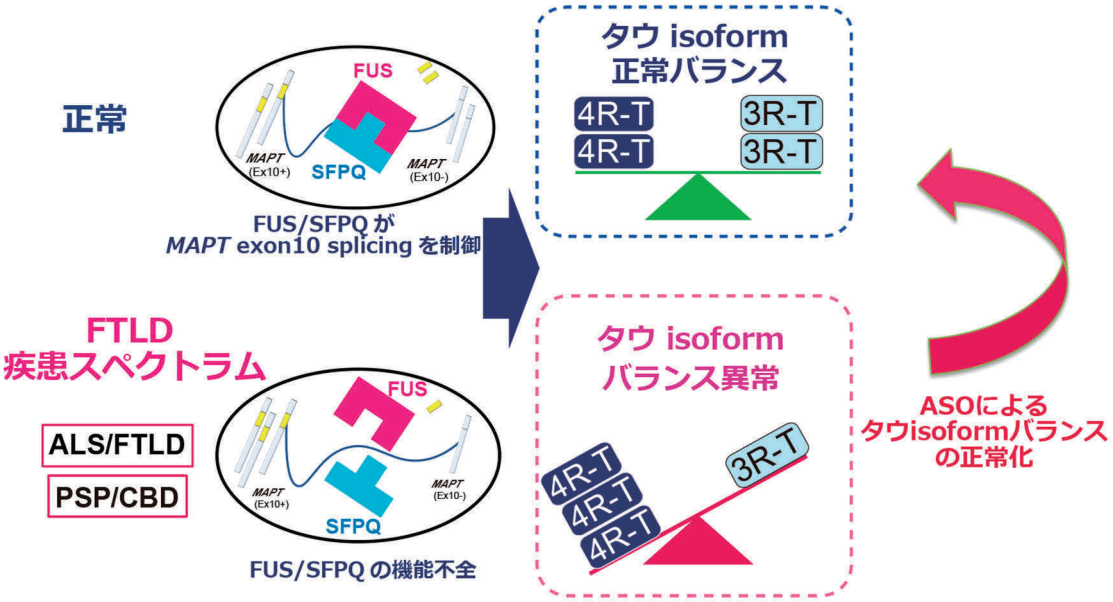
| 203　ALS/FTLDおよび4Rタウオパチーの新規治療標的探索 | 石垣　診祐 |
|---|---|

**【目的】**筋萎縮性側索硬化症（ALS）と前頭側頭葉変性症（FTLD）は、遺伝学的・病理学的に同一の疾患スペクトラムと考えられている。とくに TDP-43、FUS といった RNA 結合タンパク質が家族性症例の原因遺伝子であり、かつ同時に孤発例の重要なマーカーであることから、ALS／FTLD の病態には RNA 代謝が密接に関わると推測されている。筆者はこれまでに、ALS／FTLD に関与する分子である FUS が神経細胞の核内で、同じく RNA 結合タンパク質である SFPQ と高分子複合体を形成し、タウの選択的スプライシングを制御することで神経機能や病態に関与することを明らかにしてきた。またマウスモデルでの解析より増加した 4 リピート（R）タウ（4R-tau）を抑制することで高次脳機能異常が改善することを見出している。本研究提案ではタウの選択的スプライシングを正常化させる新規治療法開発を目的とする。
**【方法】**4R タウオパチーの疾患修飾薬として、化合物の安定性を特徴とする 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acid（ENA）修飾を用いたタウ isoform 制御アンチセンスオリゴヌクレオチド（ENA-ASO）の開発を行った。
**【結果】**ENA-ASO の候補化合物を 43 配列設計・合成し、培養系と *in vivo* でのスクリーニングで、最も効率よくタウ遺伝子 *MAPT* の exon10 を skipping し、かつ転写に与える影響が最小であった NK-18 を選定した。この NK-18 を FTLD マウスモデル（ヒト化タウマウスで FUS 発現を抑制）に髄腔内投与（50 μg、単回）したところ、投与後 6 週間の時点で 4R-tau 発現量を正常化し、高次脳機能障害を改善させた。

タウアイソフォームのバランス異常を正常化による病態改善



# 203. ALS／FTLD および 4R タウオパチーの新規治療標的探索

石垣　診祐

*名古屋大学 大学院医学系研究科 神経変性認知症制御研究部

Key words：ALS，FTLD，4R タウオパチー，タウ，核酸医薬

## 緒　言

筋萎縮性側索硬化症（ALS）／前頭側頭葉変性症（FTLD）および進行性核上性麻痺（PSP）、大脳皮質基底核変性症（CBD）など 4 リピート（R）タウオパチーは対症療法のみしか存在せず、根本治療法の開発は喫緊の課題である。タウアイソフォームである 4R-tau と 3R-tau の比率のバランス異常がその制御因子である FUS、SFPQ の会合異常を伴って ALS／FTLD や PSP、CBD など 4R-tau 優位のタウオパチーを含む FTLD スペクトラム疾患に共通した病態変化であること［1］、FTLD マウスモデルでは過剰な 4R-tau の抑制により FTLD 症状が改善すること［2］から、4R-tau／3R-tau の発現比率制御を可能にする 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acid（ENA）修飾 antisense oligonucleotide（ASO）（ENA-ASO）製剤によって、4R-tau 優位のタウオパチー（PSP、CBD）の根本治療法を確立できるのではないかという着想に至った。

## 方　法

### 1. *MAPT* exon 10 を標的とした ENA-ASO のスクリーニング

ENA-ASO は本邦で開発された ASO であり、安定性に優れる特徴がある。タウの遺伝子 *MAPT* の exon10 の周囲に候補配列を複数設定し、ヒト培養細胞を用いて *in vitro* でのスクリーニングを、MAPT exon10 skipping を指標にして実施し、候補として NK-18 を選定した（図 1）。

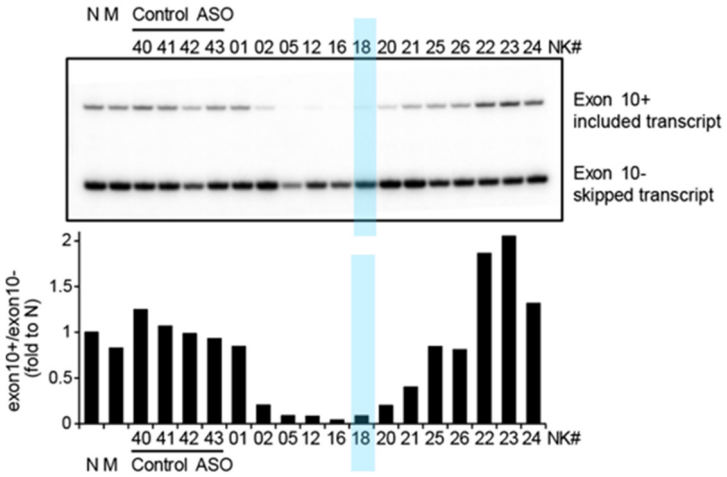



図 1. タウアイソフォームのバランス異常を正常化する ASO のスクリーニング
HEK293 細胞に合成した候補 ENA-ASO を投与し、RT-PCR で MAPT exon10 の skipping 効果を判定し、定量化したものをグラフにした。この中で skipping 効果が高く、かつ転写への影響が少ない NK-18 を選定した。

*現在の所属：滋賀医科大学 神経難病研究センター

ヒトの遺伝子 *MAPT* を標的とする ASO の評価を実施するために、マウスの内在性のタウを欠損し、ヒト *APT* の PAC clone を発現するヒト化タウマウスを用いて、NK-18 を脳室内投与することで、至適用量を決定した。さらに、FTLD マウスモデル（FUS KD マウス）に単回髄腔内投与して、タウ isoform バランス変化を指標にして薬効を評価し、高次脳機能障害および神経変性を改善するかについて検討を行った。

## 結　果

### 1. *MAPT* exon 10 を skipping する ASO、NK-18 の薬効評価

選定した NK-18 をヒト化タウマウスの髄腔内に単回投与（脳室投与）する実験を行った。RT-PCR および WB の結果から MAPT exon10 の skipping 制御できる ENA-ASO 化合物 NK-18 は、50 μg で exon10 の skipping 効果が最大になることが明らかになった（図 2）。

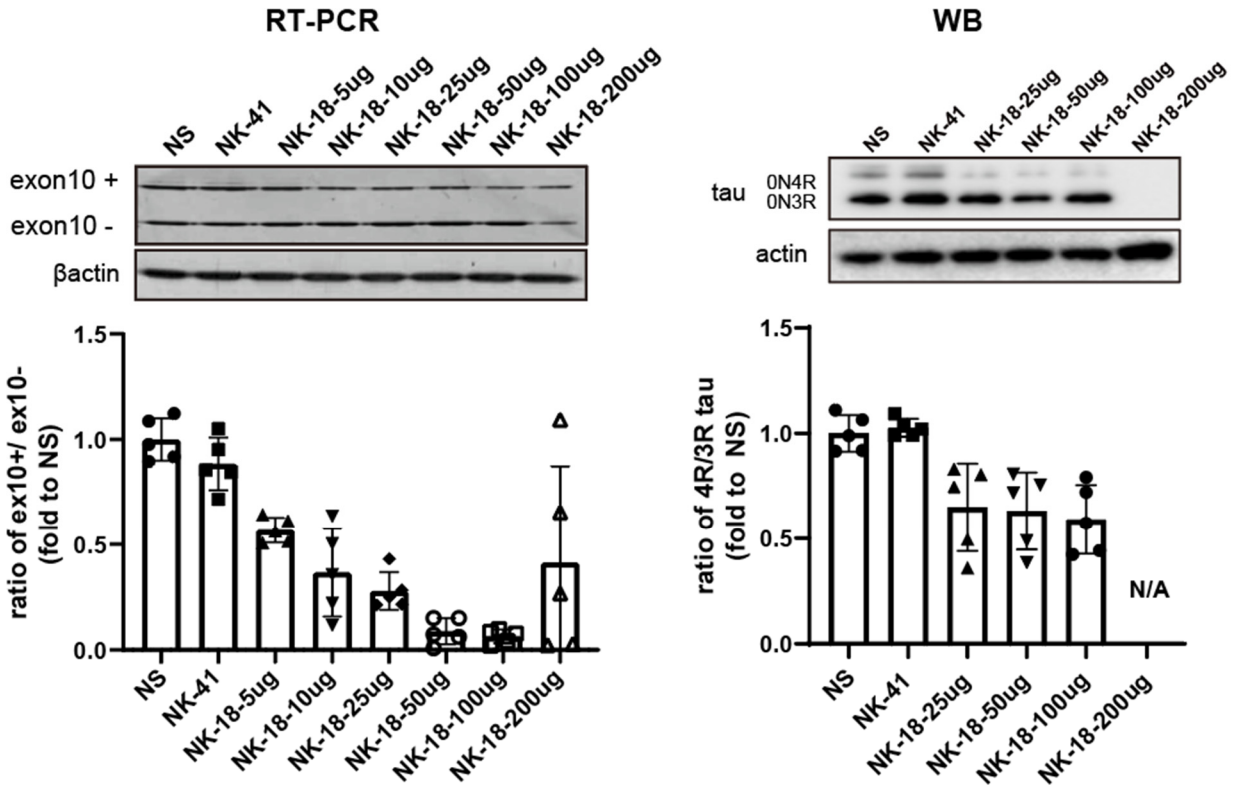



図2. ヒト化タウマウスにNK-18を濃度別に髄腔内投与した場合のMAPT exon10のskipping効果の検討
NK-18 の量を振ってヒト化タウマウスの髄腔内に投与した実験から、50 μg で最大の薬効（MAPT exon10 の skipping）が得られることを確認した（投与後 6 週）。NS：normal saline、NK-41：control ASO。

NK-18 に対するモノクローナル抗体を作製して、NK-18（50 μg）単回髄腔内投与 6 週後、免疫組織化学的に NK-18 の分布を確認すると脳実質全体に均等に NK-18 のシグナルが確認された（図 3）。

また、NK-18 の単回 50 μg 髄腔内投与後の薬効は 6～12 週後がピークとなる（図 4）

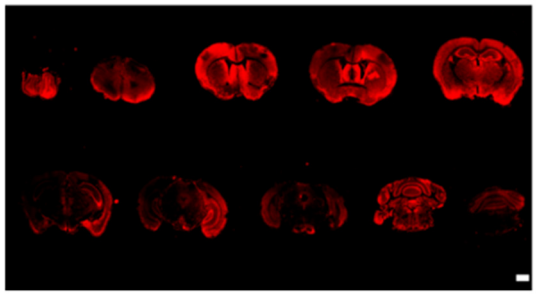


図 3. NK-18（50 μ g）単回髄腔内投与 6 週後の分布
NK-18 に対する抗体を用いて、髄腔内単回投与（50 μ g）後の NK-18 の脳組織内の分布を免疫染色法で調べた（Scale bar＝100 μ m）。NK-18 が脳実質全体に分布し、特に海馬の神経細胞に強く取り込まれていることを確認した。

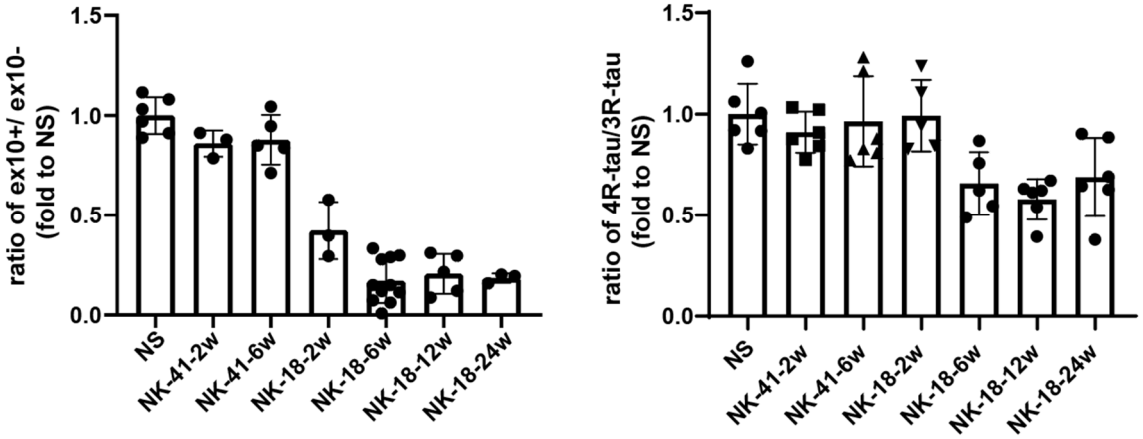



図 4. ヒト化タウマウスに NK-18 を 50 μ g 髄腔内単回投与した場合の MAPT exon10 の skipping 効果の検討
NK-18 髄腔内単回投与（50 μ g）後の MAPT exon10 の skipping を指標とした薬効の経過を調べた（左が RT-PCR、右が WB の定量結果）。少なくとも投与後 6 ヶ月まで薬効が持続することを確認した。NS : normal saline、NK-41 : control ASO。

これまでに、ALS／FTLD に関与する分子である FUS が神経細胞の核内で、同じく RNA 結合タンパク質である SFPQ と高分子複合体を形成し、タウの選択的スプライシングを制御することで神経機能や病態に関与することを明らかにしてきた。この FUS - SFPQ 複合体形成異常が ALS／FTLD のみならず PSP、CBD などの 4R 優位タウオパチーまで広く認められることを、剖検脳の海馬および前頭葉の神経細胞で病理学的に見出している［1］。脊髄の運動ニューロンで、これらのメカニズムを神経病理学的に検討したところ、同様に FUS - SFPQ の微小局在が、ALS／FTLD、PSP／CBD などの 4R 優位タウオパチーで異常を呈することが明らかになった（図 5）［3］。

この結果は、ALS、FTLD、PSP、CBD といった臨床症状の異なる神経変性疾患で、FUS - SFPQ の機能異常とタウ isoform の変化という共通の病態が基盤にあり、大脳から脊髄まで潜在的に存在することを強く示唆する。

これまでに、FUS を特異的に発現抑制する shRNA を AAV に発現させて両側海馬に stereotaxic injection により導入したマウスでは、4R-tau の増加、高次脳機能解析（elevated-plus-maze test）などで不安の欠如などの情動異常、スパインの成熟化障害を認め、FTLD に類似する病態を呈することを明らかにしてきた［2，4，5］。そこで前述の NK-18 を FTLD モデルである FUS KD マウス（タウはヒト化）に髄腔内単回投与する実験を行った。NK-18（50 μ g）単回髄腔内投与 6 週後に、tau isoform が正常化することを確認し、elevated-plus-maze test で Open arm への滞在時間が正常化することが明らかになった（図 6）。

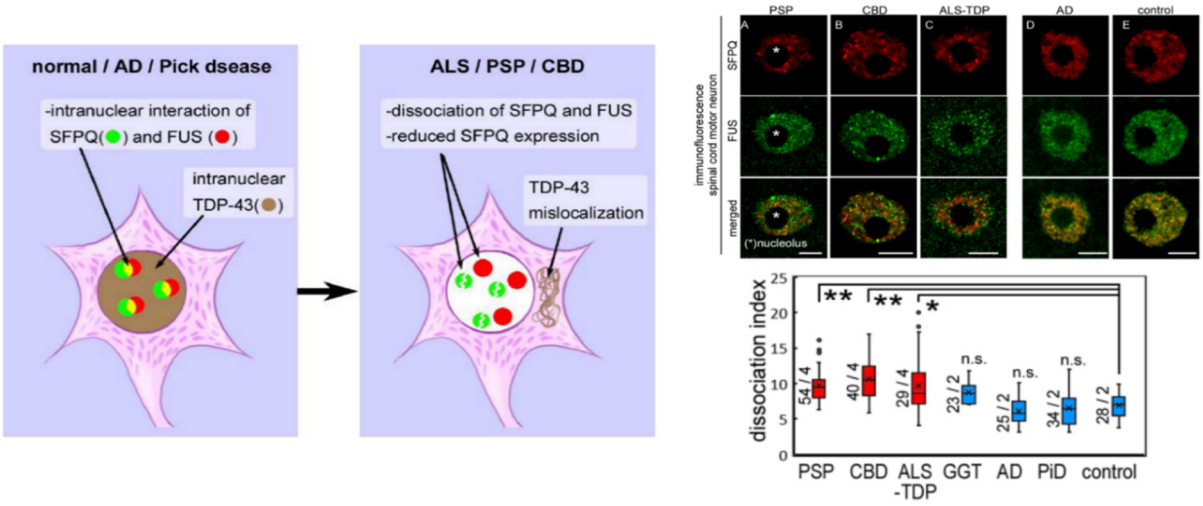



図 5. 脊髄前角の下位運動ニューロンを用いた FUS／SFPQ の微小局在性の疾患横断的な検討
FUS-SFPQ はアルツハイマー病や Pick 病では正常と同じく共局在するが、ALS／FTLD、PSP／CBD などの 4R 優位タウオパチーで局在性が低下する（Scale bars＝5μm）[3]。*P＜0.001、**P＜0.00001（Mann-Whitney U-test）。

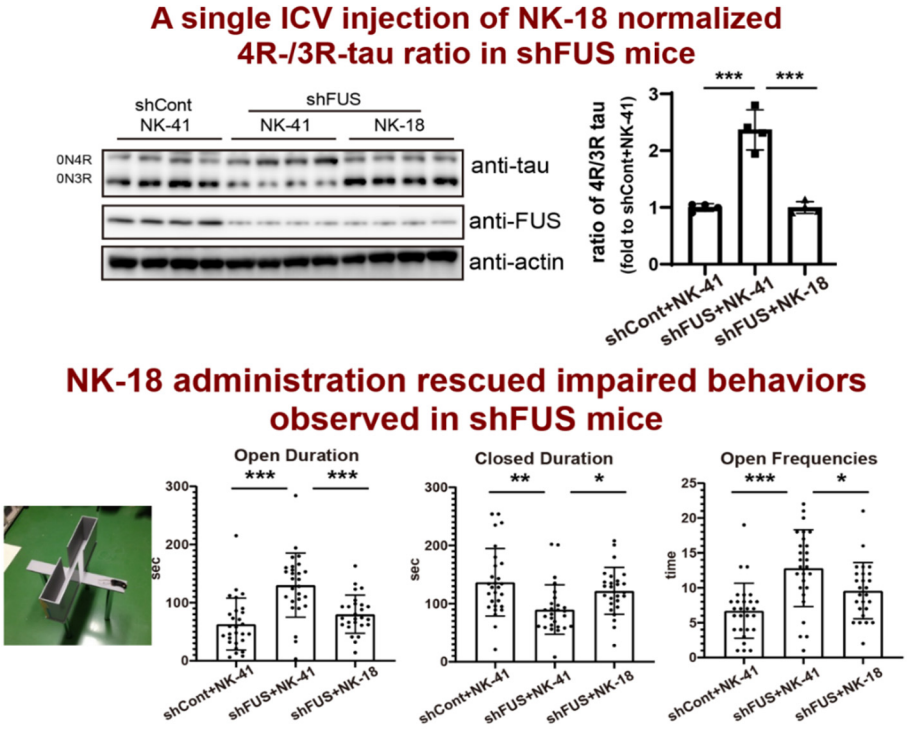



図 6. NK-18 の FTLD モデルマウスへの髄腔内単回投与による薬効
Elevated-plus maze test を用いて NK-18 の FUS KD マウスの高次脳機能障害正常化の評価を行った。Open arm への滞在時間、頻度、Closed arm への滞在時間を、control に NK-41（control ASO）を投与した群（n＝28）、FUS KD に NK-41（control ASO）を投与した群（n＝27）、FUS KD に NK-18 を投与した群（n＝26）で比較した。*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001（one-way ANOVA）。

## 考　察

ALS／FTLD や PSP、CBD など 4R-tau 優位のタウオパチーを含む FTLD スペクトラム疾患の治療薬として、4R-tau／3R-tau の発現比率制御を可能にする ENA-ASO 製剤である NK-18 を開発し、その薬効を確認した。今後は非ヒト霊長類を用いて安全性の検証を行い、first-in-human に向けての研究を進めていきたい。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、滋賀医科大学の藤岡祐介助教、名古屋大学大学院医学系研究科の佐橋健太郎准教授、遠藤邦幸助教、愛知医科大学の祖父江元学長である。

## 文　献

1） Ishigaki S, Riku Y, Fujioka Y, Endo K, Iwade N, Kawai K, et al. Aberrant interaction between FUS and SFPQ in neurons in a wide range of FTLD spectrum diseases. Brain. 2020;143(8):2398-405. Epub 2020/08/10. doi: 10.1093/brain/awaa196. PubMed PMID: 32770214.

2） Ishigaki S, Fujioka Y, Okada Y, Riku Y, Udagawa T, Honda D, et al. Altered Tau Isoform Ratio Caused by Loss of FUS and SFPQ Function Leads to FTLD-like Phenotypes. Cell Rep. 2017;18(5):1118-31. Epub 2017/02/02. doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.013. PubMed PMID: 28147269.

3） Riku Y, Iwasaki Y, Ishigaki S, Akagi A, Hasegawa M, Nishioka K, et al. Motor neuron TDP-43 proteinopathy in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. Brain. 2022;145(8):2769-84. Epub 2022/03/12. doi: 10.1093/brain/awac091. PubMed PMID: 35274674.

4） Yokoi S, Udagawa T, Fujioka Y, Honda D, Okado H, Watanabe H, et al. 3'UTR Length-Dependent Control of SynGAP Isoform alpha2 mRNA by FUS and ELAV-like Proteins Promotes Dendritic Spine Maturation and Cognitive Function. Cell Rep. 2017;20(13):3071-84. Epub 2017/09/28. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.100. PubMed PMID: 28954225.

5） Udagawa T, Fujioka Y, Tanaka M, Honda D, Yokoi S, Riku Y, et al. FUS regulates AMPA receptor function and FTLD/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. Nat Commun. 2015;6:7098. Epub 2015/05/15. doi: 10.1038/ncomms8098. PubMed PMID: 25968143