

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591244

研究課題名(和文)抗GM-CSF抗体投与によるALS治療の試み

研究課題名(英文)Treatment of animal model of ALS with anti GM-CSF antibody

研究代表者

奥野 龍禎 (Okuno, Tatsusada)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00464248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：GM-CSFはALSモデルマウスの脊髄で著増し、炎症性ミクログリア(M1)活性化と神経変性増悪に寄与していると推定されたため、GM-CSFシグナルを阻害するJAK2阻害剤(R723)を投与した。JAK2阻害剤は炎症性モノサイトや脊髄のインターフェロンガンマ及びiNOSの発現を減少させたが、マウスの症状改善には至らなかった。原因としてJAK2阻害剤がM1だけでなくM2も抑制したこと、ALSマウスの炎症機転を増悪させるTNF、NOX2、IL-1が抑制できていないことなどが考えられた。ALSの炎症機転を制御し神経変性を改善するにはM1を抑制するとともにM2の活性を促すことが重要と推定された。

研究成果の概要(英文)：To inhibit GM-CSF-mediated M1 activation in ALS model mice (G93A mSOD1 mice), we used JAK2 inhibitor(R723). Orally administered JAK2 inhibitor significantly reduced the number of inflammatory monocytes, as well as the expression level of IFN-gamma and iNOS in the spinal cord tissue of ALS model mice. However, disease progression and survival of mSOD1G93A were not altered by administration of R723. The expression levels of IL-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF), and NADPH oxidase 2 (NOX2) were not altered by R723 treatment. Furthermore, R723 suppressed the expression of Retnla, a marker of neuroprotective M2 microglia. In conclusion, oral administration of JAK2 inhibitor was not effective against ALS symptoms in mSOD1G93A mice, although it suppressed production of several inflammatory molecules. Coincidental suppression of M2 microglia and failure to inhibit critical inflammatory molecules might have contributed to this result.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 神経内科

キーワード：ALS GM-CSF M1/M2 ミクログリア 炎症

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は主に中年以降に発症し、大脳皮質と脊髄前角の運動ニューロンが不可逆進行性に障害される致死性疾患である。患者には、進行性の全身骨格筋萎縮と脱力が出現し、呼吸筋麻痺により通常発症後約 2-4 年で人工呼吸器なしでは生存できなくなる。ALS 発症の原因として興奮性アミノ酸説、ミトコンドリア機能異常説、酸化ストレス説、自己免疫反応説などが想定されているが、未だその詳細は不明である。現在日本国内では、グルタミン酸受容体拮抗薬のリルゾールが ALS 治療に臨床応用されているが、患者の予後及び QOL を著明に改善させるには至っておらず、新しい治療法の開発が切望されている。

マクロファージ (M) は自然免疫反応の一部を担う細胞で、生体内に侵入した細菌や死細胞を消化し抗原提示を行う。また、周囲に存在するサイトカイン等の刺激を受け、M1 タイプか M2 タイプのいずれかの活性化マクロファージへと分化することが知られている。インターフェロン (IFN-g)、リポポリサッカライド (LPS) と顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) により分化する M1 タイプと、IL-4、IL-13 による M2 タイプである (Nat Rev Immunol 2008,8:958-969, Immunity 2010, 32:593-604.)。M1M は炎症性サイトカイン、活性酸素、一酸化窒素 (NO) を産生し、炎症促進作用と組織障害性を持つ一方、M2M は炎症沈静と組織修復に働く。中枢神経系に固有の組織マクロファージであるミクログリア (MG) にも同様に 2 種類の活性化が存在することが判明しており、M1 MG は神経障害性に、M2 MG は神経保護的に働くことが徐々に明らかになっている (Journal of Neuroimmune Pharmacology 2009, 4:389-398.) 実際に我々の先行研究でも、MG を IFN- と CD40 刺激抗体あるいは Sema4D で刺激すると iNOS を高発現する M1 タイプに、

分化し、運動ニューロン障害性を持つようになることが判明している (Journal of Neurochemistry, 2004, 91, 404-412. Journal of Neuroscience Research, 2005, 81:874-882. The Journal of Immunology, 2010, 184: 1499-1506.)。その一方で、最近 ALS モデルマウスの成熟リンパ球を欠損させることにより、病初期に M2MG が増加し麻痺症状の発症が遅延することを見出し、M1/M2 バランスの制御により ALS の改善をもたらされる可能性が明らかになった。さらに興味深いことに、これらの研究の過程で ALS モデルマウスの麻痺症状進行に伴い、GM-CSF の脊髄内での発現が著増しているという重要な知見を得た。つまり、GM-CSF の増加による M1MG の過度の活性化が運動ニューロン障害を促進し、ALS の進行を加速させている可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、GM-CSF を阻害することで M1 ミクログリアへの分化を抑制し、致死性疾患 ALS の治療を試みることを目的としている。

3. 研究の方法

多発性硬化症のモデル動物である実験的脳脊髄炎マウス (EAE マウス) を用いた実験系では、M1 ミクログリアの活性化を阻害する薬剤を投与することにより、EAE マウスの臨床症状が改善することが示されている (Neuroscience Research 59 (2007) 457-466)。また、ex vivo においてマクロファージを M2 タイプに活性化させて EAE マウスに移入することにより、炎症の抑制と障害神経の修復が起こることがすでに示されている (Mult Scler. 2010 Sep 2. Mikita et.al.)。神経変性疾患である ALS においても、同様に M1/M2 バランスを M2 タイプにシフトさせることにより神経変性が抑制可能か明らかにするた

め、ALS モデルマウスに対して、GM-CSF の下流のシグナルを阻害する JAK2 阻害剤 R723 を投与し、対照マウスと発症時期、寿命及び罹病期間を比較する。これらのマウスの麻痺症状の評価は、臨床症状、金網落下試験及び体重測定により行う。更に運動ニューロン障害の客観的評価のために、脊髄及び前根の組織標本を作成し、Nissl 染色及びトイジンブルー染色を行い、それぞれ運動ニューロン数及び軸索数の計測を行う。実際にミクログリアの M1 活性化が抑制され、M2 活性化が起こっているかどうかは、脊髄組織の免疫染色、ウエスタンブロット、及び半定量的 PCR を行い、抗体投与群とコントロール群で、M1 関連分子 (iNOS, TNF- α , IL-1 β) 及び M2 関連分子 (Ym1, Fizz1, Arginase-1,) の発現を検討することによって行う。

4 . 研究成果

JAK2 阻害剤は予測通り炎症性モノサイトや脊髄のインターフェロンガンマ及び iNOS の発現を減少させたが、マウスの症状改善には至らなかった。原因として JAK2 阻害剤が M1 だけでなく M2 も抑制したこと、ALS マウスの炎症機転を増悪させる TNF、NOX2、IL-1 β が抑制できていないことなどが考えられた。ALS の炎症機転を制御し神経変性を改善するには M1 を抑制するとともに M2 の活性を促すことが重要と推定された。自然免疫系の過剰な活性化を抑制することや制御性 T 細胞の誘導が今後重要になってくると思われる。

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 10 件)

1. Koda T, Okuno T, Takata K, Honorat JA, Kinoshita M, Tada S, Moriya M, Sakoda S, Mochizuki H, Kumanogoh A, Nakatsuji Y. Sema4A inhibits the therapeutic effect of IFN- β in EAE. **J Neuroimmunol**.2014:

5728(14)00002-2

2. Nakatsuji Y, Okuno T, Koda T, Takata K, Honorat JA, Mochizuki H, Kumanogoh A. Roles of Sema4A in Multiple Sclerosis and IFN- β Therapy Efficacy. **Clinical Experimental Neuroimmunology** 2013, 4: 274-282.

3. Mori Y, Murakami M, Arima Y, Zhu D, Terayama Y, Komai Y, Nakatsuji Y, Kamimura D, Yoshioka Y. Early pathological alterations of lower lumbar cords detected by ultrahigh-field MRI in a mouse multiple sclerosis model. *Int Immunol*. 2014 Feb;26(2):93-101

4. Nojima, S., Toyofuku, T., Kamao, H., Ishigami, C., Kaneko, J., Okuno, T., Takamatsu, H., Ito, D., Kang, S., Kimura, T., Yoshida, Y., Morimoto, K., Maeda, Y., Ogata, A., Ikawa, M., Morii, E., Aozasa, K., Takagi, J., Takahashi, M. & Kumanogoh, A. A point mutation in Semaphorin 4A associates with defective endosomal sorting and causes retinal degeneration. **Nature communications** 4, 1406 2013.

5. Murakami M, Harada M, Kamimura D, Ogura H, Okuyama Y, Kumai N, Okuyama A, Singh R, Jiang JJ, Atsumi T, Shiraya S, Nakatsuji Y, Kinoshita M, Kohsaka H, Nishida M, Sakoda S, Miyasaka N, Yamauchi-Takahara K, Hirano T. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. **Cell Rep**. 2013 Mar 28;3(3):946-59

6. Honorat JA, Kinoshita M, Okuno T, Takata K, Koda T, Mochizuki H, Nakatsuji Y.

Xanthine oxidase mediates axonal and myelin loss in a murine model of multiple sclerosis.

PLoS One 8(8): e71329, 2013

7. Tada S, Yasui T, Nakatsuji Y, Okuno T, Koda T, Mochizuki H, Sakoda S, Kikutani H. BAFF controls neural cell survival through BAFF receptor **PLoS One** 8(7):e70924, 2013

8. Nakatsuji Y, Okuno T, Moriya M, Sugimoto T, Kinoshita M, Takamatsu H, i Nojima S, Kimura T, Kang S, Ito D, Nakagawa Y, Toyofuku T, Takata K, Nakano M, Kubo M, Suzuki S, Matsui-Hasumi A, Uto-Konomi A, Ogata A, Mochizuki H, Sakoda S, Kumanogoh A. Elevation of Sema4A implicates Th cell skewing and the efficacy of IFN- β therapy in multiple sclerosis. **Journal of Immunology** 188: 4858-65, 2012

9. Okuno T, Nakatsuji Y, Kumanogoh A The role of immune semaphorins in multiple sclerosis. **FEBS Letter** 585:3829-35, 2011

10. Muramatsu R, , Kubo T, Mori M, Nakamura Y, Fujita Y, Akutsu T, Okuno T, Taniguchi J, Kumanogoh A, Yoshida M, Mochizuki H, , Kuwabara S, Yamashita T. RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. **Nature Medicine** 17:488-94, 2011

〔学会発表〕(計2件)

2013.9.21-26 Tada S, Yasui T, Nakatsuji Y, Okuno T, Mochizuki H, Sakoda S, Kikutani H. BAFF controls neural cell survival through BAFF receptor. XXI WORLD CONGRESS OF NEUROLOGY Vienna, Austria

2013.5.29-6.1 第54回日本神経学会学術大会
ポスター 多田智、安居輝人、奥野龍禎、中辻裕司、酒井芳紀、宮川繁、澤芳樹、菊谷仁、佐古田三郎、望月秀樹。プロスタグランジン I2 アゴニストである ONO-1301 は ALS モデル動物の神経変性を抑制する 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0名称):
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

本研究も含め大阪大学神経内科の神経免疫グループの業績は
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/neurology/myweb6/group03.html>
にて公開している。

6. 研究組織
(1)研究代表者
奥野龍禎(大阪大学医学系研究科 助教)

研究者番号: 00464248

(2)研究分担者
中辻裕司(大阪大学医学系研究科 講師)

研究者番号: 20332744

(3)連携研究者
多田智(大阪大学医学系研究科)

研究者番号: 70626530