

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670439

研究課題名(和文) 孤発性ALSモデルを用いた網羅的創薬スクリーニングシステムによる治療法探索

研究課題名(英文) A drug screening system for ALS by automated, quantitative motility analysis of *C. elegans* ALS model

研究代表者

祖父江 元 (Sobue, Gen)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：20148315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：運動ニューロン特異的にdnc-1をノックダウンしたALSモデル線虫を用いた、薬剤スクリーニング法の開発に取り組んだ。まずラパマイシンをポジティブコントロールにおいてスクリーニング方法を確立した。ラパマイシン投与によりモデル線虫の運動機能が濃度依存的に改善する事を示した。次に、神経変性疾患モデルに有効であることが確認されている薬剤50薬剤を用いてスクリーニングを行った。その中で、ALSの治療薬として認可されているリルゾールは優位に治療効果が確認できた。その他ヒット化合物X(降圧薬)を検出できた。1日に約50種類の薬剤を判定可能であり、数千単位のスクリーニングが可能となった

研究成果の概要(英文)：There has not been reliable method for in vivo high-throughput quantification of the drug effects. Recently our collaborator developed a real-time computer vision system, the Multi worm tracker(WMT), that can quantify the behavior of dozens of worms. Using this system, we explored the effective drug for the ALS model animals, dnc-1KD worm, in which the dynactin 1 is knocked down in the motor neurons. This model shows the motor neuronal degeneration, and it mimics a several significant features of ALS pathology. We first chose rapamycin as a positive control and showed the effect in a dose dependent manner. Next, we screened the 50 drugs and identified two compounds which significantly rescued the motor deficit of the worm. Interestingly, one of the drug was Riluzole, which is one of the only two drugs approved for ALS in Japan. The other drug X is an anti-hypertensive drug. This method allow us to complete a drug screen in a few weeks compared with a few years when using rodent models.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 薬剤スクリーニング 低分子化合物 トランスレーショナルリサーチ 線虫

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) は、運動ニューロンが特異的に障害され変性脱落し、進行性の筋力低下をきたす極めて予後不良の疾患である。ことに、ALS患者のほとんどを占める孤発性ALSについては、現在もその病因は不明な点が多く、また有効な治療法はない。我々は孤発性ALSにおける分子病態を明らかにし、その病態を再現するモデルを作成し、治療法開発を行うことを目標にした研究に取り組んできた (Ikenaka *et al.* *PLOS ONE* 2013; Iguchi *et al.* *BRAIN* 2013)。まずレーザーマイクロダイセクションにより運動ニューロンを単離し、孤発性ALS運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成することに成功した (Jiang *et al.* *Ann Neurol* 2005)。これらの遺伝子発現変化と神経変性マーカーの発現との関係を詳細に検討することにより、特に **dynactin 1 の遺伝子発現低下が ALS における神経変性過程の初期から生じていることを明らかにした** (Jiang *et al.* *J Neuropathol Exp Neurol* 2007)。

Dynactin 1 の遺伝子変異は運動ニューロン疾患を引き起こす事が知られており (Puls *et al.* *Nature Genet* 2003)、孤発性ALS運動ニューロンにおいて dynactin 1 の発現が神経変性過程初期より低下していることは興味深い。そこで我々はその発現変化を線虫、マウスに展開し、**孤発性ALSの疾患モデルを開発した** (Ikenaka *et al.* *PLOS ONE* 2013)。これらのモデル動物は、進行性の運動神経変性と運動機能障害を呈するとともに、その病態として**軸索輸送障害、軸索腫大と、リン酸化ニューロフィラメントの蓄積、オートファジーの異常、ユビキチン陽性封入体の形成など孤発性ALS患者の病態の変化を再現していた。**

2. 研究の目的

我々は孤発性ALS患者の脊髄運動ニューロン特異的な遺伝子発現プロファイルの結果明らかとなった dynactin 1 の発現低下を再現する線虫モデルの作成と病態解析を行ってきた。このモデル線虫は孤発性ALS患者の運動ニューロンと共通する病態を示す。**本研究では我々が開発したALSモデル線虫を用いた大規模な新規治療薬スクリーニングを行う事を目的とする。**新規の線虫用ライブラリーを用い、数千種類の低分子化合物を使用する、*in vivo* では極めて大規模な薬剤スクリーニングを目指しており、線虫の運動機能を複数個体、グループで同時に定量することが可能なシステムを開発する。

3. 研究の方法

一群数十個体で、同時に複数の群の運動機能を解析するシステムを開発する。解析プログラムは研究協力者の Andrew Giles らが開発し

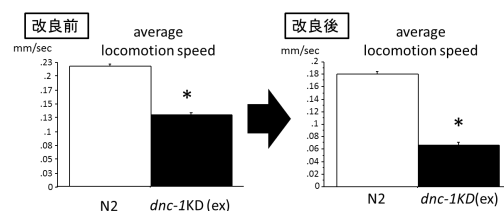
た Multiple Worm Tracker (Swierczek *et al.* *Nature Methods* 2011) を用いており、それを今回の研究用に、連携協力者の森郁恵らと運動機能解析用に改変した。申請者らの予備実験では、神経筋接合部に作用し線虫に対する麻痺効果が知られている Levamisole の濃度依存性の効果が確認できた。さらに本研究にあたっては、酸化ストレスを起こすパラコートなど複数の薬剤を用いた運動機能解析の予備実験を行い、**常に安定的で再現性のある結果が得られるような薬剤投与方法、運動機能解析のプロトコルを調整する。**

スクリーニングのライブラリー作成にあたっては、東レ株式会社と共同開発を行い、化合物の骨格や立体構造から予想して、**幅広い作用機序網羅している低分子化合物約2000種類選択**する。その際、その先にマウスへの応用、さらにはヒトへの応用を見越して、毒性が強いと予想されるものや、極めて難溶性などの理由で製剤化が困難を予想されるものを除く。化合物合成は、東レ株式会社にて行い、各々10mMの濃度になるようジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した後、96ウェルプレートに分注されて当研究室に提供される。スクリーニングは、dynactin 1 ノックダウン線虫を用いて行い、運動機能改善効果の高い化合物10種類を選出する。

4. 研究成果

dynactin 1 ノックダウン線虫を用いて、まずはS/N比の改善を目指した。当初本研究に用いる予定であった線虫株は、染色体外に遺伝子導入を行った株であった (ex株)。ex株は継代方法によって表現型がばらつく。つまり、プラスミドを多コピー保有している線虫を選んで継代することで、S/N比をより強くすることが可能である。まず我々はダイナクチンノックダウン株の改善を試みた。(Fig.1)

Fig1 dnc-1 KD 線虫の S/N 比改善



次に、陽性コントロールの確立のため、ラパマイシン投与による運動機能の改善効果を評価した。ラパマイシン投与による神経保護効果は我々が以前に報告している (PLOS ONE 2013)

Rapamycin の効果は、野生型や Voltage

gated Ca channel の mutant 線虫 (これも *dnc-1KD* と同様に運動機能障害を呈する線虫) には効果が無いが、*dnc-1KD(ex)* 線虫には効果があった。また、濃度依存性効果も確認できた。(Fig. 2, 3)

Fig2 Rapamycin の効果

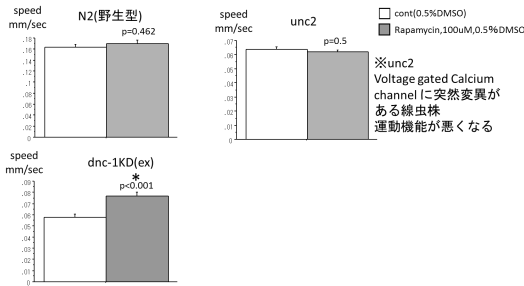
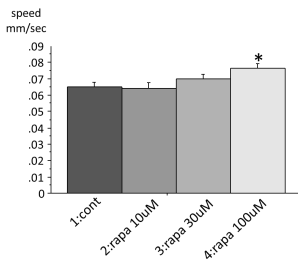
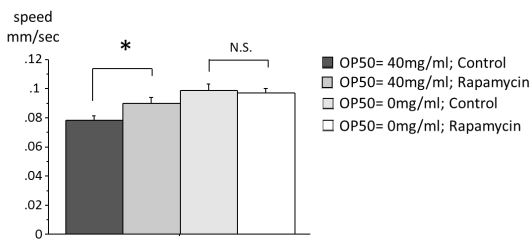


Fig3 Rapamycin の濃度依存性効果



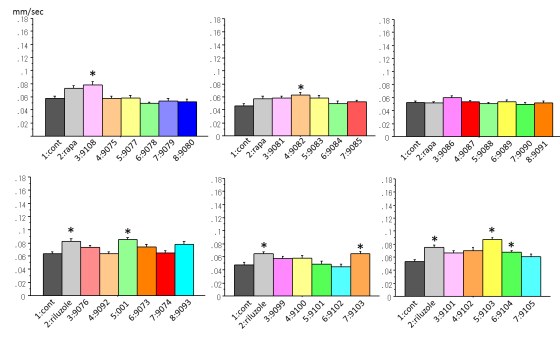
次に、薬剤投与の方法として、線虫のエサとなる大腸菌と共に投与するのかを検討した (Fig. 4) 線虫は飢餓状態で飼育すると神経変性が抑制される。そのため飢餓でラパマイシンを投与すると、ラパマイシンの効果は相殺されてしまった。薬剤投与時には大腸菌液内での投与が必要であった。

Fig. 4 大腸菌の有無がラパマイシンの効果に与える影響



スクリーニングを始めるに当たり、まずは神経変性疾患に対して既報告において効果が確認されている薬剤 50 種類を用いて、本スクリーニング系の妥当性を検証した。スクリーニングにあたっては、各薬剤終濃度が 100uM となるように、48 ウェルディッシュに分注。大腸菌は終濃度 40 mg/ml で調整した。振盪を加えながら 16 時間培養し、薬剤及び大腸菌をウォッシュしたのち、解析用プレートに移し、MWT で運動機能を解析した。

Fig. 5 薬剤投与による *dnc-1KD* 線虫の治療効果



これら約 50 種類の薬剤の中で、ALS に治療効果のあるリルゾールと、既存薬である降圧薬 X が統計学的に有意に治療効果を示した。リルゾールは 1990 年代にアメリカで発売以来、ALS に対して唯一治療効果が認められてきた薬剤であり、本スクリーニングによりリルゾールがヒットとして検出できたことは意義深い。

我々は、更にリルゾールの濃度依存性効果を確認し、神経保護作用を形態的に確認した。(Fig. 5, 6)

Fig.5 リルゾールの効果

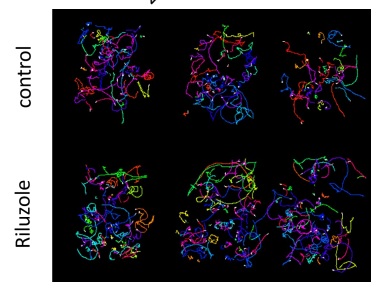
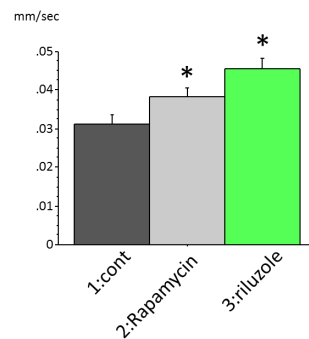
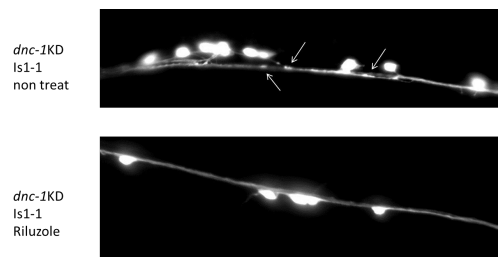


Fig. 6 リルゾールによる軸索形態変化



これまで、線虫を用いた薬剤スクリーニングや遺伝学的スクリーニングは、検者による半

定量スクリーニングか、もしくは定量性のあるデータは非常に限定的なスクリーニングであった。本研究を通して、一日約 80 種類の薬剤スクリーニングが定量性、再現性を持って可能となった。

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 17 件)

Yokoi D, Atsuta N, Watanabe H, Nakamura R, Hirakawa A, Ito M, Watanabe H, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Oda M, Abe K, Mizoguchi K, Kano O, Kuwabara S, Kaji R, Sobue G: JaCALS: Age of onset differentially influences the progression of regional dysfunction in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. in press, 2016 <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00415-016-8109-0> 査読あり

Bott LC, Badders NM, Chen KL, Harmison GG, Bautista E, Shih CC, Katsuno M, Sobue G, Taylor JP, Dantuma NP, Fischbeck KH, Rinaldi C: A small-molecule Nrf1 and Nrf2 activator mitigates polyglutamine toxicity in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. in press, 2016 doi: 10.1093/hmg/ddw073 査読あり

Watanabe H, Atsuta N, Hirakawa A, Nakamura R, Nakatochi M, Ishigaki S, Iida A, Ikegawa S, Kubo M, Yokoi D, Watanabe H, Ito M, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Kanai K, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Kawata A, Aoki M, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G: A rapid functional decline type of amyotrophic lateral sclerosis is linked to low expression of TTN. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. in press, 2016 doi: 10.1136/jnnp-2015-311541. 査読あり

Ding Y, Adachi H, Katsuno M, Sahashi K, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Sobue G: BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, induces mutant ataxin-1 degradation through the activation of heat shock factor 1. *Neuroscience*. 327: 20-31, 2016 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.015. 査読あり

Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohnai G, Watanabe H, Yokoi D, Nakatochi M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Tsuji S,

Nakashima K, Kaji R, Sobue G: Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS): Next-generation sequencing of 28 ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. *Neurobiol Aging*. 39:219.e1-8, 2016 doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.030. 査読あり

Izumi R, Niihori T, Takahashi T, Suzuki N, Tateyama M, Watanabe C, Sugie K, Nakanishi H, Sobue G, Kato M, Warita H, Aoki Y, Aoki M: Genetic profile for suspected dysferlinopathy identified by targeted next-generation sequencing. *Neurol Genet*. 1: e36, 2015 doi: 10.1212/NXG.000000000000036. 査読あり

Ding Y, Adachi H, Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Funakoshi H, Nakamura T, Sobue G: Overexpression of hepatocyte growth factor in SBMA model mice has an additive effect on combination therapy with castration. *Biochem Biophys Res Commun*. 468: 677-83, 2015 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.015. 査読あり

Ohyama K, Koike H, Takahashi M, Kawagashira Y, Iijima M, Watanabe H, Sobue G: Immunoglobulin G4-related pathologic features in inflammatory neuropathies. *Neurology*. 85: 1400-7, 2015 doi: 10.1212/WNL.0000000000002039. 査読あり

Sahashi K, Katsuno M, Hung G, Adachi H, Kondo N, Nakatsuji H, Tohnai G, Iida M, Bennett CF, Sobue G: Silencing neuronal mutant androgen receptor in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 24: 5985-94, 2015 doi: 10.1093/hmg/ddv300. 査読あり

Hikiji T, Norisada J, Hirata Y, Okuda K, Nagasawa H, Ishigaki S, Sobue G, Kiuchi K, Oh-hashii K: A highly sensitive assay of IRE1 activity using the small luciferase NanoLuc: Evaluation of ALS-related genetic and pathological factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 463: 881-7, 2015 doi:10.1016/j.bbrc.2015.05.132. 査読あり

Watanabe H, Sobue G: Filling in the missing puzzle piece between cardiac MIBG scintigraphy findings and Parkinson's disease pathology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 86: 937, 2015 doi: 10.1136/jnnp-2015-310862. 査読あり

Masuda A, Takeda J, Okuno T, Okamoto T, Ohkawara B, Ito M, Ishigaki S, Sobue G, Ohno K: Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length. *Genes Dev*. 29: 1045-57, 2015 doi: 10.1101/gad.255737.114. 査読あり

Udagawa T, Fujioka Y, Tanaka M, Honda D, Yokoi S, Riku Y, Ibi D, Nagai T, Yamada K, Watanabe H, Katsuno M, Inada T, Ohno K, Sokabe M, Okado H, Ishigaki S, Sobue G: FUS regulates AMPA receptor function and FTLD/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. Nat Commun. 6: 7098, 2015 doi:10.1038/ncomms8098. 査読あり

Sasaki S, Iguchi Y, Katsuno M, Sobue G: Alterations in the blood-spinal cord barrier in TDP-43 conditional knockout mice. Neurosci Lett. 598: 1-5, 2015 doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.005. 査読あり

Tsuboi T, Watanabe H, Tanaka Y, Ohdake R, Yoneyama N, Hara K, Nakamura R, Watanabe H, Senda J, Atsuta N, Ito M, Hirayama M, Yamamoto M, Fujimoto Y, Kajita Y, Wakabayashi T, Sobue G: Distinct phenotypes of speech and voice disorders in Parkinson's disease after subthalamic nucleus deep brain stimulation. J Neurol Neurosurg Psychiatry.;86: 856-64, 2015 doi: 10.1136/jnnp-2014-308043. 査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

Sobue G: Perspectives on therapeutic research for ALS –General review of therapeutics, and edaravone treatment-. 大韓神経筋肉疾患学会, Seoul, Korea, March 25, 2016

Sobue G: Perspectives on therapeutic research for ALS. 3rd World Centenarians Initiative International Symposium on Amyotrophic Lateral Sclerosis –giving new hope: novel therapies toward a cure-. Osaka, February 19, 2016 大阪ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

祖父江 元: 日本人ゲノムを用いた筋萎縮性側索硬化症病態関連遺伝子の探索 第 69 回 インシリコ・メガバンク研究会 2016.1.12 東北メディカル・メガバンク棟 (宮城県仙台市)

祖父江 元: ALS の病態と治療: コホート研究から得られるもの 第 3 回日本難病医療ネットワーク学会学術集会 ランチョンセミナー 2015.11.13 仙台国際センター (宮城県仙台市)

祖父江 元: パーキンソン病の自律神経障害 第 68 回日本自律神経学会総会 特別講演 2015.10.29 ウィンクあいち(愛知県名古屋)

祖父江 元: 神経変性疾患の disease-modifying therapy 開発をめざして

日本脳神経外科学会第 74 回学術総会 特別企画 2015.10.15 ロイトン札幌(北海道札幌市)

Sobue G: Impact of aging on anatomical and functional human brain connectivity-toward early detection of dementia. 9th International Congress of the Asian Society Against Dementia (ASAD), September 15, 2015 KKR ホテル熊本(熊本県熊本市)

Sobue G: The future of clinical neuroscience. Brain connects 2015, July 31, 2015 野依記念学術交流館(愛知県名古屋)

祖父江 元: 神経変性疾患の disease-modifying therapy をめざした我国初の医師主導治験の経験から 第 56 回日本神経学会学術大会 シンポジウム 1 2015.5.20 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

祖父江 元: 神経変性疾患の disease-modifying therapy への展望 第 104 回日本病理学会総会 最先端研究セミナー-3 2015.5.2 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

祖父江 元: 認知症制御へ向けた脳タンパク質老化と神経回路の可視化 第 29 回日本医学会総会 2015 関西 シンポジウム「脳はここまでわかった」 2015.4.12 京都国際会議場(京都府京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

祖父江 元 (Sobue, Gen)

所属・職名: 名古屋大学・大学院医学系研究科・特任教授

研究者番号: 20148315

(2) 研究分担者

勝野 雅央 (Katsuno, Masahisa)

所属・職名: 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 50402566

(3) 連携研究者

森 郁恵 (Mori, Ikue)

名古屋大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号: 90219999