

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07413

研究課題名（和文）標的化技術を用いたグリア間ネットワーク制御によるALSへの治療戦略

研究課題名（英文）Therapeutic strategy for ALS by the regulation of glial cell network with targeting technology.

研究代表者

寺島 智也 (Terashima, Tomoya)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40378485

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）：ALSモデルマウス由来初代培養アストロサイトおよびミクログリアにて、M1ミクログリア由来IL-1による反応性アストロサイトの誘導および、反応性アストロサイト由来TGF-によるM1ミクログリアの誘導が起こりやすい状態にあることがわかり、ALSマウスにおけるグリア細胞間の相互作用が治療標的となると考えられた。そこで、ALSモデルマウスを用いて、ミクログリア標的化siRNA-IL1を髄腔内に投与することによる治療実験を行ったところ、運動機能検査および生存曲線の改善を認め、ミクログリアを標的とした細胞特異的な遺伝子発現抑制による新たな分子治療法となる可能性が示唆され、今後の臨床応用が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSにおいて、確立された根治療法はなく、治療法開発が急務である。近年、アストロサイトとミクログリアは病態への関与が大変注目されているが、両者の相互間作用を考慮した分子治療は報告がなく、グリア間ネットワークを解明して制御することは、有効性の高い治療法開発に結び付くと考えられる。そのため、本研究にてグリア間ネットワークの解明およびMolecular ZIP codeによるsmall RNAの細胞特異的標的化輸送によって、治療効果を示したことは意義深く、他の神経変性疾患への汎用性も含め、難病への核酸医薬による治療効率を飛躍的に向上させる技術となることが期待され、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In primary culture of astrocytes and microglia derived from ALS model mice, it has been clarified that reactive astrocytes were induced by M1 microglia-derived IL-1b and M1 microglia induced by reactive astrocyte-derived TGF-. These interactions between glial cells in ALS mice was considered to be a therapeutic target. Therefore, we conducted a therapeutic experiment using microglia-targeting siRNA-IL1 intrathecally using ALS model mice. Improvements were observed in motor function tests and survival curves. These results suggest the possibility of a new molecular therapy by suppressing gene expression with microglia-specific targeting peptide, and future clinical applications are expected.

研究分野：脳神経内科学

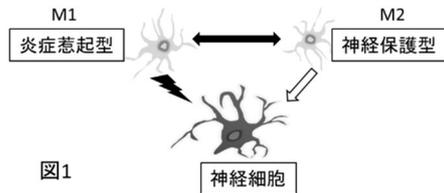
キーワード：筋萎縮性側索硬化症 ミクログリア 標的化輸送 核酸医薬 siRNA ドラッグデリバリーシステム I  
L-1 TGF-

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。

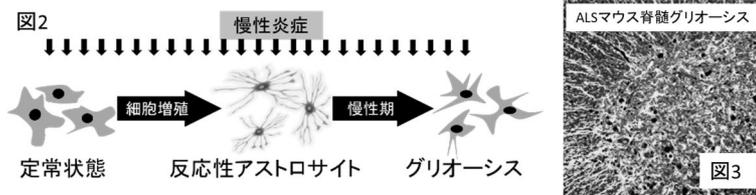
## 1. 研究開始当初の背景

ALSは、難治性神経変性疾患であり、未だ確立された根本治療はなく、その治療法の開発は急務である。近年、病変部位である脊髄組織内で、神経細胞以外の細胞が、病因に深く関わっていることが報告されており、非細胞自律性神経細胞死 (non-cell autonomous neuronal death) として、ALSのみならず神経変性疾患全般に認められる現象として注目をあびている。

それら神経細胞を取り巻く細胞のうち、ミクログリアは、特徴により大きく M1 型 (炎症惹起型) と M2 型 (神経保護型) の2つのタイプに分類される

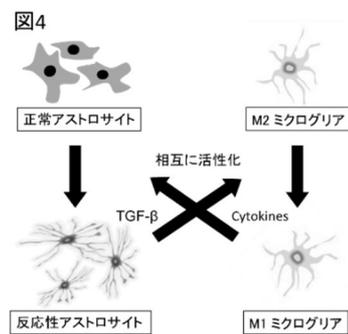


(図1)。そして、ALSの病期が進行するとともに、M1ミクログリアが病変部位に集積し、炎症の増強、神経細胞死を誘発し、機能障害を悪化させる。また、アストロサイトは、ALSにおいて病期の進行とともに反応性アストロサイトと変化して増殖し、グリオシスをきたし、神経機能障害を惹起する(図2,3)。



これら、ミクログリアとアストロサイトは相互に影響を与えていることが解っており、M1ミクログリア由来のサイトカイン刺激 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , C1q など) にて、反応性アストロサイトが誘導され(図4)、反対にアストロサイト由来の TGF- $\beta$  が M1ミクログリアを誘導することが報告されている(図4)。

これらグリア間ネットワークの制御が、ALS治療の鍵を握ると考えられ、治療標的となると考える。

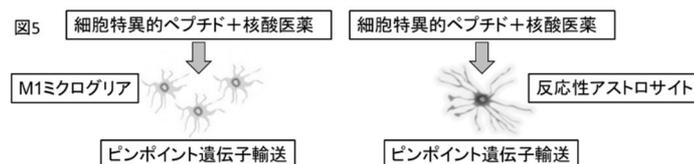


また、その制御には、M1ミクログリアおよび反応性アストロサイトを独立して特異的に標的とする薬物や遺伝子輸送が必要であり、どのように目的の細胞のみに輸送するかが問題となる。脊髄組織内には、他に、神経細胞をはじめ、オリゴデンドロサイト、血管内皮細胞など様々な細胞が存在し、治療標的以外の細胞への影響を考慮する必要があり、その副作用を最小限に抑えるために、標的化が必要である。標的化を実現するツールとして、近年、我々は細胞および組織特異的結合ペプチドを同定し、報告してきた。そのペプチドは、Molecular ZIP code (homing peptide) と呼ばれ、7つ程度のアミノ酸で構成されており、体内の郵便番号の様に考えられており、この技術の応用にて、グリア間ネットワーク制御のためのピンポイントな遺伝子輸送が可能となると考える。

## 2. 研究の目的

ALSについて世界中でその病態解明や治療法開発が行われているが、依然として根治療法はなく、治療法開発が急務である。その中で、非細胞自律性の神経細胞死に影響しているアストロサイトとミクログリアは大変注目されており、それらの疾患発症への関与が重要視されつつある。しかし、アストロサイトまたはミクログリアそれぞれを標的とした治療は認められるが、両者の相互間作用を考慮した分子治療は報告がなく、グリア間ネットワークを制御することは、有効性の高い治療法となる可能性を秘めており、独自性があると考えている。

Homing peptideを用いた研究は、ガン細胞の標的化では幅広く研究されており、本国でもガン研究で用いられているが、慢性疾患や神経難病への開発はほとんど行われておらず、新規性のある研究である。以上から、ALSにおけるグリア間ネットワークを制御する試みとピンポイントな標的化技術を組み合わせることで、画期的な治療法を開発することを目的とする(図5)。

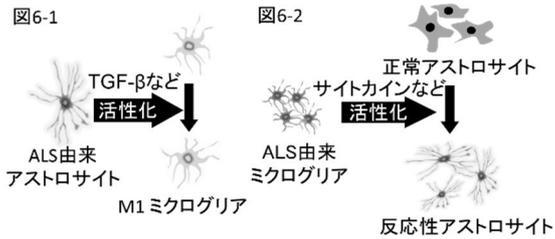


### 3. 研究の方法

#### [1] ALS マウス由来グリア細胞間の相互作用と関連遺伝子検索

##### i) ALS マウス由来アストロサイトの遺伝子発現解析とミクログリアへの影響

新生児または発症後の G93ASOD1 (ALS モデル) マウス (正常マウスをコントロール) 大脳より混合グリア培養後にアストロサイトを単離。反応性アストロサイトの割合、サイトカイン刺激 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , C1q など) による反応性アストロサイトへの移行を検証する。また、アストロサイト培養上清下に初代培養ミクログリアを孵置し、M1 タイプへの誘導割合をコントロールと比較して検証する (図 6-1)。

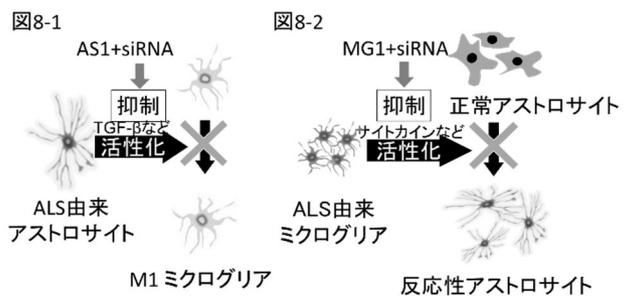


##### ii) ALS マウス由来ミクログリアの遺伝子発現解析とアストロサイトへの影響

上記同様に得られた混合グリア培養から、ミクログリアを単離。mRNA array による治療候補遺伝子解析および M1 ミクログリアの細胞割合、TGF- $\beta$  刺激による M1 ミクログリアへの反応性を検証する。また、ミクログリア培養上清下に初代培養アストロサイトを孵置し、反応性アストロサイトへの誘導割合について検証する (図 6-2)。以上により、ALS マウスにおけるミクログリア間の相互誘導作用が亢進していることを検証し、関与している遺伝子群について、治療候補遺伝子の選別を行う。

#### [2] ALS マウス由来ミクログリアへの siRNA の標的化輸送

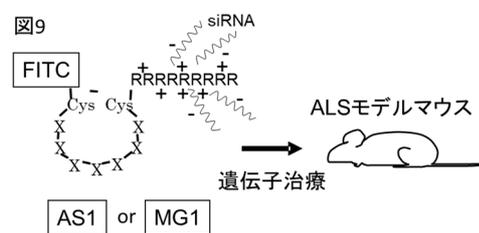
同定済みのアストロサイト結合ペプチド (AS1 ペプチド: C-LNSSQPS-C) に 9 つのアルギニン (R) 連鎖 (正電荷に富む) を連結したペプチドを合成委託。M1 ミクログリアへの誘導が報告されている TGF- $\beta$  の siRNA (siRNA-TGF- $\beta$ ) を外部業者に合成委託。AS1 ペプチドと miRNA を静電的相互作用により結合し、標的ペプチドと輸送核酸の複合体を合成する (図 7)。ALS 由来アストロサイトにその複合体を投与し、取り込み (FITC 蛍光を顕微鏡で確認) および、培養アストロサイトへの遺伝子導入効率を TGF- $\beta$  など標的遺伝子発現の抑制効果にて評価し、M1 ミクログリアの選択的誘導抑制について評価する (図 8-1)。ミクログリアについても、上記同様に、M1 ミクログリア特異的結合ペプチド (MG1 ペプチド: C-HHSSAR-C) と、治療候補 siRNA (IL-1 $\beta$ -siRNA) を外部業者に合成委託し、同複合体 (図 7) を培養ミクログリアに投与し、反応性アストロサイトの選択的誘導抑制について評価する (図 8-2)。



#### [3] Molecular ZIP code 標識遺伝子輸送による ALS マウスへの治療検討

[1][2]より得られた基礎検討の結果をもとに、MG1 + 核酸医薬による

ALS モデルマウスへの治療実験を行った (図 9)。発症早期からの予防的投与を施行し、効果判定 (行動実験 (運動機能検査 (Rota-Rod test, grip strength test, Wire-hang test など)、生存曲線)を行った。エンドステージに至ったマウスを用いて、脊髄組織内のグリオシスやミクログリアの細胞数の検証、非治療群との比較検討、残存神経細胞数の検討、遺伝子解析による炎症関連遺伝子の発現抑制の有無など総合的に治療効果を判定した。



### 4. 研究成果

#### ALS マウス由来グリア細胞間の相互作用と関連遺伝子検索

生後 1 日の G93ASOD1 (ALS モデル) マウスおよび野生型マウス大脳より得られた初代培養アストロサイトおよびミクログリアを用いて ( 1 ) GM-CSF 刺激 M1 ミクログリアとアストロサイトの共培養および ( 2 ) IL-1 で誘導した反応性アストロサイトとミクログリアの共培養にて遺伝子発現検索を行った。結果、GM-CSF 誘導 M1 ミクログリアの刺激を受けたアストロサイトで、反応性アストロサイトに特徴的な遺伝子群の発現を認め、M1 ミクログリアにより、反応性アストロサイトが誘導されることが実証された。また、反対に IL-1 にて誘導した反応性アストロサイトの刺激を受けたミクログリアは、M1 ミクログリアに特徴的な遺伝子発現を認め、反応性アストロサイトにより、M1 ミクログリアが誘導されることが実証された。また、ALS モデルマウスにおいて、反応性アストロサイトおよび M1 ミクログリアを示す遺伝子発現量が高いことも示された。

#### ALS マウス由来グリア細胞への siRNA の標的化輸送

ALS マウス由来の単離培養アストロサイトおよびミクログリアにて、アストロサイト標的ペプチド (AS1) による siRNA-TGF- $\beta$  輸送により、M1 ミクログリア誘導が、ミクログリア標的ペプチド (MG1) による siRNA-IL-1 輸送により、反応性アストロサイト誘導が抑制され、それぞれのクロストークが証明され、治療標的となると考えられた。

#### ALS マウスへのミクログリア標的化 siRNA-IL1 投与における治療検討実験

ALS モデルマウス脳脊髄腔内にミクログリア標的化 siRNA-IL1 を投与し、運動機能検査および生存曲線を調査し、その治療効果判定を行った。Rota-Rod テストおよびその他運動機能検査にて対照群に比し、進行遅延効果を示し、また、生存曲線の改善も認められ、今後の臨床応用を期待させる結果であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 寺島智也	4. 巻 38
2. 論文標題 Small RNA 標的化によるALSへの治療戦略	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BIO Clinica 11月臨時号	6. 最初と最後の頁 56-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitamura Tomoaki, Terashima Tomoya, Katagi Miwako, Ohashi Natsuko, Nozaki Kazuhiko, Tsuji Atsushi	4. 巻 25
2. 論文標題 Bone marrow-derived mononuclear cells ameliorate neurological function in chronic cerebral infarction model mice via improvement of cerebral blood flow	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 1186 ~ 1199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcyt.2023.07.003	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 Fujikawa Hitomi, Kojima Hideto, Terashima Tomoya, Katagi Miwako, Yayama Takafumi, Kumagai Kosuke, Mori Kanji, Saito Hideki, Imai Shinji	4. 巻 24
2. 論文標題 Expression of proinflammatory cytokines and proinsulin by bone marrow-derived cells for fracture healing in long-term diabetic mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-023-06710-5	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 -
1. 著者名 Nakamura Ryutaro, Kurihara Mika, Kobashi Shuhei, Tamaki Yoshitaka, Ogawa Nobuhiro, Kitamura Akihiro, Yamakawa Isamu, Bamba Shigeki, Terashima Tomoya, Urushitani Makoto	4. 巻 14
2. 論文標題 Ideal body weight-based determination of minimum oral calories beneficial to function and survival in ALS	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1286153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2023.1286153	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 Zen Rika, Terashima Tomoya, Tsuji Shunichiro, Katagi Miwako, Ohashi Natsuko, Nobuta Yuri, Higuchi Asuka, Kanai Hirohiko, Murakami Takashi, Kojima Hideto	4. 巻 10
2. 論文標題 Ambient Temperature Is Correlated With the Severity of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury via Microglial Accumulation in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 883556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2022.883556	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 Terashima Tomoya, Katagi Miwako, Ohashi Natsuko	4. 巻 -
2. 論文標題 Neuronal-Hematopoietic Cell Fusion in Diabetic Neuropathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stcltm/szad015	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 Kobashi Shuhei, Terashima Tomoya, Katagi Miwako, Urushitani Makoto, Kojima Hideto	4. 巻 24
2. 論文標題 Bone marrow-derived inducible microglia-like cells ameliorate motor function and survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcyt.2022.02.001	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 寺島 智也	4. 巻 35
2. 論文標題 先端技術を駆使した糖尿病末梢神経障害に対する次世代型治療への展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 糖尿病合併症	6. 最初と最後の頁 281-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohashi Natsuko, Terashima Tomoya, Katagi Miwako, Nakae Yuki, Okano Junko, Suzuki Yoshihisa, Kojima Hideto	4. 巻 11
2. 論文標題 GLT1 gene delivery based on bone marrow-derived cells ameliorates motor function and survival in a mouse model of ALS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92285-x	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 Katagi Miwako, Terashima Tomoya, Ohashi Natsuko, Nakae Yuki, Yamada Akane, Nakagawa Takahiko, Miyazawa Itsuko, Maegawa Hiroshi, Okano Junko, Suzuki Yoshihisa, Fujino Kazunori, Eguchi Yutaka, Kojima Hideto	4. 巻 4
2. 論文標題 Malfunctioning CD106-positive, short-term hematopoietic stem cells trigger diabetic neuropathy in mice by cell fusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02082-5	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tomoya Terashima, Rika Zen, Tomoaki Kitamura, Kazuki Mera, Nguyen Ngoc Bach, Makoto Urushitani
2. 発表標題 Development of microRNA delivery technology with homing peptides to microglia for the treatment of mice model of amyotrophic lateral sclerosis.
3. 学会等名 The 26th World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ngoc Bach Nguyen, Tomoya Terashima, Tomoaki Kitamura, Rika Zen, Makoto Urushitani
2. 発表標題 Cell therapy for the chronic stage of ischemic stroke with bone marrow-derived inducible microglia-like cells in mice.
3. 学会等名 第29回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ngoc Bach Nguyen, Tomoya Terashima, Tomoaki Kitamura, Rika Zen, Makoto Urushitani
2. 発表標題 Bone marrow-derived inducible microglia-like cells: A novel regenerative cell therapy for chronic ischemic stroke.
3. 学会等名 The 26th World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rika Zen, Shunichiro Tsuji, Tomoya Terashima, Takashi Murakami
2. 発表標題 Ameriolated brain injury in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy by M1-like microglia depletion.
3. 学会等名 The 22nd Congress of Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺島 智也, 小橋 修平, グエン ゴック バック, 米良 和起, 漆谷 真
2. 発表標題 骨髄誘導神経保護型ミクログリア様細胞による神経疾患への再生治療
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北村 智章, 寺島 智也, 漆谷 真, 辻 篤司, 吉田 和道
2. 発表標題 骨髄単核球移植による慢性期脳梗塞に対する脳血流改善を介した新規再生治療
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北村智章、櫻美和子、大橋夏子、辻篤司、寺島智也
2. 発表標題 骨髄単核球移植による慢性期脳梗塞に対する脳血流および運動機能改善効果
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 全梨花、寺島智也、辻俊一郎、櫻美和子、大橋夏子、村上 節
2. 発表標題 新生児低酸素性虚血性脳症に対するM1ミクログリア標的のアポトーシスペプチドを用いた新規治療法の開発
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nguyen Ngoc Bach, 北村智章、全梨花、櫻美和子、大橋夏子、寺島智也
2. 発表標題 Development of regenerative therapy for chronic ischemic stroke by BM-iMG cells
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺島智也、小橋修平、櫻美和子、大橋夏子、中江由希、小島秀人
2. 発表標題 骨髄由来神経保護型ミクログリア様細胞によるALSへの新規治療法開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 全 梨花、寺島 智也、辻 俊一郎、櫻 美和子、村上 節、小島 秀人
2. 発表標題 新生児低酸素性虚血性脳症の動物モデルにおける温度変化による脳障害への影響
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村智章、寺島智也、櫻美和子、野崎和彦、小島秀人
2. 発表標題 慢性期脳梗塞に対する骨髄単核球細胞を用いた再生治療法の開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺島 智也
2. 発表標題 次世代医療を目指した糖尿病研究の最前線：糖尿病末梢神経障害に対する次世代型治療
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会九州地方会 シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺島 智也
2. 発表標題 糖尿病神経障害の新しい展：：糖尿病神経障害の治療への新展開
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨髄由来神経保護型ミクログリア様細胞の選択的誘導法とその利用	発明者 寺島智也、小島秀人、櫻美和子	権利者 滋賀医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-145754	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

滋賀医科大学 内科学講座 脳神経内科 <a href="https://shiga-neurology.com/">https://shiga-neurology.com/</a>
---

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------