋細胞膜から減少し、細胞質に移行することを見出した。nNOS 欠損マウスや nNOS 阻害剤投与群では萎縮耐性が観察された。一酸化窒素 (NO)の生体内での産生量を EPR spectrometry で定量した所、萎縮筋で nNOS 由来の NO 産生増加を認めた。さらに筋萎縮関連 E3-ubiquitin-ligase である MuRF1, atrogin1 の発現および Foxo3a の活性化は nNOS 欠損マウスで抑制された。尾部懸垂に

よる nNOS の局在変化が NO の過剰産生を引き起こし、筋萎縮に繋がる新しい経路の存在を明らかにし、NO の産生過多を抑制することで筋萎縮を軽減できる可能性があることを示せた (JCI 07) H19 年度は坐骨神経切断モデルを用いて除神経における筋萎縮の分子機構を野生型および nNOS 欠損マウスを用いて Western blotting 等で比較・検討した。その結果、tail suspension の系と同様、nNOS の局在変化、および細胞内シグナルの変化が観察された。さらに nNOS 欠損マウスや nNOS 阻害剤投与の結果から nNOS の下流でそれらの細胞内シグナルが動いていることを明らかにした。また H46R 変異 SOD1 遺伝子導入マウスを繁殖させ実験に供する準備を整えた。H20 年度は H46R 変異 SOD1 遺伝子導入マウスを用いて後肢の筋萎縮進行時の nNOS の変化について検討した。筋萎縮が明らかになる病期以前から nNOS の局在変化が見られることが明らかになった。さらに tail suspension や除神経と共通のシグナル伝達系の活性化が観察された。また ALS 病態では iNOS が発現増強する事も見出した。nNOS 特異的な水溶性の阻害剤である L-VNIO を用いた投与実験では寿命や筋萎縮の程度は変化しなかった。今後投与量などの調整は必要であるが、病勢のコントロールのためには nNOS 以外の NOS subtype の調整も必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4件)

①Suzuki N. et al. Procalcitonin might help in discrimination between meningeal neuro-Behçet disease and bacterial meningitis. *Neurology*. 72: 762-763, 2009. 査読有

②Tanihata J, Suzuki N. et al. Downstream

utrophin enhancer is required for expression of utrophin in skeletal muscle. J. Gene Med. 10: 702-713, 2008. 査読有

③Dagvajantsan B, Aoki M, Warita H, Suzuki N, Itoyama Y. Up-regulation of insulin-like growth factor-II receptor in reactive astrocytes in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis transgenic rats. Tohoku J Exp Med. 214: 303-310, 2008. 査読有

④Suzuki N. et al. Nitric oxide production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation neuronal nitric oxide synthase. J. Clin. Invest. 117, 2468-2476, 2007. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① Naoki Suzuki et al. Nitric oxide production results in disuse-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal nitric oxide synthase. 7th Japanese-French Workshop on “Development of Molecular Therapy toward Muscular Dystrophy” Sho-nan International Village-Hayama-Kanagawa 8 June 2007

②鈴木直輝ら. nNOS/NOを介した除神経による筋萎縮の解析. 第 49 回日本神経学会総会 (横浜) 2008. 5. 16

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 直輝(SUZUKI NAOKI)

東北大学・病院・医員

研究者番号:70451599