

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500420

研究課題名(和文) プリン非類似体キサンチン酸化還元酵素阻害剤による筋萎縮性側索硬化症治療

研究課題名(英文) Amyotrophic lateral sclerosis therapy with non-purine analog xanthine oxidoreductase inhibitors

研究代表者

加藤 信介 (Kato, Shinsuke)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：60194817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：当該研究の目的は、現在尚、有効な治療法のない神経難病の象徴である筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する新規治療薬の開発への道を開くことである。当該基盤研究では、ALSモデル動物に、プリン非類似体キサンチン酸化還元酵素(XOR)阻害剤を経口投与することにより症候学的、病理組織学的にALSに対する有効性が得られた。重大な副作用は症候学的にも、病理組織学的にも確認されなかった。当該基盤研究の成果は、プリン非類似体キサンチン酸化還元酵素(XOR)阻害剤がALS新規治療薬としての臨床研究への道につながる第一歩となった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop the new therapeutic drug for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) that is one of the intractable diseases in which there is not an effective therapy now. Non-purine analog xanthine oxidoreductase (XOR) inhibitors as the newly-developed therapeutic drug for ALS were administered orally into the ALS model mice. The results of this study were as follows: the treated ALS mice were significantly survived, and significantly improved ALS symptoms in comparison with the untreated ALS mice. Histopathologically, the treated ALS mice were well-preserved in motor neurons, compared with the untreated ALS mice. These results show that the non-purine analog XOR inhibitors are candidates for the human ALS therapeutic drug.

研究分野：神経病理学

キーワード：神経変性疾患 筋萎縮性側索硬化症 経口治療薬 キサンチン酸化還元酵素 キサンチン酸化還元酵素阻害剤 プリン非類似体

1. 研究開始当初の背景

1993年一部の家族性筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) の原因遺伝子がスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) であることが同定され、そのヒト変異 SOD1 遺伝子をマウスに導入することによる ALS モデルマウスが 1994 年に開発された。しかし、そこから 20 年経過した現在において、ALS 治療薬はリルゾール (グルタミン酸受容体拮抗薬) のみである。かかる実状において、プリン非類似体 XOR 阻害剤を経口投与したところ、全く意外にも、ALS モデルマウスにおいて顕著に優れた ALS 治療作用を示すことを見出した。この事実は国内・国外において画期的な新発見と言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経難病の象徴である ALS に対するプリン非類似体キサンチン酸化還元酵素 (xanthine oxidoreductase, XOR) 阻害剤による新規治療薬の開発である。ALS の新規治療法の開発は、国民の医療および福祉の向上に直接結びつき、期待される社会的貢献度は大きい。プリン非類似体 XOR 阻害剤による ALS の神経変性に対する有効性の分子病理学的機序が明らかになれば、ALS の病因・病態の解明のみならず、新規治療法の開発へ道を開くことになり、その社会的波及効果は極めて大きい。

3. 研究の方法

(1) プリン非類似体 XOR 阻害剤経口投与による G1H-G93A・ALS マウスにおける臨床症状・運動機能の改善と寿命の延長の証明

実験動物には、ALS モデル動物のなかで最も治療抵抗性である G93A 点変異のヒト変異 SOD1 遺伝子を 25 コピー数過剰発現させたトランスジェニックマウス (G1H-G93A・ALS マウス) を使用した。同マウスの 80 日齢より、プリン非類似体 XOR 阻害剤として TEI-6720・Y-700・FYX-051 の構造式の異なる 3 種類の化合物に加えて、アロプリノール (プリン類似体 XOR 阻害剤: 痛風治療薬)、メチルセルロース (プラセボ) を連日経口的に投与した。即ち、実験動物を各化合物投与群の 5 群に分け、各実験群における病悩期間と生存期間を解析した。同時に、ALS の臨床症状を経時的に定量解析した。また、7 日毎に体重測定と 5 種類の運動負荷試験 (伸展反射・傾斜面角度・フットプリント・ロタロッド・ビームバランス) を施行した。

(2) 人道的エンドポイントの G1H-G93A・ALS マウスにおける残存脊髄前角細胞数に関する病理組織学的定量的解析

四肢麻痺の状態を呈する人道的エンドポイントの実験 5 群の G1H-G93A・ALS マウスの脊髄組織として頸髄 2 部位・胸髄 3 部位・腰髄 2 部位の合計 7 カ所の脊髄前角運動神経細胞領域 (Rexed 分類における VII, VIII, IX に相当する領域) を解析した。定量的解析と

して、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色とクリューバー・パレラ (KB) 染色を施し、光学顕微鏡にて脊髄前角運動神経細胞領域全域を撮影し、撮影された画像を画像解析ファイリングソフトウエア (FLVFS-LS Ver. 1.12: オリンパス社、東京、日本) にて解析した。

(3) プリン非類似体 XOR 阻害剤における用量依存性の有無の確認: 臨床応用を見据えて

我々は正常マウスの副作用実験において、当該化合物 (TEI-6720・Y-700・FYX-051) を長期間経口投与しても、副作用を示さない量として 5mg/kg 経口投与というデータを既に得ている (未発表データ)。そこで、当該化合物の G1H-G93A・ALS マウスにおける有効性の用量依存性の有無の確認を行い、それぞれの用量において神経系を含む全身臓器における病理組織学的検討を施行した。臨床応用を考慮した結果として、臨床症候学的にも病理組織学的にも副作用を示さない最適有効量が 5mg/kg であることを再度確認した。

(4) 終末期・病悩後期 (115 日齢) の G1H-G93A・ALS マウスにおける変異 SOD1 凝集封入体に関する病理組織学的定量的解析

終末期及び病悩後期 (115 日齢) における、実験 5 群間におけるすべての G1H-G93A・ALS マウスの脊髄前角領域における変異 SOD1 凝集封入体数を HE 染色と SOD1 免疫組織化学的染色を施行して病理組織学的に定量した。

(5) 当該化合物の G1H-G93A・ALS マウスにおける神経細胞死抑制機序の解明

終末期及び病悩後期 (115 日齢) における残存脊髄前角細胞において、細胞死抑制機序の解明のために免疫組織化学的解析を用いた。

4. 研究成果

(1) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 治療薬として、プリン非類似体 XOR 阻害剤である TEI-6720・Y-700・FYX-051 の構造式の異なる 3 種類の化合物を使用した。同じ XOR 阻害剤であるアロプリノール (プリン類似体 XOR 阻害剤: 痛風治療薬) を加え、4 剤の XOR 阻害剤の溶剤であるメチルセルロースをプラセボとした。上述の 5 種類の化合物を、ALS モデル動物のなかで最も治療抵抗性である G93A 点変異のヒト変異 SOD1 遺伝子を 25 コピー数過剰発現させたトランスジェニックマウス (G1H-G93A マウス) に連日経口的に投与した。各実験群における病悩期間と生存期間を解析し、同時に、ALS の臨床症状を経時的に定量解析した (ステージ (St) 1 = 俊敏性の欠如。St 2 = 一側の後肢不完全麻痺を呈するが前肢は正常。St 3 = 両側後肢高度麻痺を呈するが前肢は正常。St 4 = 前肢不完全麻痺と両側後肢高度麻痺を呈する。St 5 = 高度四肢麻痺・瀕死状態)。結果として、3 種類のプリン非類似体 XOR 阻害剤 (TEI-6720・Y-700・FYX-051) において、プラセボに比較して有意な病悩期間と生存期間の延長を認められた。また、臨床症候学的定量的解析の結果は、プリン非類似体 XOR 阻害剤

3 剤は等しく、プラセボに比較して St1 から St4 の各ステージにおける臨床症状の有意な改善を認めた。しかし、アロプリノール(痛風治療薬) 実験群では、病悩期間・生存期間及び臨床症候学的定量解析の St1 から St5 のすべてのステージにおいて、プラセボと同じであり、無効であった。

ALS 治療薬としてのプリン非類似体 XOR 阻害薬である TEI-6720・Y-700・FYX-051 の構造式の異なる 3 種類の化合物、プリン類似体 XOR 阻害薬であるアロプリノール、プラセボの 5 種類の化合物を使用して、7 日毎の体重変化解析を実施した。プリン非類似体 XOR 阻害薬である TEI-6720・Y-700・FYX-051 投与群では、プリン類似体 XOR 阻害薬であるアロプリノール、プラセボ投与群と比較して有意の体重減少抑制効果が認められた。運動負荷試験(伸張反射・傾斜面角度試験・フットプリント・ロタロッド・ビームバランス)では、プリン非類似体 XOR 阻害薬である TEI-6720・Y-700・FYX-051 投与群では、アロプリノール、プラセボ投与群と比較して運動能力の有意の改善を認めた。

(2) 人道的エンドポイントにおいては、マウス脊髄の残存脊髄前角細胞の比較において、プリン非類似体 XOR 阻害薬である TEI-6720・Y-700・FYX-051 投与群はアロプリノール、プラセボ投与群に比較して、有意の脊髄前角細胞の残存を認めなかった。

(3) G1H-G93A・ALS マウスにおけるこれら治療薬の用量依存性の副作用の発現を検討し、症状のみならず、病理組織学的にも副作用はみられないことが確認された。

(4) 生後 115 日齢における残存脊髄前角細胞数の定量的病理組織学的解析に関しては、プラセボ投与群及びアルプリノール投与群の二群に比べ、プリン型非類似体 XOR 阻害剤投与による治療群において脊髄前角細胞数が有意に残存していた。即ち、生後 115 日齢においては、プリン型非類似体 XOR 阻害剤 TEI-6720 の経口投与は ALS 脊髄前角細胞死を病理組織学的に抑制した。プラセボ投与群とアルプリノール投与群の二群間には有意差を認められなかった。

(5) 免疫組織学的解析では、活性型 caspase 3 と活性型 caspase 9 はプラセボ投与群の G1H-G93A マウスの残存脊髄前角細胞において高頻度に陽性所見が認められた。HE 染色標本において、変性・萎縮状の形態を示すものだけでなく、正常様の神経細胞においても陽性を示した。治療群においては、活性型 caspase 3 と caspase 9 陽性を示す残存脊髄前角細胞は、プラセボ投与群に比べて少なかった。

我々は、ALS の新規経口治療薬として、構造の異なるプリン型非類似体 XOR 阻害剤の 3 剤のいずれにおいても、顕著に優れた ALS 治療作用を示すことを、ALS 動物モデルを用いた実験の結果から示した。しかも、組織学的にはすでに病的所見が出現している 80 日齢

と、実際のヒトの臨床応用を十分に考慮した ALS 症状発症後の経口投与においても、プリン型非類似体 XOR 阻害剤の有効性が証明できた。一方、プリン型 XOR 阻害剤であるアロプリノールには ALS 治療作用を認めなかった。即ち、XOR 阻害作用を有した上で、プリン非類似体が故に、構造が異なるプリンサルベージ回路の基質とならない 3 種類の化合物は ALS 治療薬となり得ることを証明でき、直ちに、臨床応用可能な状態にあることを意味する。

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 4 件)

Kato S, Takikawa M, Ishihara S, Yokoyama A, Kato M.

Pathologic Reappraisal of Wallenberg Syndrome: A Pathologic Distribution Study and Analysis of Literature. *Yonago Acta medica* 57(1): 1-14, 2014. 査読有. PMID: 25067873.

Yokoyama A, Ohno K, Hirano A, Shintaku M, Kato M, Hayashi K, Kato S.

Cerebellar Expression of Copper Chaperone for Superoxide, Cytosolic Cu/Zn-Superoxide Dismutase, 4-Hydroxy-2-Nonenal, Acrolein and Heat Shock Protein 32 in Patients with Menkes Kinky Hair Disease: Immunohistochemical Study. *Yonago Acta medica*, 57(1): 23-35, 2014. 査読有. PMID: 25067875.

Suzuki N, Kato S, Kato M, Warita H, Mizuno H, Kato M, Shimakura N, Akiyama H, Kobayashi Z, Konno H, Aoki M.

FUS/TLS-immunoreactive neuronal and glial cell inclusions increase during in the disease progression of FALS with an R521C FUS/TLS mutation. *J Neuropathol Exp Neurol* 71(9): 779-788, 2012. 査読有. doi: 1097/NEN.0613e318264f164.

Yoshihara D, Fujiwara N, Kato S, Sakiyama H, Eguchi H, Suzuki K:

Alterations in renal iron metabolism caused by a copper/zinc-superoxide dismutase deficiency. *Free Radical Research* 46:750-757, 2012. 査読有. doi: 10.3109/10715762.2012.673223.

[学会発表](計 6 件)

加藤信介、瀧川みき、加藤雅子、草野輝男、西野武士: 非プリン型キサンチン酸化還元酵素阻害剤経口投与による ALS 抑制の病態解明に関する研究. 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、2014 年 6 月 5-7 日、学術

総合センター（東京・千代田区）。

隅寿恵、別宮豪一、加藤信介、伊藤朝子、山寺みさき、藤村晴俊、佐古田三郎、望月秀樹：SOD1 遺伝子変異（C111Y）を有する ALS1 症例の一次運動ニューロンにおける TDP-43 の細胞内局在変化について。第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、2014 年 6 月 5-7 日、学術総合センター（東京・千代田区）。

加藤信介、加藤雅子、草野輝男、西野武士：プリンサルベージ回路の基質とならないキサンチン酸化還元酵素阻害剤の ALS 進行抑制に関する研究。第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会、2013 年 4 月 24-26 日、タワーホール船堀（東京）。

草野輝男、加藤信介、加藤雅子、宮川拓也、西野武士：G1H-G93A 遺伝子導入マウスの呈する筋萎縮性側索硬化症へのキサンチン酸化還元酵素阻害剤の影響。第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、福岡国際会議場（福岡）。

加藤信介、加藤雅子、草野輝男、平野朝雄、西野武士：ALS 治療薬としての非プリン型キサンチン酸化還元酵素阻害剤の検討。第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会、2012 年 6 月 28-30 日、朱鷺メッセ（新潟）。

隅寿恵、別宮豪一、加藤信介、山寺みさき、藤村晴俊、望月秀樹：筋萎縮性側索硬化症の脊髄白質におけるリン酸化 TDP-43 の局在。第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会、2012 年 6 月 28-30 日、朱鷺メッセ（新潟）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 信介 (KATO, Shinsuke)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：60194817

(2) 研究分担者

加藤 雅子 (KATO, Masako)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：80221183

瀧川 みき (TAKIKAWA, Miki)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：80724369

横山 淳史 (YOKOYAMA, Atsushi)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：90529447