

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640036

研究課題名(和文) RNA aptamerを用いた孤発性ALS分子標的治療法開発

研究課題名(英文) Development of targeting therapy for sporadic ALS using RNA aptamers

研究代表者

郭 伸 (Kwak, Shin)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40160981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性ALSの運動ニューロン死には、未編集型GluA2をサブユニットに持つ異常なCa²⁺透過性AMPA受容体の発現が深く関与していることから、Ca²⁺透過性AMPA受容体特異的RNA aptamerを用いてニューロンへのCa²⁺流入を正常化することによる治療法の可能性を探る。RNA aptamerはマウス脳室内持続投与により、脳脊髄ニューロンの過剰なCa²⁺流入を有意に抑えるレベルで安定かつ安全に送達された。

研究成果の概要(英文)：Expression of abnormally calcium-permeable AMPA receptors that have Q/R site-unedited GluA2 subunit in their subunit assembly in the motor neurons is involved in the pathogenesis of sporadic ALS. We explored the possibility of stable RNA aptamers that effectively blocked Ca²⁺-permeable AMPA receptors as a drug for ALS using a mechanistic ALS mouse model. Using a subcutaneously placed mini-pump, the RNA aptamer was continuously infused intracerebroventricularly through an indwelling cannula. The RNA aptamer was safely delivered to brains and spinal cords without extensive degradation and effectively blocked abnormal Ca²⁺ influx into the cortical and spinal cord neurons. AMPA receptor-specific RNA aptamers may be a potential drug for ALS.

研究分野：総合生物

キーワード：脳神経疾患 神経科学 核酸

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は成人発症運動ニューロンでは最も頻度が高く、壮年層を数年の内に死に至らしめる難病であるため有効な治療法の開発は社会的にも強く望まれている。しかしながら、病因に繋がる分子異常が未解明のため ALS の自然経過を有意に改善する治療法は得られていなかった。

ALS の脊髄運動ニューロンでは、グルタミン酸受容体である AMPA 受容体 GluA2 サブユニットのグルタミン・アルギニン (Q/R) 部位の RNA 編集が低下し、この分子変化が ALS 運動ニューロン死に関係していることが解明されてきた。この GluA2 Q/R 部位の RNA 編集は adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) という RNA 編集酵素によって特異的に触媒され、孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンでは ADAR2 の発現が低下している。さらに、ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウス (AR2 マウス) では ALS に特徴的な緩徐進行性の運動ニューロン死が起こり、しかも ALS の病理学的指標である TDP-43 病理も ADAR2 を欠損した運動ニューロンに観察されることから、ADAR2 発現低下に伴う RNA 編集異常が ALS の病因に深く関わっている可能性が高い。このモデルマウスでは Q/R 部位未編集の GluA2 をサブユニットに持つ AMPA 受容体からの過剰な Ca^{2+} 流入を抑えることで運動ニューロン死、TDP-43 病理形成が完全に押さえられることが分かり、 Ca^{2+} 透過性の異常に高い AMPA 受容体をブロックすることが有望な治療戦略になり得ると考えられた。

2. 研究の目的

ALS 運動ニューロンで生じている AMPA 受容体からの過剰な Ca^{2+} 流入をブロックすることによる治療法の可能性を探る。そのため、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体特異的 RNA aptamer を用いる。中枢神経内への送達度、in vivo での安定性、有効局所濃度、マウスへ投与した場合の安全性・有効性を評価する。

3. 研究の方法

研究協力者の米国 Albany 大学化学教室の Li Niu 教授より提供された、正常には発現しない未編集型 GluA2 を含む AMPA 受容体をブロックする RNA aptamer を用いた。マウスへの投与方法を確立した上で、この RNA aptamer のマウス中枢神経ニューロンでの Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体ブロック効果、投与の安全性を解析する。さらに、ALS の分子病態モデル動物であるコンディショナル ADAR2 ノックアウトマウス (AR2) に長期投与し治療効果を判定する。

(1) RNA aptamer の投与方法の確立 : ALS の治療を想定して、長期間の中枢神経への投与のために、ミニ浸透圧ポンプを用いての持続的脳室内投与方法を確立する。その際、RNA aptamer のポンプ内、結合チューブ内など、脳室に入

るまでの安定性、手術法の確立、脳室へ投与した後の中枢神経内分布 (色素、及び 32P 標識 RNA aptamer)、脳脊髄各部位における局所濃度 (32P 標識 RNA aptamer) を検討・測定する。

(2) AMPA 受容体への in vivo 効果 : RNA アプタマーは in vitro 系での作用は確認されているが、生体脳へ投与した場合の効果は検討されていない。AMPA 受容体アンタゴニストとしての作用が in vivo でも得られるか如何かを、マウス皮質ニューロンで観察する。

(3) 長期投与 : ALS の分子病態モデルマウスに 2 週間以上持続投与して、運動ニューロンの変性脱落、TDP-43 の細胞内局在異常に対する抑制効果を形態学的・免疫組織化学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 鮭由来 tRNA を RNA aptamer 溶液に添加することにより、ミニ浸透圧ポンプに充填した RNA が脳室内に達するまでにポンプ内壁や結合チューブ内壁に付着することに依るロスを回避することができた。

(2) 長期間の RNA aptamer 投与のために脳室内カニューラを頭蓋骨に固定し、皮下に埋設したミニ浸透圧ポンプから結合チューブにより投与方法を確立し、数週間の持続投与が可能になった。ポンプを用量固定型から充填型に換えることによりポンプ内での RNA の安定性にかかわらず、長期間の持続投与が可能になった。

(3) 確立した投与方法により脳室に投与した RNA アプタマーは 2 日以内に腰髄まで到達することが明らかになり、頸髄レベルまでは大脳と比較しても遜色のない局所濃度が得られることが明らかになった。また、3 日以上投与においても脳脊髄液中で RNA アプタマーは安定であった。

(4) in vivo での AMPA 受容体アンタゴニスト作用をカルシウム色素を発現した大脳皮質ニューロンで確認した。100nM 以下の局所濃度で効果がみられた。

(5) 同様の方法で AR2 マウスに長期投与を行っている。

(6) 脳室内に投与した RNA aptamer は生物学的反応性が低く、標的への特異性が高いことから、標的を絞った機能分子の調節に適しており、臨床応用へのハードルも低い。Niu 教授の開発した、未編集型 GluA2 を標的とした RNA aptamer は、未編集型 GluA2 の発現が病的意義を持つ孤発性 ALS の新たな治療法として極めて有望である。

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 7件)

Aizawa H, Hideyama T, Yamashita T, Kimura T, Suzuki N, Aoki M, Kwak S: Deficient RNA-editing enzyme ADAR2 in an amyotrophic lateral sclerosis patient with a FUSP525L mutation. 査読有, *J Clin Neurosci in press*. Yamashita T, Teramoto S, Kwak S: Phosphorylated TDP-43 becomes resistant to cleavage by calpain: a regulatory role for phosphorylation in TDP-43 pathology of ALS/FTLD. 査読有, *Neurosci Res*, 107: 63-69, 2016. DOI: 10.1016/j.neures.2015.12.006. Sasaki S, Yamashita T, Kwak S: Autophagy in spinal motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice: an implication for a role of calcium in increased autophagy flux in ALS. 査読有, *Neurosci Lett*, 598:79-84, 2015. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.05.025. Sasaki S, Yamashita T, Hideyama T, Kwak S: Unique nuclear vacuoles in the motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice. 査読有, *Brain Res*, 1550: 536-546, 2014. DOI:10.1016/j.brainres.2014.01.006. Yamashita T, Kwak S: The molecular link between inefficient GluA2 Q/R site-RNA editing and TDP-43 pathology in motor neurons of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. 査読有, *Brain Res*, 1584:28-38, 2014. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.12.011. 山下雄也, 郭 伸: TDP-43 病理形成メカニズムにおける TDP-43 のカルパイン依存性断片化の意義. 査読無, 臨床神経学, 54: 1151-1154, 2014. DOI:10.5692/clinicalneuro.54.1151. 山下雄也, 郭 伸: TDP-43 病理形成メカニズム. 査読無, Dementia Japan, 28: 307-318, 2014.

[学会発表](計 23件)

郭 伸: Development of specific therapy for sporadic ALS, 3rd World Centenarian Initiative 「ALS 病治療戦略国際シンポジウム - より良い QOL と予後を目指した新規治療法の開発 - 」先端医療振興財団 ALS 国際シンポジウム, 2016.2.19, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)
郭 伸: ALS の分子標的治療法の開発, 第 19 回新潟神経内科シンポジウム、大学院特別講義 「ALS はどこまで解明されたか、どこまで治療可能となったか」, 2015.12.12, ホテルディアモント新潟 (新潟県新潟市)

郭 伸: 病因解析に基づいた孤発性 ALS の治療法開発, 京都府立医科大学 大学院特別講義, 2015.11.6, 京都府立医科大学 (京都府京都市)

郭 伸: ALS の分子病態解析とそれに基づいた治療法の開発, 東京医科歯科大学大学院講義, 2015.10.23, 東京医科歯科大学 (東京都文京区)

郭 伸: 筋萎縮性側索硬化症における RNA editing 異常の病因的意義. ISN (International Society for Neurochemistry)/JSN (Japanese Society for Neurochemistry) Joint Symposium "Epigenetics in neurological and psychiatric diseases" 第 58 回日本神経化学学会大会, 2015.9.13, 大宮ソニックシティ (埼玉県大宮市)

山下 雄也, 廣瀬 直己, 赤松 恵, 寺本 さやか, 蔡 慧令, 郭 伸: AMPA 受容体アンタゴニストであるランパネルを用いた ALS 治療法の開発. 第 38 回日本神経科学大会, 2015.7.29, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市). ポスター

郭 伸: 分子病態モデルマウスを用いた筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療法開発, ランチョンセミナー 第 56 回日本神経学会総会, 2015.5.22. 朱鷺メッセ (新潟コンベンションセンター) (新潟県新潟市)
郭 伸, 山下 雄也, 寺本 さやか: Mechanism-based gene therapy for sporadic ALS. 第 56 回日本神経学会学術大会 Hot Topics 18 "Gene Therapy for Neurological disorders, 2015.5.22, 朱鷺メッセ (新潟コンベンションセンター) (新潟県新潟市), (口演)

郭 伸: 孤発性 ALS の分子病態解析に基づいた治療法の開発, 京都大学 iPS 細胞研究所セミナー 2015.1.23, 京都大学 (京都府京都市)

Kwak S: ADAR2-downregulation, a pathogenesis of ALS and a target for therapy. Workshop "RNA editing—from genomic prediction to function", 2014.12.8, Ein Gedi (Israel)

Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Muramatsu S, Kwak S: Gene therapy for sporadic ALS using an intravenous injection of AAV vector. The 25th International Symposium on MND/ALS, 2014.12.6, Brussels (Belgium)
Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S-I, Kwak S: Mechanism-based gene therapy for ALS using sporadic ALS model mice. The 45th Annual Meeting Society for Neuroscience, 2014.11.18, Washington DC (USA)

郭 伸: AAV-ADAR2 による ALS の遺伝子治療, シンポジウム「AAV ベクターを応用した神経・精神疾患の病態解明」第 36 回日本生物学的精神医学会、第 57 回日本神経化学学会大会, 2014.10.1, 奈良県文化会館 (奈良県奈良市)

山下 雄也, 蔡 慧玲, 寺本 さやか, 辻 省次, 島崎 久仁子, 村松 慎一, 郭 伸: 孤発性 ALS モデルマウスを用いた ALS の遺伝子治療法開発の試み. 第 37 回 日本神経科学大会 Neuro2014, 2014.9.13, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Akamatsu M, Takuma H, Yamashita T, Okada T, Masu-Keino K, Oehring H, Kwak S, Masu M, Jirikowski FG: Electron microscopic observation of intranuclear aggregation of TDP-43 in mouse cerebral cortex produced by in utero electroporation. 第 37 回日本神経科学大会 Neuro2014, 2014.9.11, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

蔡 慧玲, 郭 伸, 山下 雄也: ペランパネルは ALS モデルマウス運動ニューロンの TDP-43 病理を軽減する, 第 37 回日本神経科学大会 Neuro2014, 2014.9.11, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

郭 伸: 分子病態モデルマウスを用いた筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療法開発, 第 5 回東京 ALS フォーラム, 2014.8.23, シェラトン都ホテル東京 (東京都港区)

Kwak S, Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Muramatsu S-I: Development of a gene therapy for sporadic ALS by normalizing ADAR2 activity in the motor neurons using a vascular type AAV vector. The 24th Meeting of the European Neurological society, 2014.6.1, Istanbul(Turkey), (口演)

詫間 浩, 赤松 恵, 山下 雄也, Hartmut Oehring, 岡田 拓也, 柁 和子, 石井 一弘, Gustav Jirikowsk, 郭 伸, 柁 正幸, 玉岡 晃: 子宮内電気穿孔法 TDP-43 遺伝子導入による in vivo 形成封入体の微細形態の検討. 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014.05.23, 福岡国際会議場, (福岡県福岡市)

澤田 潤, 相澤 仁志, 浅野目 明日香, 高橋 佳恵, 斎藤 司, 片山 隆行, 山下 雄也, 郭 伸, 長谷部 直幸: AMPA 受容体サブユニット GluA2 の Q/R 部位 RNA 編集率に対する薬剤の効果. 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014.5.22, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

②① 山下 雄也, 郭 伸: TDP-43 病理形成メカニズムにおける TDP-43 のカルパイン依存性断片化の意義. シンポジウム「TDP43 の新展開」第 55 回日本神経学会学術大会, 2014.5.22, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市), (招待講演)

②② 郭 伸, 山下 雄也, 蔡 慧玲, 寺本 さやか, 辻 省次, 島崎 久仁子, 村松 慎一: 分子病態に基づいた孤発性 ALS の遺伝子治療法の開発. 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014.5.21, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), (口演)

②③ 肥田 あゆみ, 井上 真奈美, 前田 明子, 山下 雄也, 郭 伸, 辻 省次, 清水 潤: 筋炎と悪性腫瘍との関連に関する疫学的検討. 第 55 回日本神経学会学術大会,

2014・5.21, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

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 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
<http://square.umin.ac.jp/teamkwak/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

郭 伸 (KWAK, Shin)
東京大学大学院医学系研究科・客員研究員
研究者番号 : 40160981

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :