

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590650

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症における内因性アルデヒド産生亢進機構の解明と新規治療薬開発

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism underlying accelerated production of endogenous aldehyde in amyotrophic lateral sclerosis and development of new drug therapy

研究代表者

伊藤 芳久(Ito, Yoshihisa)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：50151551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ALS患者やALSモデルマウスの脳脊髄液において存在する内因性アルデヒド産物である4-hydroxynonenal(HNE)の役割を精査した。HNE付加タンパク質の増加が認められる15週齢のALSモデルマウスへのN-acetyl-L-cysteine投与は生存期間に影響を及ぼさなかった。しかし、N-acetyl-L-cysteine amide(NACA)投与は、生存期間を有意に延長するとともに、運動機能低下を抑制した。以上より、HNEがALSの進行に重要な役割を演じていること、NACAは運動機能障害発症後にも有効なALS新規治療薬となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Higher levels of 4-Hydroxynonenal (HNE) have been shown in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients and mice models of ALS. In this study, we investigated pathophysiological roles of HNE in ALS and protective potentials of N-acetyl-L-cysteine (NAC) and its derivative, NAC-amide (NACA) in a mouse model of ALS (G93A). The levels of HNE-modified proteins in the spinal cord of the G93A were significantly increased at 15 weeks (onset of motor disturbance) and older. Administration of NAC had no effect on disease progression and survival in the G93A. In contrast, administration of NACA slowed disease progression and prolonged survival in these mice. These results suggest that HNE may play a role in the degeneration of motoneurons in the G93A, and that NACA is a promising therapeutic drug for ALS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 運動ニューロン N-acetyl-L-cysteine 4-Hydroxynonenal PGE2

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)は、運動ニューロンの選択的な変性を特徴とする極めて予後不良の疾患で、発症メカニズムも不明のままである。ALS の病因としては、これまでに、酸化ストレス、小胞体ストレス、グルタミン酸などの興奮性アミノ酸の過剰、神経栄養因子欠乏などが提唱されているが、いずれも仮説の域を出ない。申請者は、ALS 患者の脳脊髄液において、高濃度に存在するアルデヒド産物である 4-hydroxynonenal (HNE) に注目し、その神経細胞死誘導作用について詳細に検討を行ってきた。その結果、HNE の神経毒性発現には細胞内グルタチオン (GSH) の枯渇と HNE 付加タンパク質の増加が重要な役割を演じており、これらが原因となってミトコンドリア障害が誘導されることを見いだしている。また、ALS の病態モデルである変異 superoxide dismutase 1 (G93A-SOD1) を過剰発現させたトランスジェニックマウス (G93A マウス) において、細胞内の Cu^{2+} の不均衡により生じる酸化ストレスが発症に関与することや運動機能障害の発症に先だって HNE 付加タンパク質が脊髄で増加することも見いだしている。さらに、細胞内の主要な抗酸化物質であるグルタチオンの前駆物質である N-acetyl-L-cysteine (NAC) が HNE 付加タンパク質の発現を抑制することで細胞死抑制効果を示すことや NAC と抗酸化作用を有する ebselen と併用することで強い細胞死保護効果が発現することを見いだすとともに、このような HNE 誘発細胞死に対する細胞保護効果はトコフェロールの様な脂溶性抗酸化物質では認められないことも示した。また、この NAC が ALS モデルマウスに及ぼす影響については、経口投与により生存率を延長することが知られているものの、その効果は唯一の治療薬として認可されている riluzole が持つ延命効果には及ばないことが報告されており、申請者らも同様な結果を得ている。申請者の研究グループでは、これまでも、 Cu^{2+} のキレート剤である D-ペニシラミンやトリエンチンが ALS に対して有効であるという報告をもとに、中枢移行性や細胞移行性 (細胞外だけでなく細胞内の Cu^{2+} もキレートする) を改善した薬物である tetrathiomolybdate (TTM) が、既存のキレート剤や riluzole よりも顕著に生存期間を延長させることを報告している。このように、*in vitro* モデルでは細胞保護効果を示す NAC が *in vivo* モデルでは顕著な影響を及ぼさない原因として、NAC が生体内で代謝されやすいことや脳・脊髄への移行性が良好ではないことが原因の 1 つとして考えられる。そのため、NAC の安定性や中枢移行性を改善すれば、ALS に対してより有効なものではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)は、運動ニューロンの選択的な変性を特徴とする極めて予後不良の疾患で、発症メカニズムも不明のままである。ALS 患者の脳脊髄液中では、健常者と比較して膜脂質過酸化により生じるアルデヒド産物 HNE のレベルが高いことが報告されている。申請者は、この HNE 誘発神経細胞死のメカニズムの一部を明らかにするとともに、NAC が神経細胞死抑制作用を持つことを見だしている。そこで、本研究では、中枢移行性や細胞移行性のよい NAC 誘導体を合成して ALS モデルマウスにおける運動機能障害や生存期間等に及ぼす影響について検討するとともに、ALS の発症や病態の進行における HNE の役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

野生型マウス (WT) と G93A マウスは、Jackson Laboratory より購入し、日本大学薬学部実験動物センターで飼育、繁殖し、実験に供した。飼育条件は、温度 23 ± 1 、湿度 $50\pm 10\%$ 、明暗サイクルを 12 時間毎とし、水、餌は自由に摂取できるようにした。全ての動物実験は、日本大学動物実験運営内規に基づいて行った。

(2) 運動機能の測定

Rotarod 法を用いて評価した。回転数は毎分 24 回とし、カットオフを 60 秒とし、5 回測定した平均値を示した。

(3) タンパク質発現解析

Western Blot 法

ペントバルビタール (100 mg/kg, i.p.) 投与による深麻酔下の 9 ~ 19 週齢のマウスから腰髄を取り出して、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer [150 mM NaCl, 1% NonidetP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% TritonX-100, 5mM EDTA] 中に回収し、Handy sonic (TOMY SEIKO) でホモジナイズし、15 分間遠心した上清を抽出液とした。タンパク定量は、Bovine serum albumin (BSA) を標準として Bradford らの方法によって行い、一定の濃度になるように 4×Sample buffer [125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.04% bromophenol blue] および RIPA buffer にて 5 分間煮沸したものを sample とした。5 ~ 15% の polyacrylamide gel を用いて電気泳動した。泳動後、ImmobilonTM-P Transfer Membrane (Millipore) に転写し、blocking buffer [5% skim milk in Tween Tris buffered saline (TTBS) [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.05%

Tween20]中に浸し、攪拌しながら室温で1時間ブロッキングした。ブロッキング終了後、TTBSで洗浄し、各種の一次抗体と4で一晚反応させた。TTBSで洗浄後、HRPで標識された二次抗体を室温で攪拌しながら1時間反応させ、洗浄後にECLまたはECL plusにより発光させた。内部標準としてβ-actinを用いた。

免疫組織化学染色法（蛍光抗体法）

0.1 M Phosphate buffer、4.5 % sucrose を含む4 % PFA で30分固定し、PBSで洗浄した後、0.4 % Triton-X-100 を含むPBSを用い4で一晚反応させた。その後2 % 正常ヤギ血清を含むPBST (PBS + 0.1 % TritonX-100) を用い室温で1時間ブロッキングし、各種の一次抗体を4で24~72時間反応させた。一次抗体処置終了後、PBSTで洗浄し、蛍光標識された二次抗体を4で一晚反応させた。その後、PBSTで洗浄した後、カバーガラスに移し、共焦点レーザー顕微鏡 (CarlZeiss, LSM-510) を用いて観察を行った。

(4) 細胞培養

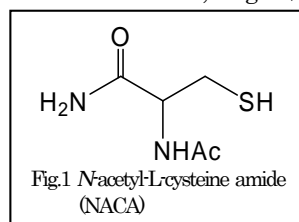
NSC34細胞は、Cashman NR (McGill University, Canada) より入手した。NSC34細胞は、10% FBS、penicillin (100 units/mL)、streptomycin (100 μg/mL) を含むDMEMで37、5% CO₂、加湿条件下で継代培養した。また、HT22細胞は、10%FBS、penicillin (200 units/mL)、streptomycin (200 mg/mL)を含むDMEMで、37、10% CO₂条件下で培養した。

(5) 細胞生存の評価

細胞の生死の評価には、Shubertらの方法に従ったMTT法を用いた。薬物処理終了後、MTT (250 μg/mL) を添加し、37、3時間インキュベートした後、SDS溶解液 (50 % dimethylformamide、20 % SDS、pH 4.7) を加えた。室温で一晩静置した後、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD) により吸光度 (吸光極大 570 nm、Reference 640 nm) を測定した。

4. 研究成果

はじめに、アミド基を導入し中枢移行性を増加したNAC (NAC amide; NACA, Fig. 1) やミトコンドリア指向型NAC (mito-NAC)をはじめ12種類の化合物を合成し、マウス海馬神経細胞由来のHT22細胞を用いて、スクリーニングを行った。その結果、HNE誘発神経細胞死に対して、NAC以上の保護効果を持つ化合物は認められなかったが、NACAがNACと同程度の細胞死抑制効果を持つことが明らかにな

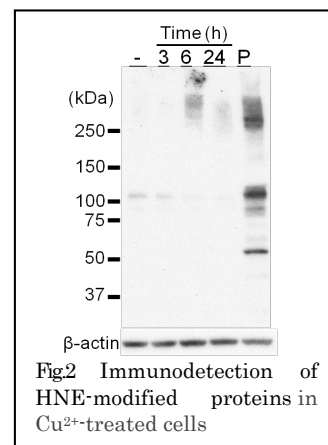


った。そこで、G93Aマウスを用い、NAC及びNACAの有効性について、運動機能についてはRota-rod法、運動ニューロンの減少については組織化学法、生存期間に及ぼす影響についてはKaplan-Meier法により検証を行った。ALS発症後(15週齢)からのNAC投与は、G93Aマウスの生存期間や運動機能の低下に影響を及ぼさなかったが、NACA投与は、G93Aマウスの生存期間を平均10日延長した。また、NACA投与は、G93Aマウスの運動機能の低下を抑制するとともに、Caspase-3の活性化を中心とするアポトーシスの亢進を顕著に抑制した。以上の結果より、HNEがALSの進行に重要な役割を演じていることが示唆された。また、化学修飾により体内動態を改良したNACAは運動機能障害発症後にも有効なALS新規治療薬となる可能性が示された。

また、G93Aの腰髄においてHNE付加タンパク質が蓄積され易い細胞や細胞内小器官について検討を行った。その結果、G93Aでは、特定の細胞種において発現増加するような傾向は認められなかった。同様に、G93Aの腰髄組織から調整した各細胞内小器官分画を解析したところ、ミトコンドリア分画および小胞体分画の発現量は増加する傾向を示した。さらに、NACAがG93Aの腰髄で認められるHNE付加タンパク質増加に及ぼす影響について検討したところ、NACAの投与によりHNE付加タンパク質の発現は顕著に抑制された。

次に、細胞内Cu不均衡とHNE付加タンパク質の発現増加の関係について検討を行った。HT22細胞および運動ニューロン様株化細胞NSC-34にCu²⁺を24時間処置したところ、Cu²⁺の濃度依存的な細胞死が誘発された。NACは、NSC-34細胞におけるHNE誘発細胞死に対しても抑制作用を示したが、Cu²⁺誘発細胞死に対しては顕著な抑制効果を示さなかった。興味深いことに、高濃度のNAC

やNACA処置はCu²⁺誘発細胞死を増強することも明らかとなった。さらに、Cu²⁺誘発細胞死におけるHNE付加タンパク質の発現変化をWestern Blot法により検討したが、Cu²⁺の24時間処

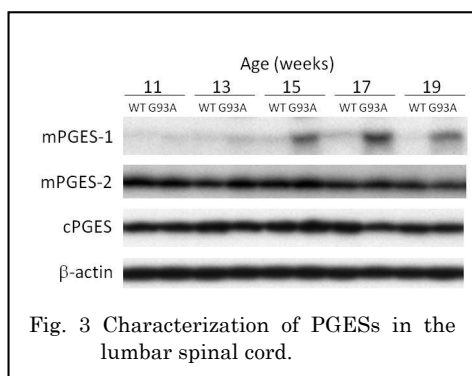


置では、その発現レベルに顕著な変化は認められなかった(Fig. 2)。以上より、Cu²⁺の急性毒性発現には、HNE付加タンパク質の発現増加は関与しないことが示唆された。

最後に、HNEにより発現が制御されるタ

ンパク質の発現変化についても検討した。近年、誘導型の prostaglandin E2 (PGE2)合成酵素である microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1)が、HNE により発現誘導されることが報告されている。Fig. 3 に示したように、G93A マウスでは、WT マウスとは異なり、mPGES-1 の発現が増加した。

この発現レベルの増加は、HNE 付加タンパク質が増加する 15 週齢で有意なものとなった。一方、構成型の PGE2 合成酵素である mPGES-2 や cytosolic PGES の発現には変化が認められなかった。



そこで、mPGES-1 の発現分布について免疫組織学的手法を用いて検討を行った。興味深いことに、G93A マウスの運動ニューロン内における mPGES-1 の発現は、運動機能の低下、運動ニューロンの減少、HNE 付加タンパク質の発現上昇に先立ち、著しく上昇することが明らかとなった。これらの結果から、この運動ニューロン内で mPGES-1 により産生される PGE2 が神経変性や運動機能障害の誘導に関与する可能性が示唆された。このように、G93A マウスでは、HNE の上昇時期と一致しない mPGES-1 の発現増加が生じており、HNE に依存しない PGE2 産生増加機構の関与や PGE2 の増加が HNE の産生を促進する可能性が示唆された。そこで、運動ニューロン由来細胞 NSC-34 を用いて、PGE2 が運動ニューロンに及ぼす影響を検討した。その結果、NSC-34 では、PGE2 の曝露は EP2 受容体の活性化を介して細胞死を誘発することが明らかとなった。以上のように、mPGES-1 による PGE2 増加が EP2 受容体の活性化を介して細胞死を誘発することが明らかとなった。しかし HNE 誘発細胞死や HNE の産生増大に及ぼす可能性関連性については、今後、詳細な検証が必要である。

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 5 件)

1. Kusama-Eguchi K, Miyano T, Yamamoto M, Suda A, Ito Y, Ishige K, Ishii M, Ogawa Y, Watanabe K, Ikegami F, Kusama T.
New insights into the mechanism of

neurolathyrism: L-β-ODAP triggers [Ca²⁺]_i accumulation and cell death in primary motor neurons through transient receptor potential channels and metabotropic glutamate receptors. *Food Chem Toxicol.* 67:113-122, 2014 (査読有り)

2. Osada N, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y. Mithramycin, an Agent for Developing New Therapeutic Drugs for Neurodegenerative Diseases. *J Pharmacol Sci.* 122:251-256, 2013 (査読有り)
3. Miyagishi H, Kosuge Y, Yoneoka Y, Ozone M, Endo M, Osada N, Ishige K, Kusama-Eguchi K, Ito Y. Prostaglandin E2-induced cell death is mediated by activation of EP2 receptors in motor neuron-like NSC-34 cells. *J Pharmacol Sci.* 121:347-350, 2013 (査読有り)
4. Miyagishi H, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y. Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the spinal cord in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Sci.* 118:225-236, 2012 (査読有り)
5. Kasai A, Kinjo T, Ishihara R, Sakai I, Ishimaru Y, Yoshioka Y, Yamamuro A, Ishige K, Ito Y, Maeda S. Apelin deficiency accelerates the progression of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* 6:e23968, 2011 (査読有り)

[学会発表](計 12 件)

1. 小菅康弘、宮岸寛子、齋藤弘明、石毛久美子、宮入伸一、伊藤芳久
N-acetyl-L-cysteine を基点とした新規筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 治療薬の開発
第 15 回応用薬理シンポジウム
2013 年 9 月 28 日 東京
2. 小菅康弘、米岡祐貴、米田景子、西山賢太、宮岸寛子、石毛久美子、伊藤芳久
筋萎縮性側索硬化症モデルマウス運動ニューロンにおける PGE2 受容体の発現変化
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013
2013 年 8 月 31 日 熊本
3. 米田景子、小菅康弘、米岡祐貴、宮岸寛子、

- 石毛久美子、**伊藤芳久**
PGE2 受容体の発現上昇は筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける運動ニューロン死に關与する
第 128 回日本薬理学会関東部会
2013 年 7 月 14 日 東京
4. 小菅康弘、宮岸寛子、長田暢宏、石毛久美子、**伊藤芳久**
運動ニューロン様株化細胞 NSC-34 における Prostaglandin E2 誘発細胞死には EP2 受容体の活性化が關与する
第 86 回日本薬理学会年会
2013 年 03 月 21 日 福岡
5. **伊藤芳久**、小菅康弘、石毛久美子
脳梗塞および筋萎縮性側索硬化症における小胞体ストレス誘導性転写因子 CHOP を標的とした新規治療薬の可能性
生体機能と創薬シンポジウム 2012
2012 年 08 月 30 日 神戸
6. 遠藤愛美、宮岸寛子、小菅康弘、石毛久美子、**伊藤芳久**
筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウスにおける prostaglandin E2 増大機構
第 126 回日本薬理学会関東部会
2012 年 07 月 14 日 東京
7. 小菅康弘、宮岸寛子、小曾根麻衣子、米岡祐貴、石毛久美子、**伊藤芳久**
運動ニューロン様株化細胞 NSC-34 におけるプロスタグランジン E2 受容体の同定
日本薬学会第 132 年会
2012 年 3 月 29 日 札幌
8. **伊藤芳久**、小菅康弘、宮岸寛子、小野真一、鈴木孝、石毛久美子
膜脂質由来毒性アルデヒド 4-hydroxynonenal を標的とした ALS の病態解明と新規治療薬探索
第 85 回日本薬理学会年会
2012 年 3 月 16 日 京都
9. 宮岸寛子、小菅康弘、長田暢弘、石毛久美子、**伊藤芳久**
筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける microsomal prostaglandin E synthase-1 の発現とその分布
第 85 回日本薬理学会年会
2012 年 3 月 16 日 京都
10. 米岡祐貴、宮岸寛子、長田暢弘、小菅康弘、石毛久美子、**伊藤芳久**
筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウスの運動ニューロンにおける PGE2 受容体の発現解析
第 125 回日本薬理学会関東部会
2011 年 10 月 15 日 船橋
11. 宮岸寛子、小菅康弘、齋藤弘明、石毛久美子、宮入伸一、**伊藤芳久**
内因性アルデヒド 4-hydroxynonenal を標的とした筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 治療薬開発の可能性
第 125 回日本薬理学会関東部会
2011 年 10 月 15 日 船橋
12. 米岡祐貴、宮岸寛子、小菅康弘、石毛久美子、**伊藤芳久**
筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける PGE2 受容体の発現変化
第 13 回応用薬理シンポジウム
2011 年 9 月 4 日 船橋
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/pharmacol.html/>
6. 研究組織
(1)研究代表者
伊藤 芳久 (Ito Yoshihisa)
日本大学・薬学部・教授
研究者番号：50151551