

日本ALS協会 IBCグラント研究報告会
2016年11月6日, 東京

グリア細胞を標的としたALSの 治療法開発と分子病態解明

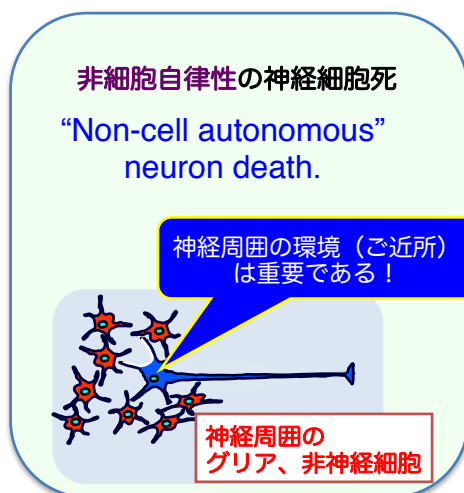
山中 宏二

名古屋大学 環境医学研究所 病態神経科学分野



1

Take home message :
神経細胞の維持には、神経周囲の
環境の改善も重要である。



2

Outline

1. 動物モデルを用いたALSの病態研究：
 - 神経周囲環境（グリア細胞）の重要性に気づくに至る道のり
 - 1) 遺伝性ALS
 - 2) ALSマウス
 - 3) 細胞群特異的なALSの病態解明：
 - 「非細胞自律性」の神経変性：コンセプトの確立
2. グリア細胞からみたALSの病態研究、神経炎症制御
 - 1) ALSにおける**神経炎症**（ミクログリア、アストロサイト）
 - 2) **アストロサイト**における治療標的分子：TGF- β 1
3. 運動神経の変性メカニズムについて
4. 神経変性疾患の病態解明に向けて：今後の展望

3

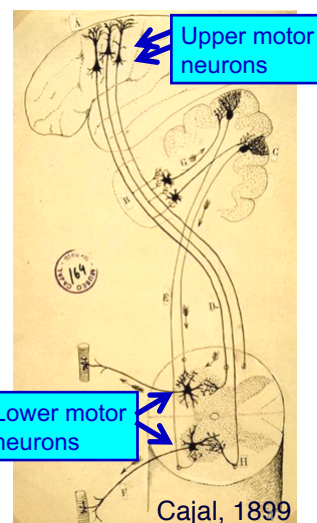
ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis): 筋萎縮性側索硬化症

1. 大脳皮質(upper)および脊髄(lower)運動ニューロンの選択的細胞死をきたす神経変性疾患
2. 晩発性（50-70歳代）、発症後1-5年以内に呼吸筋麻痺により人工呼吸器が不可欠
3. Denervation(脱神経)による骨格筋の萎縮や麻痺
4. Prevalence: 6 / 100,000 population.
本邦では約9,000人、新規発症数：約2,000人/年
5. 大半は孤発性、約10%は遺伝性
6. 神経変性の原因は不明



An Atlas of Clinical Neurology

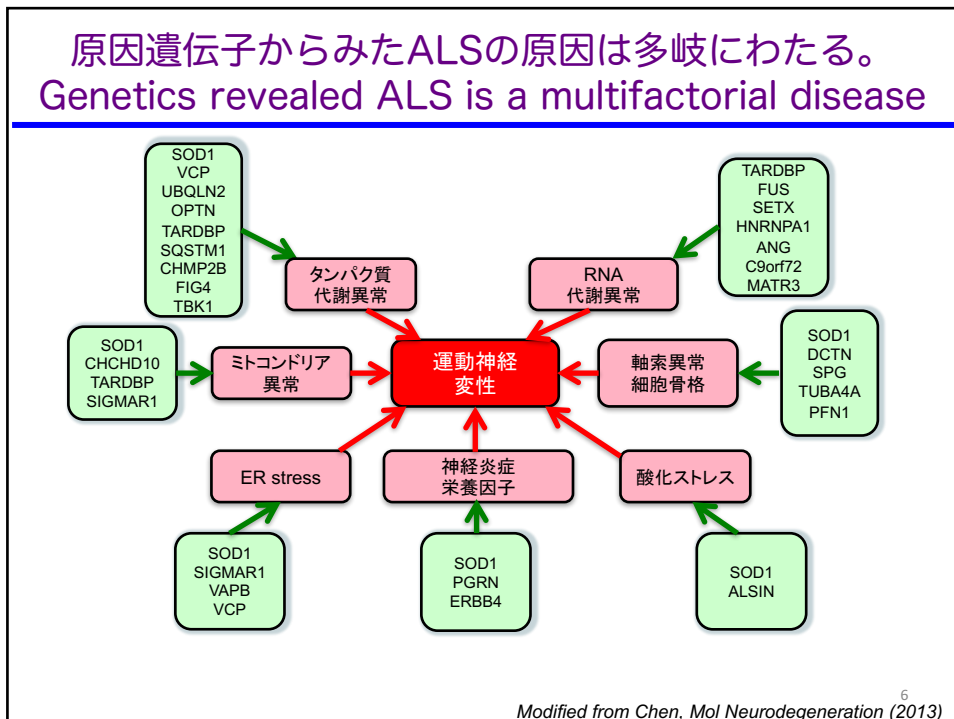
Provided by Prof. I. Nakano



Cajal, 1899

Genetics of ALS (2016)

| Notation (OMIM) | Chromosome | Gene | Inheritance/onset |
|-----------------|------------|------------------------------|--------------------------------|
| ALS1 | 21q22 | SOD1 (1993) | AD / Adult |
| ALS2 | 2q33 | ALS2 (Alsin) (2001) | AR / Infantile |
| ALS3 | 18q21 | ? | AD / Adult |
| ALS4 | 9q34 | senetaxin(helicase, 2004) | AD / Juvenile |
| ALS5 | 15q21 | Spatacsin (SPG11, 2010) | AR / Juvenile |
| ALS6 | 16q12 | FUS/TLS (2009) | AD / Adult |
| ALS7 | 20p13 | ? | AD / Adult |
| ALS8 | 20q13.3 | VAPB (2004) | AD / Adult |
| ALS9 | 14q11 | Angiogenin (2006) | AD / Adult |
| ALS10 | 1p36.22 | TDP-43 (2008) | AD / Adult |
| ALS11 | 6q21 | FIG4 (2009) | AR / |
| Progressive LMN | 2p13 | Dynactin p150 subunit (2003) | AD / adult, slow progression |
| ALS12 | 10p14-15 | Optineurin (OPTN) (2010) | AR, AD / adult onset |
| ALS13 | 12q24 | Ataxin-2 (SCA2, 2010) | AD / Susceptible gene (27-39Q) |
| ALS14 | 9p13 | VCP (2010) | AD / adult |
| ALS15 | Xp11 | UBQLN2 (2011) | XD / adult with or without FTD |
| FTD-ALS1 | 9p21 | C9orf72 (2011) | AD / adult |
| ALS16 | 9p13.3 | Sigma1R (2011) | AR / Juvenile |
| ALS17 | 3p11.2 | CHMP2B (2010) | AD? |
| ALS18 | 17p13.2 | Profilin1 (2012) | AD |
| ALS19 | 2q34 | ErbB4 (2013) | AD / adult |
| ALS20 | 12q13 | HNRNPA1 (2013) | AD |
| ALS21 | 5q31 | Matrin-3 (2014) | AD |
| FTD-ALS2 | 22q11.23 | CHCHD10(2014) | AD? |
| ALS22 | 2q35 | TUBA4A (2014) | AD? / with or without FTD |
| FTD-ALS3 | 5q35.3 | SQSTM1(p62, 2013) | AD? |
| FTD-ALS4 | 12q14.2 | TBK1(2015) | AD?, variable phenotype? |



-グリア病態への気づき-

SOD1変異モデル動物によるALS研究

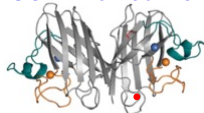
7

SOD1優性変異は 機能喪失(loss of function)ではなく、酵素活性と無関係な毒性を獲得して(gain of toxicity)神経変性を来す。

SOD1 (Cu/Zn Superoxide dismutase)

1. 活性酸素(\dot{O}_2^-)の除去に関わる酵素
2. 153アミノ酸からなり、銅、亜鉛を配位、homodimerとして存在
3. 遺伝性ALSの約20%はSOD1の優性変異による (1993) (大半はミスセンス変異) (>140 mutations known).

SOD1 homodimer



glutathione peroxidase
catalase



“Loss of function” 仮説に 反するevidence

1. Null mutationの報告はない。
2. 酵素活性が保たれているALS変異がかなり存在する。
3. SOD1^{-/-} マウスは神経変性を来さない。

“Gain of toxicities” 仮説を 支持するevidence

4. 変異SOD1トランスジェニックマウス、ラットはその酵素活性の有無にかかわらず進行性の運動神経変性を引き起こす。

Gurney et al (1994)
Wong et al (1995)
Bruijn et al (1997)
Nagai et al (2001)
Howland et al (2002)
Jonsson et al (2004)
and many reports



ALS マウス (変異 SOD1トランスジェニックマウス)

野生型 (15 ヶ月齢)

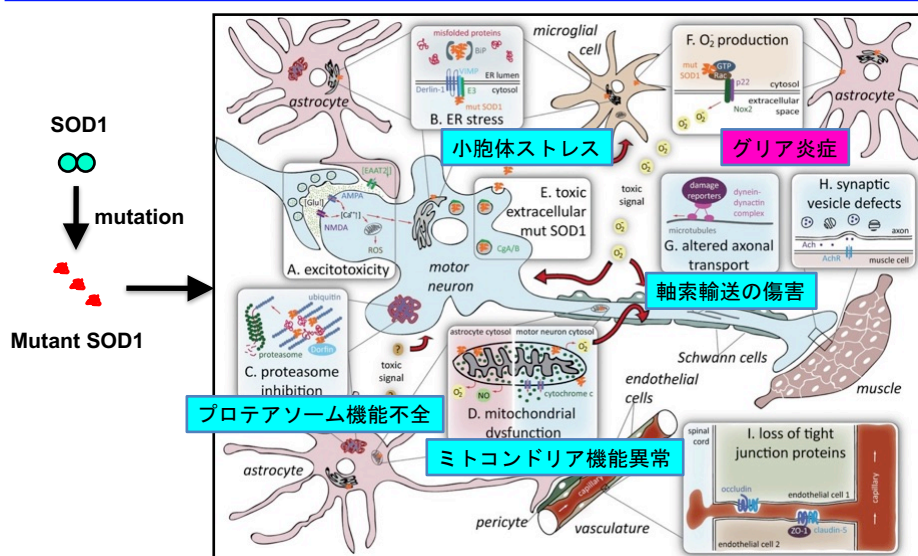
ALS マウス (4.5 ヶ月齢)

SOD1^{G93A} (Gurney, 1994)
 SOD1^{G85R} (Bruijn, 1997)
 SOD1^{G127X} (Jonsson, 2004)
 loxSOD1^{G37R} (Boillee, Yamanaka, 2006)

後肢の麻痺のため速く走れない。
 平均寿命 約5ヶ月
 (SOD1^{G93A})

9

変異SOD1タンパク質による神経毒性メカニズム：多くの学説



Ilieva et al. *J. Cell. Biol.*, 2009

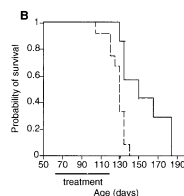
10

SOD1遺伝子変異の発見から数年間、
運動神経死のメカニズム解明とその抑止に関する
研究が中心であった。

**Functional Role of Caspase-1
and Caspase-3 in an ALS
Transgenic Mouse Model**

Mingwei Li,¹ Victor O. Ona,¹ Christelle Guégan,² Minghua Chen,¹
Vernice Jackson-Lewis,² L. John Andrews,³ Adam J. Olszewski,¹
Philip E. Stieg,¹ Jean-Pyo Lee,⁴ Serge Przedborski,^{2,3}
Robert M. Friedlander^{1*}

Li et al. Science (2000)

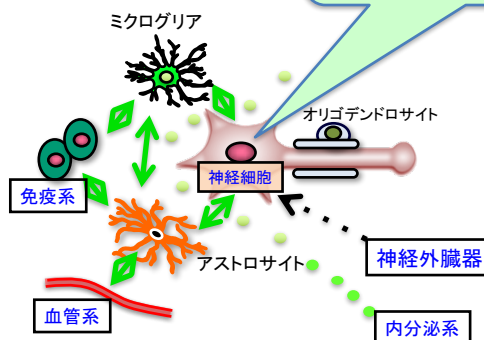


運動神経の細胞死カスケードを遮断すると、
寿命はある程度延長したが、
モデルマウスは運動麻痺で死亡した。

他に何か重要なファクターが
隠れていないか？

11

神経の中だけでなく
外の環境にも
着目してみよう。

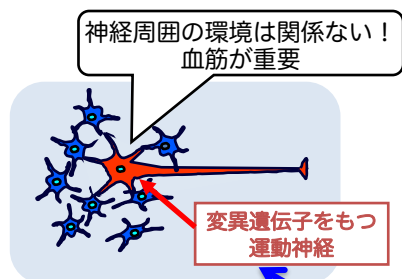


多くの優性遺伝性神経変性疾患の原因遺伝子産物はすべての
細胞に発現しているが、神経以外の細胞の役割はわかって
いなかった。

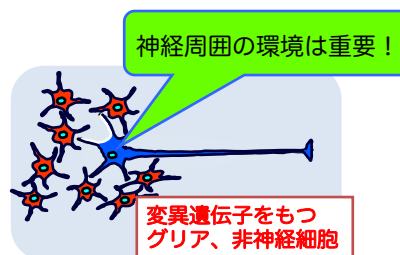
12

神経細胞死の機序を説明する2つの病態仮説

細胞自律性の神経細胞死
 “Cell autonomous”
 neuron death.



非細胞自律性の神経細胞死
 “Non-cell autonomous”
 neuron death.



これまで、神経変性疾患における神経細胞死の原因は神経細胞の病変のみに起因する(Cell autonomous)という考えが優位であった。

細胞自律性仮説を検証する： 100% SOD1^{G37R} 由来の運動ニューロンをもつ キメラマウスは作成可能か？

SOD1^{G37R} 胚
 (Can make all cell types)



Olig^{-/-}/Olig^{-/-} 胚
 (Can NOT make motor neurons**)



Olig^{-/-}::SOD1^{G37R} chimera



キメラマウスは 100% SOD1^{G37R} 発現運動ニューロン (and oligodendrocyte) と 様々な割合の その他の細胞群 (SOD1^{G37R}を発現しないOlig^{-/-}) からなる。

**Zhou and Anderson, Cell (2002) ¹⁴

Olig^{-/-}::SOD1^{G37R} マウスは長期生存し、ALS発症を免れる：
「非細胞自律性」機序の証明

キメラマウス #1 (239 day)

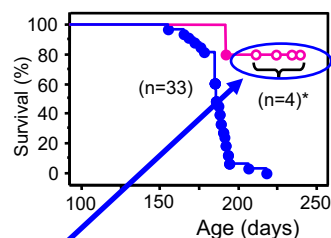


SOD1^{G37R} (180 day: 終末期)



● SOD1^{G37R} ○ Olig^{-/-}::SOD1^{G37R}

生存期間

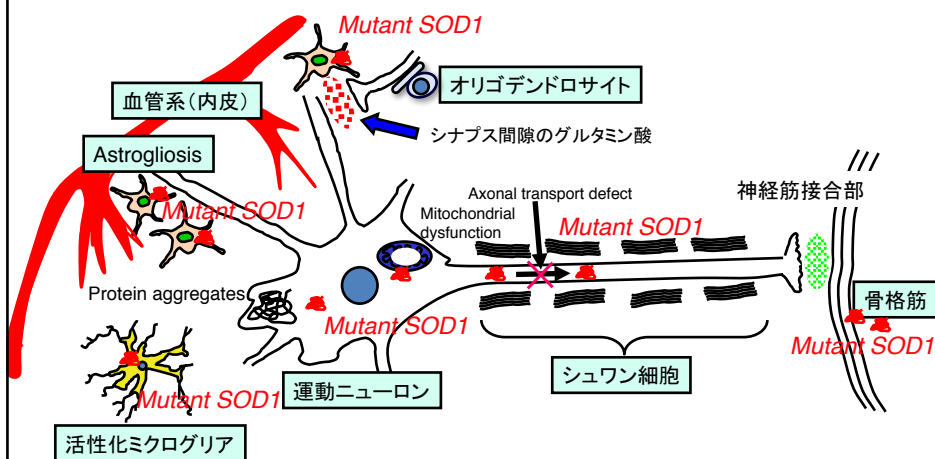


Free from disease for 50-80 days
after mean onset time of SOD1^{G37R}

変異SOD1毒性は
*Non-cell autonomous (非細胞自律性)*である
(運動神経以外の細胞を正常にすると、ALSの
病態は改善した。)

Yamanaka et al. PNAS (2008) 15

それでは、変異 SOD1 毒性はどの細胞群に
起因するのか？



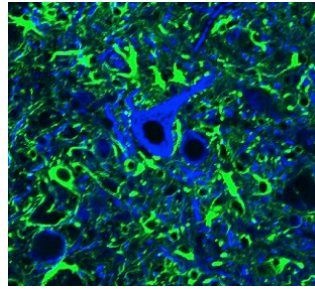
どの非神経細胞を正常化すれば運動ニューロンは保護できるか？
さらに、ALS発症とその進行に関与する細胞群はどれか？

16

グリア細胞：“神経膠細胞”

Glia = Glue : ニューロンの隙間をうめる“のり”(膠：にかわ)
 神経変性疾患ではこれまで“脇役”と考えられてきた

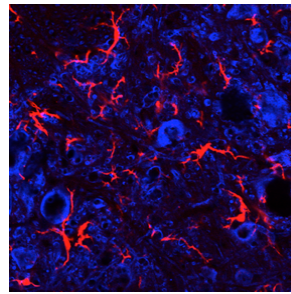
アストロサイト(Astrocyte)



アストロサイト/ニューロン

- ◆ 神経細胞より多数存在
- ◆ ニューロン間の神経伝達を調節
- ◆ 神経栄養因子を分泌

ミクログリア (Microglia)



ミクログリア/ニューロン

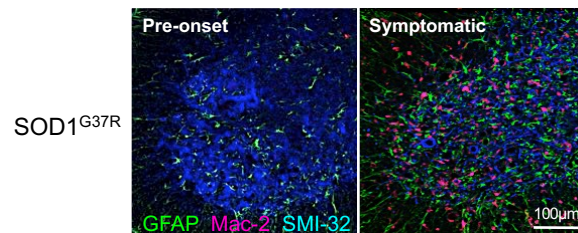
- ◆ 脳に固有の自然免疫細胞
- ◆ 脳内の異常を検知して移動し、病原体や死細胞を貪食

17

神経変性疾患における共通所見

グリア細胞（ミクログリア、アストロサイト）の異常

1. ミクログリア、アストロサイトの活性化はALS 患者病巣や mutant SOD1マウスの病巣（ニューロン変性に先立ってみられる）でみられる。 (Engelhardt & Appel, 1990; Hall et al., 1998; Turner et al., 2004)

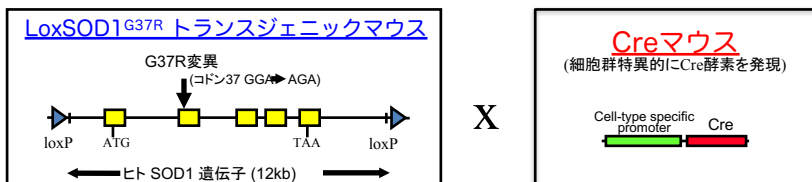


2. グリア細胞から、炎症性サイトカインや細胞傷害性因子の異常放出が変異SOD1マウスやALS患者でみられる。 TNF α , IL1 β , MCP1, NO, superoxide,...

これまでALSをはじめとした神経変性疾患におけるグリア細胞の活性化は神経細胞死に伴う二次的な現象、脇役と考えられていた。

18

特定の細胞群から変異SOD1を除去できる 新しいALSモデルマウスの開発

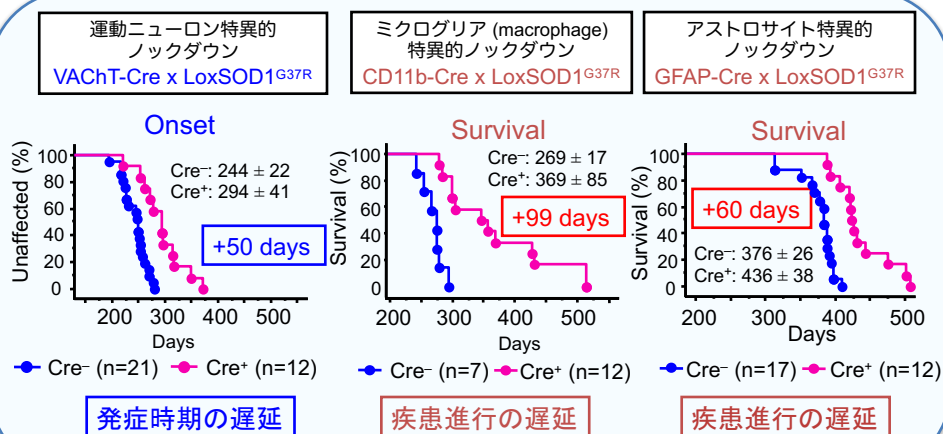


| Cre マウス | Creタンパク質の発現する細胞群 |
|-----------------------|------------------|
| Islet1-Cre, VAChT-Cre | 運動ニューロン(運動神経細胞) |
| GFAP-Cre | アストロサイト |
| CD11b-Cre | ミクログリア |
| MCK-Cre | 骨格筋 |
| P0-Cre | シュワン細胞 |

細胞群ごとに、変異SOD1をノックダウンできるモデルを開発して、
 個体レベルで細胞群ごとの毒性や病態を理解する。

19

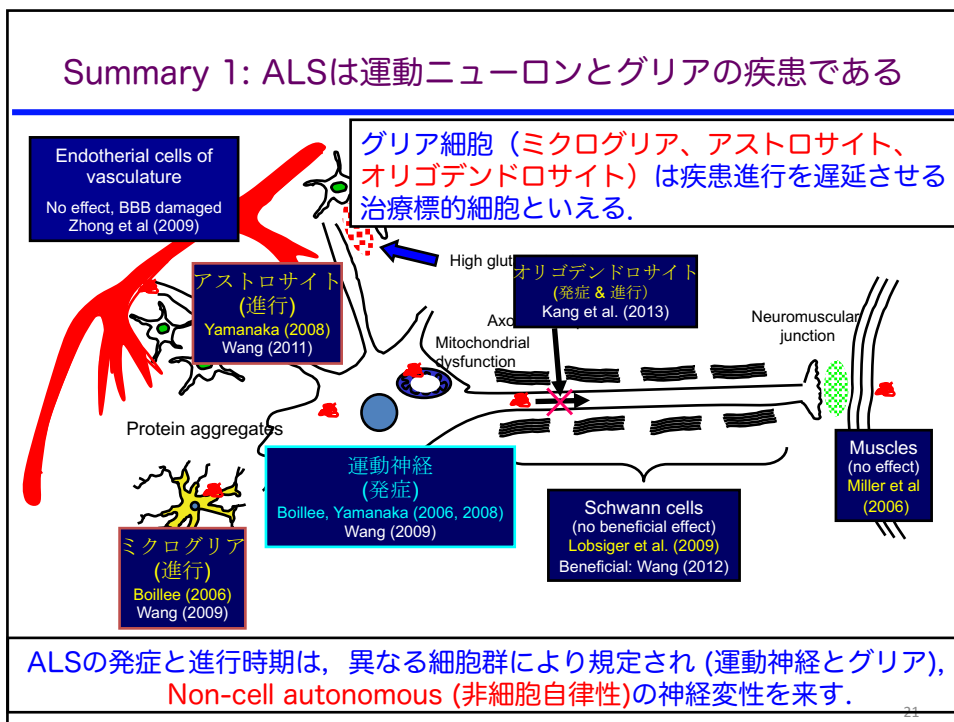
グリア細胞から変異型 SOD1を除去すると 疾患進行を著明に遅延する



グリア細胞における変異SOD1毒性は疾患進行を加速する。
 神経変性疾患におけるグリア細胞の役割は、脇役ではなかった。

Boillee & Yamanaka et al. Science (2006), Yamanaka et al. Nat Neurosci (2008)

20



グリア幹細胞(アストロサイト) の移植により、ALSモデル動物の生存期間は延長した

ラット グリア幹細胞 (アストロサイト) の移植 (2008, Lepore et al.)

Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease
Angelo C Lepore¹, Britta Rauck¹, Christine Dejea¹, Andrea C Pardo¹, Mahendra S Rao², Jeffrey D Rothstein^{1,3} & Nicholas J Maragakis¹

Lepore et al. Nat Neurosci (2008)

アストロサイト前駆細胞(rat glial restricted precursor : 幹細胞の一種)をALSラット頸髄 (SOD1^{G93A} rat) に移植すると生存期間が延長した。
155 days → 172 days.

ヒト iPSC細胞由来のグリア幹細胞の移植 (2014, Kondo et al.)

Focal Transplantation of Human iPSC-Derived Glial-Rich Neural Progenitors Improves Lifespan of ALS Mice
Takayuki Kondo,^{1,2,3} Misato Funayama,^{1,3} Kayoko Tsukita,^{1,3} Akitsu Hotta,^{1,3,4,5} Akimasa Yasuda,⁶ Satoshi Nori,⁶ Shinjiro Kaneko,^{6,7} Masaya Nakamura,⁶ Ryosuke Takahashi,⁷ Hideyuki Okano,⁸ Shinya Yamanaka,^{1,6} and Haruhisa Inoue^{1,3,5}

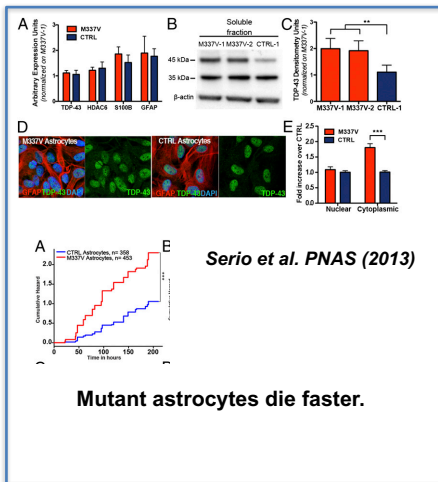
Kondo et al. Stem Cell Rep (2014)

ヒトiPSC細胞をグリア前駆細胞に分化させてからALSマウス腰髄に移植すると生存期間が延長した。
150 days → 162 days.

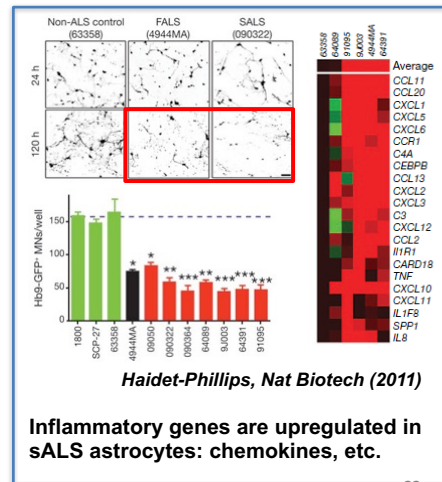
グリア細胞 (アストロサイト) の移植や健全化などグリアを標的としたALS治療の可能性を示している

TDP-43変異ALSや孤発性ALSにおいてもアストロサイトの異常や毒性がみられる

Toxicities of iPS-derived astrocytes carrying TDP-43^{M337V}



Astrocytes derived from postmortem spinal cord of ALS patients are toxic to ES-derived motor neurons.



Outline

1. 動物モデルを用いたALSの病態研究：
 - 神経周囲環境（グリア細胞）の重要性に気づくに至る道のり
 - 1) 遺伝性ALS
 - 2) ALSマウス
 - 3) 細胞群特異的なALSの病態解明：
 - 「非細胞自律性」の神経変性：コンセプトの確立
2. グリア細胞からみたALSの病態研究、神経炎症制御
 - 1) ALSにおける**神経炎症**（ミクログリア、アストロサイト）
 - 2) **アストロサイト**における治療標的分子：TGF-β1
3. 運動神経の変性メカニズムについて
4. 神経変性疾患の病態解明に向けて：
 - 今後の展望

グリア細胞をどう制御するか

25

神経炎症 (neuroinflammation)

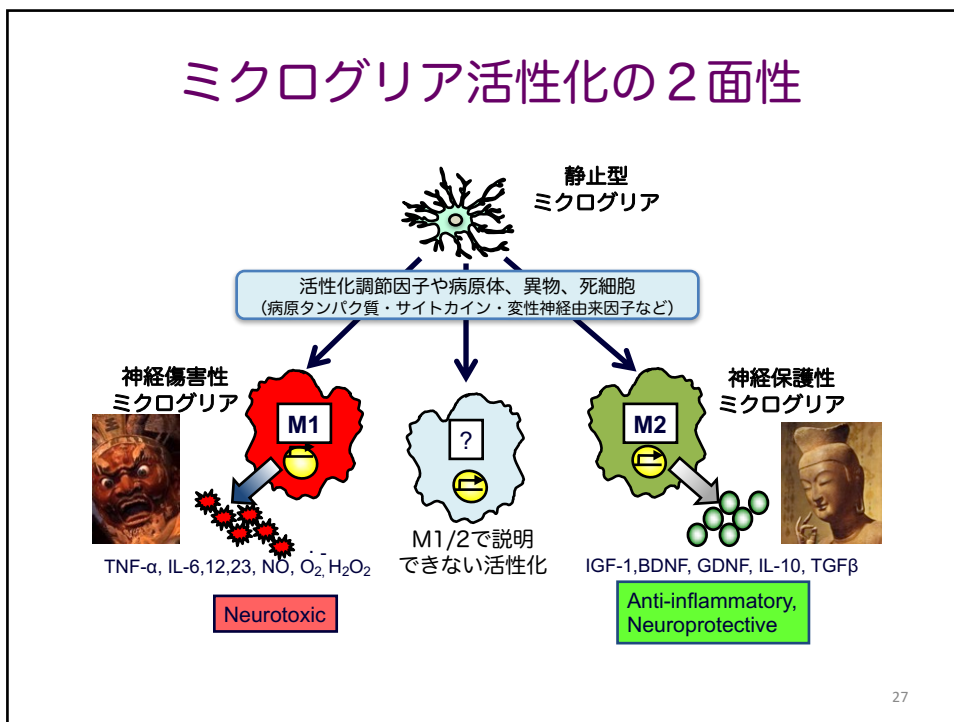
- ・ 神経感染症や多発性硬化症などにおいて惹起されるミクログリアの反応、炎症性物質の放出を示す用語として約20年前に初めて使われる。
- ・ 1995-2004年：約300報の論文。
2004-2015年は、約5000報以上の論文で”neuroinflammation”が使われ、近年注目されている。
- ・ 「**神経炎症には2面性がある。**」
 - 1) 神経変性疾患のようにグリア細胞の活性化・応答異常による、神経傷害性物質の放出 --- **毒性**.
 - 2) **神経保護的**なグリア反応.



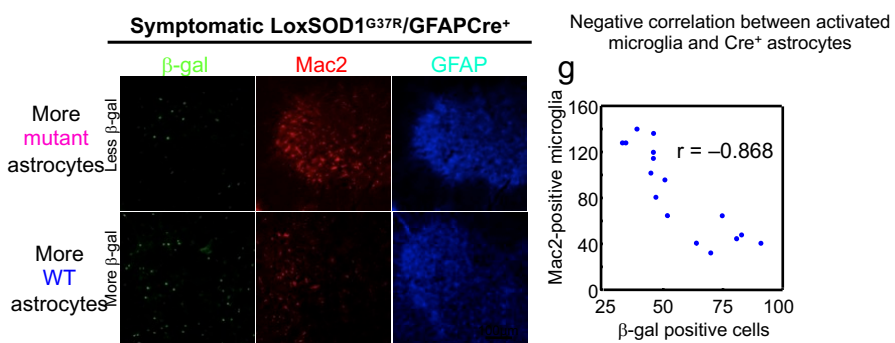
神経炎症の制御が、神経変性疾患の治療標的として注目されている。

山中：炎症と神経変性、医学のあゆみ(2013)³⁶

ミクログリア活性化の2面性



正常なアストロサイトが優位の環境では、 ミクログリア活性化の程度が低い。



アストロサイトを通じてミクログリア活性化や
神経炎症の制御は可能か？

Yamanaka et al. Nat Neurosci (2008)²⁸

ALSにおける神経炎症：beneficial and detrimental

ALSの疾患進行を制御する細胞群

活性化アストロサイト
 GLT-1 ↓
 神経傷害因子
 神経栄養因子
 グルタミン酸毒性の増強
 神経保護能の低下

浸潤T細胞
 M1/M2の制御

活性化ミクログリア
 M1 神経傷害性
 M2 神経保護性
 炎症反応の増強

IFN- γ IL-4

神経傷害性因子 神経保護性因子

変性運動ニューロン 骨格筋

神経炎症

構成細胞群
 アストロサイト
 ミクログリア
 T細胞 など

神経傷害性因子
 炎症性サイトカイン
 TNF- α , IL-1 β , etc.
 酸化ストレス
 ROS, NO, etc.
 グルタミン酸による興奮毒性

神経保護性因子
 神経栄養因子
 IGF-I, GDNF, BDNF, etc.
 抗炎症性サイトカイン
 TGF- β , IL-10

アストロサイト由来の因子は、ミクログリアやT細胞が関与する神経保護環境を制御しうるか？

29

ALSのアストロサイトからどのような因子が放出されているか？

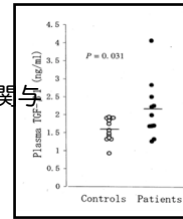
既報告の分子

神経栄養因子：GDNF, BDNF, ...
 毒性因子：ROS, NO, D-serine, ...
 炎症性サイトカイン：IFN-g, PGD2, ...
 ケモカイン...

30

TGF- β in ALS

1. Transforming Growth Factor- β :
 ミクログリアや免疫細胞の増殖, 分化に関わるサイトカイン.
 抑制性サイトカイン: Tリンパ球の増殖抑制や, 炎症の抑制.
 ニューロンに対して生存のシグナルを送る.
2. 孤発性ALS患者では, 血清, 脳脊髄液における TGF- β 1 の高値を認める.
 Houi et al. (2002)
 Itzecka et al. (2002)
3. ZNF512B gene (孤発性ALSのSNP) はTGF- β シグナルに関連
 Iida, Hum Mol Genet (2011)



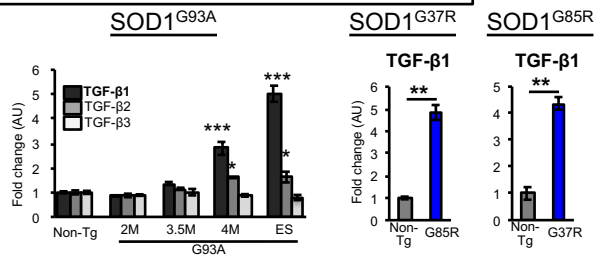
Houi et al. (2002)

ALSモデル動物におけるTGF- β 1の意義や*in vivo*での効果は
 検証されていない.

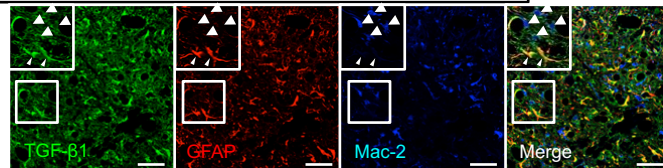
内在性TGF- β 1 はALSマウスの脊髄 アストロサイトにて上昇する



Elevated TGF- β 1 mRNA in the spinal cord of SOD1 mice

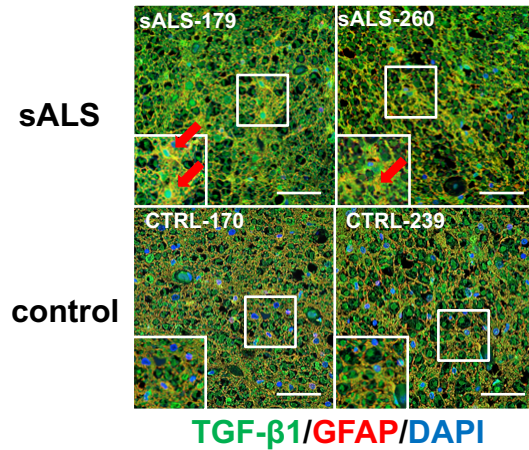


TGF- β 1 is predominantly expressed in astrocytes of symptomatic SOD1^{G93A} lumbar spinal cord.



TGF- β 1 は、孤発性ALSの脊髄アストロサイトでも増加する

TGF- β 1 is upregulated in astrocytes of sporadic ALS spinal cord



Endo et al. Cell Reports (2015)³³

解決すべき課題 Questions to be addressed

1. Whether neurodegeneration and inflammation are affected when the level of TGF- β 1 is altered in astrocytes of ALS mice.

ALSマウスのアストロサイトで、TGF- β 1の量を変えたら病態と神経炎症は変化するか？

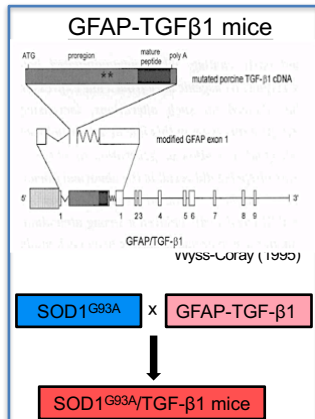
2. Whether the level of TGF- β 1 is linked to the survival time of ALS mice.

TGF- β 1の量は、ALSマウスの生存期間と相関するか？

34

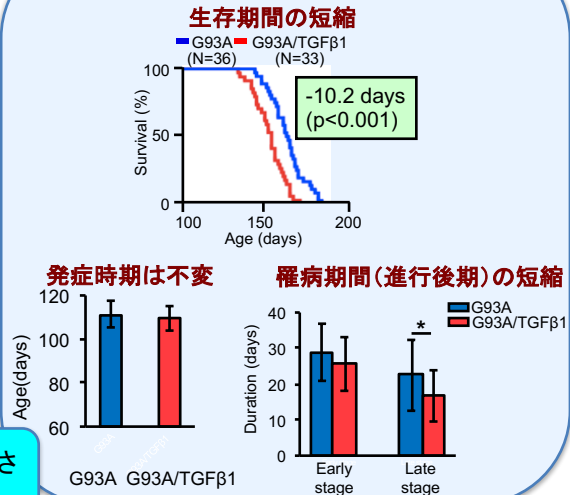
アストロサイトで TGF-β1 量をさらに増やすと SOD1^{G93A} マウスの進行が加速

アストロサイト特異的にTGF-β1を過剰産生するSOD1^{G93A}マウス

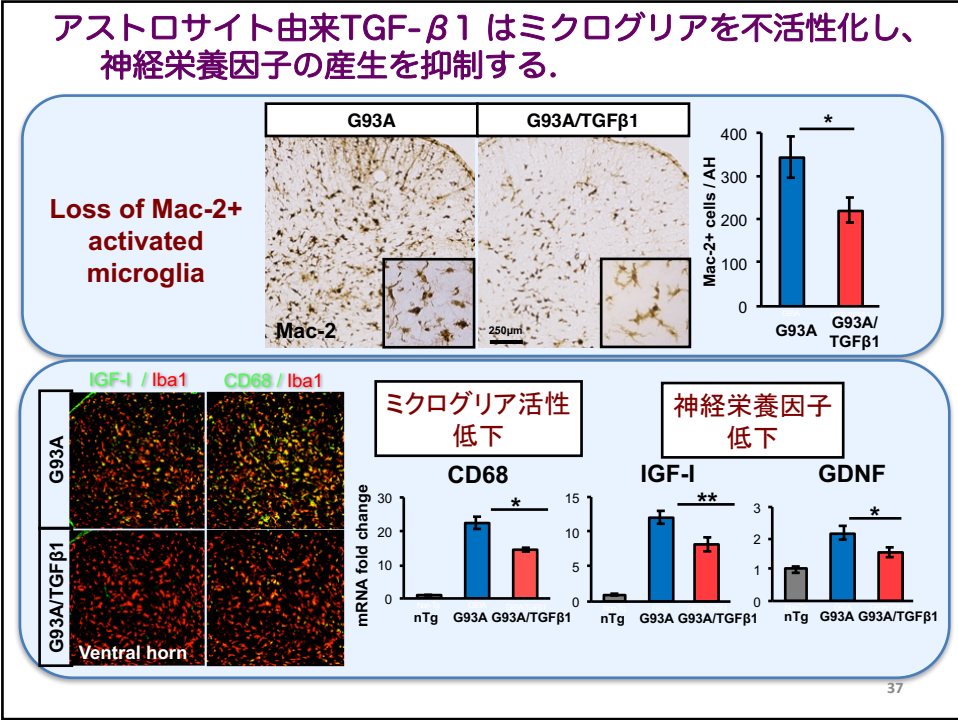


抑制性サイトカインで炎症をおさえることは有益とは限らない

SOD1^{G93A} x GFAP-TGFβ1 交配実験

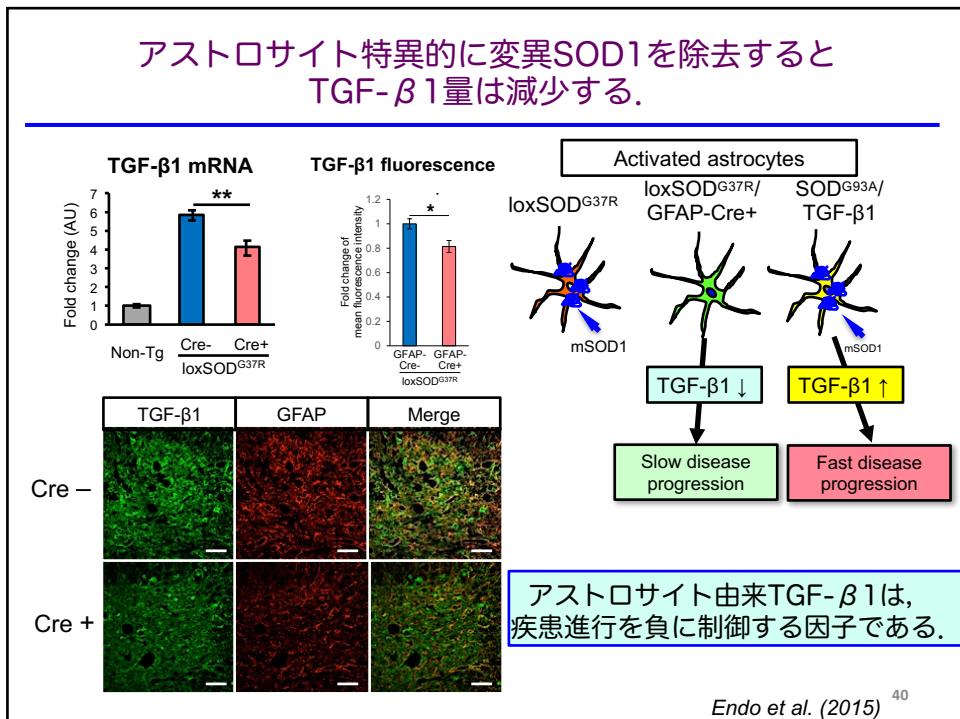
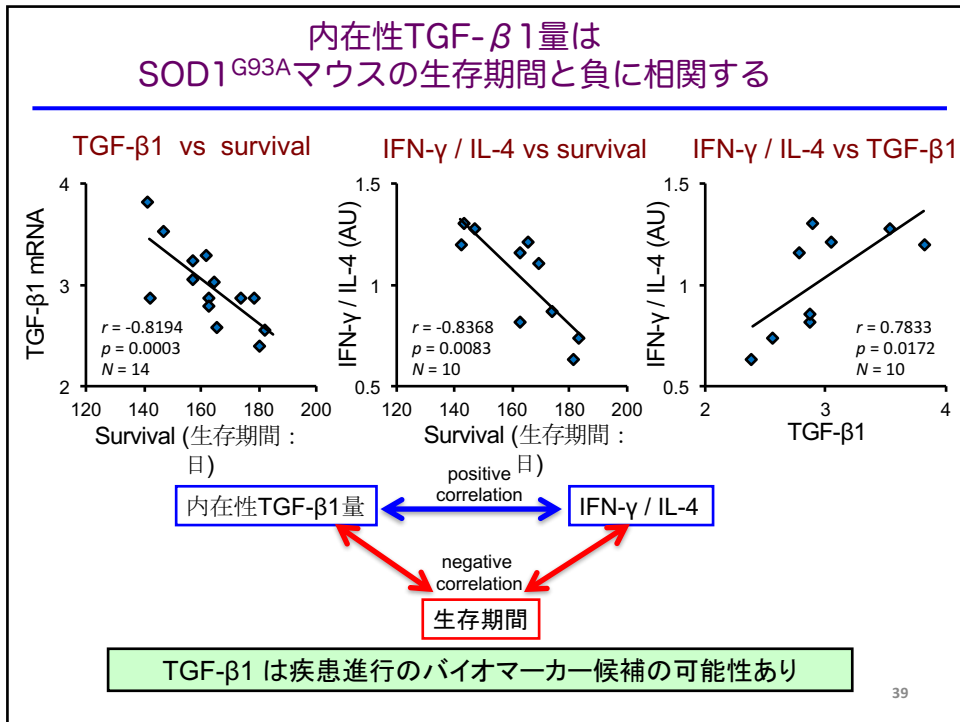


神経炎症はどうなっているか？

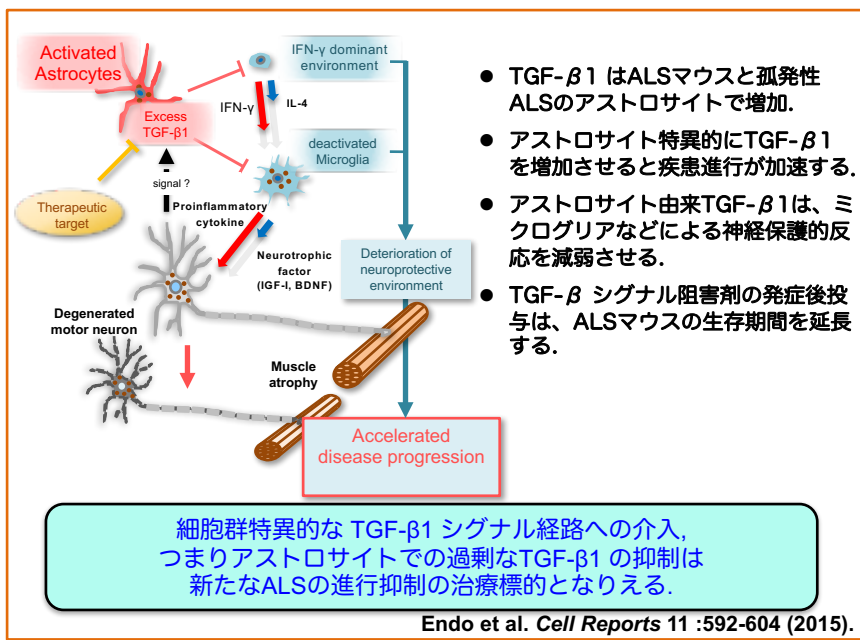


アストロサイト由来TGF- β は、疾患進行の悪化因子か？

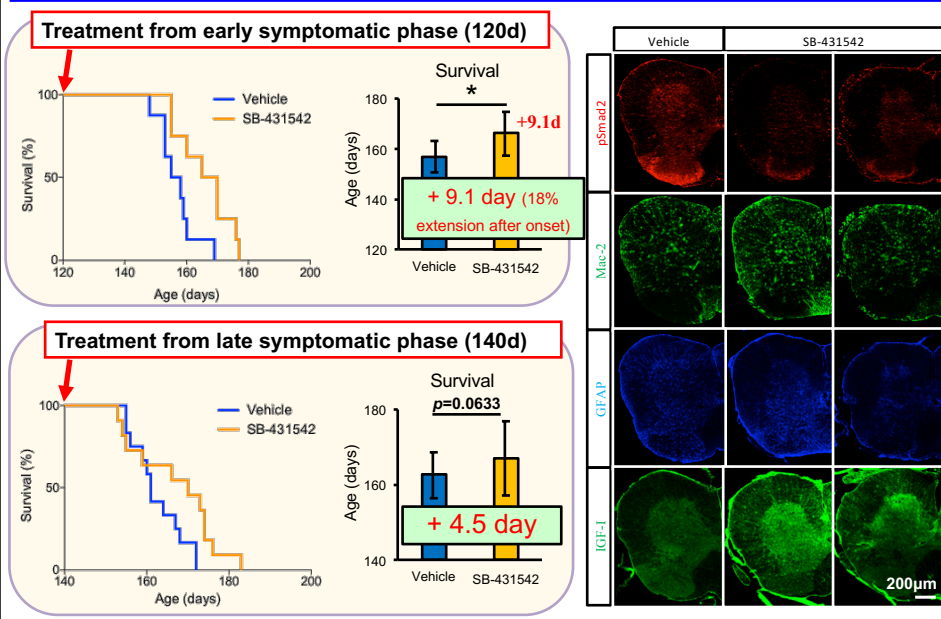
38



アストロサイト由来 TGF- β はALSの病態悪化因子である



TGF- β シグナル阻害剤の発症後投与により、ALSマウスの生存期間が延長した。



TGF- β シグナル阻害剤による実験的治療： プロトコルの最適化に向けて

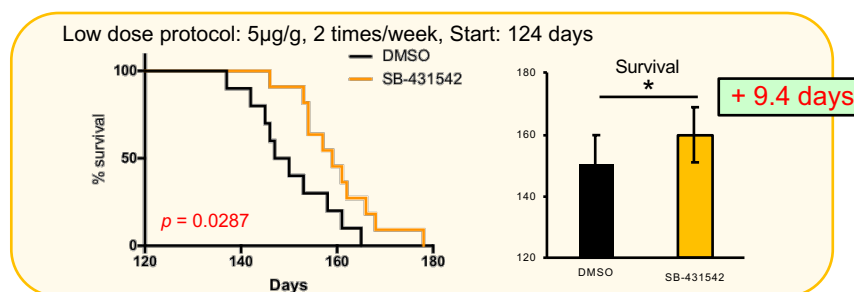
1. 投与時期について：早期投与してよいか？
2. 投与量について：投与頻度、量は最適か？
3. 代用薬はないか？

43

TGF- β シグナル阻害剤による実験的治療： プロトコルの最適化に向けて

投与プロトコルの最適化に向けて

50 μ g/g/週(週5回、10 μ g/g) から 10 μ g/g/週(週2回、5 μ g/g)へ



投与量や頻度を減らすことができた。
→ 副作用を考慮しても、少ない投与量で有効であることは意味がある。

Endo, unpublished

TGF- β シグナル阻害による治療開発にむけて

1. TGF- β 阻害剤：抗がん剤として、海外で臨床治験 Phase II (肝細胞がん、脳腫瘍ほか)
2. 既存薬による代用：drug repositioningの可能性

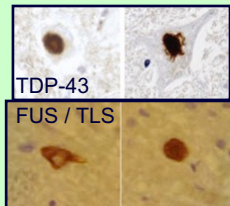
45

神経変性疾患の発症と進行のメカニズム解明にむけて

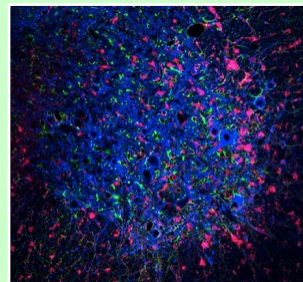
どうして発症するのか？
運動神経に起こる
病的変化の解明

RNA代謝異常
(TDP-43, FUS)

タンパク質品質管理異常、
オルガネラ異常



疾患進行のメカニズム：
グリア細胞病態の解明
炎症、免疫系の関与。



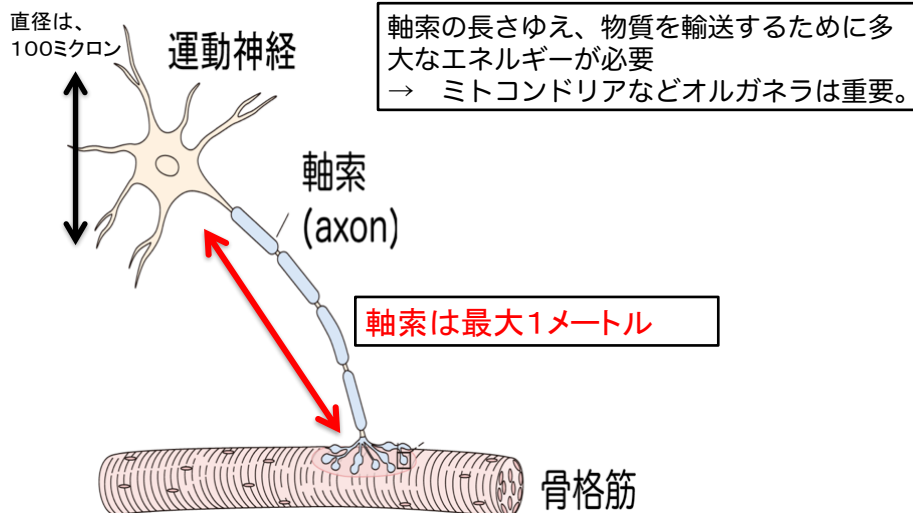
Microglia-Lymphocyte interaction
Controlling neuroinflammation
The role of astrocytes, NG2 glia

Outline

1. 動物モデルを用いたALSの病態研究：
 - 神経周囲環境（グリア細胞）の重要性に気づくに至る道のり
 - 1) 遺伝性ALS
 - 2) ALSマウス
 - 3) 細胞群特異的なALSの病態解明：
 - 「非細胞自律性」の神経変性：コンセプトの確立
2. グリア細胞からみたALSの病態研究、神経炎症制御
 - 1) ALSにおける神経炎症（ミクログリア、アストロサイト）
 - 2) アストロサイトにおける治療標的分子：TGF- β 1
3. 運動神経の変性メカニズムについて
 - オルガネラ（ミトコンドリア・小胞体）の変調
4. 神経変性疾患の病態解明に向けて：
 - 今後の展望

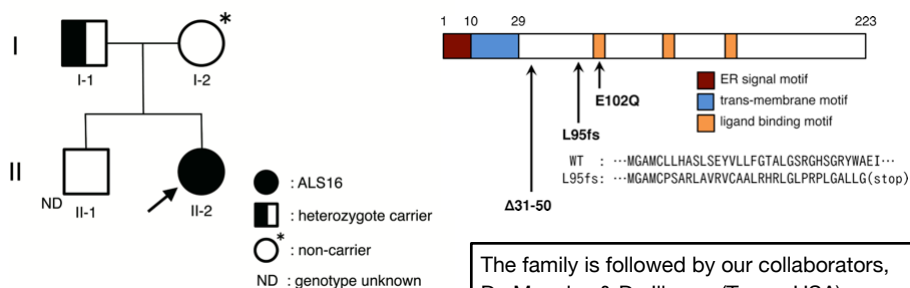
47

運動神経は最大の神経細胞



48

SIGMAR1遺伝子のp.L95fs 変異をALS16の新規変異として同定



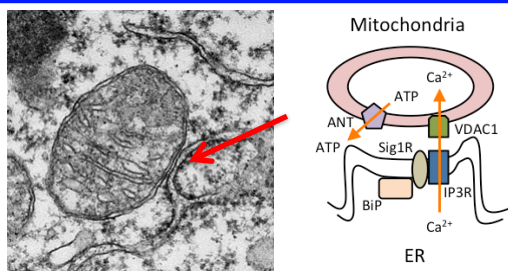
Genotype

- [c.283dupC \(p.L95fs\)](#) was detected by whole exome sequencing
- Homozygosis was a result of parental uniparental disomy for Chr. 9

Clinical features

- [progressive muscle weakness from 5 years old](#)
- both upper & lower motor involvement with slow progression
- [well consistent with the features of ALS16](#)

Sigma1受容体 (ALS16) は小胞体・ミトコンドリア膜間領域 (MAM) に局在する



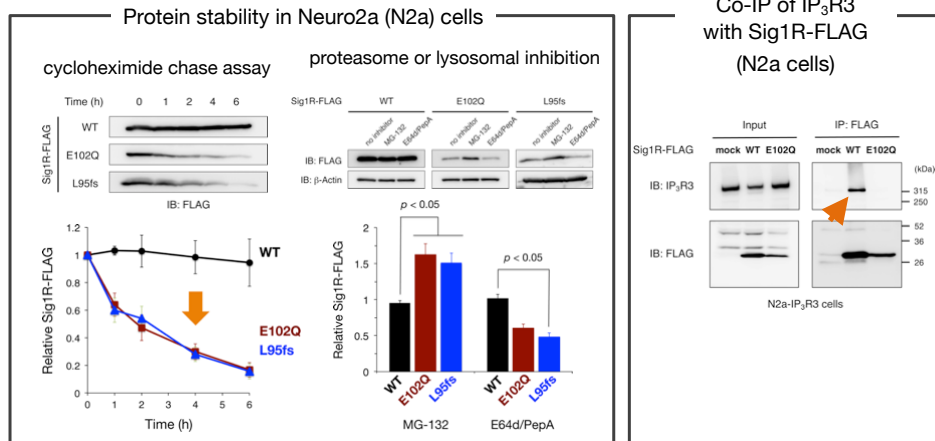
MAM: mitochondria-associated membrane

- シャペロン分子やIP3受容体など、神経の恒常性維持に重要な分子が集積。
- 主にミトコンドリアへのCa²⁺バッファリングに重要。
 (Hayashi & Su *Trends Cell Biol.* 2009)
- コレステロール合成 (Vance *J. Biol. Chem.* 1998) やオートファジーの隔離膜形成 (Hamasaki et al. *Nature* 2013) などの機能もある。

- **Sigma1受容体** : MAMに局在する膜貫通型シャペロン様オーファン受容体

→ MAM異常で変性疾患におけるERストレスやミトコンドリア障害を統一的に説明できるか。

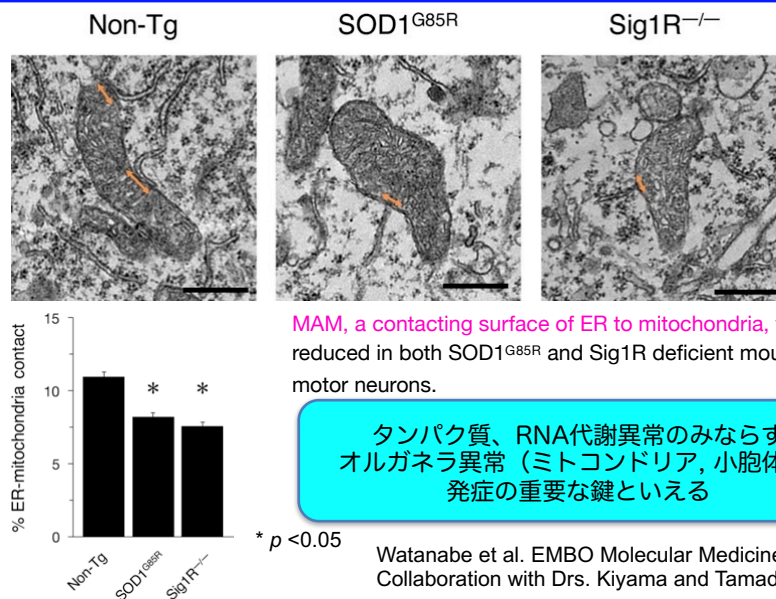
Sig1R 変異タンパク質は不安定で、IP₃R3と結合できない



Both E102Q and L95fs Sig1R variants were

- 1) unstable because of constitutive degradation via proteasome
- 2) incapable to bind to IP₃R3

MAMの崩壊はSOD1-ALS (ALS1) とSig1R-ALS(ALS16)に共通した病態である



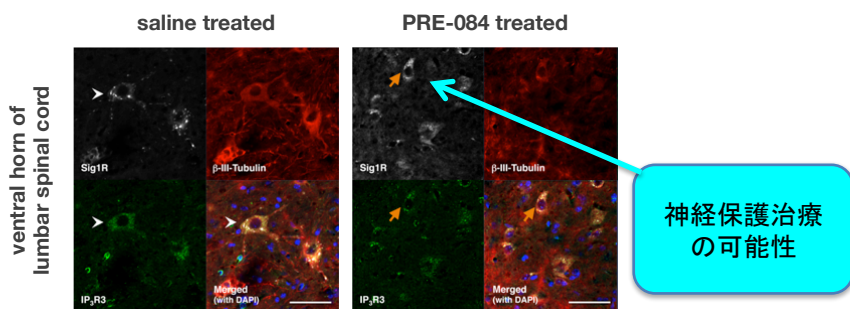
Sigma1受容体のアゴニストをSOD1マウスに投与するとMAMからのSigma1受容体の喪失、MAM異常を部分的に抑止できる

PRE-084

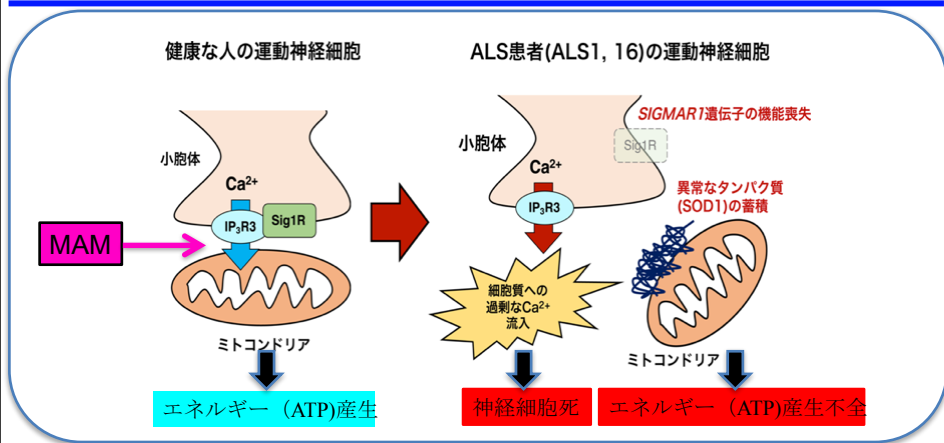
- Sig1R selective agonist ($K_i = 2.2$ nM)
- extends survival time of mutant SOD1 transgenic mice

SOD1^{G93A} mice were administered 0.25 mg/kg PRE-084 in 3 times/week.
The administration was started from 1 months, and ended in 3 months.

SOD1^{G93A} (onset, 3 months)

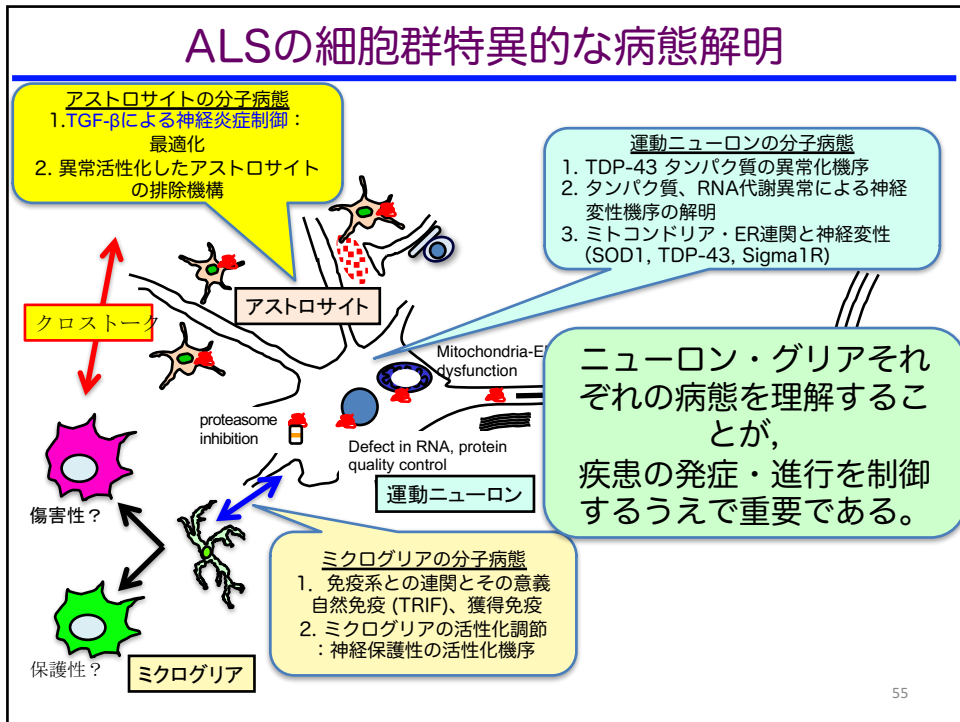


MAM異常と神経変性メカニズム



Watanabe et al. EMBO Molecular Medicine, *in press*

MAMの異常 : ALS (SOD1, SigmaR1, TDP-43, FUS, VAPB, 孤発性)
: アルツハイマー病
: パーキンソン病



Take home message :

1. 神経細胞の維持には、周囲の細胞環境の改善も重要である。

非細胞自律性の神経細胞死

“Non-cell autonomous” neuron death.

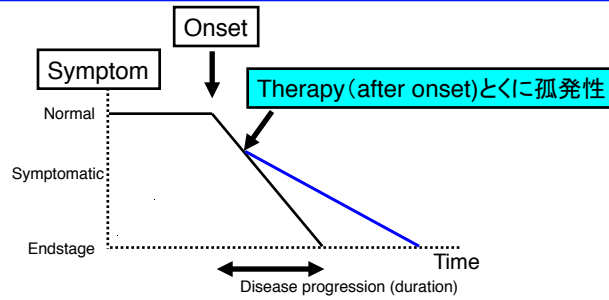
神経細胞だけの病態解明から
神経周囲の環境が重要である
という発想転換

「非自律性」の神経変性機序
が示された疾患

ALS
アルツハイマー病
パーキンソン病と類縁疾患
ポリグルタミン病
など

56

2. 疾患進行を遅延させることが神経変性疾患治療の現実的な目標である (disease-modifying therapy)



疾患の進行を遅らせることは
現実的な治療目標といえる

神経変性疾患の進行メカニズムを解明することは、疾患進行を遅らせる治療法開発の手がかりとなる。
=神経炎症の制御はその候補の一つである

37