

令和 7 年 6 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2024

課題番号：19KK0214

研究課題名（和文）タンパク質の構造生物学に基づいた筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と治療法開発

研究課題名（英文）Elucidation of ALS pathogenesis through structural biology

研究代表者

山中 宏二（Yamanaka, Koji）

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：80446533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝性筋萎縮性側索硬化症（ALS）では、SOD1タンパク質に疾患変異（アミノ酸置換）がみられ、その構造異常を通じてALSを発症することが知られている。SOD1の構造解析に基づいて、それに結合する低分子化合物エブセレンを構造展開して、SOD1を安定化する候補化合物を合成した。そして、エブセレン類縁化合物のスクリーニングを通じて、候補化合物が変異タンパク質による毒性に対する神経保護効果を発揮することを培養神経細胞およびSOD1-ALSマウスにおいて示した。本研究課題を通じて、英国・日本の構造生物学・病態神経科学の若手研究者が学術交流し国際共同研究成果として論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALS等の神経変性疾患では疾患に特徴的な病因タンパク質の構造異常が神経変性に深く関与するため、疾患・構造生物学の融合研究が不可欠といえる。本研究課題は、英日研究者の国際共同研究により病態解明を進め、学術論文として成果を発信した。学術的意義として、異分野連携による新たな知見創出と研究手法の確立が挙げられる。社会的意義では、難治性疾患克服への基盤構築と若手研究者の国際ネットワーク形成により、将来的な治療法開発と研究人材育成に貢献した。国際協力による包括的アプローチは、神経変性疾患研究に新たな展開を切り開くものである。

研究成果の概要（英文）：Based on the structural analysis of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), we synthesized a candidate compound that stabilizes SOD1 by expanding the structure of ebselen, a small molecule compound that binds to SOD1. We synthesized a candidate compound that stabilizes SOD1. Through screening ebselen analogues, we demonstrated that these compounds have neuroprotective effects against toxicity induced by mutant proteins in cultured neurons and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice. Through this project, researchers in structural biology and neuroscience from the U.K. and Japan exchanged academic ideas and published the results in an international joint research paper.

研究分野：病態神経科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経細胞に選択的な細胞死を来す神経変性疾患である。ALS は、進行性の筋萎縮および麻痺を呈する致死性の指定難病で、その治療薬としてリルズールおよびエダラボンが認可されているものの、その効果は極めて限定的であるため、病態理解に基づいたより効果的な治療法の開発が強く求められている。

ALS の約 90%以上は孤発例であるが、一部は家族性に発症し、その中でも多数を占めるのが superoxide dismutase 1 (SOD1) をコードする *SOD1* 遺伝子上のミスセンス優性変異である。英国リバプール大学の Samar Hasnain 教授の研究グループは、2000 年初頭からこの変異 SOD1 タンパク質の立体構造を詳細に解析しており (Strange et al. (2003) *J Mol Biol*, Hough et al. (2004) *PNAS*, 他)、最近、低分子化合物エブセレンが SOD1 タンパク質の立体構造の異常化を抑制することを見出した (Capper et al. (2018) *Nat Commun*)。エブセレンは構造解析の結果、本来の二量体化 SOD1 を安定化するように位置することが明らかとなった (図 1)。エブセレンは抗酸化作用を有し、脳梗塞や双極性障害の治療薬候補でもある、比較的安全性の高い化合物である (Yamaguchi et al. (1998) *Stroke*)。しかし、エブセレンは水溶性が低く、水中で容易に析出したことから、ALS のような慢性疾患においては長期の投与および吸収性の向上を目的として、水溶性および水中安定性の高い化合物へ展開する必要がある。

一方、ALS の大多数を占める孤発例の病巣では、RNA 結合タンパク質 TDP-43 (TAR DNA binding protein-43) が核外へ漏出し、細胞質に異常蓄積して凝集体を形成することが一般的な特徴である (Neumann et al. (2006) *Science*, Arai et al. (2006) *Biophys Biochem Res Commun*)。TDP-43 の局在異常は RNA 恒常性の破綻をきたし、神経細胞死につながると考えられ、実際に TDP-43 をコードする *TARDBP* 遺伝子上の変異は家族性 ALS を発症する。また、最近では核内の RNA が液-液相分離を抑制して RNA 結合タンパク質の凝集を抑制していることが報告された (Maharana et al. (2018) *Science*)。従って、TDP-43 の核外漏出や凝集を抑制すれば、孤発性 ALS の病態の改善に向けた大きな一歩となると考えられる。

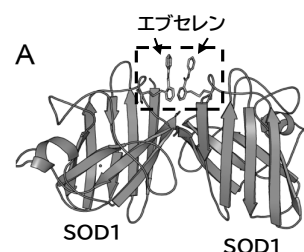


図 1. Ebselen と SOD1 タンパク質の結合： エブセレンは SOD1 タンパク質 2 量体の界面に結合して SOD1 の 2 量体を安定化し、タンパク質の異常化を抑制する。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、英国リバプール大学の構造生物学研究チームと共同で構造生物学的知見に基づいた筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の分子病態解明と新規治療戦略の開発を目指す。具体的に、1) ALS 原因タンパク質 SOD1 の立体構造を安定化させて疾患の進行を抑制する化合物の開発、2) 単量体 TDP-43 の分子の生物物理学的性状解析と立体構造解析を行う。SOD1 の構造安定化を目標に、英国チームが合成した化合物について、本邦チームが共同で培養細胞を用いたスクリーニング・構造解析を行い、神経保護効果を細胞やモデルマウスを用いて検証する。また、TDP-43 タンパク質の解析について、本邦チームによる知見である、ALS 病理の特徴である TDP-43 の異常蓄積や核外漏出と蛋白の構造異常の関係性に着目し、このメカニズムをタンパク質の物理化学的特性ならび立体構造解析から解明する。

### 3. 研究の方法

以下の研究方法により、本研究課題を遂行した。

#### 1) エブセレンおよび類縁化合物の設計、合成：

評価対象化合物の設計および合成は英国側研究者が行った。水溶性や安定性などの化合物の基本的な化学的特徴の測定、および結晶化による複合体の立体構造の取得を行い、培養細胞で使用可能と考えられる十分な安定性や SOD1 への結合能などの特徴を満たす候補を絞り込んだ。(リバプール大学)

#### 2) 候補化合物のスクリーニング：

上記で得られた候補化合物を、神経培養細胞 (Neuro2a 細胞株) を用いたスクリーニングにより絞り込みを行った。評価項目は、(1) 細胞内における異常化 SOD1 タンパク質の蓄積量、(2) 細胞内における SOD1 タンパク質の安定性、(3) 培養細胞に与える異常 SOD1 タンパク質の毒性からの保護効果、の 3 点で行った。(名古屋大学)

#### 3) ALS-SOD1 動物モデルを用いた候補化合物の検証：

発症直前、およそ生後 3 ヶ月の変異 SOD1-G93A トランスジェニックマウス (ALS モデルマウス) に候補化合物を自由飲水により終末期まで投与する。投与濃度は、培養細胞によるスクリーニングの結果をもとに海外共同研究者と打ち合わせのうえ、決定する。治療効果の指標として、(1) 生存期間 (2) 体重減少 (3) ローターロード試験を測定し、化合物投与群

で対照群と比較して差があるか検証した。(名古屋大学)

#### 4) TDP-43 の構造異常の検討:

TDP-43 の核外移行や細胞質への凝集には、TDP-43 の単量体化状態が重要であることを見出した。単量体 TDP-43 の構造予測を行い、2 量体と比較することで単量体 TDP-43 に特異的な構造を解析した。(名古屋大学)

### 4. 研究成果

#### 1) エブセレン類縁化合物による神経細胞保護

英国チームがエブセレンの構造から異常化 SOD1 との結合に必須でない部分を様々に改変し、多数の候補化合物を作製した。その結果、異常化 SOD1 への結合と安定化の効果がエブセレンより優れた化合物が複数得られた。また実際に、その結合状態を立体構造解析によって明らかにした。そこで、名大チームは得られた候補化合物が実際に神経保護効果を発揮するか、まず異常化 SOD1 を発現する神経培養細胞を用いて検討した (図 2)。その結果、エブセレンが細胞を保護できる濃度 (1  $\mu\text{M}$ ) よりもはるかに低い濃度 (0.1  $\mu\text{M}$ ) で強力に細胞を保護できる有望な化合物であることが判明した。また、それらの化合物はエブセレンよりも細胞に対する毒性も低く安全であることや、化合物の保護効果は、現在、ALS の治療薬として使用されているエダラボンより優れていた。(Amporn danai, Rogers, Watanabe et al. EBioMedicine, 2020)

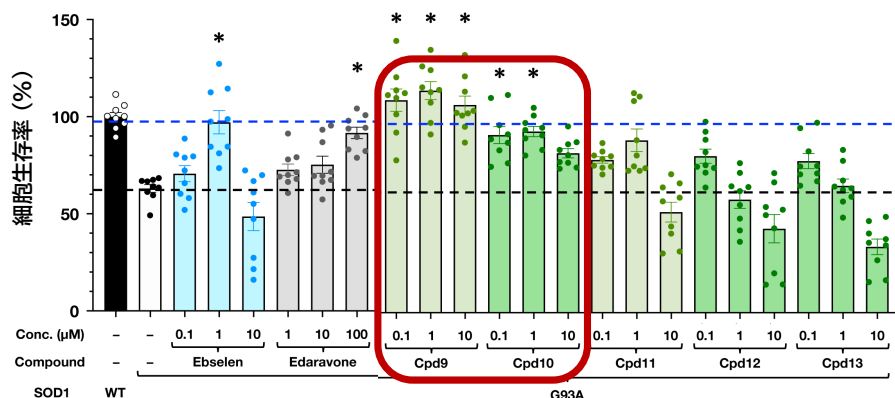


図 2 異常化 SOD1 を発現した神経細胞における候補化合物の保護効果

開発した化合物のなかで、化合物#9 と #10 (Cpd9, Cpd10) が非常に高い細胞保護効果を示した (赤枠内)。また、両化合物はエダラボン (Edaravone, 灰色) より低濃度で効果があり、その効果も優れている。青破線は毒性のない状態での細胞生存率 (陽性対照)、黒破線は化合物を加えない状態での細胞生存率 (陰性対照) を示す。相対細胞生存率は、MTS アッセイにより計測した。

#### 2) ALS モデルマウスにおけるエブセレン類縁化合物の検証

SOD1-G93A マウス (メス) に対して 70 日齢から終末期 (約 160 日) まで、#9, #10 の化合物を混餌投与した (0.016%w/w, 24mg/kg)。発症時期は最大体重の時点を発症時期、生存期間は、後肢麻痺により設定したエンドポイントとした。#9 は、発症時期を約 11 日遅延 (control: 104.4  $\pm$  8.7 days vs #9: 115.5  $\pm$  9.2 days, n=12 each)、#10 は、発症時期を約 15 日遅延 (control: 106.4  $\pm$  9.0 days vs MR6-26-2: 121.1  $\pm$  7.2 days, n=20 each)、生存期間を 6.4 日延長した。また、claspings score で評価した臨床症状についても #10 投与群で改善がみられた (図 3)。

#10 投与群において、脊髄における不溶化変異 SOD1 タンパク質、S-S オリゴマー化変異 SOD1 が減少し、運動ニューロンにおけるミスフォールド SOD1 の蓄積も軽減された (C4F6 抗体による免疫染色による)。また、前脛骨筋における神経筋接合部の支配率も投与群において改善がみられた。(Watanabe et al. Scientific Reports, 2024)

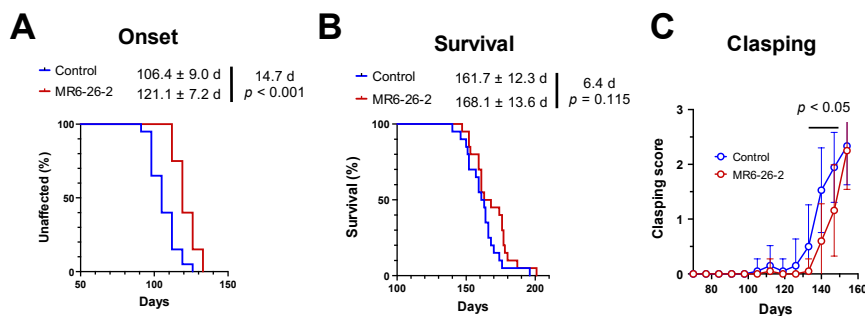


図 3. エブセレン類縁化合物の投与により SOD1-G93A マウスの発症時期が遅延した。(A) 発症時期、(B) 生存期間曲線 (#10: MR6-26-2) 平均発症時期、生存期間を示した (n=20, two-way ANOVA following posthoc multiple comparisons with Šidák correction) (C) Claspings score (n=20)

### 3) TDP-43 の構造異常の検討 :

ALS の死後脳・脊髄試料の検討により TDP-43 タンパク質の生理的な二量体化・多量体化が障害されて単量体化していることを発見し、神経系培養細胞や iPS 細胞由来運動ニューロンにおいて TDP-43 単量体化が ALS 病態を再現することを見出した。さらに、TDP-43 の二量体化・多量体化を定量する新規測定法「TDP-DiLuc」を開発して検討を行った結果、TDP-43 の単量体化が ALS の早期病態である可能性が示唆された。特に、単量体 TDP-43 の構造予測により、N 末端ドメインの一部が露出していることが判明し、その情報を活用して単量体 TDP-43 を特異的に認識する抗体を樹立した。(Oiwa et al. *Science Advances*, 2023)

本研究課題の遂行を通じて、英国リバプール大学との共同研究成果を 2 報の国際学術誌に発表できた。

### 引用文献 :

1. Amporndanai K, Rogers M, Watanabe S, Yamanaka K, O'Neill PM, S. Hasnain SS. Novel Selenium-based compounds with therapeutic potential for SOD1-linked Amyotrophic Lateral Sclerosis. **EBioMedicine** 59: 102980, (2020). doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102980.
2. Oiwa K, Watanabe S, Onodera K, Iguchi Y, Kinoshita Y, Komine O, Sobue A, Okada Y, Katsuno M, Yamanaka K. Monomerization of TDP-43 is a key determinant for inducing TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. **Science Advances** (2023) 9(31): eadf6895. doi: 10.1126/sciadv.adf6895.
3. Watanabe S, Amporndanai K, Awais R, Latham C, Awais M, O'Neill PM, Yamanaka K, Hasnain SS. Ebselen Analogues delay disease onset and its course in fALS by on-target SOD-1 engagement. **Scientific Reports** 14: 12118 (2024). doi: 10.1038/s41598-024-62903-5.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Watanabe Seiji, Ampornnanai Kangsa, Awais Raheela, Latham Caroline, Awais Muhammad, O'Neill Paul M., Yamanaka Koji, Hasnain S. Samar	4. 巻 14
2. 論文標題 Ebselen analogues delay disease onset and its course in fALS by on-target SOD-1 engagement	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-62903-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Oiwa Kotaro, Watanabe Seiji, Onodera Kazunari, Iguchi Yohei, Kinoshita Yukako, Komine Okiru, Sobue Akira, Okada Yohei, Katsuno Masahisa, Yamanaka Koji	4. 巻 9
2. 論文標題 Monomerization of TDP-43 is a key determinant for inducing TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadf6895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adf6895	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto Kei, Watanabe Seiji, Akutsu Masato, Muraki Norifumi, Kamishina Hiroaki, Furukawa Yoshiaki, Yamanaka Koji	4. 巻 299
2. 論文標題 Intrinsic structural vulnerability in the hydrophobic core induces species-specific aggregation of canine SOD1 with degenerative myelopathy-linked E40K mutation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104798 ~ 104798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.104798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Seiji, Murata Yuri, Oka Yasuyoshi, Oiwa Kotaro, Horiuchi Mai, Iguchi Yohei, Komine Okiru, Sobue Akira, Katsuno Masahisa, Ogi Tomoo, Yamanaka Koji	4. 巻 120
2. 論文標題 Mitochondria-associated membrane collapse impairs TBK1-mediated proteostatic stress response in ALS	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2315347120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2315347120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita Hirofumi, Komine Okiru, Fujimori-Tonou Noriko, Yamanaka Koji	4. 巻 16
2. 論文標題 Comprehensive expression analysis with cell-type-specific transcriptome in ALS-linked mutant SOD1 mice: Revisiting the active role of glial cells in disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1045647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2022.1045647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Seiji, Horiuchi Mai, Murata Yuri, Komine Okiru, Kawade Noe, Sobue Akira, Yamanaka Koji	4. 巻 179
2. 論文標題 Sigma-1 receptor maintains ATAD3A as a monomer to inhibit mitochondrial fragmentation at the mitochondria-associated membrane in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 106031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2023.106031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Shohei, Watanabe Seiji, Komine Okiru, Sobue Akira, Yamanaka Koji	4. 巻 35
2. 論文標題 Novel reporters of mitochondria associated membranes (MAM), MAMtrackers, demonstrate MAM disruption as a common pathological feature in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202100137R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Amporndanai Kangsa, Rogers Michael, Watanabe Seiji, Yamanaka Koji, O'Neill Paul M., Hasnain S. Samar	4. 巻 59
2. 論文標題 Novel Selenium-based compounds with therapeutic potential for SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 102980 ~ 102980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2020.102980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Seiji, Inami Hidekazu, Oiwa Kotaro, Murata Yuri, Sakai Shohei, Komine Okiru, Sobue Akira, Iguchi Yohei, Katsuno Masahisa, Yamanaka Koji	4. 巻 11
2. 論文標題 Aggresome formation and liquid-liquid phase separation independently induce cytoplasmic aggregation of TAR DNA-binding protein 43	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-03116-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Seiji, Oiwa Kotaro, Murata Yuri, Komine Okiru, Sobue Akira, Endo Fumito, Takahashi Eiki, Yamanaka Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 ALS-linked TDP-43M337V knock-in mice exhibit splicing deregulation without neurodegeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-0550-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Oiwa K, Yamanaka K
2. 発表標題 Molecular Basis of TDP-43 pathology in neurodegenerative disease.
3. 学会等名 Japan-UK Neuroscience symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山中宏二
2. 発表標題 ALSにおけるTDP-43病理形成の分子基盤.
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山中宏二.
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症におけるTDP-43病理形成の分子基盤と疾患修飾療法への展望.
3. 学会等名 第42回日本認知症学会学術集会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山中宏二
2. 発表標題 TDP-43異常に基づいたALS/FTDマウスモデル：最近の知見.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中宏二
2. 発表標題 生命金属タンパク質異常による神経変性疾患の病態とその制御.
3. 学会等名 第1回生命金属科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中宏二
2. 発表標題 神経変性疾患における蛋白質品質管理異常.
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中宏二
2. 発表標題 ALSにおけるTDP-43の凝集・局在異常の分子機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Yamanaka
2. 発表標題 Mechanism for inducing TDP-43 pathology in ALS.
3. 学会等名 PACTALS (Pan-Asia Consortium for Treatment and Research in ALS)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山中宏二
2. 発表標題 単量体・多量体バランスの異常はALSにおけるTDP-43病理を形成する.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大岩康太郎、渡邊征爾、井口洋平、勝野雅央、山中宏二.
2. 発表標題 Monomerization of TDP-43 is a key determinant for inducing TDP-43 pathology in ALS.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本 慶、渡邊征爾、小峯 起、祖父江 顕、神志那弘明、山中宏二.
2. 発表標題 E40K変異イヌSOD1タンパク質の種特異的凝集に重要なアミノ酸残基の同定.
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大岩康太郎、渡邊征爾、祖父江 顕、小峯 起、勝野雅央、山中宏二.
2. 発表標題 Multimerization of TDP-43 plays a key role in determination of its subcellular localization.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamanaka K
2. 発表標題 Molecular pathomechanism of motor neuron disease.
3. 学会等名 UK-Japan Neuroscience Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Watanabe S, Nishino K, Murata Y, Oiwa K, Yamanaka K.
2. 発表標題 TDP-43 mutant lacking its C-terminal domain induces age-dependent motor dysfunction in mice.
3. 学会等名 30th International Symposium on ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学環境医学研究所 ホームページ  
http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/index.html  
病態神経科学分野 研究室ホームページ  
http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/mnd/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡邊 征爾  (Watanabe Seiji)  (70633577)	名古屋大学・環境医学研究所・講師   (13901)	
研究分担者	祖父江 顕  (Sobue Akira)  (80823343)	名古屋大学・環境医学研究所・特任助教   (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	リバプール大学	Kings College London	