

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06681

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症の病態進行の鍵遺伝子の解明—遺伝子治療を目指して—

研究課題名(英文)Elucidation of key genes for the progression of amyotrophic lateral sclerosis - aiming for gene therapy -

研究代表者

金城 俊彦 (Kinjo, Toshihiko)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：70758599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する新規治療標的としての遺伝子治療の可能性について検討を行った。ALSは、運動神経が脱落する疾患であるが、その運動神経の生存に関与する可能性がある apelin/APJシステム遺伝子治療標的となりうるか調査した。ALSモデルマウスを用いた解析では、apelin受容体であるAPJがALS病態の進行とともに発現量が低下していることが分かっており、本研究ではその原因が、APJの機能発現が関与している可能性を明らかにした。APJは、複数の翻訳後修飾によりその機能が維持されることを見出した。この成果は、AIMS Neuroscience誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSは難治性疾患であり、その進行を緩やかにすることは可能であるが、治療法は確立していない。本研究では、運動神経の生存を活性化させる可能性がある受容体に着目し、新規治療ターゲットとして本受容体遺伝子をアデノ随伴ウイルスベクターに搭載することで、運動神経に直接タンパク質を発現させ副反応を抑え治療に資する知見を得るうえで重要な基礎的成果となった。また、遺伝子ベクターとして搭載する遺伝子を変えることで、生存を維持する受容体に関する翻訳後修飾タンパク群をコードする遺伝子を分子生物学的な機能を明らかにすることが、治療が難しい疾患について新たな治療標的を創出する波及効果のある研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possibility of apelin/APJ system gene therapy as a novel therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a disease that causes motor nerve loss. Analysis using ALS model mice revealed that the expression level of the apelin receptor, APJ, decreased with the progression of ALS pathology. APJ was found to maintain its function by multiple post-translational modifications. These results were reported in the journal AIMS Neuroscience.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子治療 翻訳後修飾 apelin/APJ システム ミトコンドリアイオン緩衝 筋萎縮性側索硬化症

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は世界でも有数の長寿国であるが、平均寿命と健康寿命との差は10年もある。すなわちQOLの低い状態で10年間を過ごした後、人々は死を迎える。ALS患者については、特定疾患医療受給者証の所持者が、2002年度では7,000名弱であったが、15年後の2017年度では9,636名まで増加した。高齢化が顕著であるわが国において、病態解明と治療薬の開発が最も急がれる難病のひとつである。

近年、遺伝子改変等によるモデルマウス開発が容易となり、より多くの研究者が精力的にALSの発症および進行抑制に関する研究を進めてきたが、残念ながら、ALSの治療に結びついた研究というのはゼロに等しい。本研究は、運動神経のサブタイプ別に脆弱性が異なる事実を起点として、抵抗性の獲得のために必要な刺激を与えて治療または予防することを目指す。その抵抗性を獲得させる刺激とは、Apelin/APJシグナルの活性化である。

ALSは現在、発症すれば完治の見込みが無い。罹患者は絶望し、大きな精神的苦痛を被ることが想像に難くない。この難病の進行を抑制することができれば、罹患者に生きる希望を与えることができる。今後遺伝子診断糖が普及しALSが発症することが確定した人々にとって、症状が軽い段階でその進行を抑えられるならその治療薬、あるいはその発症を未然に食い止めることができるならその予防薬の開発は、平均寿命だけでなく、健康寿命を延長する上でもこの上ない意義がある。

### 2. 研究の目的

ALSは、運動神経が選択的に障害され、進行性の筋萎縮を示し、発症から数年で人工呼吸の装着を余儀なくされる重篤な神経変性疾患である。その発症原因は、世界中で精力的に研究がなされているにも関わらず、いまだ不明で病態進行抑制が極めて困難であり、わが国では特定疾患に指定されている。現在、ALS患者の生存期間を延長させる薬剤として認可されているリルゾールについても、有意な生存期間の延長を認めなかった、という報告(Mitsumoto H et al., Brain. Nerve., 2007)がなされるなど、顕著な効果を示す薬剤が存在しない。ALSの原因究明とともにALS発症後に病態進行を抑制する効果的な治療薬の開発に繋がる研究が求められている。申請者はペプチド性シグナル伝達物質 Apelin 発現を欠損させた、ALSモデルマウス(SOD1変異マウス)において、ALSの発症が早まることを明らかにした。またマウス脊髄を用いた解析から、Apelinの受容体 APJ が発現している運動神経ほど、細胞死に抵抗し残存することを明らかにした。そこで Apelin/APJ システム賦活化が、ALSの発症及び病態進行を遅らせる可能性を提唱してきた(Kinjo et al. PLOS ONE, 2011)。また申請者は、Giたんぱく質共役型受容体(GPCR)依存性に開口するカリウムチャンネルにより、細胞内K<sup>+</sup>レベルを低下すると、過分極誘発以外の機構で興奮性毒性環境下の神経細胞を保護するメカニズムについて明らかにした(Kinjo et al. Neurochem. Res., 2018)。APJもまたGiたんぱく質共役型受容体であり、GPCR依存性カリウムチャンネル(GIRK)を開口しうる(図2)が、未だ報告が無い。ALSモデルマウスを用いて、病態進行に伴う脊髄運動神経細胞サブタイプにおける apelin/APJ の発現変化を経時的に明らかにすることで、病態進行における運動神経への本システムの関与を解析する。運動神経細胞において、APJの作動が興奮毒性を抑制する事実を解明する。その際、K<sup>+</sup>チャンネル開口により、細胞内のK<sup>+</sup>レベルの低下が鍵となることに注目し調査する。上記の結果を踏まえて、本システムの制御が運動神経細胞に対する保護作用に関して、アデノ随伴ウイルス(AAV)による特定細胞を遺伝子改変したマウスを用いることで、特定の遺伝子を輸送し特定の細胞で効果を発現しうるか検証する。

### 3. 研究の方法

運動神経サブタイプ別、遺伝子発現解析を通してALSモデルマウス運動神経の特徴を解析する。我々はこれまでに、ALSモデルマウスを用いて病態進行に伴う腰髄での apelin 発現量の減少を報告したが、apelin/APJシグナルの消失が運動神経の脱落を導くのかは不明のままである。そこで、次世代シーケンシングにより運動神経サブタイプ別遺伝子発現変化ヒートマップを作成し、apelin/APJシグナルが消失することによる運動神経への影響について解析を行う。運動神経は、サブタイプにより脆弱性が異なること、および運動神経が支配する骨格筋の種類が報告されている(Saxena, S. et al. Nat. Neurosci., 2009)。このことから、ALS病態の進行に伴い脱落する運動神経における apelin/APJ の役割を明らかにする。具体的には、発症前および発症後のALSモデルマウス脊髄の運動神経細胞を、サブタイプ別に切り出し、RNAを抽出後に次世代シーケンサーにより遺伝子発現解析を行う。これにより apelin/APJ シグナルのその際に APJ を修飾するイソペプチド化酵素や GIRK などの発現レベルにも注目して解析を行う。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを構築することで、ALSモデルマウスを用いて運動神経に効率よい遺伝子発現法を構築し遺伝子治療の基盤とする。また、運動神経細胞に対する興奮性毒性実験系を確立する。Apelinによる細胞内カリウム濃度低下作用による興奮性毒性の抑制運動神経マーカー遺伝子のプロモーター下流に、APJ及びイソペプチド化酵素遺伝子を持つトランスジェニックマウス

作製し運動神経サブタイプ解析を行い遺伝子発現パターンから遺伝子治療のためのカギとなる遺伝子のスクリーニングを行う。運動神経マーカー遺伝子のプロモーター下流に、APJ 及びイソペプチド化酵素遺伝子を持つトランスジェニックマウス作成：前年度までの研究成果から、運動神経依存性に、活性型 APJ を発現するコンディショナルノックインマウスを作成し、この動物個体及び調製した初代培養神経細胞の特性を調査すると共に、Apelin シグナルに対する感受性を調査する。将来的には、さらにこれを ALS マウスと掛け合わせることで、ALS の発症が Apelin の血中濃度次第で調節可能であり、またアンタゴニスト (ML221) によりその作用が遮断されることを明らかにする。研究遂行により翻訳後修飾がイソペプチド化以外である可能性もあり、その場合は変更する。すべての運動神経が Apelin シグナルを受容可能にしたトランスジェニック動物を作成、さらに ALS マウスと掛け合わせ、ALS 発症がアゴニスト (ML233) 投与による APJ 刺激で遅れることを証明する。また、AAV を用いた運動神経サブタイプ解析：運動神経細胞にアデノ随伴ウイルスを用いて、APJ 遺伝子を発現させたマウスを作製する。先に解析を行った運動神経サブタイプによる遺伝子解析の結果から、発症前後の適切な時期を選択し神経筋接合部より AAV を用いることで逆行性にベクターを運び、運動神経サブタイプ別に遺伝子発現を制御する。これによりこれまで困難であった運動神経細胞死に対する遺伝子治療の可能性を追求する。

#### 4. 研究成果

運動神経サブタイプ別遺伝子発現解析については先行研究によりシングルセルスクリーニングの報告 (Blum JA. et al, *Nat. Neurosci.*,2021) がなされたことと、新型コロナにより研究の進捗が遅れていたことから、この報告を参考することにした。新型コロナの発生により研究自粛期間があり、動物飼育、遺伝子改変動物の作製や基礎実験を思うように進行することができなかったこともあり、過去の研究から Apelin/APJ シグナルが病態に関与していることを基盤に遺伝子ターゲットを絞り解析を行った。Apelin/APJ シグナルについて総説 (Kinjo T. et al. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2021) にまとめたうえで、遺伝子治療を行うにあたり Apelin/APJ 遺伝子を組み込んだ逆行性に輸送可能な AAV ベクターの構築に成功した。マウスへの投与は、期間内に行うことができなかったが、逆行性 AAV ベクターの構築に成功したことは、モデルマウスへの投与実験を可能にするものであり、遺伝子治療の基礎データを取るうえで必要不可欠な成果であるといえる。本研究で作製した AAV ベクターは、遺伝子治療において様々な遺伝子の特異性高く発現可能なものであり、投与部位を変更することも可能であることから応用範囲が広く有用性が高いベクターであると考えられる。また、神経細胞を用いた研究では、ミトコンドリアのカリウム濃度の緩衝作用によって神経細胞死が抑制されることを明らかにしており、これらの成果について論文化のため現在査読を受けているところである。神経細胞死に関する研究から Apelin/APJ シグナルの活性化には受容体の翻訳後修飾が重要となることを見出した。特に、糖鎖修飾だけでなくイソペプチド化やユビキチン化ではない翻訳後修飾によって受容体の寿命が調節されている可能性を示した。翻訳後修飾がない受容体は安定性低下、および機能低下を引き起こす可能性を見出し、これらに関する成果をまとめ論文として報告を行った (Kinjo T. et al, *AIMS Neurosci.* 2023)。したがって、ALS モデルマウスの運動神経の生存低下は、本受容体の安定性低下が関与していることが示唆されたので、現在も引き続き本受容体の安定性を向上させる遺伝子治療ターゲットの検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toshihiko Kinjo, Hiroshi Higashi, Kyosuke Uno, Nobuyuki Kuramoto	4. 巻 14(2)
2. 論文標題 Apelin/Apelin Receptor System: Molecular Characteristics, Physiological Roles, and Prospects as a Target for Disease Prevention and Pharmacotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr Mol Pharmacol .	6. 最初と最後の頁 210-219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1874467213666200602133032.	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 Toshihiko Kinjo, Shun Ebisawa, Tatsuya Nokubo, Mifu Hashimoto, Takonori Yamada, Michiko Oshio, Ruka Nakamura, Kyosuke Uno, Nobuyuki Kuramoto	4. 巻 10(4)
2. 論文標題 Post-translational modifications of the apelin receptor regulate its functional expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 AIMS Neurosci .	6. 最初と最後の頁 282-299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3934/Neuroscience.2023022.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Toshihiko Kinjo, Kyosuke Uno, Sadaaki Maeda and Nobuyuki Kuramoto
2. 発表標題 Cell growth inhibitory effect of the green tea amino acid L-theanine in cells expressing solute carrier family 7 member 5.
3. 学会等名 JPW2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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	倉本 展行 (Kuramoto Nobuyuki) (60324092)	摂南大学・薬学部・教授  (34428)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宇野 恭介  (Uno Kyosuke)  (30608774)	摂南大学・薬学部・講師    (34428)	

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