

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ALS モデルマウスを用いた揮発性薬剤の解析

研究代表者 鳥居 征司¹⁾
研究分担者 大西 颯¹⁾, 金澤 雅人²⁾

1) 群馬大学 食健康科学教育研究センター 2) 新潟大学 脳研究所 脳神経内科学分野

研究要旨

種々の神経変性疾患の病態に酸化ストレス性細胞死フェロトーシスが関与することが示唆されている。申請者は、フェロトーシスの解析から揮発性の細胞死阻害剤を見出し、マウスにおいて脳保護作用を果たすことを明らかにした。本研究共同利用・共同研究の支援により、神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルマウスを用いた検証を行い、揮発性薬剤による脳保護効果の汎用性、長期吸入に対する安全性を明らかにする。

A. 研究目的

フェロトーシスは2012年に提唱されたネクローシス様の新規細胞死で、細胞内遊離鉄に依存して細胞膜における脂質過酸化連鎖が広がることで引き起こされる。最近はいくつかの別経路も見出されてきたが、グルタチオン・ペルオキシダーゼ4 (GPX4) は主要抑制分子として機能していることが明らかにされている。このGPX4の過剰発現あるいは欠損マウスの解析によって、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態にフェロトーシスが関与することが示唆され、ALSモデルマウスでは特異的阻害剤が運動神経脱落を抑制することなどが報告されてきた。

申請者は培養細胞を用いたフェロトーシスの解析から、ラジカル捕捉化合物の2, 2, 6, 6-テトラメチルピペラジン-1-オキシル (TEMPO) が気体として作用し、細胞保護を果たすことを発見した。また脳虚血モデルを作成し検証したところ、揮発したTEMPOを吸入したマウスは脳障害が有意に抑制された。本研究では金澤雅人博士との共同研究により、遺伝性ALSモデルの一つである変異型SOD1トランスジェニックマウスを用いて、TEMPO吸入に

よる神経細胞保護効果を検証する。またTEMPOの揮発特性やマウスに対する安全性の評価を進める。

B. 研究方法

マウス中大脳動脈永久閉塞モデルでは、プラスチックディッシュに TEMPO 水溶液を入れてケージ内に放置した状態で神経障害が有意に抑制された。しかしながら、TEMPO の自然揮発の程度およびマウスの吸入量・経路は不明である。本研究ではまず、揮発動態の解析を行う。

検出は吸光度測定およびLC/MSを用いた計測で行い、検量線により濃度を算出する。TEMPO を保持する支持体や容器、容量を検討し、また溶媒と温度を変えて揮発率の測定を行う。また吸入マウスでMRIによるイメージングを行い、脳内のラジカルを可視化することでTEMPOの動態を解析する。

ALSモデルはhSOD1 (G93A) トランスジェニックマウスを用いる。TEMPO の吸入は先行実験をベースにし、穴を開けた試験管に綿を入れて TEMPO 水溶液を染み込ませる。これをケージ内に静置して自然吸入投与とし、使用量と交換頻度、別途吸入

器具等を検討する。吸入開始を生後3ヶ月、4ヶ月、発症後の3グループに分け、生存日数を比較する。陽性対照群は3ヶ月からエダラボンを静注する。病態等評価として、体重計測、Rota-rod試験等の運動機能測定、脳や脊髄の組織化学的解析（酸化ストレス評価など）を行う。

動物実験は動物の苦痛軽減に努力し、適切に麻酔薬や鎮痛薬を使用するなど倫理的に配慮して行う。マウスは自由給水、自由給餌、23℃、55%湿度、明暗サイクル14/10時間の環境で飼育し、病態末期あるいは実験に適さない個体は速やかに安楽死の処置を行う。すべての動物実験は、群馬大学実験動物委員会の承認のもと、群馬大学実験動物ガイドラインに従い行った。

C. 研究結果

培養皿の閉鎖環境でTEMPO水溶液の揮発率と隣接する水への移動度を解析すると、37℃1時間の加温で23%が揮発し、14%が隣接する水に移動することが判明している（J Biochem 172:71, 2022）。しかしながら開放環境における揮発度は分かっていない。そこで、TEMPOを水またはDMSOに溶解して、それぞれを1.5mlチューブに入れて、蓋を開放した状態で経時的な揮発度を解析した。水溶液を37℃で加温すると、24時間でほとんどが揮発し、室温では24時間で半分程度の濃度となった。一方、DMSO溶液からの気化は非常に遅く、24時間時点では室温で数%の揮発にとどまった。同様に、脱脂綿入り試験管における揮発度を調べた。TEMPOの水溶液は室温環境下24時間でやはり半分が揮発し、DMSO溶液では4分の1程度が揮発することが明らかとなった。

上記の結果にしたがって、マウスに対する投与を、水溶液を入れた試験管で行うこととし、50-60時間毎に交換するようにした。まず最大濃度で安全性の評価を行ったところ、3ヶ月の継続投与でも体重や運動機能（Rota-rod試験）に影響はなかった。

次に同じプロトコルで、hSOD1 (G93A) トランスジェニックマウスでTEMPOまたは水の投与効果の

検証を行った。生まれたマウスの個体数の関係から、すべての検証は終わっていないが、ALSの発症前（生後3ヶ月）に投与を開始した群は、有意な生存延長効果が認められた。

D. 考察

TEMPOはフェロトーシスの実行過程で生体膜中に生成する脂質ラジカルを捕捉して細胞死を抑止する。本研究では、病態にフェロトーシスに関わることが示唆されているALSのモデルマウスを用いて、揮発TEMPO吸入による病態抑制効果の検証を行った。使用したSOD1 (G93A) マウスは、我々の環境では125日前後での病態発症と観察されたため、生後約3ヶ月でTEMPOを与える発症前グループを中心に解析を行った。その結果、TEMPO吸入群に確かな生存期間延長効果が認められた。SOD1 (G93A) マウスを用いた先行研究では様々な化合物に有効性が報告されているが、エダラボンをはじめ、その多くは筋萎縮などの発症を遅らせるもので、生存期間の延長効果を示すものは少ない。動物モデルにおける病態発症の評価は難しく、臨床に照らした場合も発症時投与による寿命延長効果がより重要であることから、本研究成果の意義は大きいと考えられる。引き続き解析を進めて、揮発TEMPO吸入がALSの修飾療法の候補になりうることを明らかにする。

E. 結論

ALSのモデルマウスにおいて、揮発TEMPO吸入による生存期間延長効果が確認された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

2. 学会発表

1) 鳥居 征司, 水野 寛之, 久保田 知里, 瀧川 雄太, 神徳 亮介, 好本 裕平, 興石 一郎. The nitroxide radical TEMPO prevents ferroptosis and neuronal cell death in an airborne manner. 第96回日本生化学会大会, 10.31.2023 福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）