

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15622

研究課題名（和文）神経栄養因子プレオトロピンのALS/FTLD病態治療効果の検証

研究課題名（英文）Verification of the therapeutic effect of the neurotrophic factor pleiotropin on ALS/FTLD pathology

研究代表者

藤岡 祐介 (Fujioka, Yusuke)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・助教

研究者番号：70896381

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ALS/FTLDの病初期にみられるグリア細胞の神経保護効果を維持、活用するという独自の治療戦略の有用性を示すため、十分量のプレオトロピンを変性神経細胞周囲に供給させる方法としてリコンビナント-プレオトロピンの補充（定期的髄腔内投与）を検証した。リコンビナント-プレオトロピンの髄腔内/脳室内投与に伴い特筆すべき副作用が見られないことを病理学的検討を含めて確認した。変異SOD1マウスへのリコンビナント-プレオトロピン髄腔内投与を施行し、生存率、運動機能の変化を確認した。さらに、グリア特異的FUSノックダウンにて、プレオトロピンの発現上昇、一部神経保護効果を病理学的に確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性硬化症/前頭側頭葉変性症(ALS/FTLD)は未だ致死性の神経難病であり新規治療法の確立は急務である。我々が今回着目したプレオトロピンはFUS機能喪失時に生理的に機能する神経保護因子であるが、検討により治療効果、副作用の面で十分期待ができるものであった。本課題を通じプレオトロピンのALS/FTLDへの治療応用への道筋を示した社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：To demonstrate the utility of a unique therapeutic strategy to preserve and harness the neuroprotective effects of glial cells in the early stages of ALS/FTLD disease, we tested recombinant pleiotropin supplementation (periodic intrathecal administration) as a means of providing sufficient amounts of pleiotropin to the peri-neuronal degenerating cells. Pathological studies confirmed that there were no significant adverse effects associated with intrathecal/intracerebroventricular administration of recombinant pleiotropin. Intrathecal administration of recombinant pleiotropin to SOD1 mutant mice was performed and changes in survival and motor function were confirmed. In addition, we pathologically confirmed the increased expression of pleiotropin and some neuroprotective effects in glia-specific FUS knockdown.

研究分野：神経内科学

キーワード：プレオトロピン FUS グリア細胞 ALS/FTLD

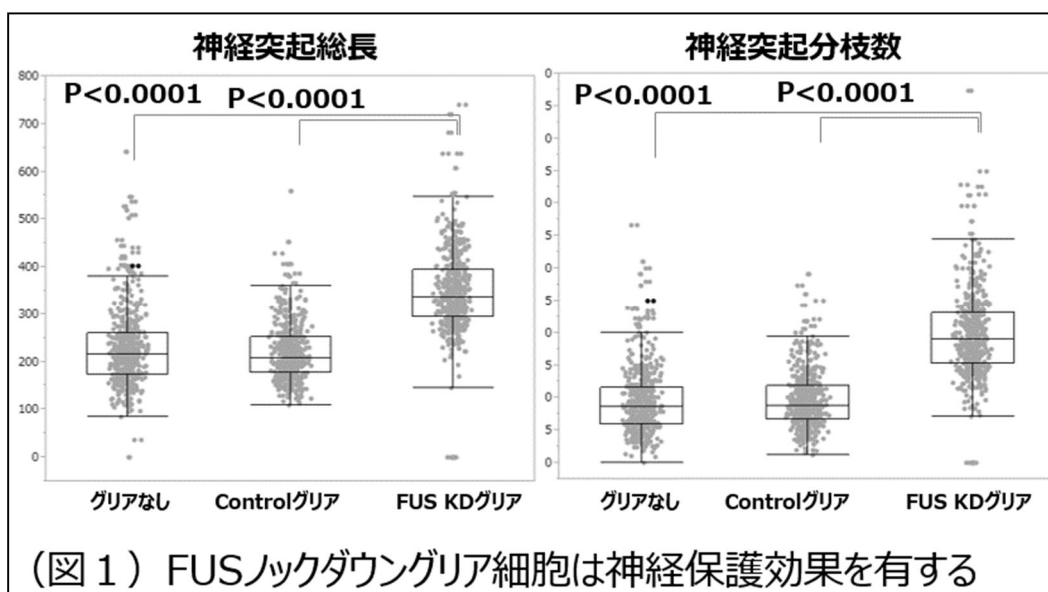
1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性硬化症/前頭側頭葉変性症(ALS/FTLD)は致死性の難治性神経変性疾患の一つであり、治療に直結する病態解明が喫緊の課題である。種々のグリア細胞からなる周辺環境の毒性化がALS/FTLDの発症、病気の進行に関わることも近年指摘されつつあるものの、治療応用は道半ばである(Yamanaka K et al, Neurosci Res. 2018)。

一方、申請者らはこれまで家族性ALS/FTLDの原因遺伝子の1つであるFUSの生理機能に注目し機能喪失が神経変性に関わることを報告してきた(Sci Rep 2012, Nat Commun 2015, Cell Rep 2017a, Cell Rep 2017b)。そして、神経細胞のみならずグリア細胞においてもFUSの機能喪失時には非常に多くの遺伝子発現変化、スプライシング変化が生じることを明らかにした(Sci Rep 2014)。とりわけ、グリア細胞での免疫・炎症に関わる分子の変化が顕著であったことから、神経に対する何らかの影響の存在が示唆された。治療介入を念頭にFUSを発現抑制したマウスの初代培養グリア細胞と共培養させた神経細胞の神経突起形態を観察すると、FUSノックダウン(KD)グリア細胞に強力な神経保護効果を認めた(図1)。FUS KDグリア細胞の培養上清をLC-MS/MSを用いて網羅的に解析したところFUS KDグリア細胞特異的にプレオトロピンという分泌型神経栄養因子が存在していることを発見した(図2)。

プレオトロピンはGDNF,NGF等とともに主にアストロサイトから分泌されるMidkineファミリーの神経栄養因子で、通常成人時は抑制されているものの、発生段階や虚血モデル、脊髄損傷モデルなどの非常時に増加がみられる(Gonzalez-Castillo C et al, Front Cell Neurosci. 2015)。

病初期の神経保護効果の消失もALS/FTLD悪化の一因であり、このグリア細胞の変容を把握し、プレオトロピンを補充するなど適切に補正することは有効な治療戦略となりうるのではないか、との仮説に至った。



(図1) FUSノックダウングリア細胞は神経保護効果を有する

2. 研究の目的

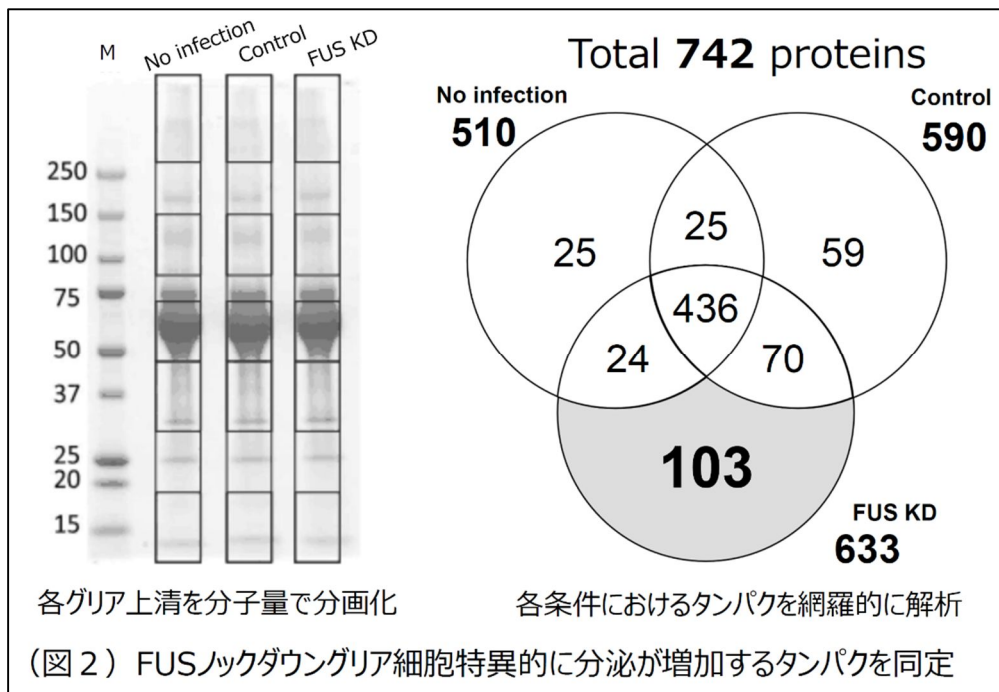
本研究の目的はプレオトロピンのALS/FTLD治療への応用である。プレオトロピン自体は、強力な神経栄養因子として知られているがALS/FTLD病態における役割は未知であった。ALS/FTLD病態関連分子FUSのグリア細胞における機能喪失によって増加する分泌型タンパク質の網羅解析という独自のアプローチによってはじめて、ALS/FTLD関連病態でのプレオトロピンの分泌亢進が明らかとなった。プレオトロピンは効果が強力であるだけでなく、この意味で生理的であるためALS/FTLDの治療としても理にかなった神経栄養因子である点是他治療薬と大きく異なる。さらに、本研究課題にて提案するアデノ随伴ウイルス(AAV)投与による生体細胞の遺伝子改変を用いた手法は、単純な補充にとどまらない周辺微小環境の積極的な補正であり、新たな治療戦略の創出にもつながると考えた。

3. 研究の方法

病初期にみられるグリア細胞の神経保護効果を維持、活用させる独自の治療戦略を立案した(図5,6)。その主眼は変性神経細胞周囲に十分量のプレオトロピンを供給することである。以下、2つの戦略に大別し計画を概説する。

リコンビナント-プレオトロピンの補充(定期的髄腔内投与)

プレオトロピンはグリア細胞におけるFUSの機能喪失等ALS/FTLD病態の進展に即応して分泌



される生理的かつ強力な神経栄養因子であるため、これまでの神経栄養因子補充療法に比べて高い効果が期待される。一方で、FUS機能喪失が依然不明である孤発性ALSや他家族性ALSの進行抑制に効果が得られるかは未知である。そこで申請者らが作成したFUS conditional knockout (CKO) マウスモデルに加え、変異SOD1家族性ALSモデルマウスに対し、治療介入を行った。リコンビナント-プレオトロピンの髄腔内/脳室内に投与し、投与開始時期、投与回数、用量ごとに治療効果を比較。治療効果は生存率、運動機能検査に加え、FUS/TDP-43 CKO、TDP-43 BAC Tg マウスモデルではFTLDの表現型を念頭に、高架式十字試験やオープンフィールド試験等を用いて高次脳機能解析も行う。また、経時的なMRI画像変化、脊髄運動神経の神経脱落、グリオシス、炎症の程度など病理学的な検討も併せて行う。リコンビナント製剤投与の副作用を確認するため、血液検査、各種臓器の病理学的検討も行う。

グリア細胞の神経保護効果の賦活

AAVを用いグリア細胞のFUSを発現抑制しプレオトロピンを持続的に分泌させる。

の様に神経栄養因子を髄腔投与する直接投与するシンプルな方法は、これまでにも複数のALS臨床研究で同様に行われてきたが、頻回の髄腔内投与による患者負担、費用面でのデメリットも大きく、有効な治療濃度が神経周囲微小環境で得られているかという問題点も存在した。このため本研究では予め複数の戦略を平行して検討する。神経細胞の近傍に存在するグリア細胞のFUSの発現抑制によってプレオトロピンの分泌を賦活する。まず、変異SOD1家族性ALSモデルマウスを用いGFAPプロモーター下にFUSに対するshRNAを発現するAAVを髄腔内にそれぞれ単回投与する。治療効果判定は生存率及び運動機能検査等にて行う。また、コホート群と別に投与後2週間後、4週間後、8週間後に予定数解剖し病理学的な経時変化からプレオトロピン発現量、治療効果、および副作用を詳細に検討する。

4. 研究成果

まず十分量のプレオトロピンを変性神経細胞周囲に供給させる方法としてリコンビナント-プレオトロピンの補充(定期的髄腔内投与)を検証した。まずリコンビナント-プレオトロピンの髄腔内/脳室内投与が技術的に可能であることを検証するために、GFPを発現可能なAAVを投与し各組織への分布を確認した。またリコンビナント-プレオトロピン製剤投与に際し副作用の出現を確認するため、野生型マウスに投与後、血液検査や各種臓器の病理学的検討も行き、特筆すべき副作用が見られないことを確認した。

複数のALS/FTLDマウスモデル(FUS conditional knockout(CKO)マウスモデル、変異SOD1家族性ALSモデルマウスおよびTDP-43 CKOマウスモデル、TDP-43 BAC Tgマウスモデル)を用意した。投与回数、用量の妥当性の検討を行ったのち変異SOD1家族性ALSモデルマウスを用い投与を開始した。この結果に基づき変異SOD1マウスへのリコンビナント-プレオトロピン髄腔内投与を施行し、生存率、運動機能の変化を確認した。

またAAV投与によるグリア細胞の賦活による神経保護効果の検証()を行うためのウイルス作成を問題なく行った。モデルマウスに投与し、有用性確認および経時的な病理学的検討を施行した。ウイルス投与により、近傍のグリア細胞においてFUSのノックダウンおよびプレオトロピンの発現上昇を認めた。さらに、コントロールAAVと比較し神経細胞脱落が軽度であることから一部神経保護効果を病理学的に確認した。運動機能の改善効果は有意差を認めなかったが改善の傾向を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Satoshi Yokoi, Takuji Ito, Kentaro Sahashi, Masahiro Nakatochi, Ryoichi Nakamura, Genki Tohnai, Yusuke Fujioka, Shinsuke Ishigaki, Tsuyoshi Udagawa, Yuishin Izumi, Mitsuya Morita, Osamu Kano, Masaya Oda, Takefumi Sone, Hideyuki Okano, Naoki Atsuta, Masahisa Katsuno, Yohei Okada, Gen Sobue | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 The SYNGAP1 3'UTR Variant in ALS Patients Causes Aberrant SYNGAP1 Splicing and Dendritic Spine Loss by Recruiting HNRNPK | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J Neurosci | 6. 最初と最後の頁 8881-8896 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0455-22.2022 | 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 Riku Yuichi, Iwasaki Yasushi, Ishigaki Shinsuke, Akagi Akio, Hasegawa Masato, Nishioka Kenya, Li Yuanzhe, Riku Miho, Ikeuchi Takeshi, Fujioka Yusuke, Miyahara Hiroaki, Sone Jun, Hattori Nobutaka, Yoshida Mari, Katsuno Masahisa, Sobue Gen | 4. 巻 145 |
| 2. 論文標題 Motor neuron TDP-43 proteinopathy in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Brain | 6. 最初と最後の頁 2769-2784 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awac091 | 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 Riku Yuichi, Iwasaki Yasushi, Ishigaki Shinsuke, Akagi Akio, Hasegawa Masato, Nishioka Kenya, Li Yuanzhe, Riku Miho, Ikeuchi Takeshi, Fujioka Yusuke, Miyahara Hiroaki, Sone Jun, Hattori Nobutaka, Yoshida Mari, Katsuno Masahisa, Sobue Gen | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Motor neuron TDP-43 proteinopathy in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Brain | 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/brain/awac091 | 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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Fujioka Y, Ishigaki S, Kawai K, Takashima A, Katsuno M, Sobue G. |
| 2. 発表標題 Tau regulates reward-system which is responsible for eating behavior pattern |
| 3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤岡 祐介、河合 香里、祖父江 元、石垣 診祐 |
| 2. 発表標題 ストレスによる報酬系異常は「ガラガラ食べ」の原因となる |
| 3. 学会等名 第16回 日本臨床ストレス応答学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yusuke Fujioka, Kaori Kawai, Masahisa Katsuno, Akihiko Takashima, Gen Sobue, Shinsuke Ishigaki |
| 2. 発表標題 Tau regulates reward-system which is responsible for eating behavior pattern |
| 3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤岡 祐介、河合 香里、勝野雅央、祖父江 元、石垣 診祐 |
| 2. 発表標題 Stress-impaired reward pathway promotes distinct feeding behavior patterns |
| 3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤岡祐介, 河合香里, 遠藤邦幸, 勝野雅央, 渡辺宏久, 石垣診祐, 祖父江元. |
| 2. 発表標題 ストレスは報酬系異常を介して摂食行動パターンを変化させる. |
| 3. 学会等名 第15回日本臨床ストレス応答学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yusuke Fujioka, Kaori Kawai, Kuniyuki Endo, Mianaka Ishibashi, Satoshi Yokoi, Nobuyuki Iwade, Masahisa Katsuno, Hirohisa Watanabe, Shinsuke Ishigaki, Gen Sobue. |
| 2. 発表標題 Tau regulates reward-system which is responsible for eating behavior pattern |
| 3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |