

筋萎縮性側索硬化症に対する
新規治療薬の創出に向けた研究

2021

上田 智之

目次	ページ
序論	1
第1章 機能性食品を用いた予防医学に向けて	
第1節 緒言	7
第2節 実験材料および方法	10
第3節 実験成績	20
第4節 考察	41
第2章 抗酸化に着目した新規治療薬の提言	
第1節 緒言	46
第2節 実験材料および方法	48
第3節 実験成績	50
第4節 考察	57
第3章 ヒト乳歯歯髄幹細胞を用いた治療基盤の構築	
第1節 緒言	60
第2節 実験材料および方法	62
第3節 実験成績	69
第4節 考察	85
第4章 総括および結論	88
第5章 謝辞	92
第6章 参考文献	93
第7章 略語	108

序論

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、随意筋を支配する

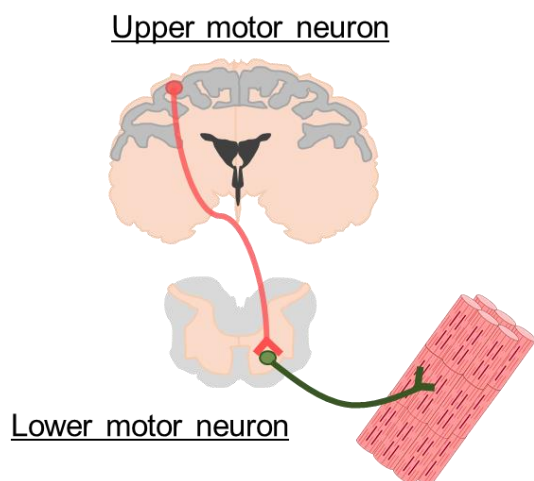
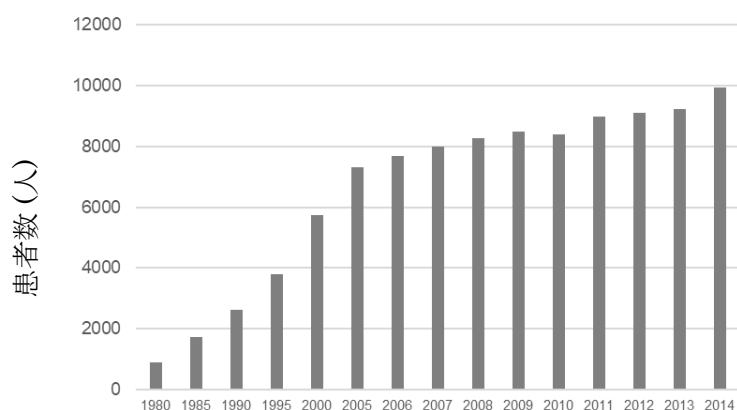


Figure 1. Overview of ALS.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a severe intractable neurodegenerative disease characterized by the degeneration of upper and lower motor neurons.

上位 (大脳皮質運動野) および下位 (脊髄全角細胞など) の運動神経の変性を伴う進行性の神経変性疾患である (Figure 1). 原因として、金属、事故などの外傷など幅広く検討されているが未だ不明である^{1,2,3}. 主に、60~70歳代で発症することが多い疾患である. 臨床症状としては、上位運動神経の障害による腱反射亢進、下位運動神経の障害による四肢の筋力低下と筋萎縮、および、球麻痺症状による嚥下障害、構音障害など

が見られ、最終的には呼吸筋麻痺により死亡する重篤な疾患として難病に指定されている. ALS の疫学的な特徴には大きな地域差がある. 欧米では、発症率



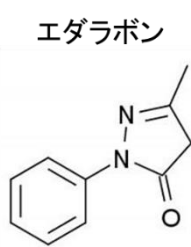
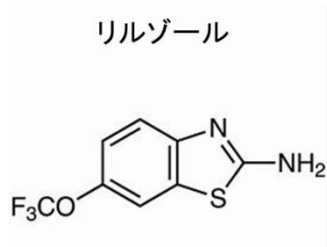
ALSの現状と展望 | ALS最前線 | 筋萎縮性側索硬化症の情報サイト「ALSステーション」より

Figure 2. Number of ALS patients.

In Japan, the number of patients with ALS is increasing every year, with the aging of society.

は 10 万人あたり年間 1.75~3 人、有病率は 10 万人あたり 10~12 人と推定されている⁴. 男性は女性に比べて孤発性 ALS のリスクが高く、世界の男女比は 1 : 1.2~1.5 となっている⁵. 本邦における患者数は 9,000 人前後であり、年々、増加傾向にある (Figure 2)⁶.

地域ベースの網羅的罹患率や発症率調査によれば、和歌山県の古座川地区において ALS の発症率が高くなっており、地理的な要因も関連している可能性がある⁶。



米国食品医薬品局 (FDA) で承認されている治療薬には、抗グルタミン酸剤であるリルゾールと、フリーラジカル消去剤であるエダラボンがある (Figure 3)。しかし、これらの薬は対症療法薬であり、生存期間を数

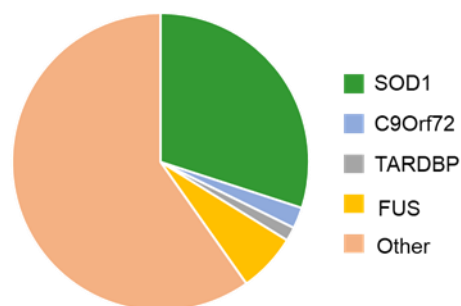
Figure 3. Drugs for ALS.

Riluzole as an anti-glutamate agent and edaravone as a free radical scavenger.

ヶ月延ばす効果しかなく、根本的な治療薬は未だ見出されていない。また、高齢化社会を迎える現代では、その患者の数は増加することが考えられ、根治を目指した治療薬の開発は急務である。

ALS の約 90%は遺伝歴がない孤発性 ALS (SALS) と呼ばれており、残りの約 10%が遺伝歴のある家族性 ALS (FALS) と報告されている⁷。FALS の内 20%近

In Asia



In Europe

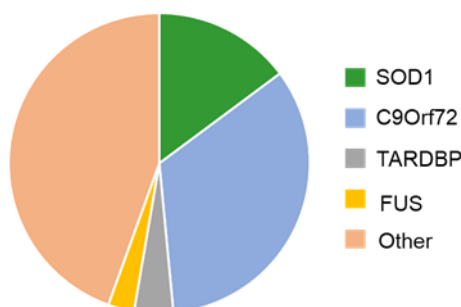


Figure 4. Percentage of gene mutations in ALS.

In Asian FALS mutations are in *SOD1* (30%), *FUS* (6.4%), *C9ORF72* (2.3%), and *TARDBP* (1.5%).

くが *copper-zinc superoxide dismutase 1 (SOD1)* の変異であることが報告されている (Figure 4)⁷。この 20 年間で、*SOD1* 以外にも 40 種類を超える ALS の原因遺伝子が報告されている (Figure 5)⁸。例えば、*chromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72)*, *TAR DNA-binding protein 43 (TARDBP)*, *fused in sarcoma / translated in liposarcoma (FUS)* などである。これらの遺伝子解析の結果から、多様な病態パスウェイが判明してきた。

Symbol	原因遺伝子	遺伝子座	遺伝形式
ALS1	<i>SOD1</i>	21q	AD
ALS2	<i>Alsin</i>	2q33	AR
ALS4	<i>Senataxin</i>	9q34	AD
ALS5	<i>Spatacsin</i>	15q21	AR
ALS6	<i>FUS</i>	16p11	AD,AR
ALS8	<i>VABP</i>	20q13	AD
ALS9	<i>Argiogenin</i>	14q11	AD
ALS10	<i>TDP-43</i>	1p36	AD
ALS11	<i>FIG4</i>	6q21	AD
ALS12	<i>OPTN</i>	10p15	AD,AR
ALS13	<i>Ataxin-2</i>	12q24	AD
ALS14	<i>VCP</i>	9p13	AD
ALS15	<i>UBQLN2</i>	Xp11	XLD
ALS16	<i>SIGMAR1</i>	9p13	AR
ALS17	<i>CHMPB2</i>	3p11	AD
ALS18	<i>PFN1</i>	17p13	AD
ALS19	<i>ErbB4</i>	2q34	AD
ALS20	<i>HNRNP1</i>	12q13	AD
ALS21	<i>Matr3</i>	5q31	AD
ALS22	<i>TUBA4A</i>	2q35	AD
ALS23	<i>ANXA11</i>	10q22.3	AD
ALS24	<i>NEK1</i>	4q33	AD
ALS25	<i>KIF5A</i>	12q13.3	AD

Figure 5. More than 40 genetic variants identified in familial ALS.

In the last 20 years, *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP*, and *FUS* have been revealed as the most commonly mutated genes in ALS.

AD: dominant, AR: recessive.

その代表的な病態パスウェイとして、過剰な小胞体ストレス、ミトコンドリア機能障害、分解システム (オートファジー, ユビキチンプロテアソーム

(Ubiquitin Proteasome System; UPS)があげられる⁹。臨床的な視点からも SALS や FALS 問わず共通のメカニズムとしてタンパク質の構造の変化に伴う、異常タンパク質の蓄積が観察される。さらに、異常なタンパク質が周囲のグリア細胞に伝播されることも、ALS の進行には大きく関与すると考えられる (Figure 6)^{10,11}。以上から、運動神経細胞内の細胞内の凝集体蓄積を抑制することが ALS に対する有効な治療ターゲットであると考えられる。

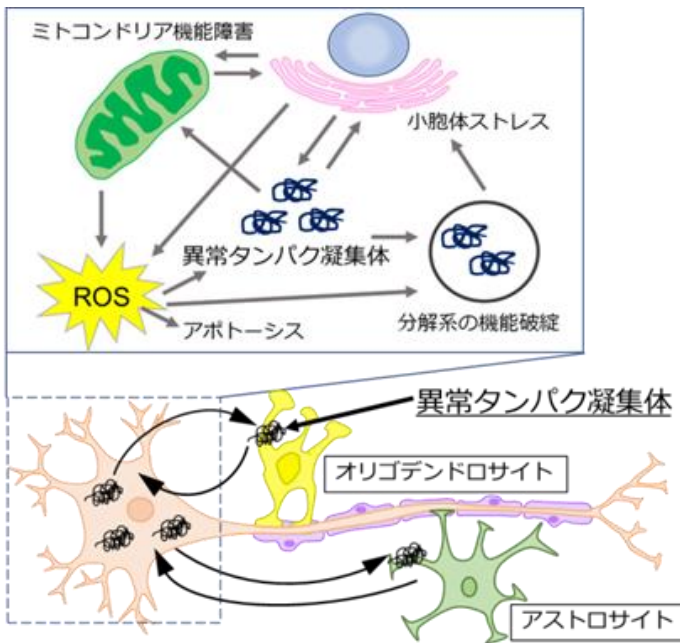


Figure 6. Motor neurons and glial cells in the patients with ALS. In motor neurons of the patients with ALS, accumulation of abnormal proteins has been observed. In addition, the transport of abnormal proteins into surrounding glial cells is thought to play a major role in the progression of ALS.

本研究においては、アジアで最も多く遺伝子変異が報告されている *SOD1* に着目した。*SOD1* は、1993 年に ALS に関連する遺伝子として初めて発見され、ALS1 とも呼ばれている¹²。

SOD1 は有毒であるスーパーオキシドを過酸化水素と酸素に不均化する抗酸化酵素である (Figure 7)。これまでに 150 を超える変異が報告されており、酵素活性の発現は変異により様々である

8. 野生型の *SOD1* が安定した 2

量体を形成するのに対し、変異型の *SOD1* はその立体構造に異常をきたし、凝集体を形成、蓄積することで細胞毒性を発現する^{13,14}。遺伝子工学的手法を用いて変異 *SOD1* を導入したマウスが作製され、ミトコンドリア機能障害、*SOD1* の凝集体蓄積、神経細胞死などを示す病態の再現モデルとして研究の進展に寄

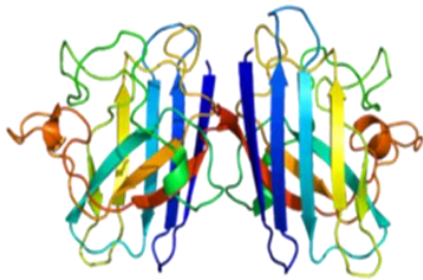


Figure 7. The structure of SOD1.
Wild-type SOD1 forms a stable dimer.

与している^{13,14,15}。しかしながら、このモデルマウスを用いて ALS に有効な治療薬の研究が多く行われてきにもかかわらず、ALS 患者に対して福音をもたらす有効な治療薬は未だ見出されていない。このように、ALS の新規治療薬の発見は非常に困難である。

ALS 治療薬の開発が難渋している原因として大きく 3 点考えられる。まず、1 つ目は ALS の診断確定時には、既に多くの運動神経が不可逆的に脱落し、症状が進行していることである。ALS を始めとした神経変性疾患では、症状が発症する数十年前から細胞内凝集体の蓄積が見られ、その進行を抑制することが重要である。その為、発症以前から予防医学の観点より検討、考察を行う必要がある。次に 2 つ目は、既存薬であるエダラボンの効果が極めて限定的であることが考えられる。その為、エダラボンよりも広域なスペクトルを有する化合物の探索が必要である。最後に 3 つ目は、ALS の発症及びその進行が単一薬剤、単一のシグナルで抑制できるほど単純ではないことが考えられる。その為、ALS を始めとする病態が複雑な疾患に対しては、複合的に作用し進行を抑制する薬剤の探索を行う必要がある。

そこで、著者はこれらの課題を克服し、ALS に対する真に有効な治療薬の創出のため本研究をおこなった。第 1 章では、まず薬剤の有効性を正確にかつ、俊敏に計測するためのモデル細胞を作製した。さらに、このモデル細胞を用いて ALS に対する有効な予防薬シーズを探索した。有効な予防薬のシーズを同定することができれば、難治性の神経変性疾患に対する予防薬の候補となり患者の QOL を上昇させることができる。第 2 章では、抗酸化作用の観点から検討を行った。既存薬と同等、もしくはそれ以上の効果を有する化合物を発見することで、今後それらをシーズとしてさらに有効な治療薬開発ができると考えて

いる。第 3 章では、複合的な神経保護作用を期待して幹細胞を用いて検討を行った。幹細胞は再生医療の分野でも用いられており、ALS を始めとする神経変性疾患に対する保護効果を認めることができれば、今後さらに幹細胞の有効活用が可能であると考えられる。

第1章 機能性食品を用いた予防医学に向けて

第1節 緒言

ALS を始めとした神経変性疾患においては、発症以前より細胞内に異常タンパク質が蓄積しており、それに伴い神経細胞の脱落が不可逆的に進行していることが知られている (Figure 8)²。その為、発症以前から細胞内凝集体の蓄積、またそれに伴う酸化ストレスや小胞体ストレスなどを予防することで ALS 発症の抑制につながると考えられる。また、高齢者発症型が多い ALS に対して有効な予防薬を探索する上で、高齢者でも安全にかつ、日常的に摂取可能であることが最重要である。

このような背景から機能性食品のブラジル産グリーンプロポリス (EBGP) に着目した。プロポリスはミツバチが集めた木の芽や樹液と、自らの唾液を混ぜ合わせて作った固形の物質である。プロポリスは産地や起源植物により含有成分が異なるいくつかのタイプが存在する。色や香り、安定的な品質と生産量などから EBGP が、日本国内のプロポリス市場の 8 割を占めている。プロポリス

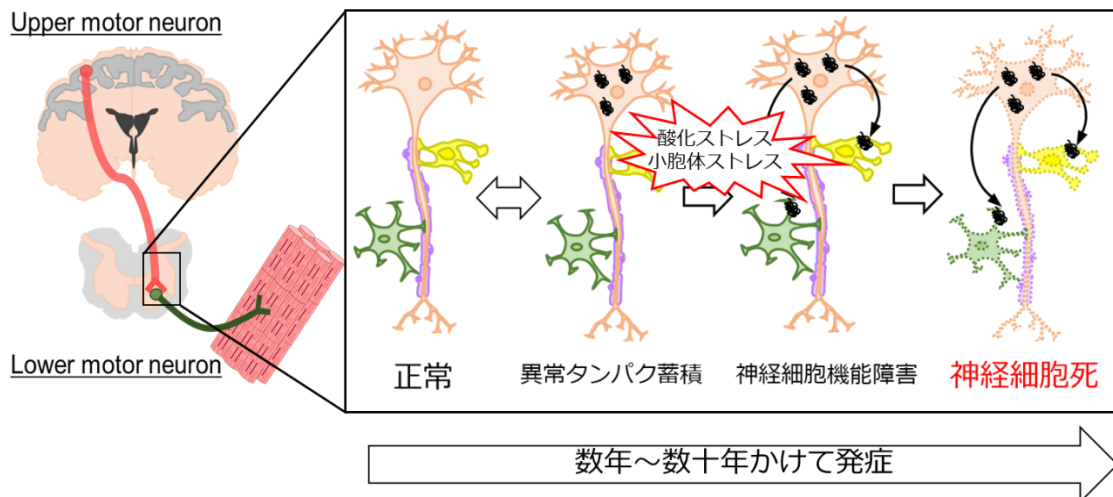


Figure 8. The accumulation of aggregation proteins, before the onset of the disease.

In neurodegenerative diseases such as ALS, it is known that aggregation proteins accumulate, before the onset of disease, which leads to the irreversible progression of neuronal loss.

は抗炎症作用や抗酸化作用などの多くの生物学的や薬理学的作用を持っている^{16,17,18,19}。EBGP にはフラボノール類、桂皮酸誘導体などの様々な天然化合物が豊富に含有されている (Table 1)。そこで、第 1 章においては EBGP 及び、その含有成分であるフラボノール類、桂皮酸誘導体の変異 SOD1 毒性に対する神経保護効果について検討した。

フラボノール類や桂皮酸誘導体は種類によって特徴や作用が異なるが、多くが強力な抗酸化作用を持っており、機能性食品などにも活用される。先行研究より、フラボノール類はタンパク分解系の一つであるオートファジーの活性化作用があると報告されている^{20,21}。桂皮酸誘導体には *artepillin C* (artC), *p-coumaric acid* (p-CA) などが含まれており、フラボノール類同様に桂皮酸誘導体にも抗酸化作用、オートファジーの活性化などが数多く報告されている^{22,23,24}。また、ラパマイシンなどのオートファジー活性化薬がアルツハイマー病、パーキンソン病の神経変性モデル動物において、異常タンパク蓄積の除去を促進することで保護効果を有している事が報告されている^{25,26}。そのため、ALS においても異常タンパク質とタンパク質分解系との関連について数多く報告されており、治療薬候補の 1 つとしてオートファジーの活性化薬が提言されている²⁷。

フラボノール類や、桂皮酸誘導体において変異 SOD1 に対する保護効果を確認することができれば、それらを含有している EBGP にはさらに付加価値がつけられると考えている。前述のとおり、ALS を始めとする神経変性疾患は症状が発症してから進行を抑制することは困難である。その為、このような日常的に摂取可能である EBGP などのサプリメントが今後の予防医療のための足掛かりとなり得る。

EBGP中の各成分含有量 (mg / g)

Ingredients	
Artepillin C	69.92
Baccharin	21.35
Drupanin	15.69
Kaempferol	0.75
Dihydrokaempferide	7.87
Betuletol	7.11
Kaempferide	14.27

Table 1. Quantitative value of each component per extract (weight) measured by HPLC method.

第 2 節 実験材料及び方法

2-1 薬物及び試薬

本実験では以下の薬物及び試薬を用いた。

メタノール (methanol), エタノール (ethanol), ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS), 塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl), スキムミルク (skim milk), トリスヒドロキシメチルアミノメタン [tris (hydroxymethyl) aminomethane: tris], リン酸二水素ナトリウム・二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), リン酸水素ナトリウム・12 水和物 (disodium hydrogen phosphate dodecahydrate: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate: KH_2PO_4), 塩酸 (hydrochloric acid: HCl), ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (polyoxyethylene sorbitan monolaurate: Tween), 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol), ブロモフェノールブルー (bromophenol blue), フッ化フェニルメチルスルホニル (phenyl methylsulfonyl fluoride: PMSF), Ultrapure DNase / RNase-Free Distilled Water (DW), N,N-dibutyladenosine 3', 5'-phosphoric acid (dbcAMP), シルベストステイン ワン, protease inhibitor, phosphatase inhibitor は Nacalai tesque, Inc (Kyoto, Japan) より購入した。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物 (ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid disodium salt, dehydrate EDTA), デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate), アセテート (acetate), テトラメチレンジアミン [N,N,N',N' - (tetramethylethylenediamine: TEMED)], 水酸化ナトリウム (sodium hydroxide: NaOH), 塩化カリウム (potassium chloride: KCl), ペルオキシ二硫酸アンモニウム (ammonium peroxodisulphate: APS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), D-MEM (Low glucose), 正常ヤギ血清 (Normal Goat Serum), Iron (II) sulfate heptahydrate, Lipofectamine 2000, Opti-MEM は Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA) より購入した。臭化エチジウム (ethidium

bromide: EtBr), precision plus protein dual color standards は Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA) より購入した。BCA protein Assay Kit, ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA), ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS), Cell ROX[®] GREEN, Mito SOX[®] RED は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) より購入した。アプロチニン (aprotinin), ロイペプチン (leupeptin), β -actin antibody は Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) より購入した。ECL Prime western blotting detection system は GE Healthcare UK Ltd (Buckinghamshire, England) より購入した。Living Colors[®] mCherry Monoclonal Antibody は Takara Bio Inc. (Shiga, Japan) より購入した。HiSpeed[®] Plasmid Midi Kit は QIAGEN (Hilden, Germany) より購入した。Cell Counting Kit-8, Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST は Dojindo molecular technologies, inc (Dojindo, Tokyo, Japan) より購入した。kaempferol, kaempferide, p-CA, artC, Silver Stain Kit, Chloroquine, 過酸化水素 (H₂O₂), 硫酸鉄(II)七水和物 (Fe₂SO₄) は, Fujifilm-wako chemicals company (Fujifilm, Tokyo, Japan) より購入した。LC-3 antibody, p62 antibody, CHOP antibody, Bip antibody は Cell Signaling (Danvers, MA, USA) より購入した。5,5-dimethyl-1-pyrroline N-Oxide (DMPO) は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (TCI, Tokyo, Japan), Jeol Resonance は, JEOL Ltd (Tokyo, Japan) より購入した。EBGP は API 株式会社 長良川リサーチセンターよりご供与していただいた。

2-2 実験方法

研究方法の概要は、Figure 9 に示した。

N2a 細胞をそれぞれの個数で播種した後、kaempferol, kaempferide, p-CA, artC を種々の濃度で処置し、その 24 時間後もしくは 48 時間後細胞生存率、細胞毒性、酸化ストレス、小胞体ストレスまたオートファジーの活性化の観点から検討を行った。

2-2-1 SOD1^{WT}-mCherry プラスミドベクター作製

pOTB7-SOD1 ベクターを鋳型とし primeSTAR[®] MAX DNA Polymerase 25 μ L, 及びプライマー 10 pmol を用いて SOD1 の cDNA をサブクローニングした。フォワードプライマー及びリバースプライマーは Table 2 に示した。反応条件は初期熱変性 (98°C, 10 秒) 後、熱変性 (98°C, 10 秒), アニーリング (55°C, 5 秒), 及び伸長反応 (72°C, 5 秒) を 45 サイクル行い、最終的な伸長反応 (72°C, 5 分) を行った。その後、1%アガロースゲルで PCR 産物を 100 V, 30 分泳動した。泳動後ゲルをビュアブルーステイン KANTO に 5 分間浸透し、milliQ 水で脱色後バンドの確認を行った。バンドを切り出し、wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega, Madison, WI, USA) を用いて精製した。精製した PCR 産物 25 μ L, 制限酵素 (BamHI, HindIII) をそれぞれ 1 μ L, 及び 10xSURE / Cut Buffer B 2 μ L を混和し 37°C で 1 時間静置した。pmCherry-N1 ベクター 2 μ L 及び milliQ 水 14 μ L を混和し、37°C で 1 時間静置した。制限酵素処理産物を 1%アガロースゲルで 100 V, 30 分、泳動後ゲルをビュアブルーステイン KANTO に 5 分浸透し、milliQ 水で脱色後のバンドの確認を行った。バンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega, Madison, WI, USA) を用いて精製した。その後、PCR 産物の制限酵素処理産物 5 μ L, ベクターの制限酵素処理産物 5 μ L, 及び Ligation high 5 μ L を混和し 16°C, 30 分静置した。氷上で E.coli DH-5 α コンピテントセル

を融解させた後、ライゲーション産物 5 μ L 添加し、1 秒間攪拌した。氷上で 5 分間静置し、直ちに 42°C, 45 秒間静置した。1 秒間攪拌後、全量をカナマイシン含有 LB 寒天培地プレートに塗布し、37°C, 16 時間培養した。カナマイシン含有 LB 寒天培地プレートに形成されたコロニーをピックアップし、カナマイシン含有 LB 液体培地 2 mL で 37°C, 17 時間, 250 rpm で振とう培養した。振とう培養したものうち 1.5 mL を 3 分間, 10000 rpm で遠心分離し、上清を破棄した。その後、Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit (Life Technologies) を使用して SOD1^{WT}-mCherry プラスミドベクターを精製して得た。得た SOD1^{WT}-mCherry プラスミドベクターは、シーケンスにて確認した。

Table 2 サブクロニング用 PCR プライマー塩基配列

Primer	sequence (黄色部分は制限酵素サイト)
HindIII-SOD1	5'-GTTAAGCTTATGGCGACGAAGGGGCCGTGTGC-3'
SOD1-BamH1	5'-GCAGGATCCGGTTGGGCGATCCCAATTACACC-3'

2-2-2 変異型 SOD1-mCherry プラスミドベクター作製

SOD1^{WT}-mCherry プラスミドベクター 2 μ L を鋳型にして、primeSTAR[®] MAX DNA Polymerase 25 μ L, 及びプライマー 10 pmol, milliQ 水 23 μ L を混和し PCR を行った。フォワードプライマー及びリバースプライマーは Table 3 に示した。反応条件は初期熱変性 (98°C, 10 秒) 後、熱変性 (98°C, 10 秒), アニーリング (55°C, 5 秒), 及び伸長反応 (72°C, 60 秒) を 30 サイクル行い、最終的な伸長反応 (72°C, 5 分) で行った。その後、ライゲーション, 形質転換, プラスミドベクターの精製を上記 2-2-1 に従い行い、SOD1^{G85R}-mCherry プラスミドベクターを得た。得たそれぞれのプラスミドベクターは、シーケンスにて確認した。

Table 3 Primer sequence (黄色はそれぞれの変異部分)

SOD1 G85R Forward	5'-GACTTGC G GCAATGTGACTGCTGACAAA-3'
SOD1 G85R Reverse	5'-CACATTG G GCAAGTCTCCAACATGCCT-3'
SOD1 G93A Forward	5'- GCTGACAAAGATG C TGTGGCCGATGTG-3'
SOD1 G93A Reverse	5'- CACATCGGCCACA C CATCTTTGTCAGC-3'

2-2-3 異常タンパク蓄積モデル細胞

マウス神経芽細胞腫である Neuro2a (N2a) 細胞に Lipofectamine 2000 を用いて *mCherry (mock)*, *SOD1^{WT}-mCherry (SOD1^{WT})*, *SOD1^{G85R}-mCherry (SOD1^{G85R})*, 遺伝子をそれぞれ導入した. 遺伝子導入して 24 時間後にオールインワン蛍光顕微鏡にて観察することで mCherry 陽性の変異 SOD1 の封入体を確認できた. また, 遺伝子導入して 24 時間後に, 培地に 2 mM dbcAMP を加えた low glucose DMEM の混合培地 (low glucose DMEM : DMEM=4 : 1) に置換し, その後 48 時間神経分化誘導させることで細胞死が見られた. 過去の報告より, 変異 SOD1 遺伝子が SOD1 封入体形成, 細胞死を誘導させているものを変異 SOD1 毒性モデル細胞とした²⁸.

2-2-4 SOD1 タンパク蓄積観察

乾熱滅菌したカバーガラスを敷いた 12 well plate に N2a 細胞を播種し, 70~80 %コンフルエントになるまで培養した. その後, Lipofectamine 2000 を用いて *mock*, *SOD1^{WT}* 及び, *SOD1^{G85R}* 遺伝子をそれぞれ導入し, 遺伝子導入して 24 時間後に kaempferol, kaempferide, p-CA, artC を種々の濃度処置した. その 24 時間後に 4 %パラホルムアルデヒドを用いて固定した. In Cell Analyzer 2200 にて, 1 サンプル当たり 2000 細胞を撮影し, 細胞内に 2 個以上の mCherry 陽性蓄積が見られる細胞数をカウントした.

2-2-5 Reactive Oxygen Species (ROS) の測定

活性酸素種により産生される ROS を検出するために CellROX[®] GREEN, MitoSOX[®] RED を用いた. 乾熱滅菌したカバーガラスを敷いた 12 well plate に N2a 細胞を播種し, 70~80%コンフルエントになるまで培養した. その後, Lipofectamine 2000 を用いて *mock*, *SOD1^{WT}* 及び, *SOD1^{G85R}* 遺伝子をそれぞれ導入した. 遺伝子導入してから 24 時間後, kaempferol, kaempferide, ArtC, p-CA を種々の濃度処置した. CellROX[®] GREEN については, p-CA を処置した 24 時間後に, 終濃度 5 μ M となるように CellROX[®] GREEN を細胞に 37°C で 30 分間処置した後, 4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し, VECTASHIELD Mounting Medium で封入したものをサンプルとして保存した. MitoSOX[®] RED については, p-CA を処置した 24 時間後に, 終濃度 5 μ M となるように MitoSOX[®] RED を細胞に 37°C で 30 分間処置した後, 4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し, VECTASHIELD Mounting Medium で封入したものをサンプルとして保存した. サンプルを共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700) にて観察, 撮影した後, ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて蛍光強度を測定した.

2-2-6 ウェスタンブロット法

N2a 細胞を 6 well plate に播種し, 70~80%コンフルエントになるまで培養した. その後, Lipofectamine 2000 を用いて *SOD1^{WT}*, *SOD1^{G85R}* 遺伝子をそれぞれ導入し, 遺伝子導入して 24 時間後に kaempferol, kaempferide, ArtC, p-CA を種々の濃度処置した. 24 時間後 PBS で洗浄し, タンパク質抽出まで -80°C に保存した. タンパク質抽出は, 0.1% TritonX-100, protease inhibitor, phosphatase inhibitor を含む RIPA buffer [50 mM Tris HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1% SDS, 1% NP-40] を用いた. RIPA buffer を 150 μ L を 6 well

plate の各 well に添加し、15 分間水中に静置させ、1.5 mL マイクロチューブに回収した。その後、12,000×g, 4°C, 30 分間遠心した。遠心した上清を回収し、サンプルとして用いた。また、SOD1 タンパク蓄積を評価する際は 1% TritonX-100 を含んだ TNE buffer [50 mM Tris HCl (8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 µg / ml aprotinin, 1 µg / ml leupeptin, 1 mM PMSF] で溶解し遠心後、上清を soluble 分画とした。また、残りの沈殿物に 2% SDS を加えた TNE buffer を 100 µL 加え、ホモジナイザー (Pycotron, Microtec Co., Chiba, Japan) を用いてホモジネート処理したものを insoluble 分画とした。

SDS ポリアクリルアミドゲルを泳動装置にセットし、容器に running buffer (25 mM Tris, 190 mM Glycine, 3.5 mM SDS) を入れ、ゲルを取り付けた泳動装置に浸した。泳動装置の中にも running buffer を入れた。1 well 当たりの添加量は分子量マーカーを 5 µL, 各サンプルを 15 µg となるように添加した。サンプルを添加後、200 V, 300 mA, 45 分の条件で泳動した。転写膜は、メタノールに 15 秒間浸透し、超純水に 10 分間浸した。その後、transfer buffer (25 mM tris, 192 mM Glycine, 20% (v/v) methanol) に 10 分間浸した。陽極側から、ろ紙, transfer buffer に浸した転写膜, ゲル, ろ紙の順番に組み、100 V, 500 mA, 60 分の条件で転写した。転写後、転写膜を 5% skim milk に浸し、60 分間ブロッキングした。0.05% Tween TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) で洗浄後、5% skim milk で希釈した一次抗体を用いて 4°Cで一晩反応させた。0.05% Tween TBS で洗浄後、3% skim milk で二次抗体を希釈して室温で 30 分間反応させた。0.05% Tween TBS で洗浄した後、ECL prime に 5 分間浸した。その後、Fusion system (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。なお、リン酸化タンパク質を検出する際、skim milk で行っていたものを、全て BSA に変更した。

一次抗体には、mouse anti-mCherry antibody (1:2000), rabbit anti-LC3 antibody (1:2000), rabbit anti-p62 antibody (1:2000), rabbit anti-bip antibody (1:2000), rabbit

anti-chop antibody (1:2000)を用いた。二次抗体には HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2000), HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (1:2000) を用いた。

タンパク質の発現強度は、Multi Gauge Ver 3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて解析した。バンドの強度を数値化し、個々の値を算出した。

2-2-7 細胞生存率測定

96 well plate に N2a 細胞を 1.0×10^4 個 / well になるように播種し、24 時間後に Lpofectamine 2000 を用いて *mock*, *SOD1^{WT}*, *SOD1^{G85R}* 遺伝子をそれぞれ導入した。遺伝子導入して 24 時間後に、培地に 2 mM dbcAMP を加えた low glucose DMEM と DMEM の混合培地に置換し、その後 48 時間かけて神経細胞死を誘導させた。また、kaempferol, kaempferide, ArtC, p-CA を種々の濃度処置し、24 時間後、生細胞数測定試薬 (Cell Counting Kit 8) を各 well に 10 μ L ずつ添加し、37°C, 2 時間 30 分インキュベーターで静置した後、細胞生存率を測定した。

2-2-8 細胞毒性計測

96 well plate に N2a 細胞を 1.0×10^4 個 / well になるように播種し、24 時間後に Lpofectamine 2000 を用いて *mock*, *SOD1^{WT}*, *SOD1^{G85R}* 遺伝子をそれぞれ導入した。遺伝子導入して 24 時間後に、培地に 2 mM dbcAMP を加えた low glucose DMEM と DMEM の混合培地に置換し、その後 48 時間かけて神経細胞死を誘導させた。また、kaempferol, kaempferide, ArtC, p-CA を種々の濃度処置し、24 時間後、添付のプロトコールに従い LDH アッセイキットを用いて計測した。

2-2-9 電子スピン磁気共鳴 (ESR) を用いたヒドロキシラジカル (\cdot OH) の測定

Center field 330 mT, sweep width 1.5×10 mT, sweep time 4 min, field modulation width 2×0.1 mT, amplitude 5.0×100 , time constant 0.3s, microwave power 4.0 mW

の条件で測定した。・OH 消去能はマンガンマーカ―に対する相対的な比較により検討した。・OH はフェントン反応により生成させた。測定はサンプル溶液 (50 μ L), 72 mM DMPO (50 μ L), 2 mM H₂O₂ (50 μ L), 0.2 mM FeSO₄ (50 μ L) を混合させ、セルにいれ 1 分間静置した後、強度を Jeol Resonance により測定した。

2-2-10 銀染色を用いた不溶性分画の定量

泳動後、シルベストステインワンのプロトコールに従いゲルを染色した。得られた染色像を、スキャナーで読み込み ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて定量解析を行った。

2-2-11 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的な比較は、Stat View を用いて多群間解析については分散分析以後、Bonferroni / Dunn test により行った。危険率が 5%未満を有意差ありとした。

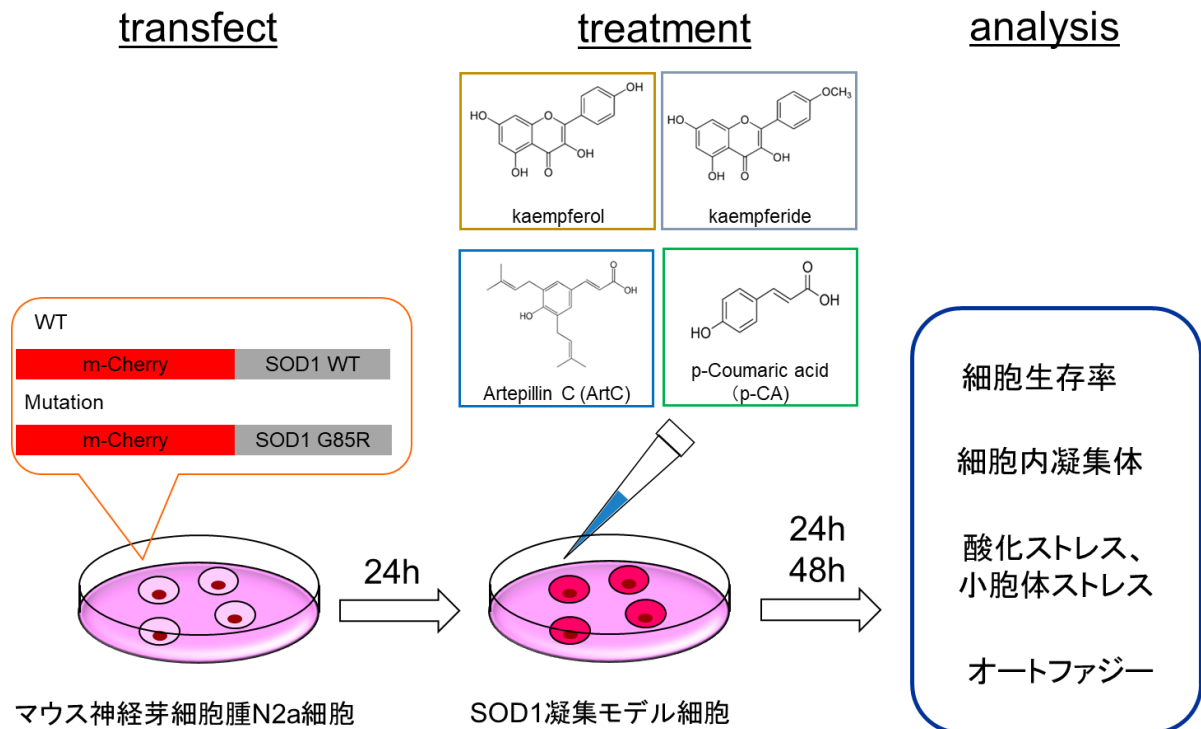


Figure 9. Time course for experimental procedures including cell seeding, treatment of kaempferol, kaempferide, ArtC and p-CA, and analysis by using N2a cells.

The transfection of mCherry, SOD1^{WT}-mCherry, and SOD1^{G85R}-mCherry in N2a cells was performed using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. After transfection, the cells are incubated with or without kaempferol (0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M and 10 μ M), kaempferide (5 μ M, 15 μ M, 30 μ M and 50 μ M) p-CA (1 nM, 100 nM and 1 μ M) and ArtC (50 nM, 500 nM and 1 μ M).

第3節 実験成績

3-1 変異 SOD1 毒性モデル細胞の構築

変異 SOD1 毒性に対する保護効果を検討するにあたり、簡便で適切なモデル系の作製が重要であると考えた。そこでまず、*SOD1^{G85R}* 遺伝子を導入した変異 SOD1 毒性モデル細胞 (*SOD1^{G85R}* 細胞) を作製した。以前の報告通り *SOD1^{WT}* 遺伝子を導入した N2a 細胞 (*SOD1^{WT}* 細胞) と比較して、*SOD1^{G85R}* 細胞では細胞内に変異 SOD1 タンパク質の蓄積が見られた (Figure 10A)²⁹。また、ウェスタンブロット法を用いて生化学的に変異 SOD1 蓄積を検討した。*SOD1^{G85R}* 細胞では不溶性の insoluble 分画にて蓄積の割合が増加していた (Figure 10B)。さらに、変異 SOD1 による神経細胞死について検討した。*SOD1^{WT}* 細胞と比較して *SOD1^{G85R}* 細胞では約 60%まで生存率が低下していた (Figure 10C)。病理所見において特徴的にみられる細胞内凝集体の蓄積や神経細胞死を再現したことから、変異 SOD1 毒性を評価する簡易的なモデル細胞系を作製できたと考えられる。

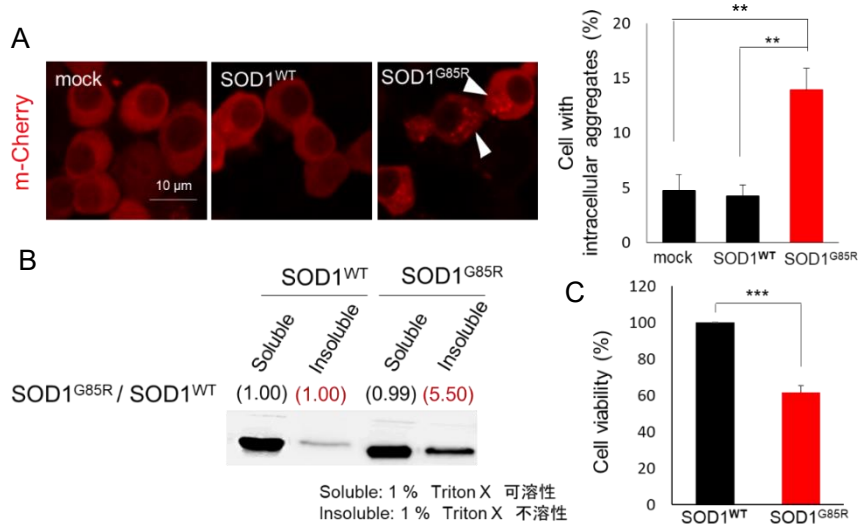


Figure 10. Mutant SOD1-induced neurotoxicity.

(A) Representative fluorescent microscopy images of N2a cells expressing mCherry-SOD1^{WT} or mCherry-SOD1^{G85R}. The arrowheads indicate the intracellular SOD1 aggregates. (B) Immunoblot analysis of mCherry with a 1% Triton X-100 insoluble fraction. (C) N2a cells expressing mCherry-SOD1^{WT} or mCherry-SOD1^{G85R} were incubated for 48 h in the differentiation medium. The cell viability was measured by MTT assay. SOD1^{G85R} caused neurotoxicity *via* the formation of insoluble aggregates. ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

3-2 変異 SOD1 毒性に対する EGBP の保護効果

3-1 で作製したモデル系を用いて EGBP の効果を検討した。 *SOD1^{WT}* や *SOD1^{G85R}* の遺伝子を導入した 24 時間後 EGBP (20 ng/ml) を処置し、異常タンパク質の蓄積への影響や神経保護効果について検討した。結果、EGBP により変異 SOD1 細胞内凝集体の蓄積が抑制された (Figure 11A,B)。さらに、生化学的にも同様に検討したところ不溶性の insoluble 分画において変異 SOD1 の蓄積が減少していた (Figure 11C,D)。さらに、細胞生存率について検討を行った結果、EGBP により変異 SOD1 由来の神経毒性が抑制された (Figure 11E)。

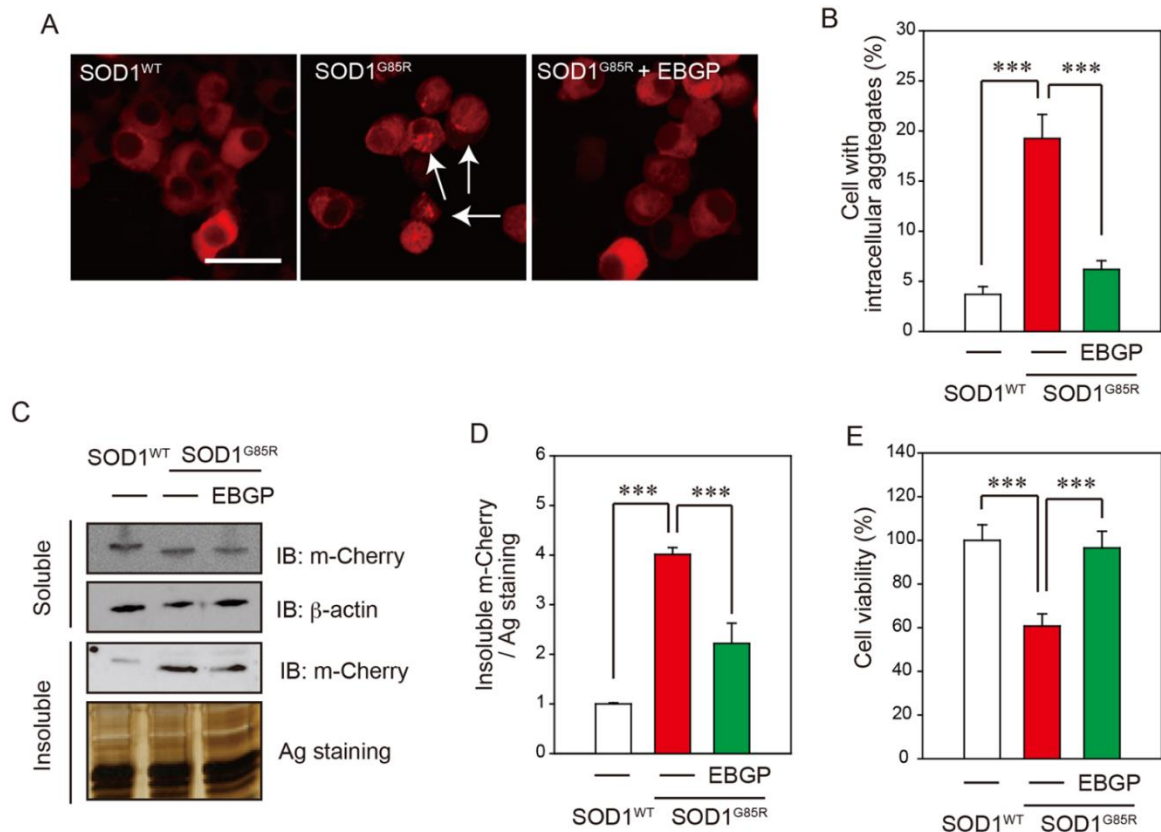


Figure 11. EBGP protected SOD1^{G85R}-induced neurotoxicity via the reduction of the aggregates of SOD1^{G85R}. (A) Representative fluorescent microscopy images of N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} incubated for 24 h with 20 ng/mL EBGP. The arrowheads indicate the intracellular SOD1 aggregates. (B) Quantified data of intracellular SOD1 aggregates are expressed as mean \pm S.E.M from three independent experiments. In each experiment, at least 2000 cells were counted. (C) Reduction of Triton-insoluble mutant SOD1^{G85R} by EBGP. After treatment of 20 ng/mL EBGP, N2a cells expressing SOD1^{G85R} were lysed with 1% TritonX-100. Triton-insoluble fraction was resuspended with 2% SDS and analyzed with immunoblotting. (D) The density of Triton-insoluble mutant SOD1^{G85R} is given as mean \pm S.E.M from three independent experiment, based on the density of Triton-insoluble mutant SOD1^{WT}. (E) N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} were treated with 20 ng/mL EBGP. The cell viability was measured by MTT assay. *** p < 0.001. Scale bar: 10 μ m.

3-3 変異 SOD1 毒性に対する kaempferol, kaempferide の保護効果

EBGP にはフラボノイドのなかでもフラボノール類 (kaempferol, kaempferide) が豊富に含まれている (Figure 12A Table 1). そこで, kaempferol 及び kaempferide の効果を検討した. *SOD1^{WT}* や *SOD1^{G85R}* の遺伝子を導入した 24 時間後 kaempferol (0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M), kaempferide (5 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 50 μ M) の濃度で処置し, 異常タンパク質の蓄積への影響や神経保護効果について検討した. 結果, *SOD1^{G85R}* 細胞では細胞内に変異 SOD1 由来細胞内凝集タンパク質の蓄積が見られた. 一方で, kaempferol や kaempferide を処置することでそれらの蓄積が抑制されていた (Figure 12B,C). さらに, 生化学的にも同様に検討したところ不溶性の insoluble 分画において kaempferol や kaempferide により蓄積が減少していた (Figure 12D,E). 細胞毒性に関しても, *SOD1^{G85R}* 細胞では細胞生存率が有意に低下したのに対し, kaempferol 及び kaempferide を処置した群に関しては, 細胞生存率が回復していた (Figure 12F).

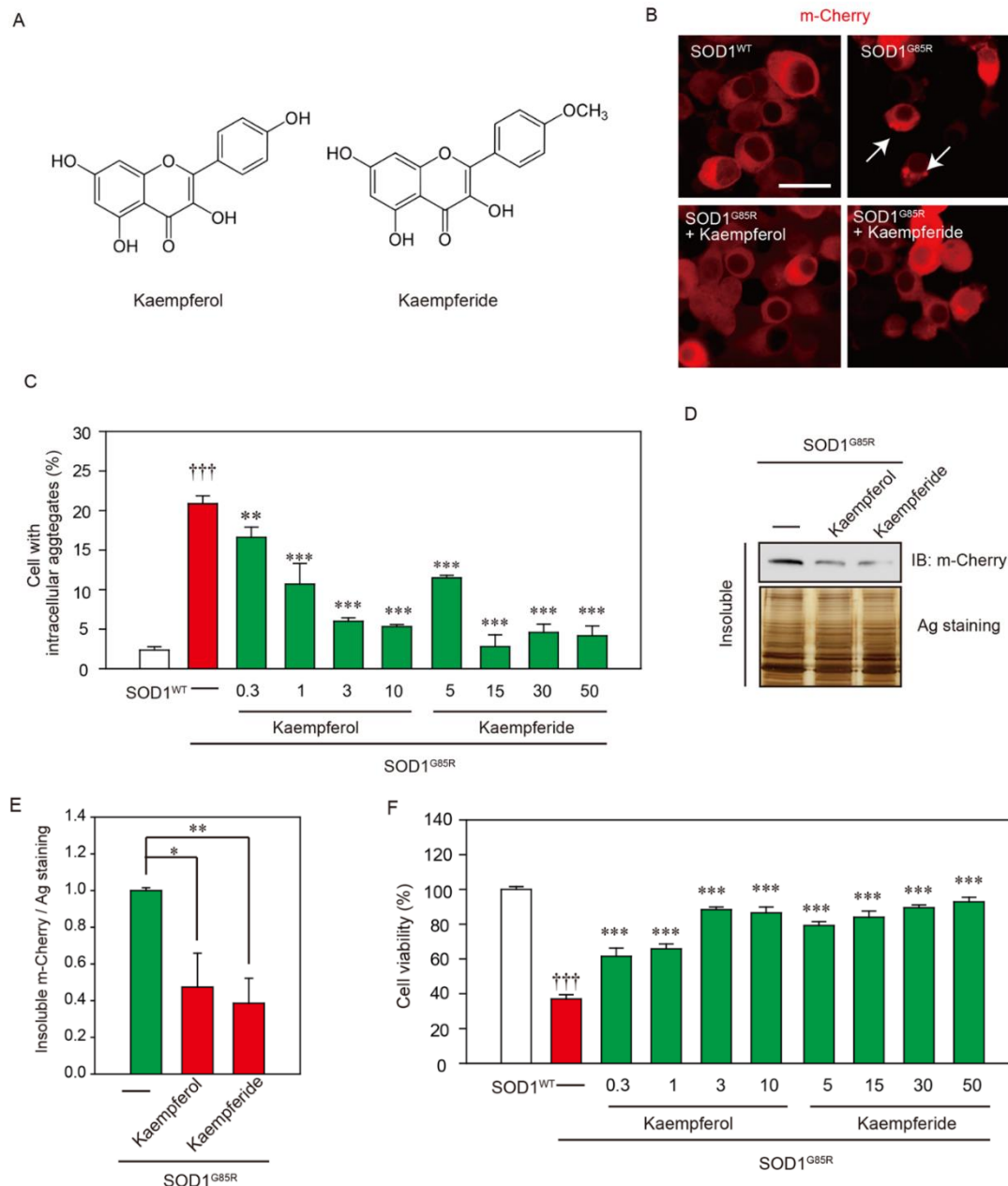


Figure 12. Kaempferol and kaempferide prevented SOD1^{G85R}-related neurotoxicity. (A) Chemical structures of kaempferol and kaempferide. (B) Representative fluorescent microscopy images of N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} incubated for 24 h with 3 μM kaempferol or 15 μM kaempferide. (C) Quantified data of intracellular SOD1 aggregates in N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} incubated for 24 h with kaempferol (from 0.3 μM to 10 μM) or kaempferide (from 5 μM to 50 μM) are expressed as mean ± S.E.M from three independent experiments. In each experiment, at least 2000 cells were counted. (D) Reduction of Triton- insoluble mutant SOD1^{G85R} by kaempferol and kaempferide. After treatment of 3 μM kaempferol or 15 μM kaempferide, Triton-insoluble fraction of N2a cells expressing SOD1^{G85R} was resuspended with 2% SDS and analyzed with immunoblotting. (E) The band density of Triton-insoluble mutant SOD1^{G85R} group is given as mean ± S.E.M from three independent experiments, based on the band density of Triton-insoluble non-treated mutant SOD1^{G85R} group. (F) N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} were treated with kaempferol (from 0.3 μM to 10 μM) or kaempferide (from 5 μM to 50 μM). The cell viability was measured by MTT assay. Data is expressed as mean ± S.E.M from three independent experiments, based on SOD1^{WT} group. †††p < 0.05. vs. WT, *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. Scale bar: 10 μm.

3-4 酸化ストレスに対する kaempferol, kaempferide の効果

酸化ストレスを抑制することは、ALS の進行を抑制する効果があると考えられている³⁰。そこで、抗酸化作用を有することが知られている kaempferol 及び kaempferide が酸化ストレスを減弱していると考え、ミトコンドリア内の酸化ストレスを特異的に計測する MitoSOX[®] RED 試薬を用いて SOD1^{G85R} 由来の Reactive Oxidative Stress (ROS) を検討した。SOD1^{WT} 細胞と比較して SOD1^{G85R} 細胞では、ROS の産出が増加していた。Kaempferol や kaempferide によりその産出が有意に抑制された (Figure 13A,B)。次に、kaempferol 及び kaempferide による酸化ストレスの減少のメカニズムを検討するために ESR を用いて検討した。今回の検討においては ROS の中でも特に毒性の高い・OH に着目し、kaempferol や kaempferide の効果を確認した。結果、kaempferol 及び kaempferide は有意に・OH の低下させた (Figure 13C,D)。以上より、kaempferol や kaempferide は・OH を直接抑制することで、変異 SOD1 による酸化ストレスを有意に抑制している可能性がある。

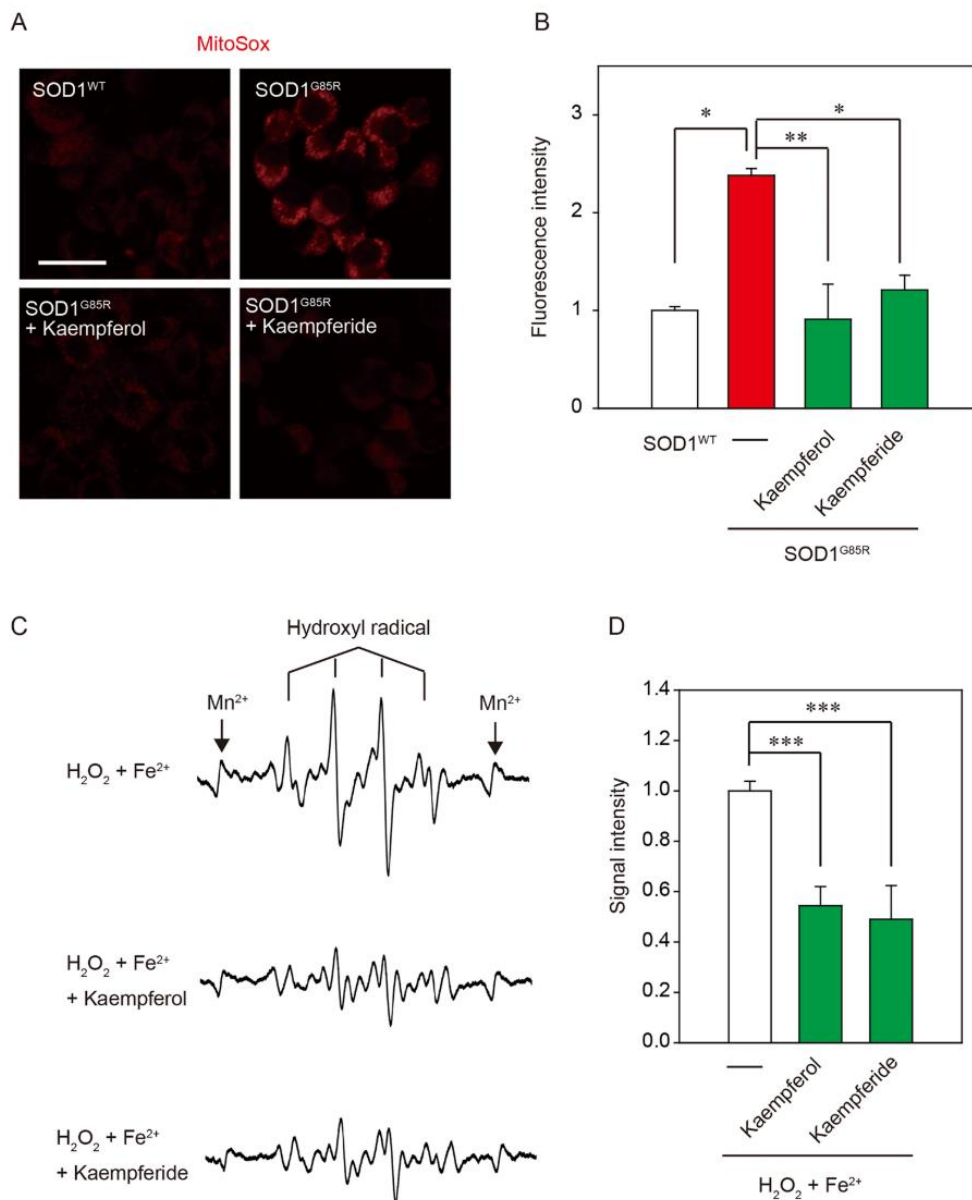


Figure 13. Both kaempferol and kaempferide suppressed SOD1^{G85R}-induced superoxide in mitochondria. (A) N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} were treated with 3 μ M kaempferol or 15 μ M kaempferide for 24 h. Subsequently, MitoSOX Red was added to the cell culture to a final concentration of 5 μ M to the cells and incubated for 30 min at 37 °C. (B) The relative fluorescence intensity was quantified by computerized image analysis with ImageJ. Data are expressed as mean \pm S.E.M from three independent experiment, based on the fluorescence intensity of SOD1^{WT}. (C) Traces show typical spectra of DMPO-OH spin adducts generated from H₂O₂ plus Fe²⁺ in the absence (control) or presence of kaempferol and kaempferide. (D) The amount of \bullet OH was semi-quantitatively measured as the formation of DMPO-OH spin adducts by ESR spectrometry. Data is expressed as the mean \pm S.E.M of three determinations, based on control. *p < 0.05; **p < 0.01. ***p < 0.001. Scale bar: 50 μ m.

3-5 kaempferol はオートファジーを介して神経保護効果を有する

前述のとおり，ALS においては異常タンパク質が蓄積することで，神経細胞死を引き起こすことが知られている．異常タンパク質が蓄積する疾患に対して，不溶性のタンパクを減少させることが神経保護につながると考えられており，この凝集体の抑制が治療薬開発の一つの戦略になる^{25,26,27}．そこで，kaempferol 及び kaempferide を用いてタンパク質の分解系の一つであるオートファジーと変異 SOD1 毒性に対する神経保護効果との関連について検討を行った．オートファジーの活性化の指標として LC3-II，p62 が知られている．オートファジーを活性化することで LC3-II は増加する．また，p62 はオートファジーの活性化キャリアーであり，オートファジーが活性化すると p62 は分解され減少する．結果，kaempferol により LC3-II の増加，p62 の減少を確認した．一方で，kaempferide においては，LC3-II，p62 ともに変化が見られなかった (Figure 14A,B)．以上のことから，kaempferol はオートファジーを活性化している可能性がある．

次に，オートファジー阻害剤である 3 メチルアデニン (3-MA) を用いて検討を行った．3-MA の共処置において，kaempferol によるオートファジーの活性化は抑制された (Figure 14C-E)．さらに，細胞内凝集体，細胞生存率，細胞毒性の観点から検討した．結果，kaempferol を処置することで，細胞内蓄積は減少した一方で，3-MA (10 mM) を処置した群では蓄積が増加していた (Figure 14C-E)．また，kaempferol を処置することで細胞生存率が回復した一方で，3-MA を処置した群では，細胞生存率も低下した (Figure 15A-C)．以上のことから，kaempferol はオートファジーを活性化することで，細胞内蓄積を減少させ，神経保護効果を有していることが示唆された．

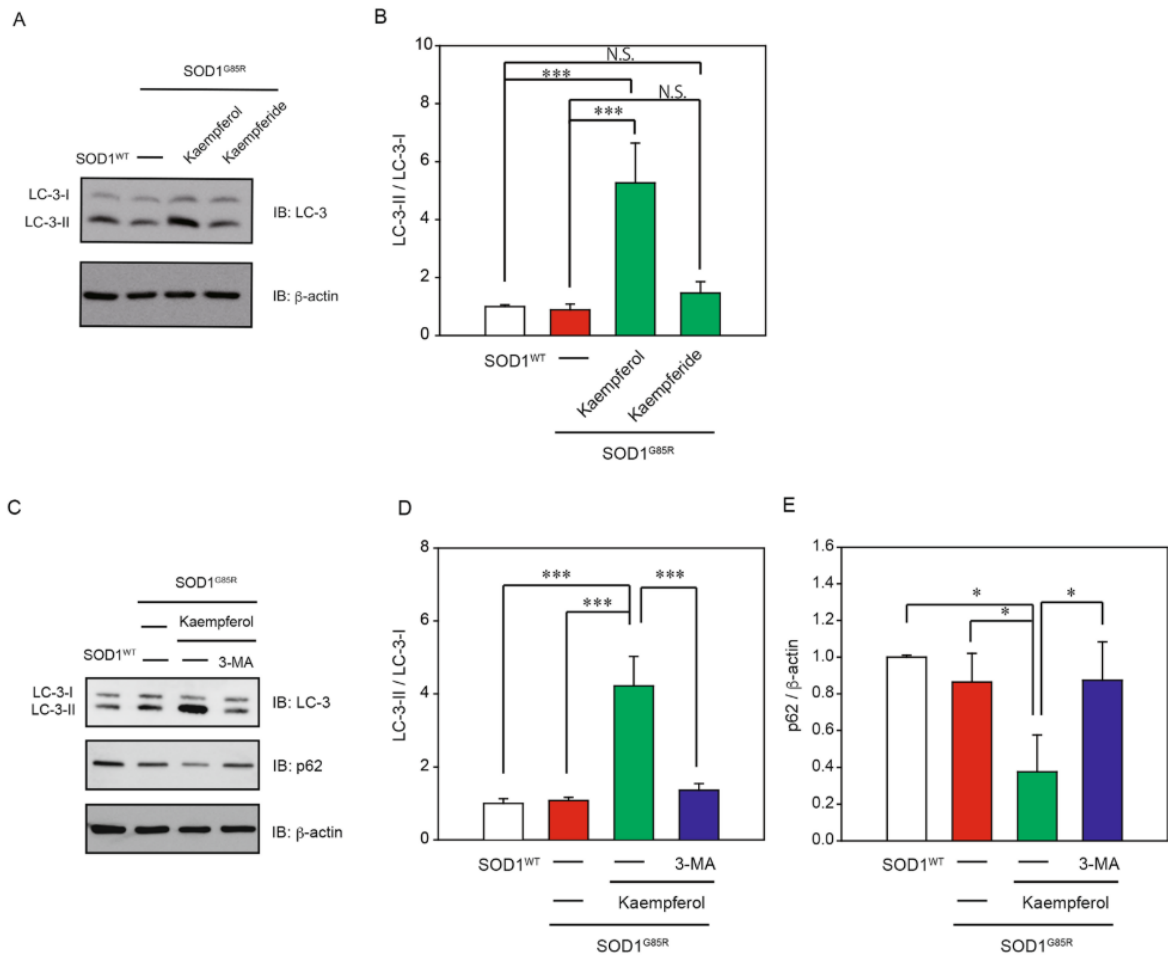


Figure 14. Kaempferol, but not kaempferide, reduced the intracellular aggregates via the activation of autophagy. (A) Induction of LC-3-II by kaempferol, but not kaempferide. N2a cells were transfected with SOD1^{G85R}, and then incubated with 3 μ M kaempferol or 15 μ M kaempferide for 24 h. The lysates were analyzed by immunoblotting with anti-LC-3 and anti- β -actin antibodies. (B) Relative levels of LC-3-II/LC-3-I normalized by the expression of β -actin were quantified, based on the band density of SOD1^{WT}. (C–E) Immunoblotting analysis of autophagy. N2a cells expressing SOD1^{G85R} were treated with kaempferol for 24 h with and without 3-MA. The lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies for LC-3, p62 and β -actin. Relative levels of LC-3-II/LC-3-I and p62 normalized by the expression of β -actin were quantified, based on the band density of SOD1^{WT}. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. N.S.; not significant.

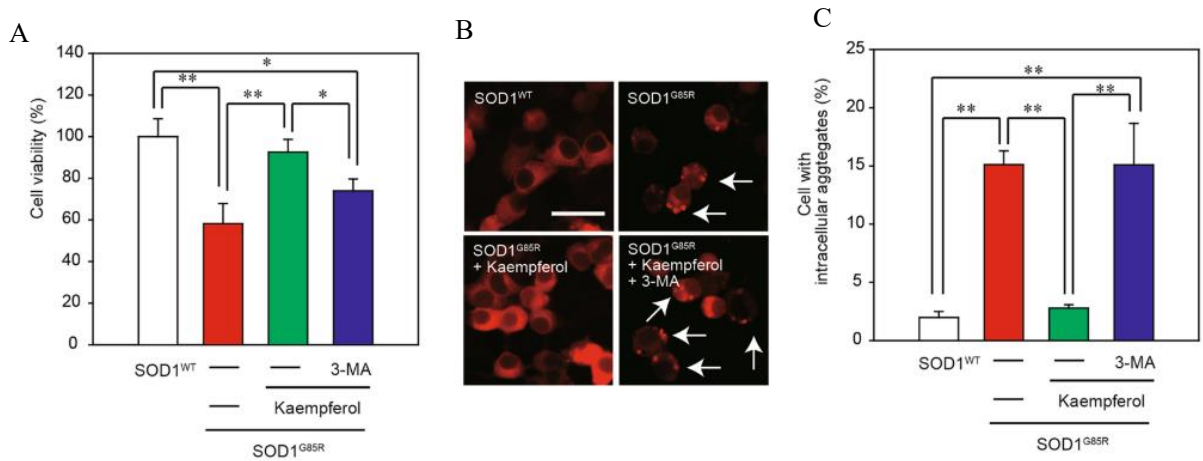


Figure 15. Kaempferol, but not kaempferide, reduced the intracellular aggregates via the activation of autophagy. (A) Representative fluorescent microscopy images of N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} incubated for 24 h with 3 μ M kaempferol with and without 3-MA. (B) Quantified data of intracellular SOD1 aggregates are expressed as mean \pm S.E.M from three independent experiments. In each experiment, at least 2000 cells were counted. (C) N2a cells expressing SOD1^{G85R} was incubated for 24 h with 3 μ M kaempferol with and without 3-MA. Cell viability was determined. Data is expressed as mean \pm S.E.M from three independent experiments. Scale bar: 10 μ m. * p < 0.05; ** p < 0.01. *** p < 0.001.

3-6 Kaempferolは AMPK-mTOR 経路を介してオートファジーを活性化する

フラボノール類は mTOR の活性を阻害することで、オートファジーを抑制していることが、これまでの研究で明らかにされている²⁰。しかしながら、kaempferol の mTOR の阻害メカニズムについては不明であった。そこで、kaempferol のオートファジー活性化機序を解明するために、AMPK, AKT シグナルに着目した。AMPK は mTOR を負に調節することでオートファジーを活性化する。また、AKT は mTOR を正に調節することでオートファジーを不活性化する。今回の検討の結果、kaempferol は mTOR を不活性化することを示した (Figure 16A,B)。さらに、kaempferol は AMPK シグナルを活性化させるものの AKT シグナルには変化を及ぼさないことを示した。これらの結果から、kaempferol は AMPK-mTOR 経路を介してオートファジーを活性化する可能性を示した (Figure 16A,C and D)²⁸。

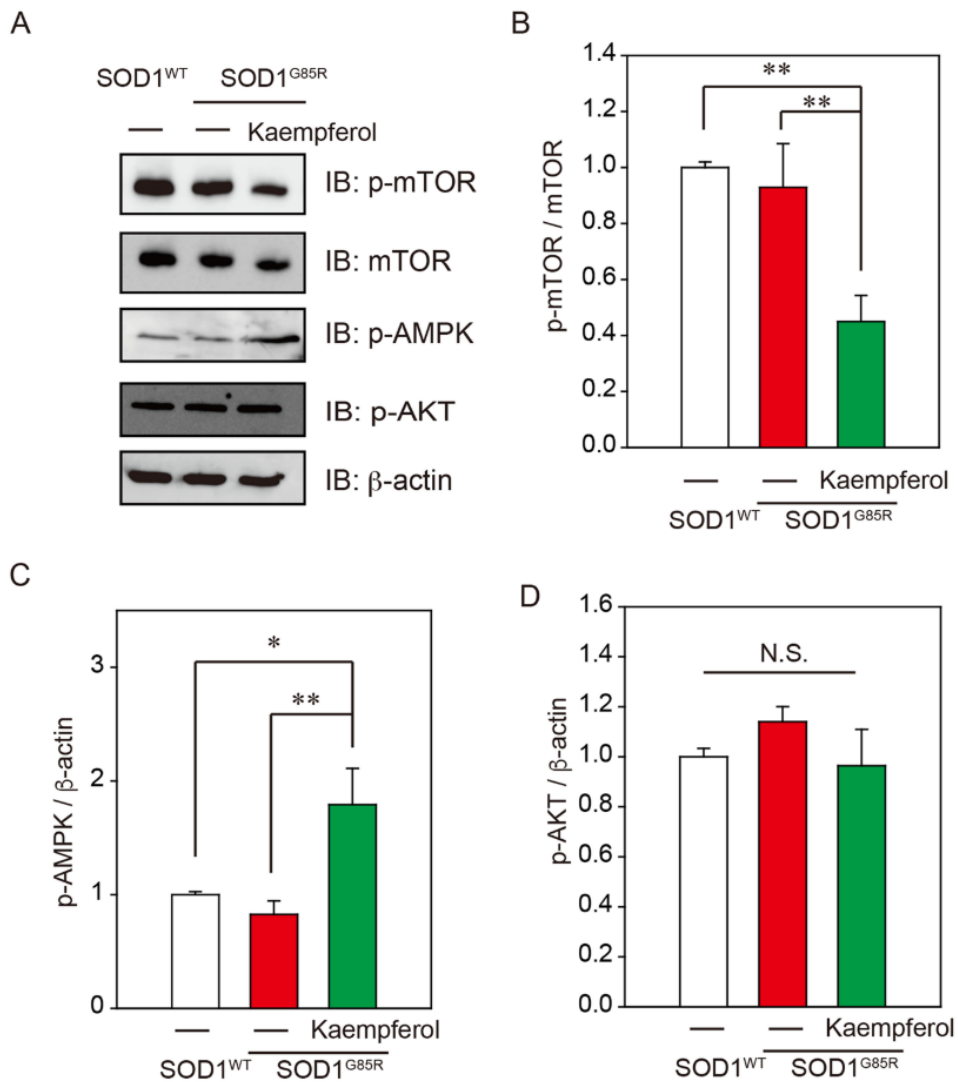


Figure 16. Kaempferol increases AMPK phosphorylation. (A) Immunoblotting analysis of autophagy regulators. N2a cells expressing SOD1^{G85R} were treated with 3 μ M kaempferol for 24 h. The lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies for phosphorylated mTOR (p-mTOR), mTOR, phosphorylated AMPK (p-AMPK), phosphorylated AKT (p-AKT), β -actin. (B) Relative levels of p-mTOR normalized by the expression of mTOR were quantified, based on the density of SOD1^{WT}. (C,D) Relative levels of p-AMPK and p-AKT normalized by the expression of β -actin were quantified, based on the band density of SOD1^{WT}. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. N.S.; not significant.

3-7 変異 SOD1 毒性に対する artC, p-CA の保護効果

3-1 で作製したモデル系を用いて EBGp の他の含有化合物である artC, p-CA の効果を検討した。SOD1^{WT}や SOD1^{G85R}の遺伝子を導入した 24 時間後 p-CA (1 nM, 100 nM, 1 μM), artC (50 nM, 500 nM, 1 μM) の濃度で処置し、異常タンパク質の蓄積への影響や神経保護効果について検討した。結果、SOD1^{G85R} 細胞では細胞内に変異 SOD1 由来細胞内凝集タンパク質の蓄積が見られた一方で、artC, p-CA により変異 SOD1 凝集体の蓄積が減少した (Figure 17A,B)。さらに、生化学的にも同様に検討したところ p-CA により insoluble 分画において蓄積が減少した (Figure 17C,D)。細胞毒性に関しても、artC, p-CA を処置した群では、変異 SOD1 による神経毒性を抑制した (Figure 18)。

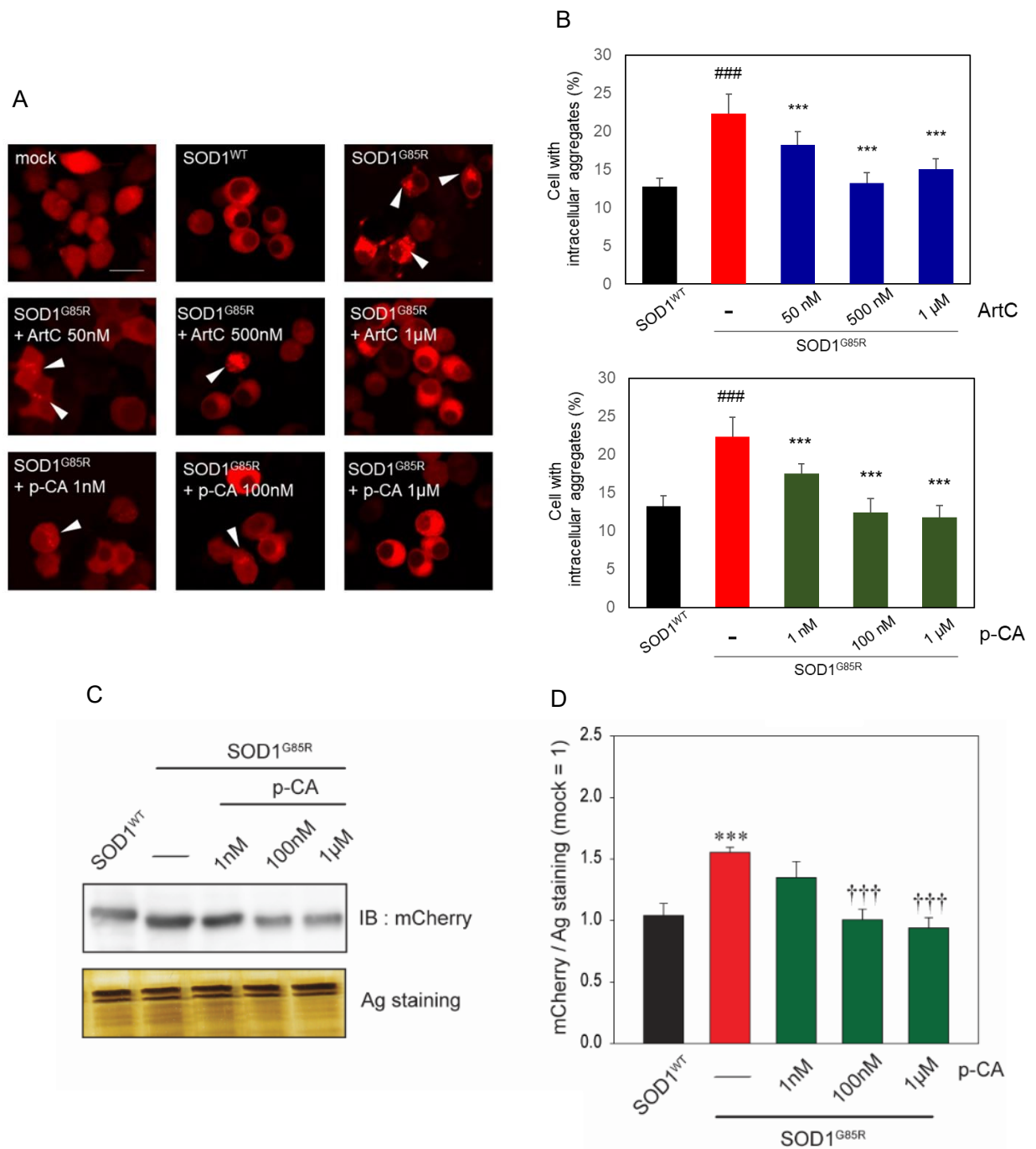


Figure 17. p-CA reduced subcellular aggregation of SOD1^{G85R}.

(A) Imaging of cytoplasmic mCherry–SOD1 aggregates (white arrowheads) in the presence or absence of p-CA in N2a cells. (B) Quantified analysis of imaging. ^{###} $p < 0.001$. vs. WT, ^{***} $p < 0.001$. (C) Immunoblot analysis of mCherry with a 1% Triton X-100 insoluble fraction. (D) Densitometric quantification of mCherry. Scale bar: 10 μm . ^{*} $p < 0.05$ vs. WT; ^{††} $p < 0.01$; ^{†††} $p < 0.001$. ArtC : arteminC, p-CA : p-coumaric acid.

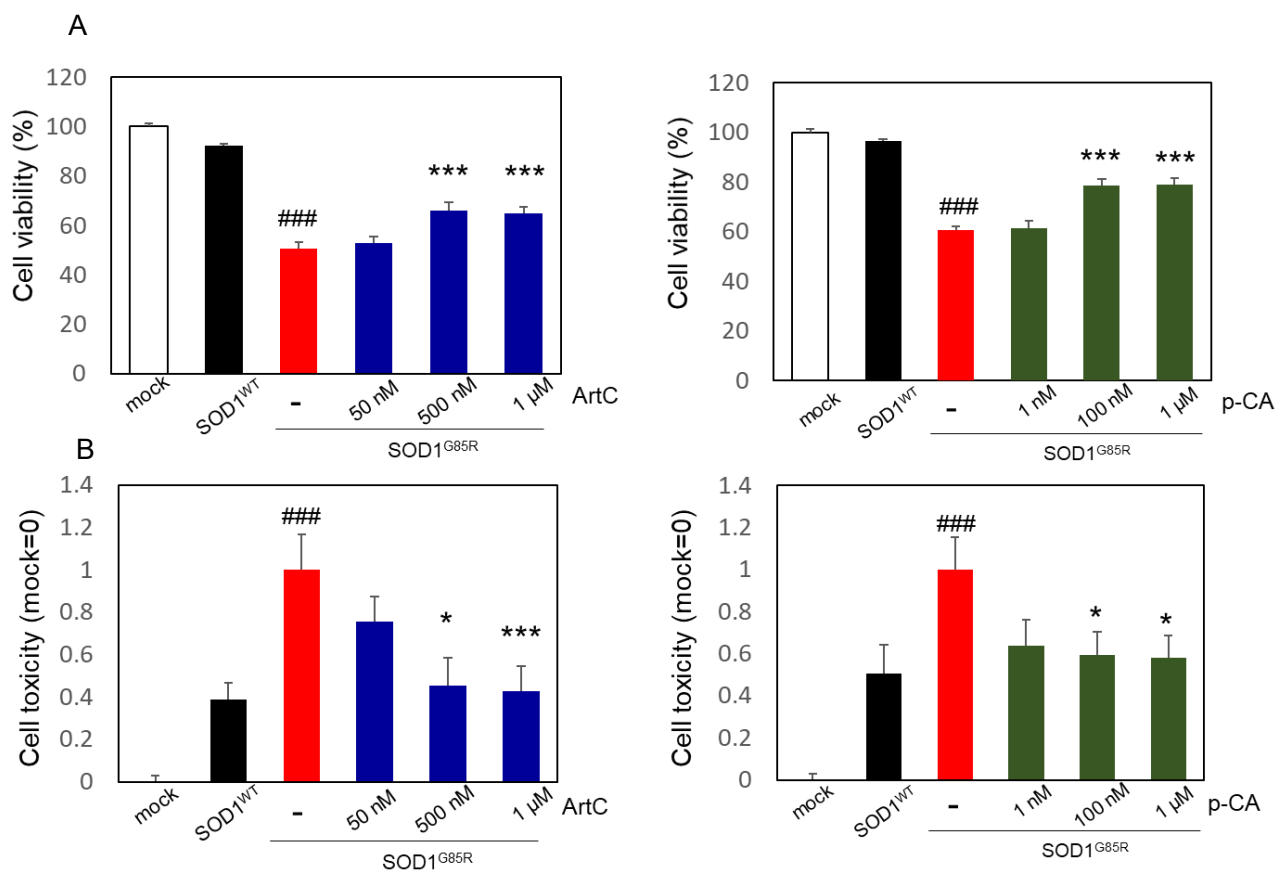


Figure 18. p-CA protected against SOD1-induced neurotoxicity.

(A) Cell viability was measured by MTT assay. (mock = 100%) (B) Cell toxicity was measured by LDH assay. (G85R = 1) Differences were evaluated by one-way ANOVA (mean ± SEM, n = 3) ^{###} p < 0.001 vs. SOD1^{WT}, ^{***} p < 0.001, ^{*} p < 0.05 vs. SOD1^{G85R}. ArtC: artemipilinC, p-CA: p-coumaric acid.

3-8 酸化ストレスに対する p-CA の効果

抗酸化物質として知られている p-CA においても、酸化ストレスを減弱していることを考え、細胞内の酸化ストレスを測定する為に Cell ROX[®] GREEN, ミトコンドリア特異的な酸化ストレスを測定するために MitoSOX[®] RED 試薬を用いて SOD1^{G85R} 由来の ROS を測定した. SOD1^{WT} 細胞と比較して SOD1^{G85R} 細胞では, ROS の産出が増加していた. さらに, p-CA により変異 SOD1 による ROS が有意に抑制された (Figure 19A-D). 次に, p-CA による酸化ストレスの減少のメカニズムを検討するために ESR を用いて検討した. 今回の検討においても ROS の中でも特に毒性の高い $\cdot\text{OH}$ に着目し, p-CA の効果を確認した. 結果, p-CA は有意に $\cdot\text{OH}$ の低下させた (Figure 20A,B). 以上より, p-CA は $\cdot\text{OH}$ を直接抑制することで, 変異 SOD1 による酸化ストレスを有意に抑制している可能性を示した.

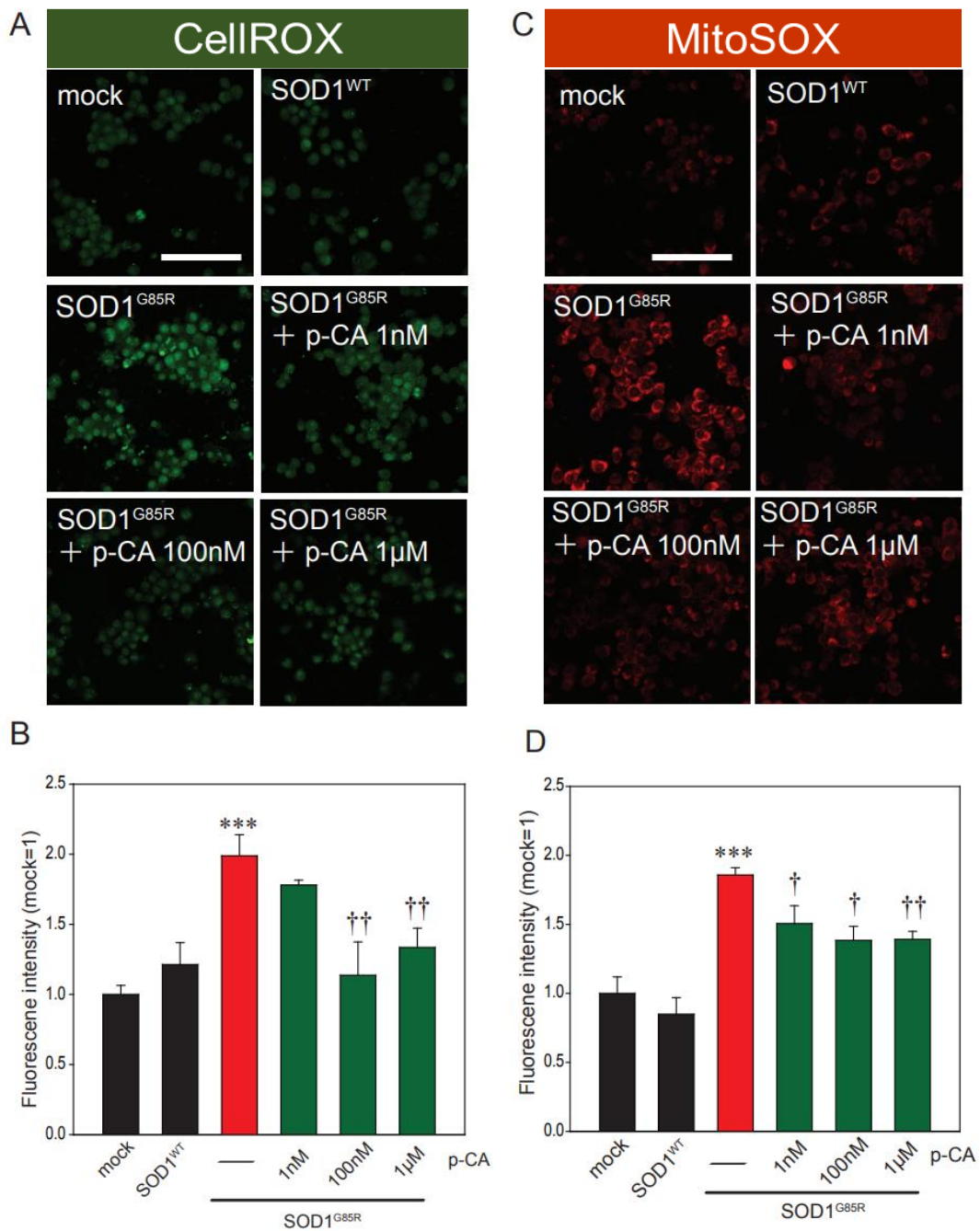


Figure 19. p-CA reduced mutant-SOD1-related oxidative stress.

(A) Confocal imaging of CellROX in N2a cells transfected with mCherry–SOD1^{G85R} with p-CA for 24 h. (B) Quantified analysis of CellROX using Image J. (C) Confocal imaging of MitoSOX in N2a cells transfected with mCherry–SOD1^{G85R} with p-CA for 24 h. (D) Quantified analysis of MitoSOX using Image J. Differences were evaluated by one-way ANOVA (mean ± SEM, n = 3) *** p < 0.001 vs. SOD1^{WT}, †††p < 0.001, †† p < 0.01, † p < 0.05 vs. SOD1^{G85R}. Scale bar: 100 μm. p-CA: p-coumaric acid.

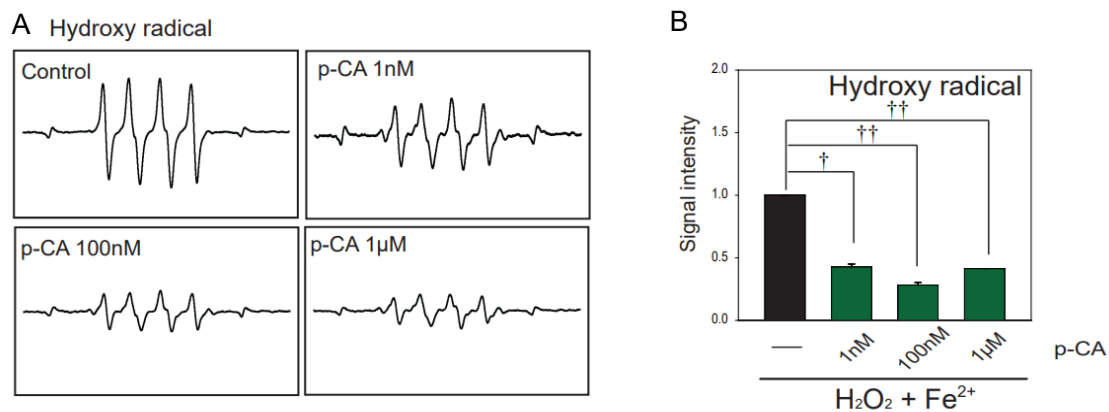


Figure 20. p-CA reduced mutant-SOD1-related oxidative stress.

(A) Typical spectra of DMPO-OH spin generated from H₂O₂ plus Fe²⁺ in the absence (control) or presence of p-CA. (B) The amount of hydroxy radicals was semi-quantitatively measured as the formation of DMPO-OH spin adducts by ESR spectrometry. Differences were evaluated by one-way ANOVA (mean ± SEM, n = 3) †† p < 0.01, † p < 0.05 vs. SOD1^{G85R}. p-CA: p-coumaric acid.

3-9 小胞体ストレスに対する小胞体ストレスの効果

小胞体 (Endoplasmic reticulum: ER) ストレスは ALS の症状進行メカニズムの一つであり，主要な病態反応として提唱されている³¹。SOD1^{G85R} による ER ストレスに対する p-CA の効果を調べるために，小胞体ストレスマーカーとして知られている BiP，CHOP のウエスタンブロット解析を行った。結果，p-CA により BiP および CHOP の発現が抑制された (Figure 21A-C)。

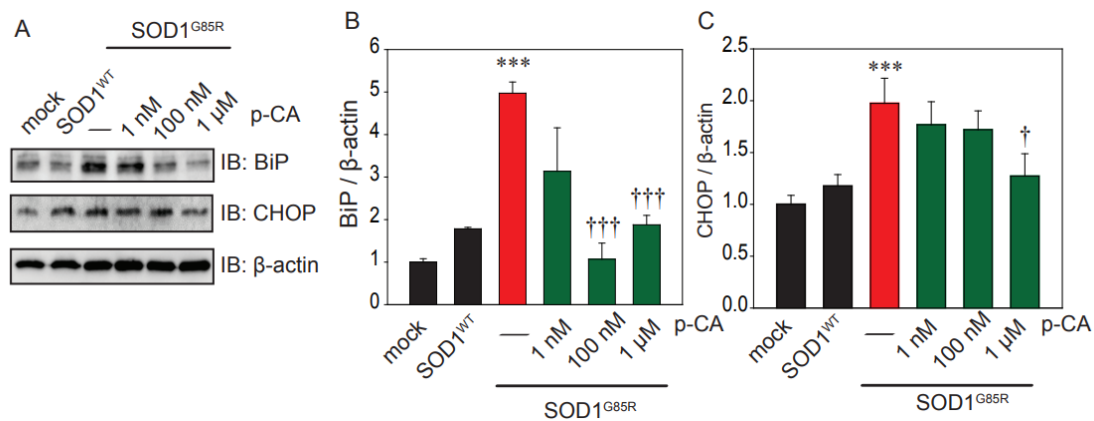


Figure 21. p-CA reduced SOD1^{G85R}-related ER stress.

(A) Immunoblot analysis of BiP and CHOP relating to ER stress. (B,C) Densitometric quantification of BiP (B) and CHOP (C). Differences were evaluated by one-way ANOVA (mean \pm SEM, n = 3) *** p < 0.001 vs. SOD1^{WT}, ††† p < 0.001, † p < 0.05 vs. SOD1^{G85R}. p-CA: p-coumaric acid.

3-10 p-CA はオートファジーを介して神経保護効果を有する

p-CA を用いてタンパク質の分解系の一つであるオートファジーと変異 SOD1 毒性に対する神経保護効果との関連について検討を行った。3-5 の検討と同様に、オートファジーの活性化の指標として LC3-II, p62 を用いた。p-CA により、LC3-II の増加, p62 の減少を確認した (Figure 22A-D)。以上のことから、p-CA はオートファジーを活性化していることを確認した。

次に、作製した変異 SOD1 モデル細胞において、オートファジーが神経保護効果に関与していることを確かめるために、オートファジー阻害剤であるクロロキン (CQ) を用いて細胞内凝集体、細胞生存率、細胞毒性の観点から検討した。結果、p-CA により、細胞内蓄積は減少したのに対し、CQ を処置した群では変異 SOD1 の蓄積が増加していることを確認した (Figure 22E, F)。また、p-CA により細胞生存率が回復したのに対し CQ を処置した群では、細胞生存率も低下することが確認された (Figure 22G, H)。以上のことから、p-CA はオートファジーを活性化することで、細胞内蓄積を減少させ、神経保護効果を有していることが示唆された。

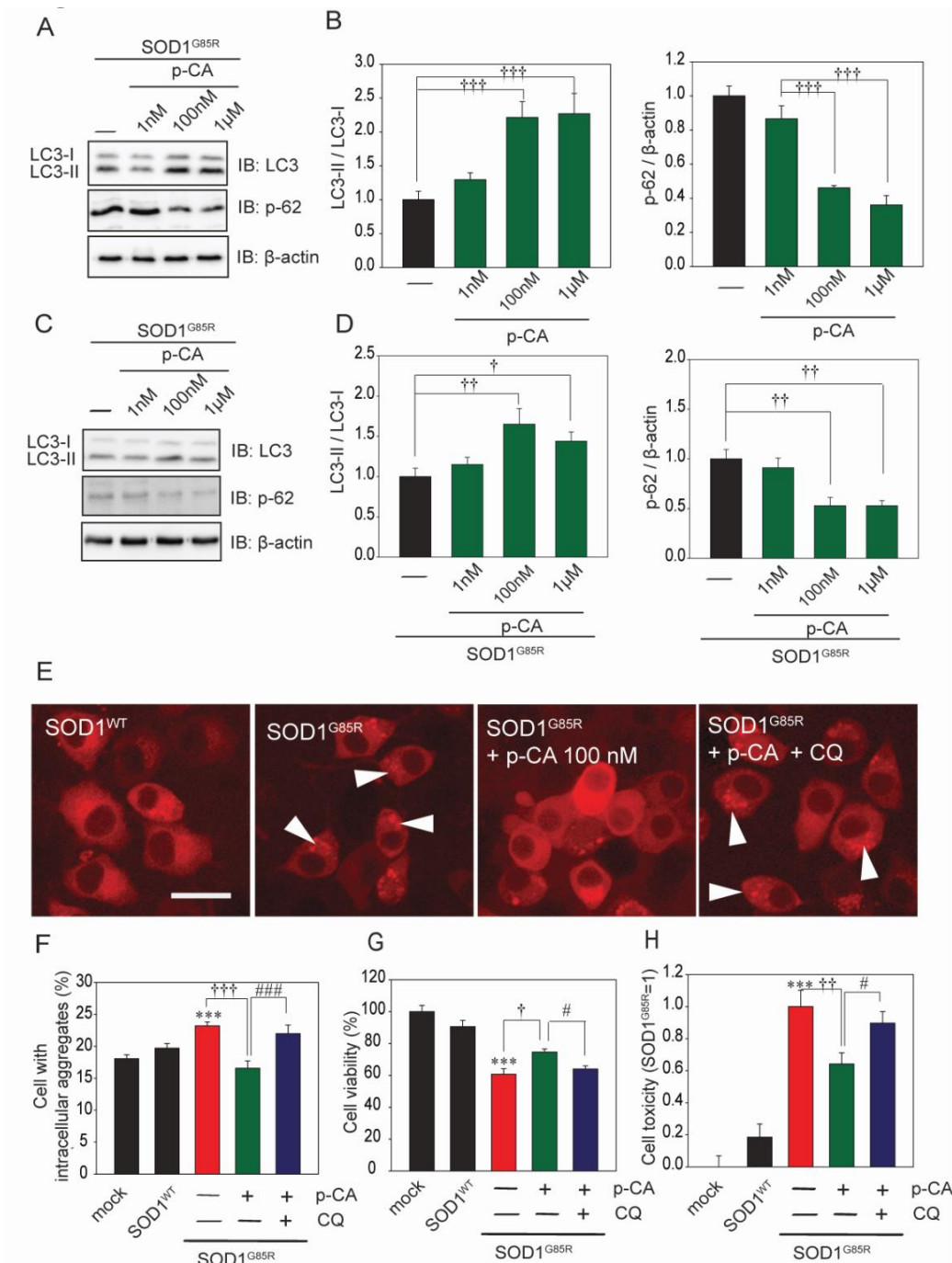


Figure 22. p-CA prevented SOD1^{G85R}-associated neurotoxicity through autophagy.

(A) Immunoblot analysis of LC3 and p62 relating to autophagy. (B) Densitometric quantification of LC3 and p62. ††† $p < 0.001$ vs. control. (C) Immunoblot analysis of LC3 and p62 relating to autophagy with SOD1^{G85R} expressing cells. (D) Densitometric quantification of LC3 and p62. ††† $p < 0.001$ vs. control. (E) Imaging of cytoplasmic mCherry-SOD1 aggregates (white arrowheads) in the N2a cells with CQ (1 nM) before p-CA (100 nM) treatment. (F) Quantified analysis of imaging. (G) Cell viability was measured by MTT assay. (H) Cell toxicity was measured by LDH assay. Differences were evaluated by one-way ANOVA (mean \pm SEM, $n = 3$). *** $p < 0.001$ vs. SOD1^{WT}, ††† $p < 0.001$, †† $p < 0.01$, † $p < 0.05$. vs. SOD1^{G85R}, ### $p < 0.001$, # $p < 0.05$. vs. SOD1^{G85R} + p-CA. Scale bar: 10 μ m. p-CA: p-coumaric acid, CQ: chloroquine.

第4節 考察

EBGP の健康効果やその作用メカニズムについては、ウイルス、炎症、がんに対する効果など多くの研究が行われている^{16,17,18,19}。しかし、ALS などの神経変性疾患に対する EBGP の効果については報告されていない。そこで第1章では、EBGP が SOD1^{G85R} による神経毒性に対して神経保護作用について検討した。結果、EBGP は SOD1^{G85R} 誘発の神経毒性を抑制した。EBGP には、多くの天然化合物が含有されており、これらの成分が SOD1^{G85R} 誘発神経毒性に対して作用していると示唆している²⁸。

ALS の発症、進行メカニズムについては明らかにされていないが、SALS および FALS 患者の運動ニューロンには、共通して凝集した異常タンパク質が蓄積している。凝集した異常タンパクの蓄積を減らすことで、ALS の発症や進行を防ぐことができる可能性が高いことが考えられる。また、EBGP やその含有成分である kaempferol や p-CA はタンパク質分解系の一つであるオートファジーを活性化することも報告されている。そこで本研究では、N2a 細胞に変異 SOD1 を過剰発現させた ALS の細胞モデルにおいて、SOD1^{G85R} 由来の神経毒性と kaempferol 及び p-CA の関係を探査することを目的とした。

フラボノイドのフリーラジカルの抑制効果には化学構造が大きく関与していることが示されている。これまでの研究において、3-ヒドロキシ(OH)基を有するフラボノイドが抗酸化活性に重要な役割を果たすことが報告されている³²。Kaempferol と Kaempferide は、3-OH 基を持つフラボノイドである。したがって、3-OH 基を有するフラボノイドの化学構造は、変異 SOD1 誘導活性酸素に対する抗酸化活性に寄与している可能性がある。一方、Kaempferol は AMPK-mTOR 経路を介したオートファジーを誘導した。kaempferol と kaempferide の化学構造の違いは、B 環にある官能基のみである。Kaempferol は 4'-OH 基、kaempferide は

4'-methoxy 基を B 環に持つ。したがって、B 環に 4'-OH 基を持つ kaempferol はオートファジーに関係していると考えられるが、フラボノイドの化学構造とオートファジーの関係については、さらなる研究が必要である。一方、kaempferol や kaempferide を含むフラボノイドが変異 SOD1 に化学シャペロンのように結合するという報告は未だない。今後、リコンビナント変異 SOD1 を用いた相互作用実験の詳細についてさらなる研究が必要である。

これまでに抗炎症作用、抗がん作用、抗酸化作用などの p-CA の有用性について、いくつかの研究が報告されている^{24,33,34}。しかし、ALS のような神経変性疾患と p-CA との関連についてはほとんど報告されていない。著者はこれまでの報告と同様に、p-CA がオートファジーを誘導することを明らかにした^{23,24}。AMPK は、mTOR の活性化を抑制し、オートファジーを負に制御する。著者らは EBGp に含まれるケンフェロールが AMPK のリン酸化を介して、オートファジーを誘導する可能性があることを示した²⁸。また、p-CA が AMPK を活性化することが報告されている^{35,36}。以上のことから、p-CA は AMPK-mTOR 経路を介してオートファジーを誘導することも考えられる。また、AKT-mTOR 経路もオートファジーの活性化には関与することが知られている³⁷。これまでの報告で、p-CA は AKT シグナルを阻害することが知られている³⁸。したがって、p-CA は、AMPK-mTOR 経路だけでなく、AKT-mTOR 経路も介してオートファジーを誘導する可能性があると推察される。

AMPK は変異 SOD1 のモデルでは不活性化されている^{29,39,40}。さらに、不活性化した AMPK を正常レベルまで回復させることで、SOD1 変異に伴う神経毒性に対して神経保護効果を発揮することが報告されている^{29,40}。AMPK の活性化は、オートファジーを誘導する以外にも、エネルギー代謝など幅広く関与する。以上の事から、ALS の進行を防ぐ上で非常に重要な役割を果たしていることが示唆される。

オートファジーは、変異 SOD1 の凝集体の蓄積を抑制することが報告されている^{28,41}。このような凝集タンパク質の蓄積を防ぐことは、小胞体ストレスの抑制を伴う神経保護のための重要なアプローチである。変異 SOD1 を始めとする異常タンパク質の形成、蓄積の抑制には UPS も深く関与していることが示されている⁴²。実際に、UPS の活性化が異常タンパク質のレベルを減少させ、保護的に作用していることが報告されている⁴²。本研究においては、p-CA による UPS の活性化について検討しておらず、これまでも UPS を活性化させる報告は未だない。今後 p-CA と UPS との関連についてはさらなる検討が必要である^{43,44}。一方で、フラボノール的一种であるケルセチンは UPS を活性化する報告はある⁴⁵。これらのフラボノイドは EBCG の中にも少量含有されており、以上の事を考慮すると EBCG はオートファジーと UPS の両方を通じて、変異 SOD1 の細胞内凝集体の量を減少させることができると考えられる。

これまでの研究で過剰な酸化ストレスは、凝集した SOD1 の蓄積によって引き起こされることが報告されている⁴⁶。そして酸化ストレスは、SOD1 変異体の細胞内凝集体の形成をさらに増加させる^{47,48}。このように、タンパク質の品質管理が損なわれた状況は、ALS 患者の運動神経細胞に悪循環をもたらす。したがって、過剰な酸化ストレスを軽減することは、治療薬の開発につながる可能性がある。ALS の治療薬として現在 FDA にも認可されているエダラボンがある。エダラボンは抗酸化作用を有しているとされており、幅広く用いられている。p-CA も酸化ストレスの原因となるヒドロキシラジカルを直接的にトラップすることで、結果的に酸化ストレスを抑制、さらには凝集体の蓄積を抑制することが示唆される。これらの結果から、オートファジーと抗酸化作用の双方が、変異 SOD1 による細胞内凝集さらには神経毒性を抑制したことが考えられる⁴⁹。

以上の結果から、変異 SOD1 毒性に対して、kaempferol 及び p-CA はオートファジーの活性化、並びに抗酸化作用により神経保護的に作用することを本章に

において明らかにした。異常タンパク質の蓄積や、酸化ストレスの増大は ALS だけでなく他の神経変性疾患においても、症状が発症する以前より同様に見られる特徴である。桂皮酸誘導体やフラボノイドなど多くの有効成分を含有している EBG は日頃より気軽に摂取することが可能であり、予防医療の観点より長年のストレスなどの蓄積で発症する神経変性疾患に対して非常に有効な予防薬としての役割を担うことが考えられる (Figure 23).

先制医療としての可能性

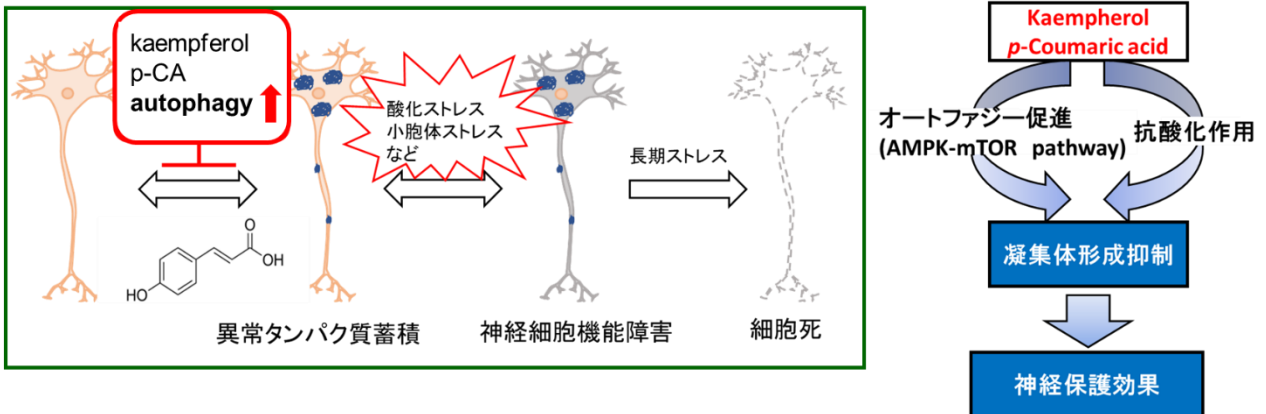


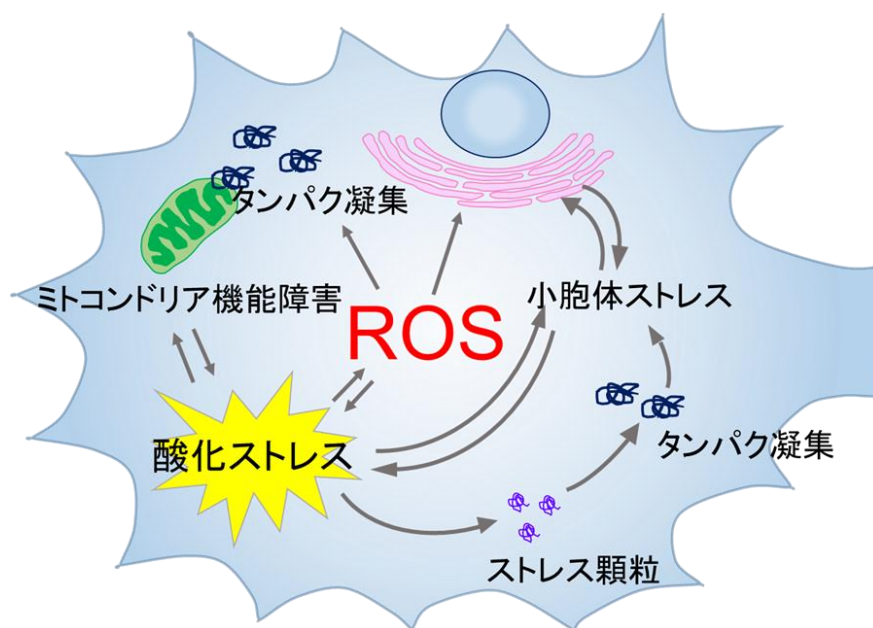
Figure 23. The search for preventive medicines from the perspective of preventive medicine.

kaempferol and p-CA degraded SOD1 aggregates and suppressed their formation via the activation of autophagy.

第2章 抗酸化に着目した新規治療薬の提言

第1節 緒言

ALS 患者の運動神経細胞内における特徴として、細胞内凝集体の蓄積、過剰な酸化ストレスなどが関与していることが古くから報告されてきた^{50,51}。さらに、過剰な酸化ストレスがミトコンドリアなどの細胞小器官に悪影響を及ぼし、



最終的に細胞に悪影響を及ぼす (Figure 24)^{29,47}。

このことは生体内でも確認されている。例えば、変異 SOD1 を発現する ALS モデルマウス、また ALS 患者にお

Figure 24. Oxidative stress and protein aggregations are associated with ROS.

ROS is produced by abnormal protein aggregation, abnormal mitochondrial function and etc.

いても positron emission tomography (PET) 解析により酸化

ストレスが増大することが報告されている^{52,53}。このような酸化ストレスを抑制する目的で、エダラボンが注目を集めていた。エダラボンはもともと、脳梗塞急性期の能保護目的で用いられてきた抗酸化薬 (フリーラジカル除去剤) である。特にペルオキシ亜硝酸に強い除去効果を発揮することが知られている。

ALS に対するエダラボンの効果は短期間の投与実績に基づく評価であり、かつ軽症型に限定した患者群での背景による結果であったが、近年長期投与による効果も報告された⁵⁴。このように、本邦においては有効性のエビデンスを示す

数少ない薬剤であるが、投与方法が10~14日にわたる連日投与であり、患者のQOLへの影響が無視できない。そこで、著者らは新規治療薬シリーズとしてエダラボンのような抗酸化作用を有する化合物、特に神経細胞への送達また、血液脳関門の透過性などを考慮し、低分子に着目し探索を行った。

著者は、本学合成薬学研究室で開発された *gem*-dihydroperoxides (DHPs) に着目した⁵⁵。DHPsには様々な種類が存在する。特に12AC3Oは末梢血単球(PBMC)や線維芽細胞などの正常な細胞株に影響を与えることなく、白血病の

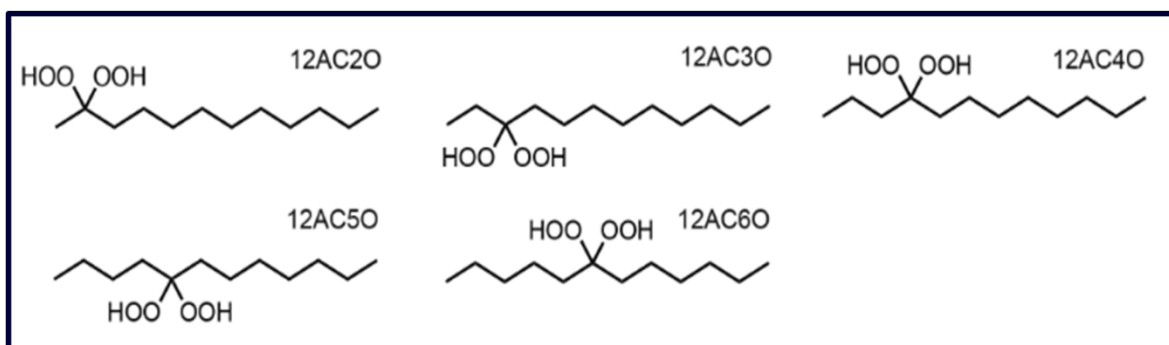


Figure 25. Chemical structures of each DHPs.

K562細胞に対しては細胞内の活性酸素状態を調節してアポトーシスを誘導することが報告されている⁵⁶。したがって、12AC3Oは活性酸素消去剤として作用する可能性があると考えられる。本章では、変異SOD1による神経毒性に対するDHPsの抗酸化作用について検討した。DHPsは、C-12シリーズ(12AC2O, 12AC3O, 12AC4O, 12AC5O, 12AC6O)を用いた(Figure 25)。エダラボンのように抗酸化作用を有する化合物を見出すことができれば、今後の治療薬シリーズ探索における足掛かりになり得ると考える。

第 2 節 実験材料及び方法

2-1 薬物及び試薬

第 1 章 2-1 薬物及び試薬で使用した薬物ならびに試薬に準ずる。
gem-dihydroperoxides (DHPs) は、本学、合成薬品製造学研究室 教授 伊藤彰近 博士よりご供与して頂いた。

2-2 実験方法

2-2-1 SOD1WT-mCherry プラスミドベクター作製

第 1 章 2-2-1 と同様に実施した。

2-2-2 変異型 SOD1-mCherry プラスミドベクター作製

第 1 章 2-2-2 と同様に実施した。

2-2-3 異常タンパク蓄積モデル細胞

第 1 章 2-2-3 と同様に実施した。

2-2-4 SOD1 タンパク蓄積観察

第 1 章 2-2-4 と同様に実施した。

2-2-5 Reactive Oxygen Species (ROS) の測定

第 1 章 2-2-5 と同様に実施した。

2-2-6 ウェスタンブロット法

第1章 2-2-6と同様に実施した.

2-2-7 細胞生存率測定

第1章 2-2-7と同様に実施した.

2-2-8 ESRを用いたヒドロキシラジカルの測定

第1章 2-2-9と同様に実施した.

スーパーオキシドアニオンラジカルについては、ヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼを用いた。サンプル溶液 (50 μ M), 500 mM DMPO (50 μ l), 5 mM ヒポキサンチン (50 μ l), 0.4 units/ml キサンチンオキシダーゼ (50 μ l) を混合しセルへ移す。キサンチンオキシダーゼを加えてから1分後に強度を Jeol Resonance により測定した。

2-2-9 銀染色を用いた不溶性分画の定量

第1章 2-2-10と同様に実施した.

2-2-10 統計学的解析

第1章 2-2-11と同様に実施した.

第3節 実験成績

3-1 DHPsは変異SOD1による神経毒性を抑制する

第1章で作製した変異SOD1蓄積モデル細胞を用いて、DHPsの内C-12シリーズ(12AC20, 12AC30, 12AC40, 12AC50, 12AC60)の変異SOD1毒性に対する保護効果について検討を行った。*SOD1^{WT}*や*SOD1^{G85R}*遺伝子を導入した24時間後DHPsをそれぞれ0.1 μ M, 0.3 μ M, 1.0 μ M, 3.0 μ Mの濃度で処置し、神経保護効果について検討した。結果、12AC20, 12AC30により変異SOD1による毒性が軽減された(Figure 26A,B)。しかしながら、12AC40, 12AC50, 12AC60においては、変異SOD1に対する保護効果を確認できなかった(Figure 26C-E)。さらに、*SOD1^{G93A}*由来の神経毒性についても検討した。*SOD1^{G93A}*を一過性に発現させたN2a細胞においても*SOD1^{G85R}*と同レベルの神経毒性を確認できた。一方で、12AC20により、その毒性が軽減された(Figure 26F)。以上より、DHPsの内12AC20は*SOD1^{G85R}*由来神経毒性だけでなく、その他の幅広い変異SOD1由来の毒性にも同様に神経保護の効果を有する可能性が考えられる。

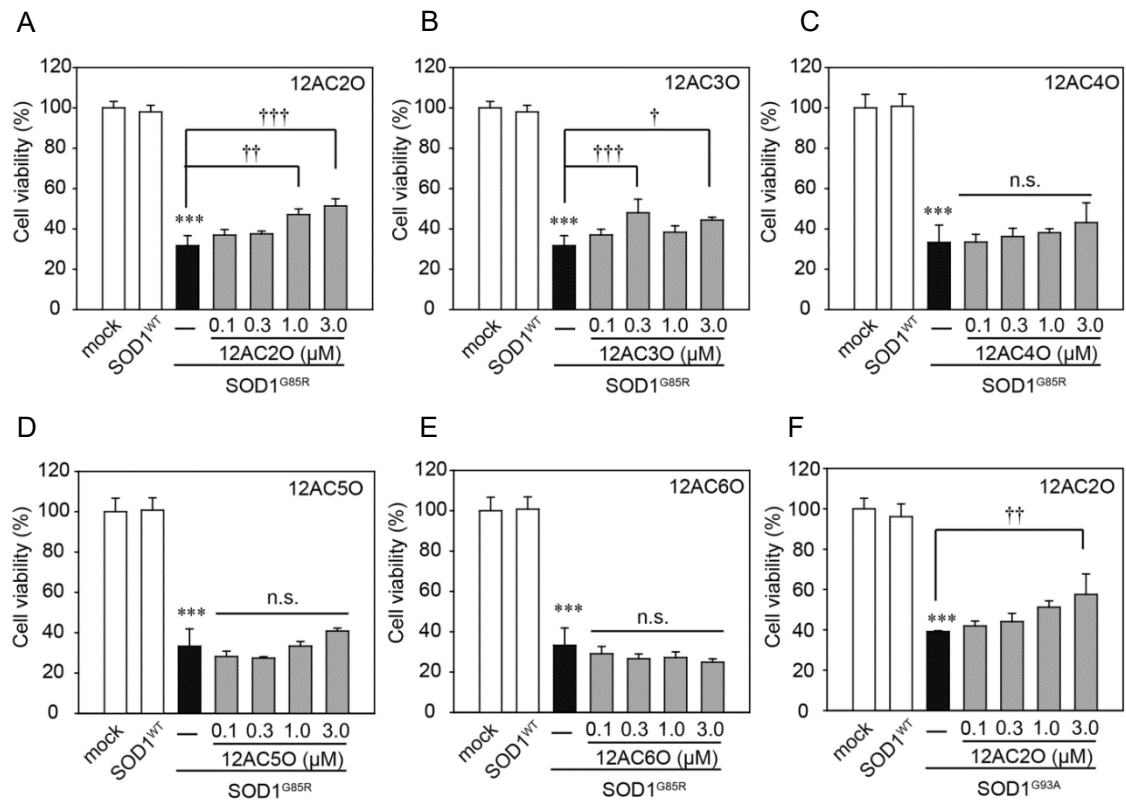


Figure 26. 12AC20 and 12AC30 protect against SOD1^{G85R} induced neurotoxicity.

(A-F) mCherry, mCherry-SOD1^{WT}, mCherry-SOD1^{G85R} or mCherry-SOD1^{G93A} expressing N2a cells were differentiated under culture medium (2 mM dbcAMP, 2% FBS) in the presence or absence of each DHPs (0.1, 0.3, 1, 3 μM / 24 h). Cell viability was measured by MTT assay. Results are presented as the mean ± S.E.M of the three independent experiments, or as percent of mock (mock = 100%). *** p < 0.001 vs. WT, ††† p < 0.001, †† p < 0.01, † p < 0.05, n.s.: not significant.

3-2 DHPs は変異 SOD1 による細胞内凝集体を抑制する

12AC2O の抗酸化作用により，変異 SOD1 由来の細胞内凝集体の蓄積も抑制できると考え，作製したモデル細胞を用いて検討した．結果，SOD1^{G85R} 細胞及び SOD1^{G93A} 細胞では細胞内に変異 SOD1 由来細胞内凝集タンパク質の蓄積が見られた．一方で，12AC2O により変異 SOD1 の凝集体の蓄積が減少した (Figure 27A,B)．さらに，生化学的な解析でも，不溶性の insoluble 分画において変異 SOD1 凝集タンパク質の蓄積が増加していたが，12AC2O によりその蓄積が減少した (Figure 27C-F)．

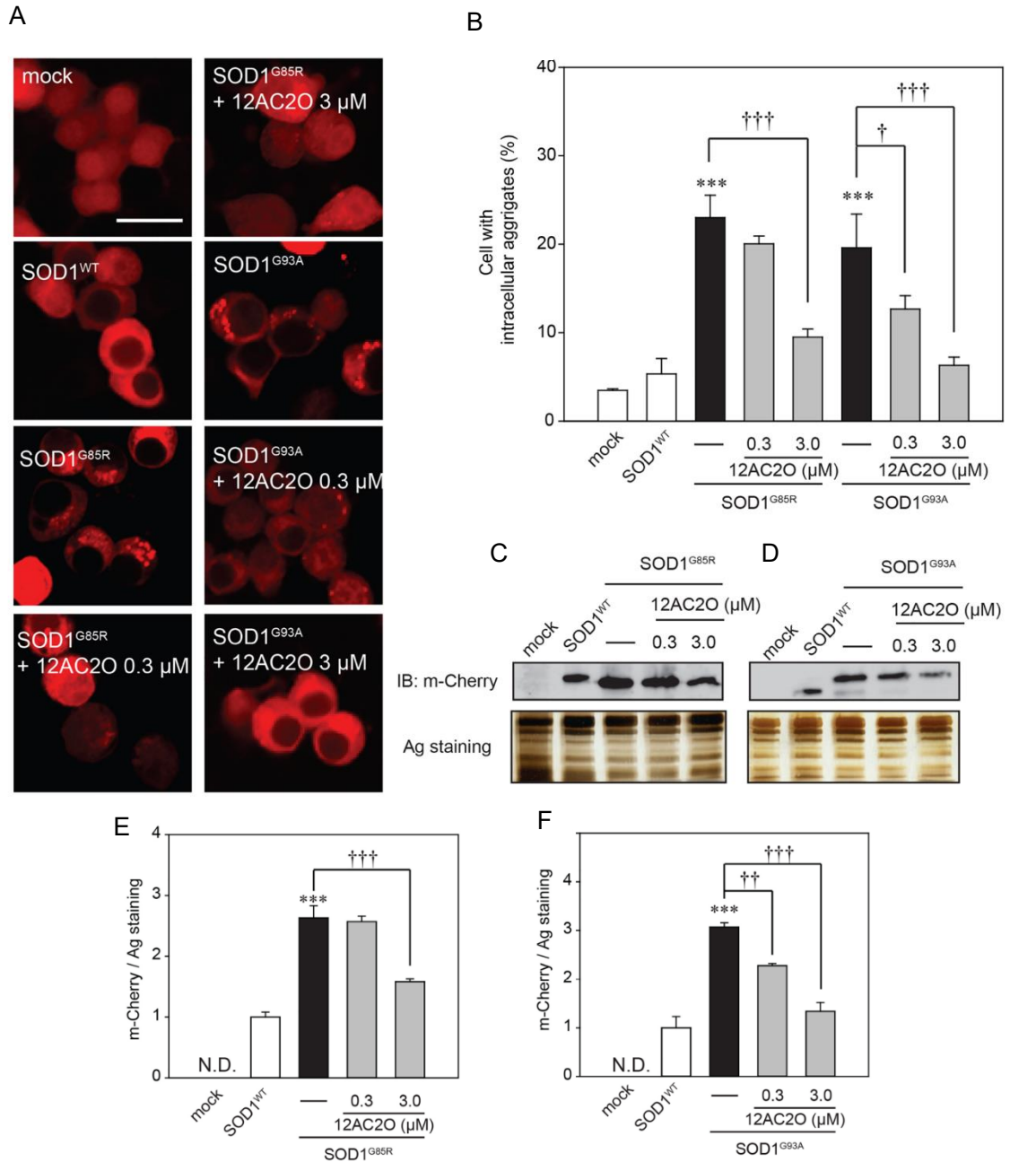


Figure 27. 12AC20 reduces the aggregates of SOD1^{G85R} and SOD1^{G93A}. (A) Representative fluorescent microscopy images of N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} and mCherry-SOD1^{G93A} incubated for 24 h with 12AC20 (0.3 μM, 3 μM). (B) Quantified data of intracellular SOD1 aggregates are expressed as the mean ± S.E.M of the three independent experiments. In each experiment, at least 200 cells were counted. (C and D) After treatment of 12AC20 (0.3 μM or 3 μM), N2a cells expressing SOD1^{G85R} and SOD1^{G93A} were lysed with 1% TritonX-100. Triton-insoluble fraction was resuspended with 2% SDS and analyzed with immunoblotting. (E and F) The density of Triton-insoluble mutant SOD1^{G85R} and SOD1^{G93A} is given as mean ± S.E.M from three independent experiment, based on the density of Triton-insoluble mutant SOD1^{WT}. *** p < 0.001 vs.WT, ††† p < 0.001, †† p < 0.01, † p < 0.05. N.D.: not detection. Scale bar: 10 μm.

3-3 酸化ストレスに対する DHPs の効果

酸化ストレスを抑制することは、ALS の進行を抑制する効果があると考えられている^{46,51}。そこで、抗酸化物質としても知られている DHPs、特に 12AC2O において、酸化ストレスを減弱していることを考え、Cell ROX[®] GREEN, MitoSOX[®] RED 試薬を用いて SOD1^{G85R} 由来の ROS を測定した。SOD1^{WT} 細胞と比較して SOD1^{G85R} 細胞では、ROS が増加していた。さらに、12AC2O はその ROS を有意に抑制した (Figure 28A-D)。次に、12AC2O による酸化ストレスの減少メカニズムを検討するために ESR を用いて検討した。今回の検討においては・OH および・O₂ に着目し、12AC2O の効果を確認した。結果、12AC2O は有意に・OH、・O₂ の発生を低下させた (Figure 29A,B)。以上より、12AC2O は・OH と・O₂ に直接作用することで、ラジカル補足効果を持ち、変異 SOD1 による酸化ストレスを有意に抑制していることを明らかにした。

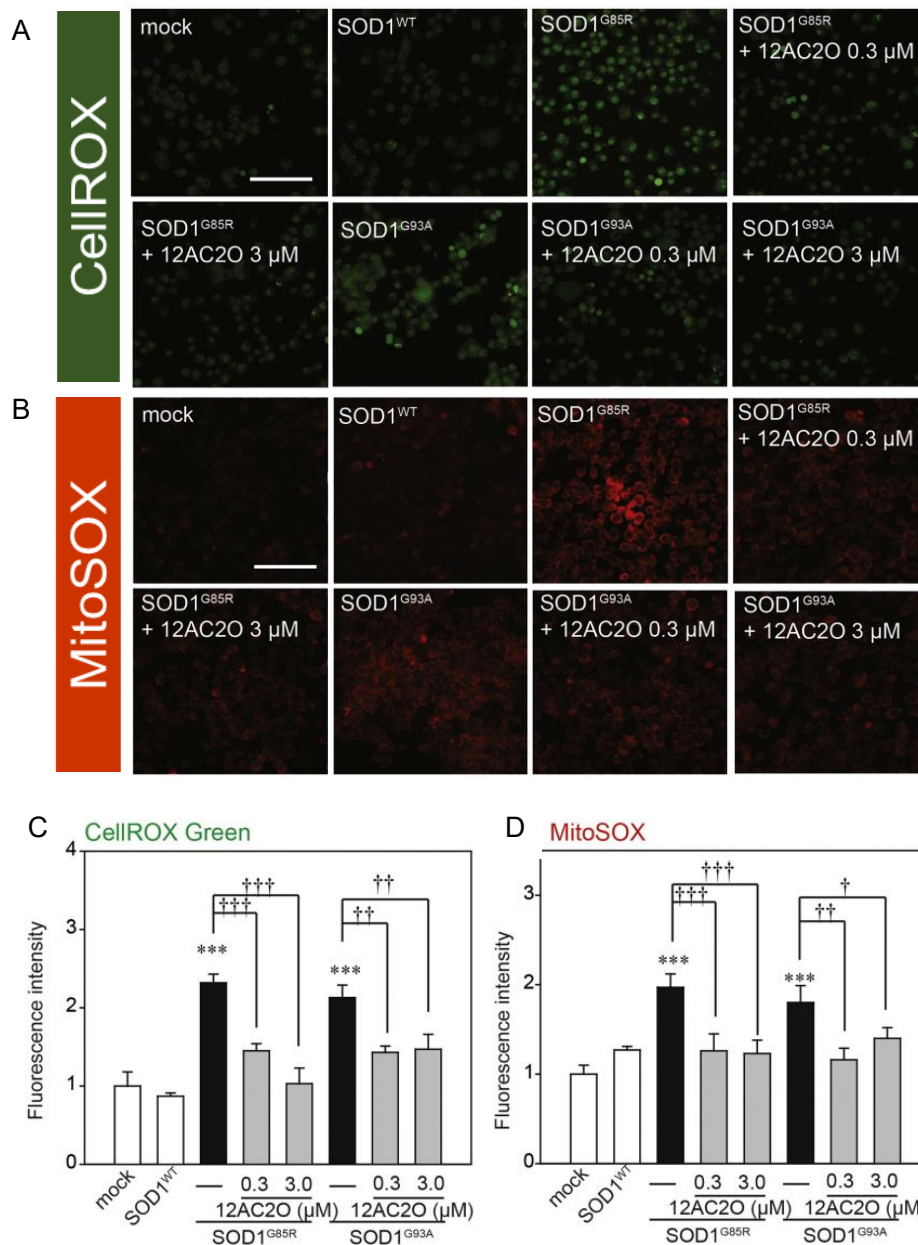


Figure 28. 12AC2O suppresses SOD1^{G85R} and SOD1^{G93A} -induced oxidative stress. (A) N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} and mCherry-SOD1^{G93A} were treated with 12AC2O (0.3 μM, 3 μM) for 24h. Subsequently, CellROX Green was added to the cell culture to a final concentration of 5 μM and incubated for 30 min at 37°C. (B) N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} and mCherry-SOD1^{G93A} were treated with 12AC2O (0.3 μM, 3 μM) for 24 h. Subsequently, MitoSOX Red was added to the cell culture to a final concentration of 5 μM and incubated for 30 min at 37°C. (C and D) The relative fluorescence intensity was quantified by computerized image analysis with Image J. Results are presented as the mean ± S.E.M of the three independent experiments, based on the fluorescence intensity of the mock. (mock = 1). *** p < 0.001 vs. WT, ††† p < 0.001, †† p < 0.01, † p < 0.05. Scale bar: 100μm.

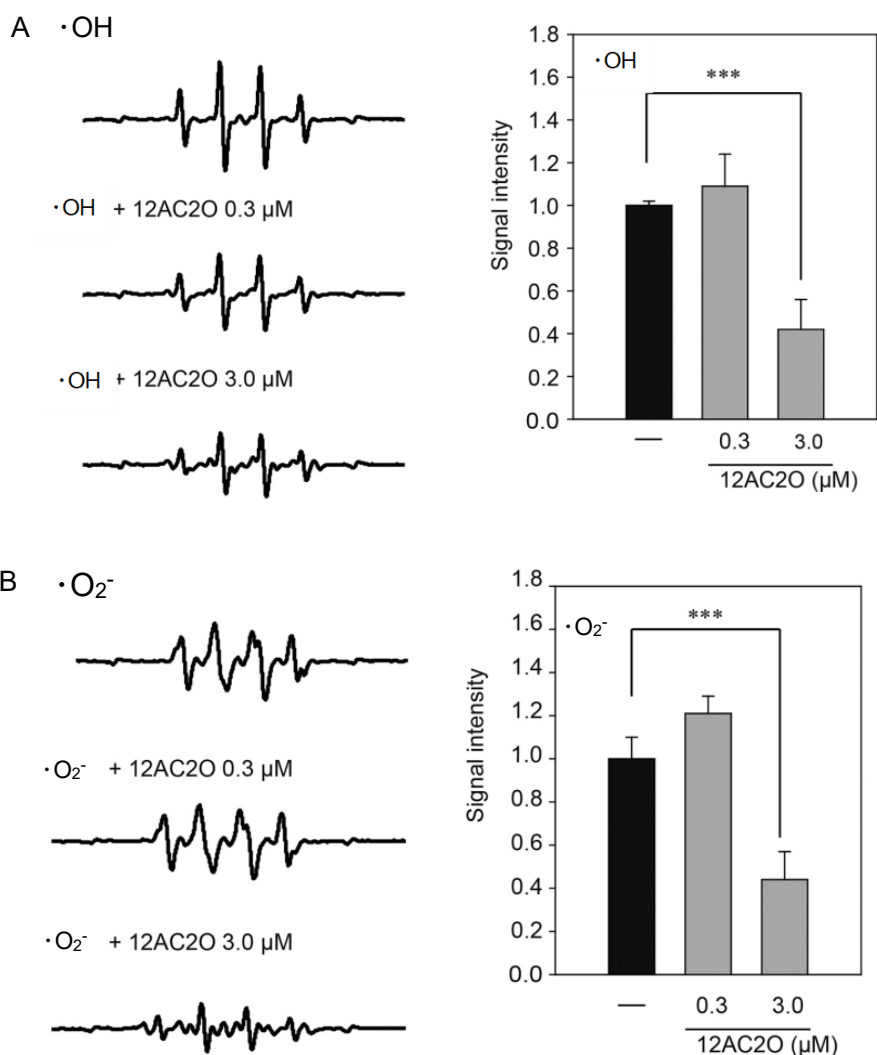


Figure 29. 12AC2O possesses direct scavenging effect against $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{O}_2^-$. (A) Traces show typical spectra of DMPO-OH spin adducts generated from H_2O_2 plus Fe^{2+} in the absence (control) or presence of 12AC2O. DMPO (72 mM/50 μL), H_2O_2 (2 mM/50 μL), FeSO_4 (0.2 mM/50 μL), and sample solution (50 μL) were mixed and transferred into an ESR spectrometry cell. Exactly 1 min after FeSO_4 addition, the ESR spectrum of DMPO-OH spin adducts was recorded. The amount of $\cdot\text{OH}$ was semi-quantitatively measured as the formation of DMPO-OH spin adducts by ESR spectrometry. (B) Traces show typical spectra of DMPO-OOH spin adducts generated from hypoxanthine plus xanthine oxidase in the absence (control) or presence of 12AC2O. DMPO (500 mM/50 μL), hypoxanthine (5 mM/50 μL), xanthine oxidase (0.4 units/ml/50 μL), and sample solution (50 μL) were mixed and transferred into an ESR spectrometry cell. Exactly 1 min after xanthine oxidase addition, the ESR spectrum of DMPO-OOH spin adducts was recorded. The amount of $\cdot\text{O}_2^-$ was semi-quantitatively measured as the formation of DMPO-OOH spin adducts by ESR spectrometry. Results are presented as the mean \pm S.E.M of the three determinations, based on control. *** $p < 0.001$.

4.考察

本章では、本学の合成薬品製造学研究室にて製造された新規 DHP の 1 つである 12AC2O を用いて SOD1^{G85R} および SOD1^{G93A} による神経毒性に対する効果を検討した。結果、12AC2O は変異 SOD1 由来の神経毒性を減弱した。特に、12AC2O は細胞内の変異 SOD1 による細胞内凝集体の蓄積を有意に減少させた。さらに、12AC2O は $\cdot\text{OH}$ および $\cdot\text{O}_2$ に対して直接的に作用することで、抗酸化作用を示した。

変異 SOD1 の凝集は、孤発性および家族性の ALS に見られるが、その病態への関与はいまだ不明である^{57,58}。これまでの報告では、ALS モデルマウスの脊髄において、SOD1 の不溶性凝集体が酸化され、分子間ジスルフィド結合で架橋されていることが明らかになっている^{59,60,61}。ALS モデルマウスのように、本実験で用いた細胞モデルにおいても、変異 SOD1 が酸化されていることが推測され、凝集した SOD1 を減少させることは ALS に対する有効な治療戦略の一つとして期待されている。そこで、第 2 章では変異 SOD1 による神経毒性に対する治療薬として抗酸化剤である DHPs の神経保護効果を明らかにするとともに、ALS に対する新規治療薬を提言することを目的として研究を行った。

現在、FAD で承認されているのは 2 つの治療薬のみであり、抗グルタミン酸剤であるリルゾールと、フリーラジカル消去剤であるエダラボンである⁶²。しかし、両剤は ALS に対して限られた治療効果しか発揮しない。著者の研究では 12AC2O を 0.3 μM および 3.0 μM で投与すると、変異 SOD1 の凝集体によって誘発される酸化ストレスを減弱した (Figure 28)。3.0 μM の 12AC2O は、変異 SOD1 の細胞内凝集体を減少させ、SOD1 による神経毒性を抑制したが、0.3 μM の 12AC2O では抑制されなかった。この結果から、酸化ストレス以外にも、変異 SOD1 の細胞内凝集や SOD1 による神経毒性を引き起こすメカニズムが存在する

可能性が考えられる。

本研究では、12AC2O が $\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{O}_2$ を直接捕捉した。一方でエダラボンは $\cdot\text{OH}$ のみを捕捉することが示されている⁶³。これらの結果を単純に比較すると、12AC2O がエダラボンよりも効果的に ROS を捕捉できることが示唆され、ALS 治療薬シーズとしての可能性を示している。

これまでの多くの研究において、ALS モデルマウスなどでは、ミトコンドリアの著しい異常が確認されている^{64,65,66}。また、変異 SOD1 は、ミトコンドリア内の外膜表面に不溶性の凝集体を形成するためミトコンドリアの機能に影響を与える^{67,68}。これらの研究をまとめると、変異 SOD1 がミトコンドリアの酸化損傷に影響を与え、酸化ストレスを誘発していることが考えられる。本研究では、SOD1^{G85R} または SOD1^{G93A} を一過性にした N2a 細胞で、MitoSOX, CellROX の蛍光が増加した。この MitoSOX, CellROX の蛍光の増加は、12AC2O によって有意に抑制された。以上の事から、12AC2O は変異 SOD1 によるミトコンドリアの異常に対しても保護作用を有することが考えられる。

本研究では、0.3 μM の 12AC2O は ESR を用いた検討においては ROS を抑制することができなかった。しかし、同濃度の 12AC2O は、細胞培養条件下で活性酸素を抑制した。したがって、12AC2O は細胞培養条件下で活性酸素を抑制するだけでなく、細胞内シグナルを活性化して酸化ストレスを抑制する可能性が考えられる。先行研究では、DHPs が細胞内の MAPK などの細胞内シグナルを制御することが示されている⁵⁶。AMPK はこれまでに、抗酸化シグナルを活性化することが知られていることから、12AC2O は直接的に酸化ストレスを抑制するだけでなく、細胞内のシグナルを活性化することで、神経保護的に作用している可能性がある。

結論として、本研究では 12AC2O が変異 SOD1 誘発性の $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ を除去することで、細胞内凝集体を抑制し、さらには変異 SOD1 による神経毒性から細胞を保護することを明らかにした。これらの結果は、12AC2O が ALS の進行を遅らせる有望な治療薬候補であること、そして酸化ストレスが原因で発症する神経変性疾患を治療するための新たな抗酸化化合物としても期待される (Figure 30).

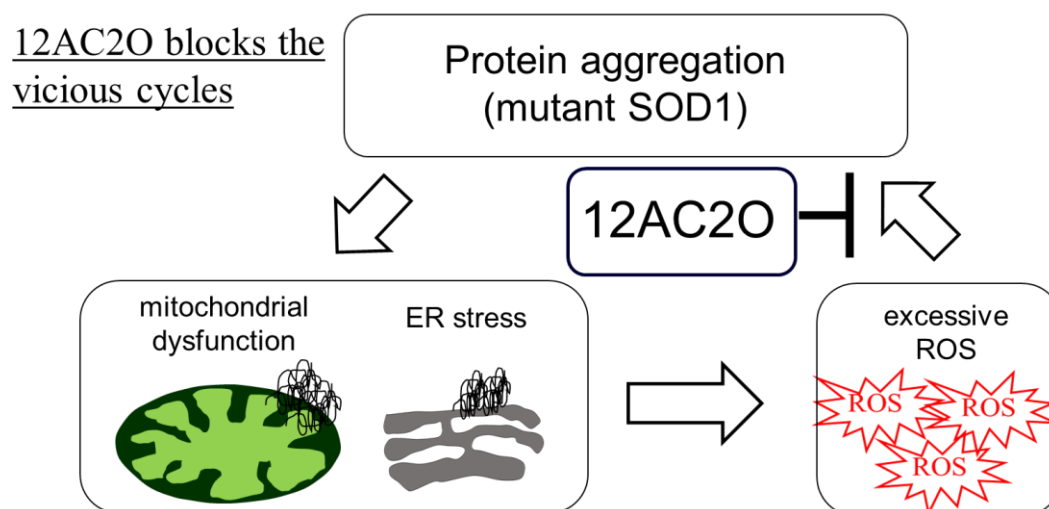


Figure 30. 12AC2O reduces the intracellular aggregates of mutant SOD1 by scavenging mutant SOD1-induced $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{O}_2^-$. 12AC2O protects cells from mutant SOD1-related toxicity. These findings support 12AC2O as a promising candidate to slow the progression of ALS and as a novel ROS scavenger agent to treat neurodegenerative diseases triggered by oxidative stress. Although the pathophysiology of ALS is heterogeneous and complicated, 12AC2O will be a promising candidate in combination with other agents against ALS.

第3章 ヒト乳歯歯髄幹細胞を用いた治療基盤の構築

第1節 緒言

これまでに多くの研究者が ALS 治療薬の開発を試みたが、満足のいく治療効果を見出せた薬剤はない。リルゾール、エダラボンが ALS に対する治療薬として認可されてはいるものの、その効果は極めて限定的であり、また、高齢化社会を迎える現代においてはその治療薬の開発は急務である。著者はこのように治療薬開発が難渋している理由の一つとして、ALS という疾患が単一の薬剤、一つの標的を制御するだけで治療できるような単純な疾患ではないと考えている。近年、アルツハイマー病においても多剤併用療法により神経保護効果が得られたという報告もされている⁶⁹。しかし、高齢者発症型が多い ALS においては、多剤併用するのは非常にリスクが高いことが予想される。そこで、著者は ALS を始めとする病態が複雑な疾患に対して、一つの薬剤で複数の治療標的を制御できるような薬剤の探索を試みた。

新たな治療薬シーズとして、幹細胞、特にヒト乳歯歯髄幹細胞 (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous; SHED) に着目した。SHED は乳歯歯髄の血管周囲に局在する細胞であり、2003 年に初めて単離された。SHED は再生医療の分野でも幅広く用いられており、幹細胞治療において大きな期待をかけられている。また、SHED は軟骨細胞、内皮細胞、神経細胞など様々な細胞に効率的に分化できる^{70,71}。これまでの報告では、SHED は神経栄養因子など多くの因子やエクソソームなどを放出し、中枢神経障害からの改善を促進することが報告されている^{72,73}。さらに、SHED の無血清培養上清 (SHED Conditioned Medium; SHED-CM) はインスリンや、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor; HGF) など様々な増殖因子が骨髄由来幹細胞の無血清培養上清 (BMSC-CM) よりも多く含有されていることが報告されており、複合的な作用を介した保護効果が期待

されている⁷⁴。最近、アルツハイマー病、急性肺疾患や糖尿病の動物モデルを用いた前臨床試験において SHED-CM の様々な因子によるカクテル療法としての有効性が示された^{75,76,77}。ALS では、モデルマウスにおいて歯髄幹細胞由来の無血清培養上清が運動機能の低下を改善することが報告されているが、SHED-CM を用いた前臨床試験などは未だない⁷⁸。

本研究においては、SHED-CM の変異 SOD1 による神経毒性に対する神経保護効果を、細胞モデルおよび、患者由来疾患特異的 iPS 細胞を用いて検討した。N2a 細胞を用いたモデル細胞での検討のみならず、患者由来疾患特異的 iPS 細胞を用いることで、よりヒトの臨床に近いモデルとして、SHED-CM の有効性を明らかにできる。SHED から放出される様々な因子の複合的な効果を明らかにすることで、ALS に対する新規治療薬の開発につながると考えている。さらに、SHED-CM の ALS に対する有効性を確立することができれば、将来的に SHED そのものを移植することによる革新的な治療法の開発につながる。

第 2 節 実験材料及び方法

2-1 倫理

iPS 細胞および SHED-CM に関するすべての実験は、岐阜薬科大学および岐阜大学の倫理委員会で承認されており、日本の「人を対象とする医学・健康科学研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行った (岐阜薬科大学承認番号:1-23 および 1-25, 岐阜大学承認番号:1-25). 岐阜薬科大学の承認番号:1-23 および 1-25, 岐阜大学の承認番号:29-501 および 2020-162. 岐阜薬科大学承認番号:1-23, 1-25, 岐阜大学承認番号:29-501, 2020-162, 登録 ID:UMIN000038561and 000030101.

SHED-CM に関するすべての実験は、岐阜薬科大学、徳島大学の倫理委員会 (3269-1) で承認され、日本の「人を対象とする医学・健康科学研究に関する倫理指針」および日本の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行われた。

ヒト iPSC の作製と使用は、京都大学を含む各部局の倫理委員会の承認を得ている。iPS 細胞を用いた研究は、京都大学の倫理委員会の承認 (R0091, G259) を受け、「人を対象とする医学・保健学研究のための倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究のための倫理指針」に従って実施された。

2-2 薬物及び試薬

第 1 章 2-1 薬物及び試薬で使用した薬物ならびに試薬に準ずる。

抗ミスフォールド SOD1 抗体 (MS785 / MS27), Pifithrin mu (Pi-mu), anti- Insulin-like Growth Factor-II (IGF-II) antibody は R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA) より購入した。p-AKT antibody, AKT antibody, p-ERK antibody, ERK antibody, p-GSK-3 β

antibody, GSK-3 β antibody, p-Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) receptor antibody, HSP60 antibody, HSP70 antibody, HSP90 antibody は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より購入した。IGF-II Human recombinant は Wako pure chemical industry Ltd (Osaka, Japan), ReverTra Ace qPCR RT Master Mix は TOYOBO (Osaka, Japan), StepOne Real-Time PCR System は Wakenyaku Co.,Ltd (Kyoto, Japan), SYBR Green は Takara Bio Inc. (Shiga, Japan)より購入した。Protein G 磁気ビーズ は Millipore (Massachusetts, US) より購入した。STEM Fit は Ajinomoto (Tokyo, Japan) より購入した。N2 サプリメント, Neurobasal Medium, TrypLE は Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, USA) より購入した。マトリゲルは Corning (Arizona, United State) より購入した。

2-3 実験方法

研究方法の概要は、Figure 31 に示した。

細胞を播種した後、SHED-CM を種々の濃度で処置し、その 24 時間後もしくは 48 時間後に検討を行い、統計解析を行った。

2-3-1 SOD1WT-mCherry プラスミドベクター作製

第 1 章 2-2-1 と同様に実施した。

2-3-2 変異型 SOD1-mCherry プラスミドベクター作製

第 1 章 2-2-2 と同様に実施した。

2-3-3 異常タンパク蓄積モデル細胞

第 1 章 2-2-3 と同様に実施した。

2-3-4 SOD1 タンパク蓄積観察

第 1 章 2-2-4 と同様に実施した.

2-3-5 Reactive Oxygen Species (ROS) の測定

第 1 章 2-2-5 と同様に実施した.

2-3-6 ウェスタンブロット法

第 1 章 2-2-6 と同様に実施した.

抗体に関しては, rabbit anti-p-AKT antibody (1:2000), rabbit anti-AKT antibody (1:2000), rabbit anti-p-ERK antibody (1:2000), rabbit anti-ERK antibody (1:2000), rabbit anti-p-GSK3 β antibody (1:2000), rabbit anti-GSK3 β antibody (1:2000), rabbit anti-p-IGF-I receptor antibody (1:2000), rabbit anti-HSP60 antibody (1:2000), rabbit anti-HSP70 antibody (1:2000), rabbit anti-HSP90 antibody (1:2000) を用いた.

2-3-7 細胞生存率測定

第 1 章 2-2-7 と同様に実施した.

2-3-8 細胞毒性計測

第 1 章 2-2-8 と同様に実施した.

2-3-9 リアルタイム qRT-PCR 法

N2a 細胞にベクターを 24 時間トランスフェクションした後, SHED-CM を 24 時間処置した (30%, 50%, 70%). これらの RNA サンプルを抽出し, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて, プロトコールに従い逆転写を行った. qRT-

PCR は SYBR Green を用いて StepOne Real-Time PCR System 上でプロトコールに従って行った。遺伝子プライマーの配列は Table 4 に示す通りである。mRNA の発現量は、 β -actin mRNA の発現量を用いて補正した。

2-3-10 SHED-CM, Fb-CM の調整

徳島大学大学院 医歯薬学研究部 組織再生制御学分野 教授 山本朗仁 博士よりご供与して頂いた。70~80%コンフルエントになった SHED と線維芽細胞を PBS で洗浄し、培養液を無血清 DMEM に交換した。48 時間培養後、培地を回収し、 $440\times g$ で 4-5 分間遠心分離した後、上清を回収し、 $4^{\circ}C$, $17,400\times g$ で 1 分間遠心分離した。

2-3-11 Phospho-receptor tyrosine kinase array (RTK array)

種々の細胞における RTK のチロシンリン酸化の相対レベルを測定した。細胞を SHED-CM で 30 分間処理した。処理後、製品シートに記載されているサンプル採取および保存条件を用いた。翌日、メンブレンを洗浄バッファーで 2 回洗浄した。洗浄バッファーを注意深く除去した後、希釈した抗 phospho tyrosine-Horseradish peroxidase (HRP) を加えた。最後に、ECL prime でインキュベートして HRP 抗体の化学発光を生じさせ、Fusion システムで検出した。

2-3-12 免疫沈降法

細胞を RIPA バッファーで溶解した後、 $15,000\times g$, $4^{\circ}C$ で 30 分間遠心分離した。免疫沈降法は、プロテイン G 磁気ビーズを用いて行った。プロテイン G は、上澄み液が抗ミスフォールド SOD1 抗体 (MS785 / MS27) と結合するようになるまで、 $4^{\circ}C$ で一晩インキュベートした。翌日、ビーズを磁石で回収し、3 回洗浄した。ライセートを 10% 2-メルカプトエタノールを含むサンプルバッファーと

混合し、12% SDS-PAGE を行った。PVDF 膜を Blocking One でブロッキングし、SOD1 抗体 (1:1000) でイムノブロットした。最後に ECL prime でインキュベートし、HRP 抗体化学発光を生じさせ、Fusion システムを用いて検出した。

2-3-13 iPS 細胞の運動神経への分化

LIM Homeobox 3 (Lhx3), Neurogenin 2 (Ngn2), islet 1 (Isl1) 含有のポリシストロンベクター (LNI カセット) を含んだ iPS 細胞を iPS 細胞研究センター (CiRA) 井上 治久 教授からご提供していただいた。この細胞は TrypLE を用いて 7 日ごとに継代した。これらの細胞が運動神経細胞に分化した時点で、STEM Fit を用いてマトリゲルコートしたディッシュにプレーティングした。翌日、すべての培地を N2 サプリメントおよび doxycycline (1 mg/ml) を含む Neurobasal Medium に変更し、7 日間培養を行った。

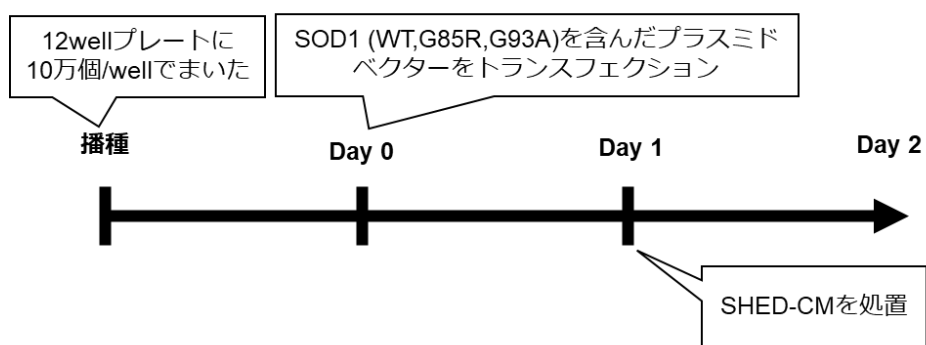
2-3-14 運動神経を用いた検討

LNI カセットを有する iPSC を TrypLE で単細胞に解離させた後、N2 補充液と doxycycline (1 mg/ml) を含む Neurobasal Medium とともにマトリゲルコートした 12well プレート上にプレーティングし、7 日間培養を行った。運動神経細胞に分化したところで、SHED-CM を加え、14 日目に染色した。SHED-CM と線維芽細胞由来 CM (Fibro blast-conditioned medium; Fb-CM) は限外ろ過により約 20 倍に濃縮した (例えば、4 ml を 200 μ l に濃縮した)。iPS 細胞を用いた本研究では、濃縮した両 CM を、N2 サプリメントと doxycycline (1 mg/ml) を含む Neurobasal Medium 1 ml に 25 μ l ずつ添加したものを処置した。生存運動ニューロンの数は、運動神経特異的マーカーである SMI-32 の染色を用いて計数した。

2-3-15 統計学的解析

第1章 2-2-11と同様に実施した.

細胞内凝集体、種々のストレス解析プロトコル



細胞生存率、細胞毒性プロトコル

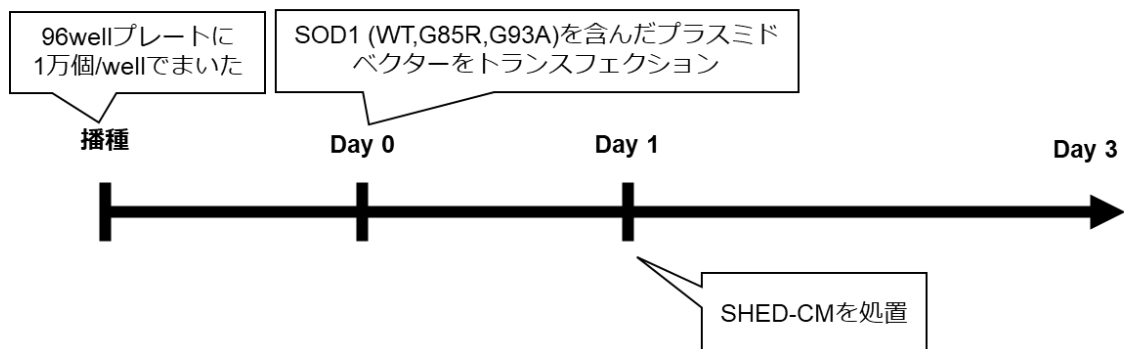


Figure 31. Time course for experimental procedures including transfection, treatment with SHED-CM and analysis.

Table 4 Primer sequence

Gclm Forward 5'-TTGGAGTTGCACAGCTGGATTC-3'

Gclm Reverse 5'-TGGTTTTACCTGTGCCCACTG-3'

Nqo1 Forward 5'-CGCAGACCTTGTGATATTCCAG-3'

Nqo1 Reverse 5'-CGTTTCTTCCATCCTTCCAGG-3'

Ho-1 Forward 5'-CACGCATATAACCCGCTACCT-3'

Ho-1 Reverse 5'-CCAGAGTGTTTCATTCGAGA-3'

Hspd1 Forward 5'-GATATGGCTATTGCTACTGGTGGTGC-3'

Hspd1 Reverse 5'-CCTAAGTCATGAGCTTGAACATCTTC-3'

Hspa1 Forward 5'-TGGTGCAGTCCGACATGAAG-3'

Hspa1 Reverse 5'-GCTGAGAATCGTTGAAGTAGGC-3'

Hsp90aa1 Forward 5'-ATGACAGCGGCAAAGACAAG-3'

Hsp90aa1 Reverse 5'-AGGTCCTCGGAGTCAACCAC-3'

β -actin Forward 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACC-3'

β -actin Reverse 5'-GCTAGGAGCCAGAGCAGTAA-3'

第3節 実験成績

3-1 SHED-CM は変異 SOD1 の細胞内凝集体を抑制し、変異 SOD1 による神経毒性を軽減する

第1章、第2章の研究に基づき、SOD1^{G85R} および SOD1^{G93A} を導入した N2a 細胞を変異 SOD1 モデル細胞として使用した^{28,30}。このモデル細胞を用いて、変異 SOD1 による神経毒性に対する SHED-CM の効果を検討した。その結果、SHED-CM (培地量に対して 50%~70%処置, e.g. 1ml の培地中に 500 μ L~700 μ L) は、SOD1^{G85R} および SOD1^{G93A} の凝集体の蓄積を減少させた (Figure 32A,B and Figure 33A,B)。SOD1^{G85R} および SOD1^{G93A} による神経毒性に対する SHED-CM の効果を検討するため、MTT および LDH アッセイを行った (Figure 32C,D and Figure 33C,D)。その結果、SHED-CM は SOD1^{G85R} および SOD1^{G93A} による神経毒性を 50%程度抑制することがわかった。さらに、他の無血清培養上清との比較を行うために Fb-CM の効果を検討したところ、Fb-CM (培地量に対して 30%処置, e.g. 1 ml の培地中に 300 μ L) は SHED-CM ほどではなかったが、変異 SOD1 の細胞内凝集体を抑制した。しかしながら、Fb-CM は細胞の生存率に対して神経保護効果を示さなかった (Figure 34A-C)。

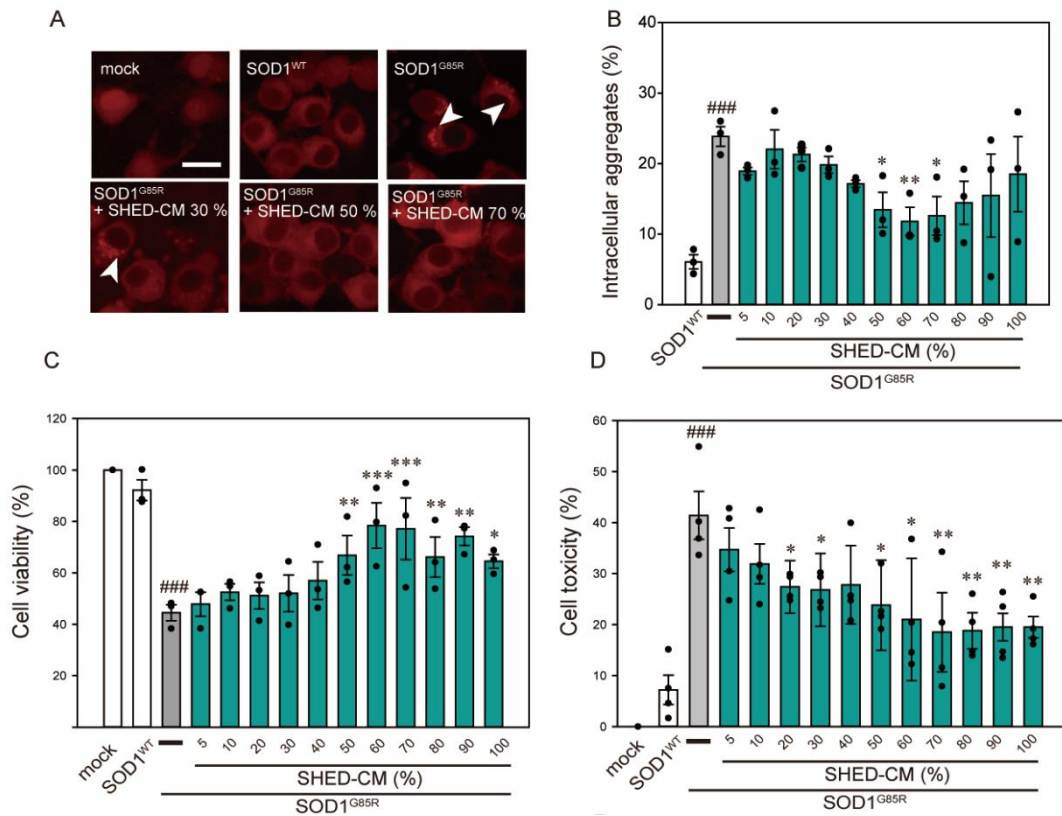


Figure 32. SHED-CM protects against SOD1^{G85R}-induced aggregation and neurotoxicity.

(A–D) shows data on the G85R variant. Representative fluorescent microscopy images of N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} incubated for 24 h with SHED-CM (5%–100%). Arrow heads show SOD1 aggregates. (B): Quantified data on intracellular SOD1 aggregates (expressed as means \pm SEM of three independent experiments). In each experiment, at least 2,000 cells were counted. (C): Cell viability was measured via a CCK-8 assay. (D): Cell toxicity was measured via an LDH assay. N2a cells were differentiated under culture medium (2-mM dbcAMP and 2% FBS) in the presence or absence of SHED-CM (5%–100% / 24 h). Results are presented as means \pm SEM of three independent experiments or as a percentage of “mock” (mock = 100%). ### $p < 0.001$ vs. WT; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$ vs. G85R. Scale bar: 10 μ m.

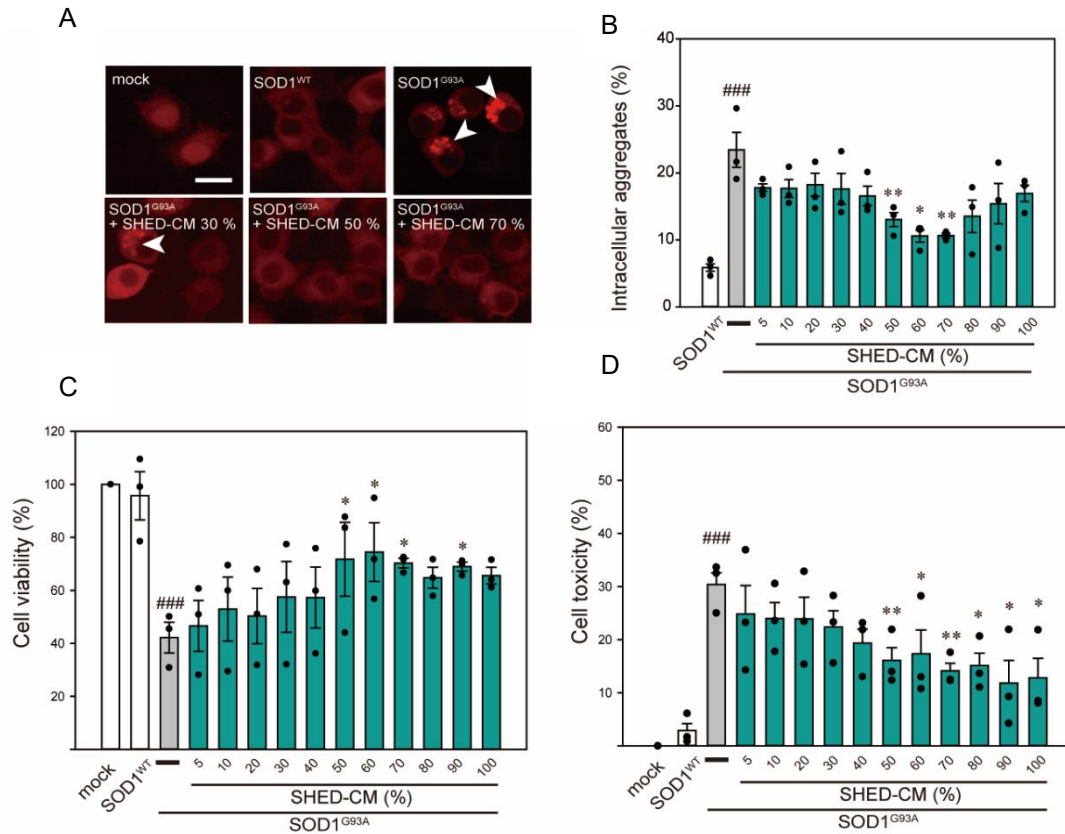


Figure 33. SHED-CM protects against SOD1^{G93A}-induced aggregation and neurotoxicity.

(A–D) shows data on the G93A variant, whereas Representative fluorescent microscopy images of N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} and mCherry-SOD1^{G93A} incubated for 24 h with SHED-CM (5%–100%). Arrow heads show SOD1 aggregates. (B) Quantified data on intracellular SOD1 aggregates (expressed as means \pm SEM of three independent experiments). In each experiment, at least 2,000 cells were counted. (C) Cell viability was measured via a CCK-8 assay. (D) Cell toxicity was measured via an LDH assay. N2a cells were differentiated under culture medium (2-mM dbcAMP and 2% FBS) in the presence or absence of SHED-CM (5%–100% / 24 h). Results are presented as means \pm SEM of three independent experiments or as a percentage of “mock” (mock = 100%). ### $p < 0.001$ vs. WT; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$ vs. G93A. Scale bar: 10 μ m.

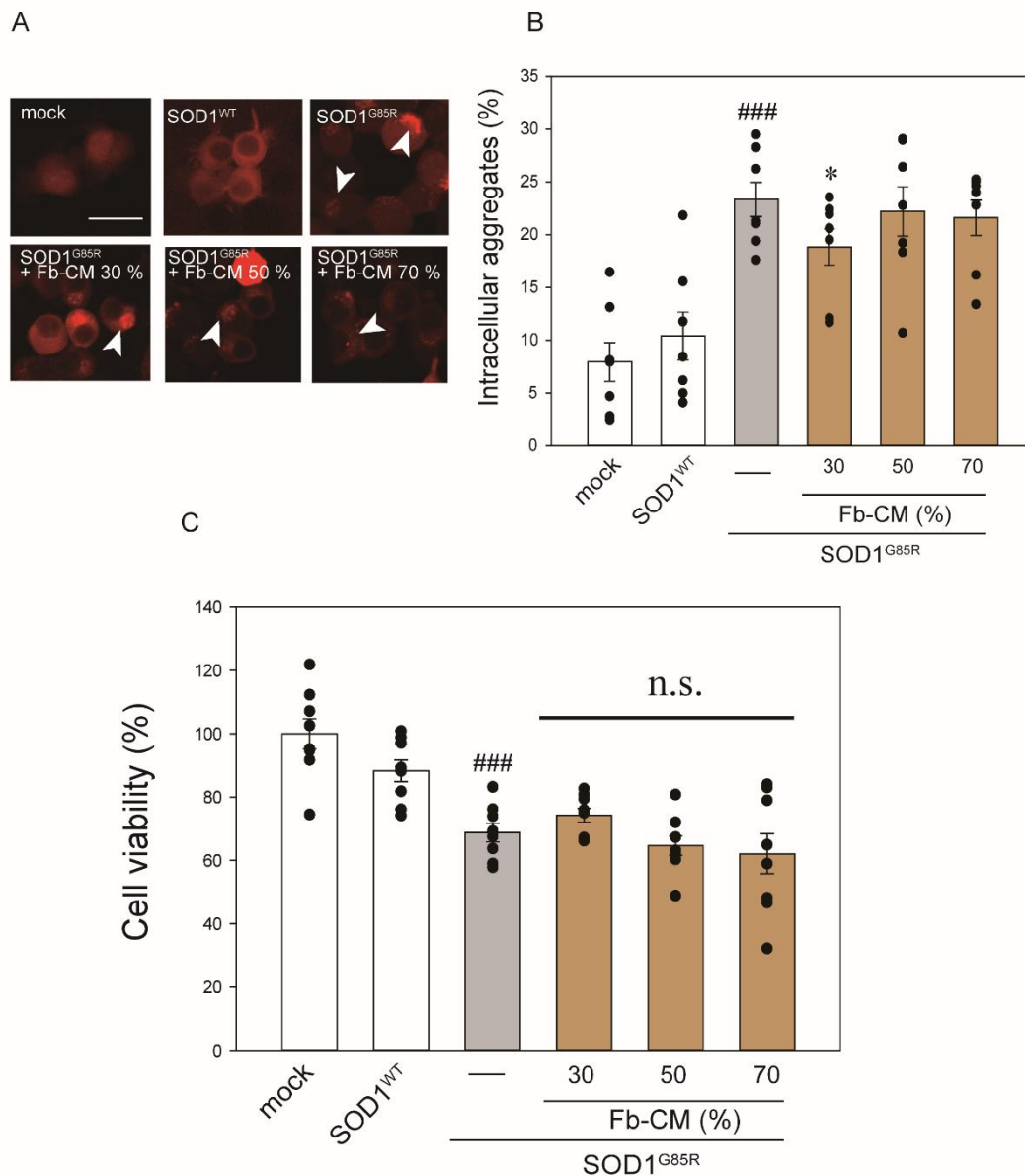


Figure 34. Fb-CM does not protect against SOD1^{G85R}-induced aggregation and neurotoxicity.

(A) Representative fluorescent microscopy images of N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R}, incubated for 24 h with Fb-CM (30%, 50%, 70%). Arrow heads show SOD1 aggregates. (B) Quantified data of intracellular SOD1 aggregates are expressed as the mean \pm S.E.M of the three independent experiments. In each experiment, at least 2000 cells were counted. (C) mCherry, mCherry-SOD1^{WT}, mCherry-SOD1^{G85R} expressing N2a cells were differentiated under culture medium (2 mM dbcAMP, 2% FBS) in the presence or absence of Fb-CM (30%, 50%, 70% / 24 h). Cell viability was measured by CCK-8 assay. Results are presented as the mean \pm S.E.M of the three independent experiments, or as percent of mock (mock = 100%). ### p < 0.001 vs.WT, * p < 0.05 vs. G85R, n.s.: no significant Scale bar: 10 μ m.

3-2 SHED-CMは変異 SOD1 による酸化ストレスを抑制する

酸化ストレスを抑制することで、ALS の進行を抑制することができる³⁰。そこで、CellROX Green, MitoSOX Red を用いて、変異 SOD1 による酸化ストレスに対する SHED-CM の効果を調べた。その結果、SHED-CM (30%, 50%, 70%) により、変異 SOD1 由来の酸化ストレスが抑制されることを確認した (Figure 35A-D)。さらに、酸化ストレスの抑制と抗酸化遺伝子の発現との関係を検討するために、抗酸化ストレスのマーカーとして知られている *Gclm*, *Nqo1*, *Ho-1* について、リアルタイム qPCR を行った。その結果、SHED-CM はこれらの遺伝子の発現に影響を与えないことがわかった (Figure 35E-G)。

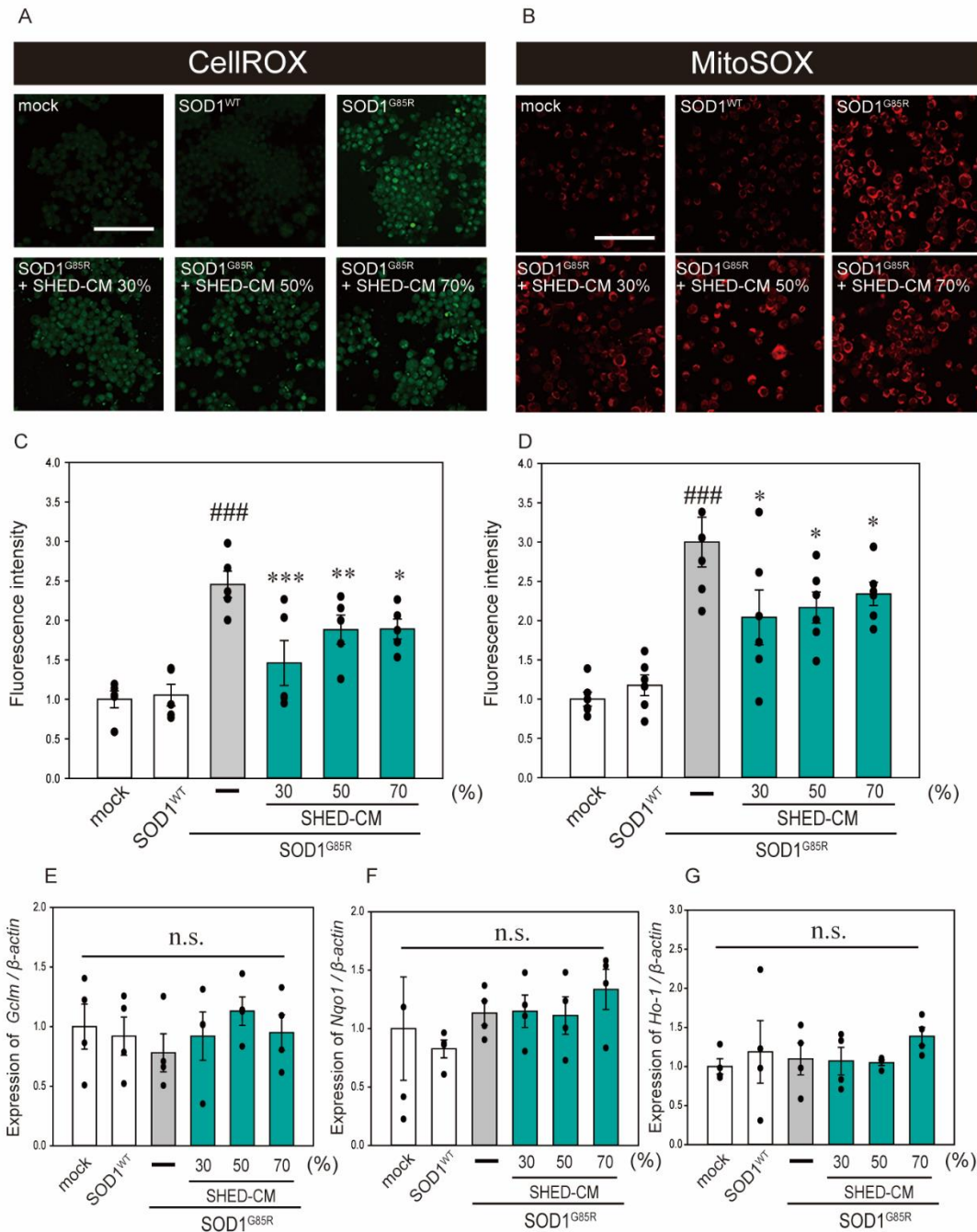


Figure 35. SHED-CM suppresses SOD1^{G85R}-induced oxidative stress.

(A) N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} were treated with SHED-CM (30%, 50%, and 70%) for 24 h. Subsequently, CellROX Green was added to the cell culture to a final concentration of 5 μM and incubated for 30 min at 37°C. (B) MitoSOX Red was added to the cell culture to a final concentration of 5 μM and incubated for 30 min at 37°C. (C and D) The relative fluorescence intensities of CellROX and MitoSOX were respectively quantified by computerized image analysis with Image J. Results are presented as the means ± SEM of three independent experiments, based on the fluorescence intensity of the “mock” (mock = 1). ### p < 0.001 vs. WT; *** p < 0.001, ** p < 0.01, and * p < 0.05 vs. G85R. Scale bar: 100 μm. (E–G) Expression of *Gclm*, *Nqo1*, and *Ho-1* are presented as a ratio of β-actin, respectively. N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} were treated with SHED-CM (30%, 50%, and 70%) for 24 h, and mRNA expressions were analyzed using a SYBR Green-based RT-qPCR assay. The expression levels of mRNAs were normalized to the expression level of β-actin mRNA. Results are presented as means ± SEM from three independent experiments based on the fluorescence intensity of the “mock” (mock = 1). n.s.: not significant.

3-3 SHED-CM は変異 SOD1 による ER ストレスを抑制し、HSP70 レベルを上昇させる

我々は以前の研究で、変異 SOD1 モデル細胞では小胞体ストレスが増加することを報告した⁴⁹。また、小胞体ストレスは ALS 病態の特徴として知られている⁷⁹。そこで、変異 SOD1 由来の小胞体ストレスに対する SHED-CM の効果を検討した。SHED-CM (50%, 70%) は、変異 SOD1 による小胞体ストレスを減少させ (Figure 36A-C), 変異 SOD1 の凝集を抑制した。SHED-CM がこれらの凝集体を抑制するメカニズムを明らかにするために、細胞に幅広く存在し、さまざまな機能を持つ HSP に注目した。HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP27 などの HSP は、シャペロンタンパク質として存在し、細胞内のタンパク質の正しい構造を維持する役割を果たしている⁸⁰。著者は、変異 SOD1 に対する SHED-CM の効果には HSP が関与していると考え、代表的な HSP である HSP60, HSP70, HSP90 のウェスタンブロットを行った。その結果、特に HSP70 の発現が SHED-CM (30%, 50%, 70%) により増加していた (Figure 37A-D)。また、HSP70 の増加が遺伝子発現と関係していることを調べるために、それぞれの HSP と対応している *Hspd1*, *Hspa1*, *Hsp90aa1* のリアルタイム qPCR を行った。その結果、SHED-CM はこれらの遺伝子の発現に影響を与えなかった (Figure 37 E-G)。

変異 SOD1 に対する SHED-CM の保護効果への HSP70 の関与を明らかにするため、HSP70 阻害剤 (Pifithrin mu) を用いて、細胞凝集体と細胞生存率を調べた。SHED-CM と HSP70 阻害剤を併用により、変異 SOD1 による細胞凝集体が増加し、SHED-CM の保護効果が減弱した (Figure 38A-C)。これらの結果は、HSP70 が SHED-CM の保護効果の一部を担っていることを示している。

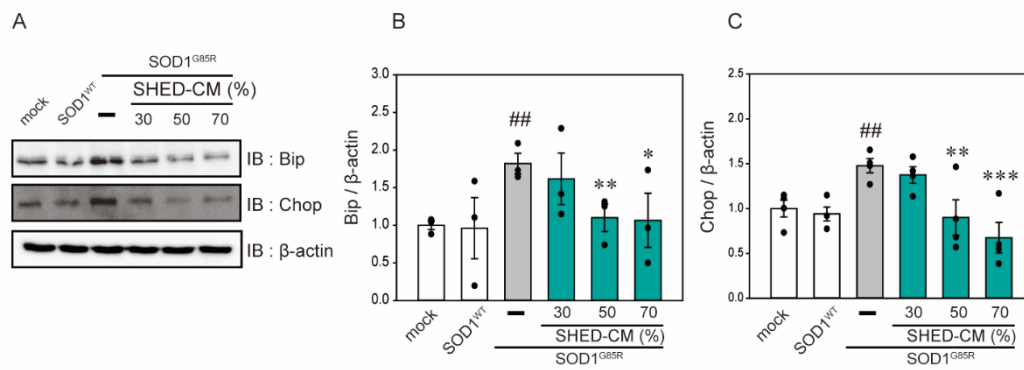


Figure 36. SHED-CM suppresses SOD1^{G85R}-induced ER stress.

(A) N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} were treated with SHED-CM (30%, 50%, and 70%) for 24 h. Subsequently, immunoblot analysis of Bip and Chop was conducted in relation to ER stress. (B and C) Densitometric quantification of Bip and Chop. ### $p < 0.001$ vs. WT; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$ vs. G85R.

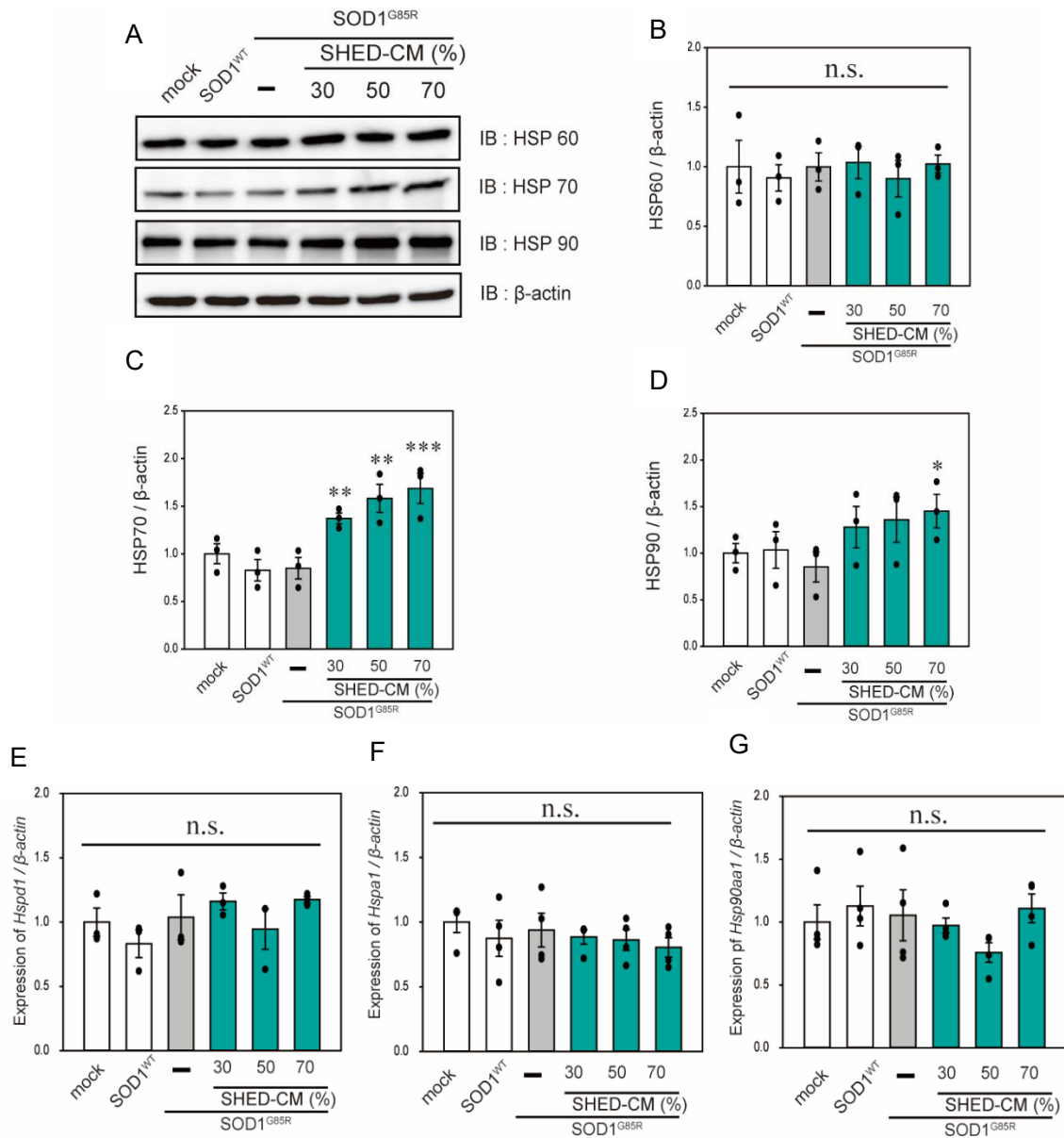


Figure 37. SHED-CM suppresses SOD1^{G85R}-induced ER stress and increases HSP70 levels.

(A) Immunoblot analysis of HSP60, HSP70, and HSP90. (B-D) Densitometric quantification of HSP60, HSP70, and HSP90. Results are presented as means \pm SEM of three independent experiments based on the fluorescence intensity of the “mock” (mock = 1). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$ vs. G85R. n.s.: not significant. (E-G) N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} were treated with SHED-CM (30%, 50%, and 70%) for 24 h, HSP-related gene mRNA expression of HSP60, HSP70, and HSP90 (*Hspd1*, *Hspa1*, and *Hsp90aa1*, respectively) were analyzed using the SYBR Green-based RT-qPCR assay. The expression levels of mRNAs were normalized to the expression level of β -actin mRNA. Results are presented as means \pm SEM of three independent experiments based on the fluorescence intensity of the “mock” (mock = 1). n.s.: not significant.

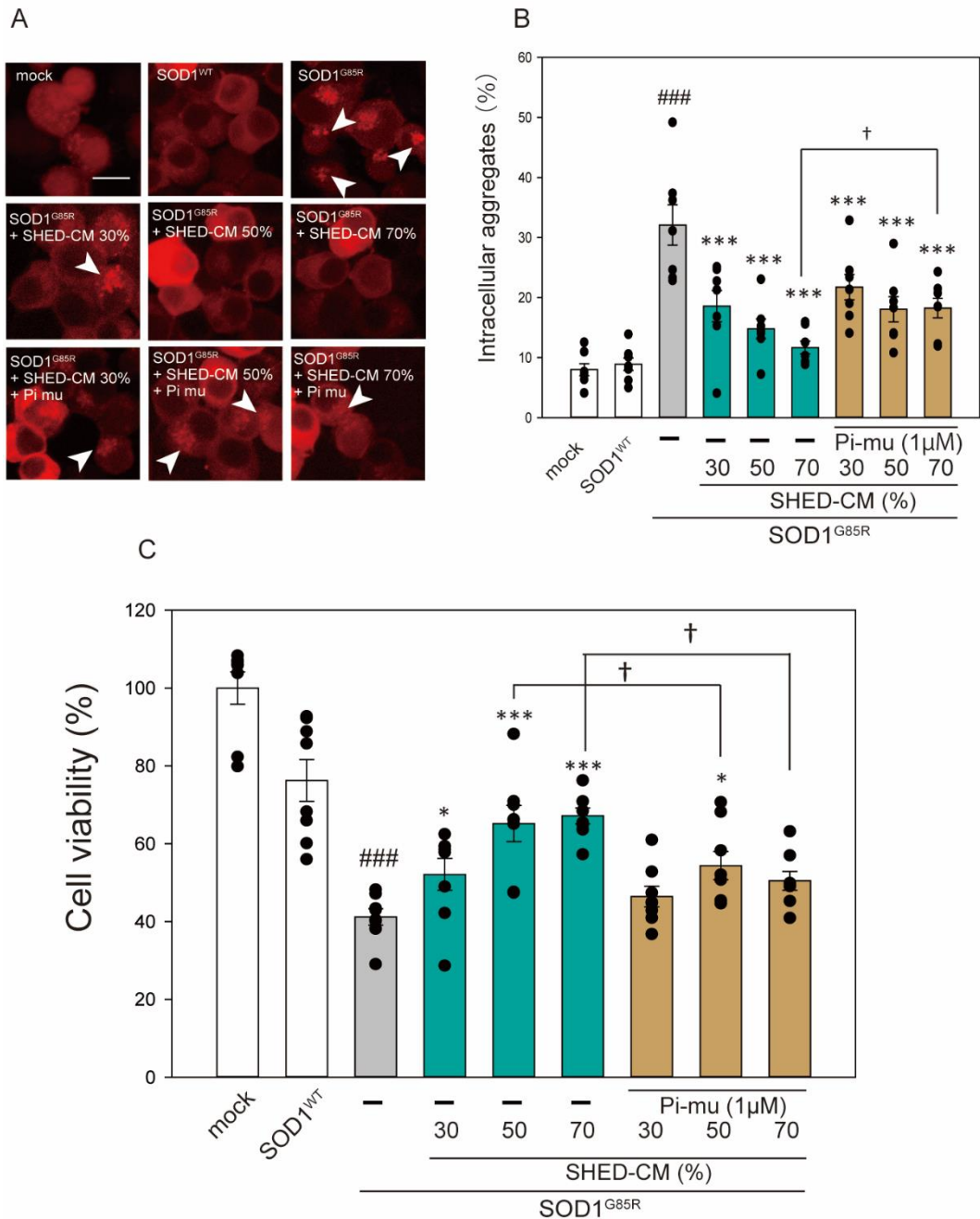


Figure 38. HSP70-related protective effects of SHED-CM.

(A) Representative fluorescent microscopy images of N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} incubated for 24 h with SHED-CM (30%, 50%, and 70%) and the HSP70 inhibitor Pifithrin mu (Pi mu) (1 μM / 24h). Arrow heads show SOD1 aggregates. (B) Quantified data of intracellular SOD1 aggregates are expressed as means ± SEM of three independent experiments. In each experiment, at least 2,000 cells were counted. ### p < 0.001 vs. WT; *** p < 0.001, ** p < 0.01, and * p < 0.05 vs. G85R; † p < 0.05 vs. G85R treatment of SHED-CM. Scale bar: 10 μm. (C) mCherry-, mCherry-SOD1^{WT}-, and mCherry-SOD1^{G85R}-expressing N2a cells were differentiated in culture medium (2-mM dbcAMP and 2% FBS) in the presence or absence of SHED-CM (30%, 50%, and 70% / 24 h) and the HSP 70 inhibitor (Pi mu) (1 μM / 48h). Cell viability was measured via a CCK-8 assay. Results are presented as means ± SEM of three independent experiments or as a percentage of the “mock” (mock = 100%). ### p < 0.001 vs. WT; *** p < 0.001, ** p < 0.01, and * p < 0.05 vs. G85R; † p < 0.05.

3-4 SHED-CMはIGF-1受容体を介して神経保護作用を持つ

SHED-CMには様々な成長因子が含まれている⁷³。そこで、SHED-CMの神経保護効果と受容体活性化との関係を調べるために、受容体のリン酸化を網羅的に検出するRTK arrayを行った。数多くの受容体の中で、SHED-CMによりIGF-1Rが活性化される傾向にあった。さらに、ウエスタンブロット法でもSHED-CMによるIGF-1Rの活性化を確認した (Figure 39A-C and Figure 40A)。IGF-1R活性化によるシグナル伝達経路を明らかにするために、IGF-1Rの下流シグナルタンパク質であり、かつALSに関連するAKTとERKに注目した^{81,82,83}。SHED-CM (50%, 70%)はAKTを活性化し、その下流シグナルであるGSK-3 β をリン酸化した (Figure 40B-F)。これまでの研究で、SOD1マウスモデルにおいてAKT-GSK-3 β 経路のリン酸化が神経保護効果を持つことが示されている⁸⁴。したがって、SHED-CMの神経保護効果は、IGF-1R, AKT, GSK-3 β のリン酸化に一部関係していると考えられる。さらに、SHED-CMとIGF-1Rとの関係を明らかにするために、ヒト組換えIGF-2 (hrIGF-2)と中和IGF-2抗体を用いてSHED-CMの効果を検討した。hrIGF2は、SHED-CMに含有されている量と等しくなるように用いた。hrIGF-2はSHED-CMの保護効果ほどではないが、保護効果の傾向があることを示した (Figure 41A)。さらに、SHED-CMの保護効果は中和IGF-2抗体によって軽減された (Figure 41B)。これらの結果は、SHED-CMの保護効果にIGF-1Rが関与している可能性を示唆している。

RTK array

Coordinate	Receptor Family	RTK/Control	Coordinate	Receptor Family	RTK/Control
A1,A2	Reference Spots		C17,C18	Tie	Tie-1
A23,A24	Reference Spots		C19,C20	Tie	Tie-2
B1,B2	EGF R	EGF R	C21,C22	NGF R	TrkA
B3,B4	EGF R	ErbB2	C23,C24	NGF R	TrkB
B5,B6	EGF R	ErbB3	D1,D2	NGF R	TrkC
B7,B8	EGF R	ErbB4	D3,D4	VEGF R	VEGF R1
B9,B10	FGF R	FGF R2	D5,D6	VEGF R	VEGF R2
B11,B12	FGF R	FGF R3	D7,D8	VEGF R	VEGF R3
B13,B14	FGF R	FGF R4	D9,D10	MuSK	MuSK
B15,B16	Insulin R	Insulin R	D11,D12	Eph R	Eph A1
B17,B18	Insulin R	IGF-1R	D13,D14	Eph R	Eph A2
B19,B20	Axl	Axl	D15,D16	Eph R	Eph A3
B21,B22	Axl	Dtk	D17,D18	Eph R	Eph A6
B23,B24	Axl	Mer	D19,D20	Eph R	Eph A7
C1,C2	HGF R	HGF R	D21,D22	Eph R	Eph A8
C3,C4	HGF R	MSP R	D23,D24	Eph R	Eph B1
C5,C6	PDGF R	PDGF Ra	E1,E2	Eph R	Eph B2
C7,C8	PDGF R	PDGF Rβ	E3,E4	Eph R	Eph B4
C9,C10	PDGF R	SCF R	E5,E6	Eph R	Eph B6
C11,C12	PDGF R	Flt-3	E7,E8	Contrpl	PBS
C13,C14	PDGF R	M-CSF R	F1,F2	Reference Spots	
C15,C16	RET	c-Ret			

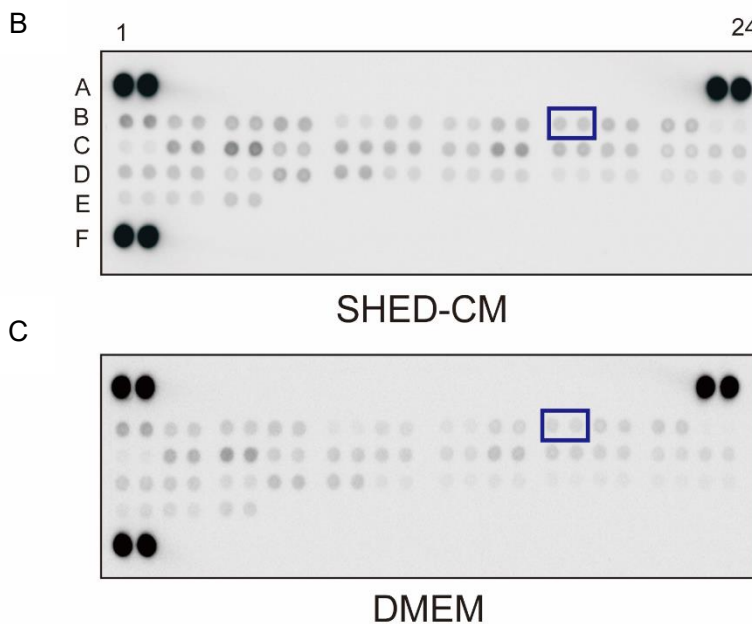


Figure 39. SHED-CM activates various receptors, especially IGF-1R.

(A-C) To comprehensively detect for receptor phosphorylation by using RTK array, N2a cells incubated for 30min with SHED-CM (70%). SHED-CM activates many receptors, especially IGF-1R (blue box).

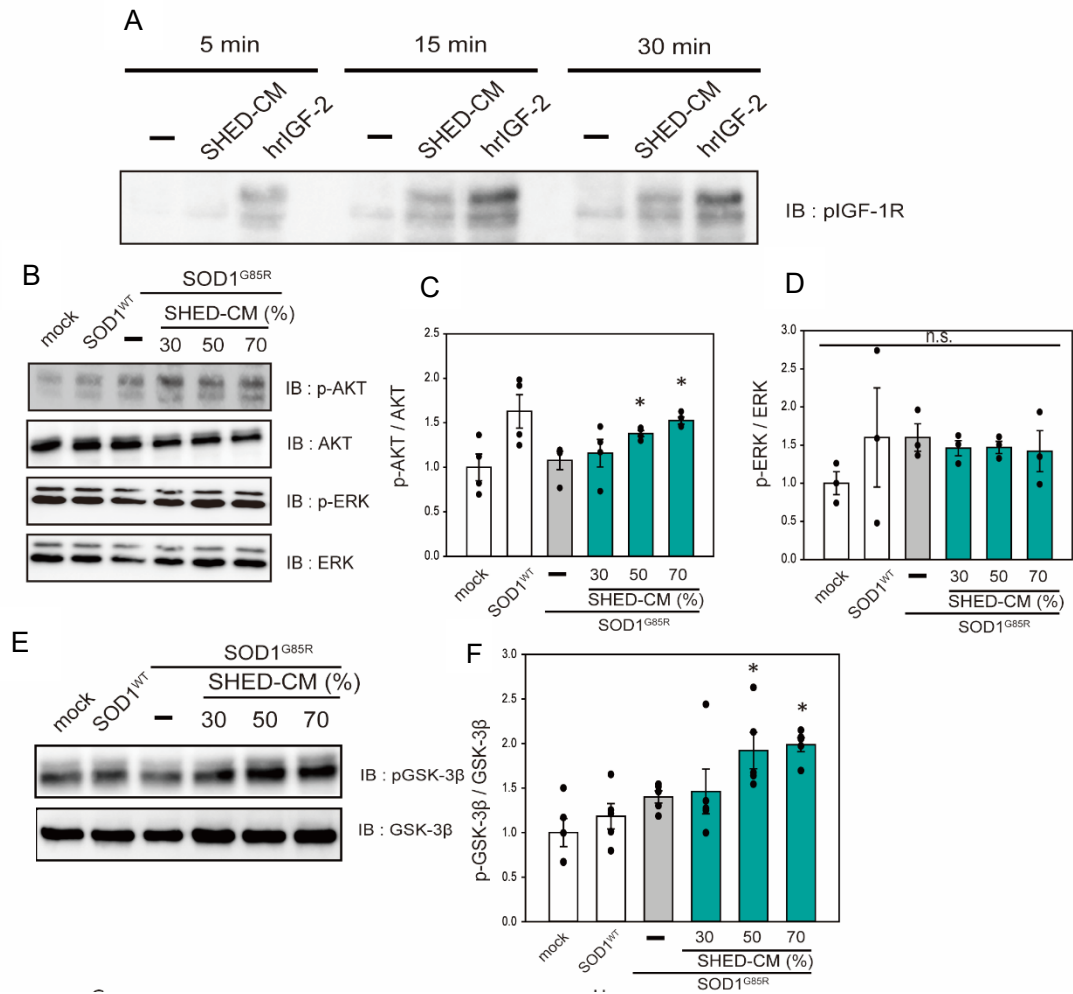


Figure 40. SHED-CM effects the activation of IGF-1 receptor.

(A) N2a cells were treated with SHED-CM (50%) for 5, 15, and 30 min. Subsequently, immunoblot analysis of p-IGF-1R was conducted. (B and E) The lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies for phosphorylated AKT (p-AKT), phosphorylated ERK (p-ERK), phosphorylated GSK-3β (p-GSK-3β), and β-actin. (C, D, and F) Densitometric quantification of p-AKT, p-ERK, and p-GSK-3β. Results are presented as means ± SEM of three independent experiments based on the fluorescence intensity of the “mock” (mock = 1). * p < 0.05 vs. G85R.

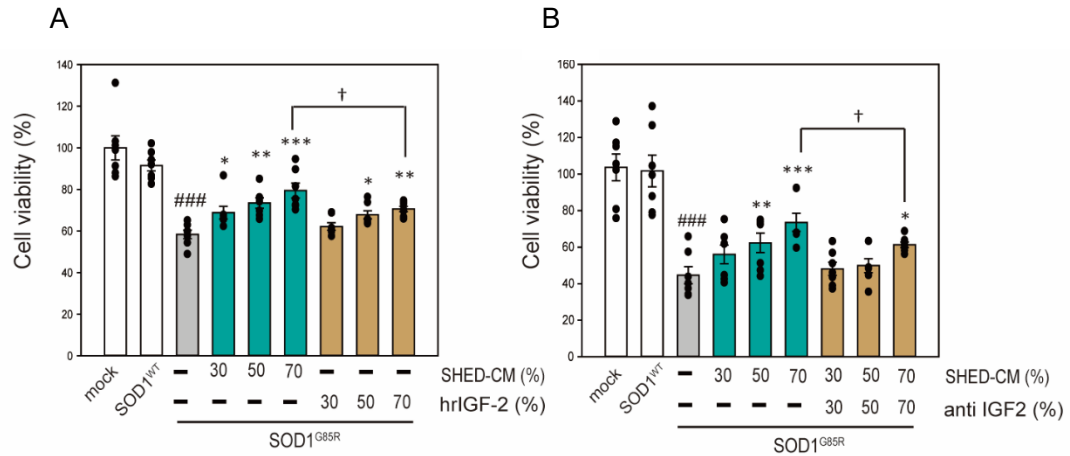


Figure 41. SHED-CM effects the activation of IGF-1 receptor.

(A) N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} were treated with SHED-CM (30%, 50%, and 70%) and human-recombinant IGF-2 (same amount as included in SHED-CM) for 24 h. Cell viability was measured using a CCK-8 assay. (B) N2a cells expressing mCherry-SOD1^{G85R} were treated with SHED-CM (30%, 50%, and 70%) and neutralizing anti-IGF-2 antibody for 24 h. Cell viability was measured via a CCK-8 assay. Results are presented as means \pm SEM of three independent experiments based on the fluorescence intensity of the “mock” (mock = 100). ### $p < 0.001$ vs. WT; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$ vs. G85R; † $p < 0.05$.

3-5 SHED-CMはiPS細胞由来の運動神経細胞を保護する効果がある

ヒト由来の細胞に対する SHED-CM の効果を調べるため、FALS 患者 (F144LVX) 由来の iPS 細胞を用い、7日間かけて運動神経細胞に分化させた⁸⁵。これらの細胞は、運動神経細胞のマーカーである SMI-32 を高レベルで発現していた。7日間の分化後、SHED-CM (50%) と Fb-CM (50%) を培養液に加えてさらに7日間培養し、14日目に SMI-32 の免疫染色を用いて生存している運動ニューロンを測定した。ただし、iPS 細胞と SHED、Fibro の培養液は異なるため、SHED-CM、Fibro-CMは限外ろ過により約20倍に濃縮した。その結果、無処理群では14日目にはほとんどの細胞が死滅していたのに対し、SHED-CM 処理群では生存率が約60%まで回復した。一方で Fb-CM による保護効果は見られなかった (Figure 42A-C)。さらに、SALS 患者由来の iPS 細胞でも検討したところ、SALS に対しても SHED-CM による同様の効果を確認した (Figure 42D,E)。さらに、SHED-CM の保護効果を調べるために、凝集した SOD1 を特異的に認識する抗体を用いた免疫沈降法により、運動神経細胞における異常タンパク質の蓄積を検討した。その結果、SHED-CM は FALS のミスフォールド SOD1 を減少させた。一方で Fb-CM による変化は見られなかった (Figure 42F)。以上より、SHED-CM が疾患特異的 iPS 細胞由来運動神経に対しても保護効果を有すること、また SHED-CM が FALS だけでなく SALS にも有効であることを示唆しており、有望な治療薬シーズとなる可能性がある。

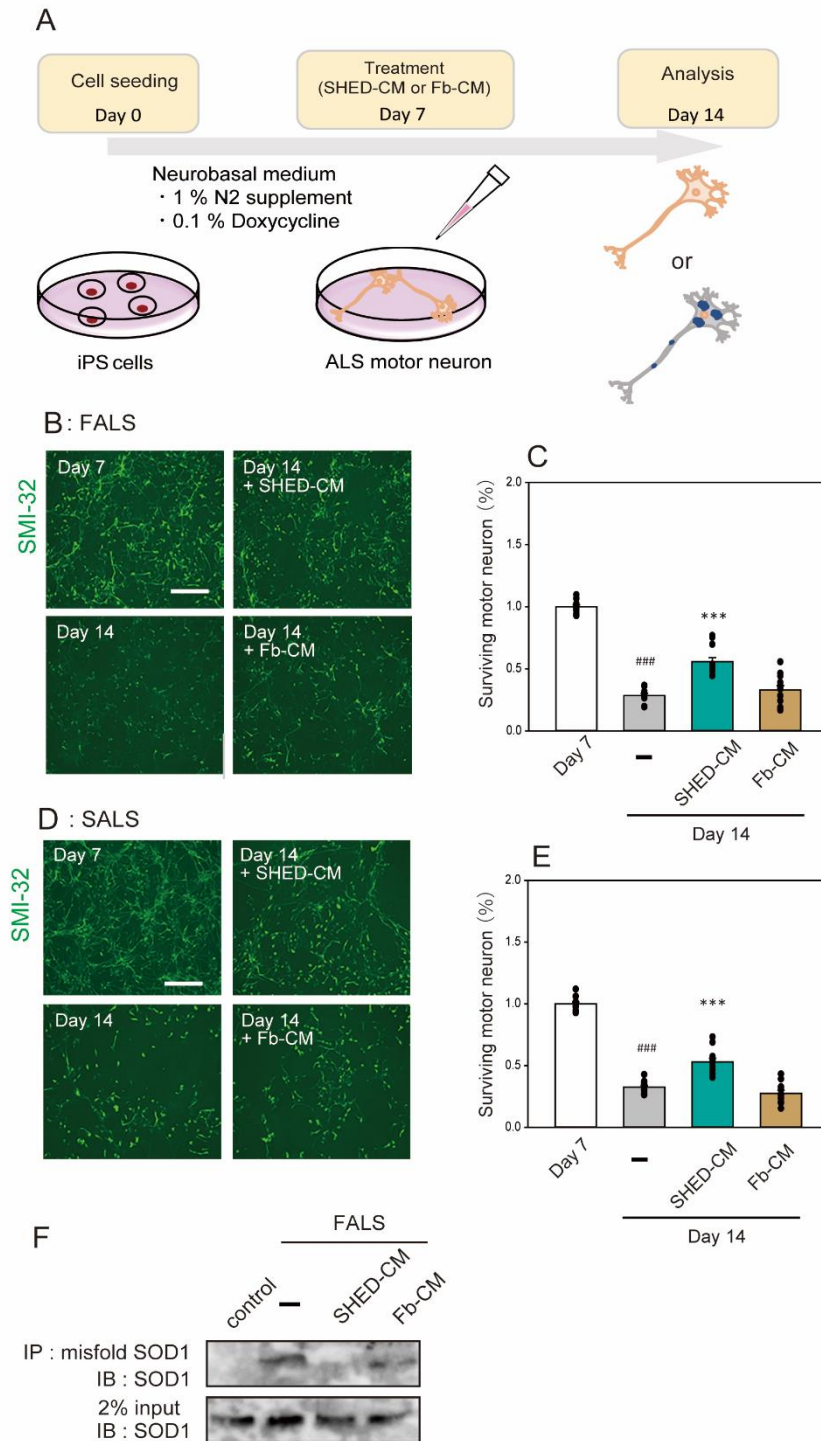


Figure 42. Neuroprotection of ALS motor neurons using (or treated with) SHED-CM.

(A) The scheme of this study. (B and D) Generation of motor neurons from iPSCs derived from ALS patient. Representative images of ALS motor neurons on day 7 and day 14 after treatment with vehicle, ultrafiltered SHED-CM (50%), or Fb-CM (50%). Treatment with SHED-CM increased survival of ALS motor neurons compared with the survival of vehicle-treated ALS motor neurons. Scale bar: 200 μ m. (C and E) Cell viability was measured by staining SMI-32. Results are presented as means \pm SEM of three independent experiments based on the fluorescence intensity of the “mock” (mock = 100). ### $p < 0.001$ vs. Day 7; *** $p < 0.001$ vs. Day 14. Scale bar: 200 μ m. (F) Accumulation of misfolded SOD1 protein in ALS patient iPSC-derived motor neurons was detected using an immunoprecipitation assay.

第4節 考察

これまでに著者は N2a 細胞を用いて、患者の運動神経細胞の特徴に類似した変異 SOD1 毒性モデルを作製した(第1章)。著者の先行研究では、変異 SOD1 毒性に対して、AMPK-mTOR 経路を介したオートファジーの活性化や、抗酸化作用を有する化合物などが新たな治療薬候補となることを明らかにした^{30,49}。現在、日本で ALS の治療にはエダラボンやリルゾールが用いられている。しかしながら、両剤ともその効果が極めて限定的であり、高齢者に対して使用し難い問題点がある。さらに、ALS は単一の薬剤で抑制できるほど単純な疾患ではないことが考えられる。そこで、著者は新規治療薬の創出に向けて複合的な効果をもたらす薬剤の特定を行った。新規治療薬のシーズとして神経栄養因子などの多くの因子を放出する SHED に注目した。SHED および SHED-CM の有効性は、糖尿病、免疫疾患など様々な疾患に対して現在、世界中で活発に研究されている^{86,87}。しかし、神経系、特に ALS における SHED-CM の効果については、これまで検討されていなかった。そこで第3章では、変異 SOD1 を導入した N2a 細胞および ALS 患者由来の iPS 細胞において SHED-CM による保護作用について検討を行った。

結果、SHED-CM は、N2a 細胞モデルおよび iPS 細胞において、変異 SOD1 の細胞内凝集体を減少させた。さらに、この凝集の抑制には HSP が関与していることも示した。これまでの報告では、HSP 誘導剤である arimoclomol が、SOD1Tg マウスの運動機能と生存率を回復させた^{88,89}。また、特定 SOD1 の変異を有する ALS 患者に対して治療効果が期待できた⁹⁰。しかしながら、ALS 患者を対象に arimoclomol を用いた二重盲検プラセボ試験では、統計的に有意なレベルでは検出されなかった。本研究では、SHED-CM 投与により HSP70 レベルが上昇し、HSP90 も上昇傾向を示した。HSP70 の阻害剤を用いた検討においては、

SHED-CMによる保護効果が軽減された。これらの結果は、変異 SOD1 に対する SHED-CM の保護効果に、HSP が一部関与していることを示唆している。先行研究では、HSP が変異 SOD1 由来の FALS の運動ニューロンに対してだけでなく、SALS 患者由来の運動ニューロンに対しても保護効果を持つことが示されている⁹¹。これらの結果より、SHED-CM は、FALS 患者だけでなく、SALS 患者でも有望な治療薬シーズになり得ることが考えられる。

SHED-CM には、インスリン、HGF、血管内皮成長因子 (VEGF)、各種バイオメタルなど、さまざまな成長因子が含まれている。そこで、RTK アレイを用いて、SHED-CM によってリン酸化される受容体を調べた。その結果、SHED-CM は IGF など様々な受容体を活性化した (Figure 39)。これまでの報告では、ALS マウスモデルにおいて IGF-1R が活性化されると生存期間が延長することが示されている^{84,92}。今回の結果は、SHED-CM による IGF-1R, AKT, GSK-3 β 経路の活性化が細胞の生存に大きく寄与していることを示唆している。他にも多くの研究で、GSK-3 β と変異 SOD1 の関係性の存在が報告されている。GSK-3 β 阻害剤は、SOD1Tg マウスのアポトーシスを抑制し、運動機能の低下などを抑制する^{93,94}。これらの結果は、SHED-CM で見出された保護効果に GSK-3 β のリン酸化が一部関与していることを示唆している。

これまでに、HGF が本邦において ALS の治療薬の一つとして治験が実施されている。HGF は肝臓からクローニングされた増殖因子であるが、強力な神経栄養因子として作用する。SOD1Tg マウスと HGF を全身に過剰発現する Tg マウスを交配させると SOD1 マウスの寿命が顕著に増加することが明らかになっている。さらに、ヒト型リコンビナント HGF タンパク質を SOD1Tg ラットの髄腔内に持続投与したところ進行を有意に抑制した^{95,96}。リコンビナント HGF タンパク質はマーモセットの脊髄損傷モデルにおいても有効性が認められている⁹⁷。今回の研究では、SHED-CM は N2a 細胞の HGF 受容体を活性化しなかった

(Figure 39). これは N2a 細胞の HGF 受容体の発現量が少ないためと推測される. iPS 細胞由来の運動神経の HGF 受容体が発現しているかを今後確認する必要がある.

近年, iPS 細胞が ALS の創薬研究に用いられるようになってきた. その結果, パーキンソン病の治療薬であるロピニロールが, ALS の新規治療薬の候補として同定された⁹⁸. 第 3 章では iPS 細胞から分化させた運動神経を用いて SHED-CM の保護効果を検討した. 変異 SOD1 に対して SHED-CM と iPS 細胞を用いた初めての研究である.

今回の研究にはまだ検討すべき点が多くある. SHED-CM による FALS, SALS 由来運動ニューロンに対する有効性を *in vitro* で検討したが, さらなる SHED-CM の有効性を明らかにするためには, 他の変異型 (欧米で多く報告されている *C9orf72*, *FUS* など) を持つ患者由来の iPS 細胞でさらに検討する必要がある. さらに, 神経細胞だけでなく生体内のグリア細胞との共培養系を用いて評価する必要もある.

SHED-CM を用いた研究は数多く行われているが, SHED そのものを使用した臨床試験はこれまでほとんど報告されていない. しかしながら, SHED の臨床応用を開発する目的で多くの研究が行われてきた. 現在, SHED の患者への臨床応用は再生医療の焦点となっている⁹⁹. SHED 治療の長期モニタリングにより, 安全で副作用がないことがわかっている^{100,101}. さらに, SHED は, 機能的・構造的に活性化した神経細胞を含む様々な細胞に分化することができる. したがって, SHED は幹細胞治療に利用できる大きな可能性を秘めている. 将来的には, SHED-CM だけでなく SHED そのものによる, 様々な疾患に対して広く使用できる臨床グレードの薬剤として開発されることが期待されている (Figure 43).

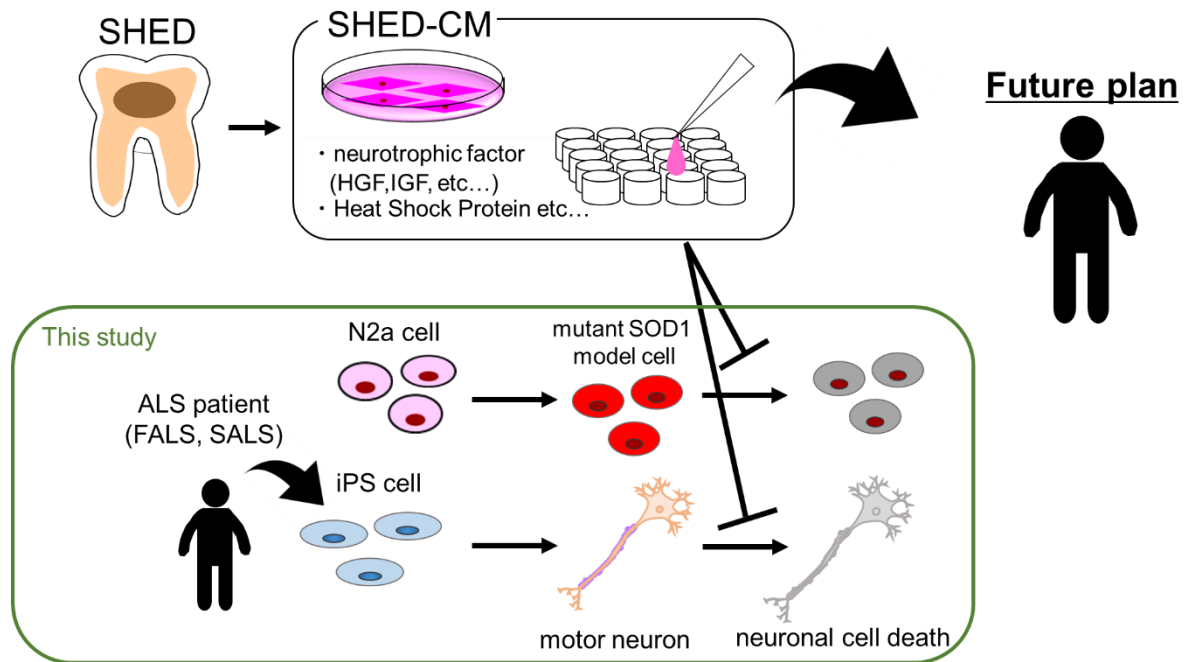


Figure 43. SHED-CM is a promising treatment for amyotrophic lateral sclerosis.

we reveal that SHED-CM is a promising candidate for the treatment of ALS using iPS cells. SHED release factors such as neurotrophic factors. The efficacy of SHED and SHED-CM are now being actively studied worldwide. However, the effects of SHED-CM on the nervous system, especially in ALS, had previously not been investigated. In the present study, SHED-CM exhibited protective effects in mutant SOD1-transfected N2a cells and ALS patient-derived iPS cells. Few clinical trials in which SHED was used have been reported to date. However, many studies have been conducted for the purpose of developing the clinical application of SHED. Now clinical application of SHED into patients is a focus of regenerative medicine. Indeed, SHED exists in young human bodies. In addition, long-term monitoring of SHED treatment shows that it is safe and does not produce adverse reaction. Moreover, SHED can differentiate into various cells including chondrocytes, endothelial cells, and functionally and structurally active neurons. Therefore, SHED has great potential for use in stem cell therapy. In the future, SHED and SHED-CM are expected to be developed as clinical grade agents that could be widely used against various diseases.

総括および結論

これまでに ALS モデル動物などを用い 100 を超える治療薬候補が提言されてきた。しかし、ヒトで十分な効果が見込める薬剤は未だ見出されていない。その理由として以下の 3 点が考えられる。

- ・ 診断時には既に多くの運動神経が不可逆的に脱落し、症状が進行している。
- ・ 既存の治療薬であるエダラボンは効果が極めて限定的である。
- ・ ALS の発症が単一薬剤で抑制できるほど単純な発症、進行機構ではない。

上記の課題に対し、これまでに様々な角度から治療薬開発に向けアプローチを行ってきた。まず、著者らは ALS 特に FALS で最も患者数が多いとされている変異 SOD1 モデル細胞を作製した。このモデル細胞では、実際の ALS 患者剖検で見られるような変異 SOD1 の凝集体の蓄積、種々のストレス発現を確認することができた。このモデル細胞を用いて、第 1 章から第 3 章まで上記の課題を解決できうる薬剤の探索を行った。さらに、よりヒトに近いモデルでの検討を行うために、第 3 章ではヒト患者由来疾患特異的 iPS 細胞を用いて検討を行った。

第 1 章では、発症以前から神経障害を抑制することが重要であるため、予防医学の観点より検討、考察を行った。高齢者でも日常的に摂取可能であるという観点から EBCG に着目し、変異 SOD1 による毒性に対する保護効果について検討し以下の成果を得た。

- 1) 変異 SOD1 凝集体を EBCG またその含有成分である kaempferol, kaempferide, p-CA, ArtC が減少させ、さらに細胞障害を抑制した。
- 2) 変異 SOD1 による酸化ストレス、小胞体ストレスを kaempferol, kaempferide, p-CA が抑制した。

3) kaempferol と p-CA は分解系の一つであるオートファジーを活性化することで、変異 SOD1 凝集の蓄積を抑制させた。

変異 SOD1 毒性に対して、p-CA はオートファジーの活性化、並びに抗酸化作用により神経保護的に作用することを本研究において明らかにした。Kaempferol や p-CA だけでなく、他の多くの有効成分を含有している EBCG は日頃より気軽に摂取することが可能であり、予防医療の観点より長年のストレスなどの蓄積で発症する神経変性疾患に対して非常に有効な予防薬としての役割を担うことが考えられる。

第 2 章では、既存薬であるエダラボンよりも有効な治療薬について探索した。前述のとおり、現在 ALS の治療薬としてはエダラボンが主に用いられているが、肝機能が低下している患者には適応できない、また生存期間も 3 か月程度延長するだけなど治療薬とは言い難いものである。そこで、著者は新規治療薬シーズとして強力な抗酸化作用を有する化合物、特に低分子創薬 (*gem*-DHPs) に着目し探索を行い以下の成果を得た。

- 1) 変異 SOD1 凝集体、それによる神経毒性を *gem*-DHPs (12AC2O) が減少させた。
- 2) 変異 SOD1 による酸化ストレスを *gem*-DHPs (12AC2O) が抑制させた。
- 3) *gem*-DHPs (12AC2O) は $\cdot\text{OH}$ および $\cdot\text{O}_2$ にも直接的に作用することで保護的に作用した。

本研究では 12AC2O が変異 SOD1 誘発性の $\cdot\text{OH}$ および $\cdot\text{O}_2$ を除去することで、細胞内凝集体を抑制し、さらには変異 SOD1 による神経毒性から細胞を保護することを明らかにした。これらの結果は、12AC2O が ALS の進行を遅らせる有望な治療薬候補であること、そして酸化ストレスが原因で発症する神経変性疾患を治療するための新たな活性酸素消去剤としても期待される。

第 3 章では、ALS という疾患が単一の薬剤、一つの標的を制御するだけで治療できるような単純な疾患ではないと考えている。そこで、著者らは ALS を始めとする病態が複雑な疾患に対して、複数の治療標的を制御できるような薬剤の開発を行った。新たな治療薬シーズとして、SHED に着目した。今回の研究ではインスリンや、HGF など様々な増殖因子が豊富に含まれている SHED-CM を用いて検討を行い以下の成果を得た。

1) 変異 SOD1 凝集体、それによる神経毒性また種々のストレスを SHED-CM が減少させた。

2) SHED-CM は HSP70 の増加、IGF-1-receptor/AKT/GSK-3 β シグナルなどを活性化することで細胞保護効果を有している。

3) SHED-CM は iPS 細胞由来の運動神経においても神経保護効果を有している。

SHED-CM が変異 SOD1 毒性に対して HSP70 や IGF-1-receptor など多様な因子もしくはシグナルを介して保護作用を有していることが示された。さらに、iPS 細胞を用いた検討においては FALS だけでなく SALS 患者由来の運動神経にも SHED-CM が保護的に作用することから、変異 SOD1 だけでなく ALS 患者すべてで有効な治療薬になり得ることが考えられる。今後、SHED の研究がさらに進み、ALS に対する真に有効な治療薬となることを望んでいる。

以上、本研究においては変異 SOD1 モデル細胞を作製し、種々の薬剤の検討を行った。第 1 章では予防医学の観点、第 2 章では既存薬よりも強力な薬剤の探索の観点、第 3 章では複合的に作用する薬剤の探索の観点からそれぞれ検討を行った。それぞれの章で同定した薬剤及び治療法は、変異 SOD1 に対する保護効果を有すると考えられる。以上、本研究で確立したモデル細胞、また種々の保護効果を有する薬剤は ALS 等の神経変性疾患におけるトランスレーショナル研究に有用であると考えられる。

謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を受け賜りました岐阜薬科大学 医療薬学大講座 薬物治療学研究室 特任教授 保住 功 博士、教授 位田 雅俊 博士に深甚なる謝意を表します。

また、薬物治療学研究室 講師 栗田 尚佳博士並びに薬物治療学研究室諸氏に深謝致します。

そして、実験に際して終始御協力受け賜りました API 株式会社 長良川リサーチセンター 市原 賢二様、本学 合成薬品製造学研究室 教授 伊藤彰近 博士、徳島大学大学院 医歯薬学研究部 組織再生制御学分野 教授 山本朗仁 博士、京都大学 iPS 研究所 (CiRA) 教授 井上治久 博士に深謝致します。

本論文の審査に当たり有益なる御指導・御助言を賜りました岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座 臨床薬剤学研究室 原 宏和博士、生命薬学大講座 生化学研究室 遠藤 智史博士及び生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室 中村 信介博士に深謝致します。

本研究は日本薬学会長井記念薬学研究奨励金、理科研株式会社 若手研究者支援の助成を受けたものです。

最後に、研究に専念できるよう経済的、精神的支援を惜しまなかった父・博之、母・朝枝に心から深く感謝いたします。

参考文献

1. Ling, SC., Polymenidou, M., Cleveland, DW. (2013) Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 12, 416-438.
2. Cleveland, D. W. & Rothstein, J. D. (2001) From charcot to lou gehrig : deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci.* 2, 806-819.
3. Bruijn, L. I., Miller, T. M. & Cleveland, W. (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci.* 27, 723-749.
4. Cronin, S., Hardiman, O. & Traynor, B. J. (2007) Ethnic variation in the incidence of ALS A systematic review. *Neurology.* 68, 1002-1007.
5. McCombe, P. A. & Henderson, R. D. (2010) Effects of Gender in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gend. Med.* 7, 557-570.
6. Okamoto, K. & Kondo, T. (2005) Changes in the incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Wakayama , Japan. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 6, 155-163.
7. Gros-louis, F., Gaspar, C. & Rouleau, G. A. (2006) Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1762, 956-972.
8. Damme, P. Van, Robberecht, W. & Bosch, L. Van Den. (2017) Modelling amyotrophic lateral sclerosis : progress and possibilities. *Dis Model Mech.* 1, 537-549.
9. Kaur, S. J., Mckeown, S. & Rashid, S. NU SC. (2015) Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene.* 577, 109-118.
10. Guareschi, S., Cova, E., Cereda, C., Ceroni, M., Donetti, E., Bosco, DA., Trotti D, Pasinelli P. (2012) An over-oxidized form of superoxide dismutase found in sporadic amyotrophic lateral sclerosis with bulbar onset shares a toxic

- mechanism with mutant SOD1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 5074-5079.
11. Valentine, J. S. & Hart, P. J. (2003) Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 3617-3622.
 12. Rosen, DR., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, DA., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, JP., Deng, HX. (1993) *Nature.* 362, 59-62.
 13. Ilieva, H., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders : ALS and beyond. *J Cell Biol.* 187, 761-772.
 14. Hayashi, Y., Homma, K. & Ichijo, H. (2015) Advances in Biological Regulation SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1. *Adv. Biol. Regul.* 1-10.
 15. Ido, A., Fukuyama, H. & Urushitani, M. (2011) Protein Misdirection Inside and Outside Motor Neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): A Possible Clue for Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci.* 12, 6980-7003.
 16. Drago, L., Vecchi, E. De, Nicola, L. & Gismondo, M. R. (2007) In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). *J Appl Microbiol.* 103, 1914-1921.
 17. Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F and Cormier, M. (1994) Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J Nat Prod.* 57, 644-647.
 18. Paulino, N., Teixeira, C., Martins, R., Scremin, A., Dirsch, VM., Vollmar, AM., Abreu, SR., de Castro, SL., Marcucci, MC. (2006) *J Ethnopharmacol.* 107, 1-6.
 19. Xuan, H., Li, Z., Yan, H., Sang, Q., Wang, K., He, Q., Wang, Y and Hu, F. (2014) Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2014,

- 280120.
20. Han, B., Yu, Y. Q., Yang, Q. L., Shen, C. Y. & Wang, X. J. (2017) Kaempferol induces autophagic cell death of hepatocellular carcinoma cells via activating AMPK signaling. *Oncotarget*. 8, 86227-86239.
 21. Gong, J. H., Shin, D., Han, S. Y., Kim, J. L. & Kang, Y. H. (2012) Kaempferol suppresses eosinophil infiltration and airway inflammation in airway epithelial cells and in mice with allergic asthma. *J. Nutr.* 142, 47-56.
 22. Peng, J., Zheng, TT., Liang, Y., Duan, LF., Zhang, YD., Wang, LJ., He, GM., Xiao, HT. (2018) P-Coumaric acid protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis by MAPK signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 8549052.
 23. Sunitha, M. C., Dhanyakrishnan, R., PrakashKumar, B. & Nevin, K. G. (2018) p-Coumaric acid mediated protection of H9c2 cells from Doxorubicin-induced cardiotoxicity: Involvement of augmented Nrf2 and autophagy. *Biomed. Pharmacother.* 102, 823-832.
 24. Shailasree, S., Venkataramana, M., Niranjana, S. R. & Prakash, H. S. (2014) Cytotoxic Effect of p-Coumaric Acid on Neuroblastoma, N2a Cell via Generation of Reactive Oxygen Species Leading to Dysfunction of Mitochondria Inducing Apoptosis and Autophagy. *Mol. Neurobiol.* 51, 119-130.
 25. Caccamo, A., Majumder, S., Richardson, A., Strong, R. & Oddo, S. (2010) Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid- β , and Tau: Effects on cognitive impairments. *J. Biol. Chem.* 285, 13107-13120.
 26. Crews, L., Spencer, B., Desplats, P., Patrick, C., Paulino, A., Rockenstein, E., Hansen, L., Adame, A., Galasko, D., Masliah, E. (2010) Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with lewy body disease and in

- models of α -synucleinopathy. *PLoS One* 5, e9313.
27. Chhangani, D., Endo, F., Amanullah, A., Upadhyay, A., Watanabe, S., Mishra, R., Yamanaka, K., Mishra, A. (2016) Mahogunin ring finger 1 confers cytoprotection against mutant SOD1 aggregates and is defective in an ALS mouse model. *Neurobiol Dis.* 86, 16-28.
 28. Ueda, T., Inden, M., Shirai, K., Sekine, SI., Masaki, Y., Kurita, H., Ichihara, K., Inuzuka, T., Hozumi, I. (2017) The effects of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *Sci. Rep.* 7, 1-11.
 29. Watanabe, S., Hayakawa, T., Wakasugi, K. & Yamanaka, K. (2014) Cystatin C protects neuronal cells against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *Cell Death Dis.* 5, e1497-13.
 30. Ueda, T., Inden, M., Asaka, Y., Masaki, Y., Kurita, H., Tanaka, W., Yamaguchi, E., Itoh, A., Hozumi, I. (2018) Effects of gem-dihydroperoxides against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated neurotoxicity. *Mol. Cell. Neurosci.* 92, 177-184.
 31. Hetz, C. & Saxena, S. (2017) ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurol.* 13, 477-491.
 32. Jeong, JM., Choi, CH., Kang, SK., Lee, IH., Lee, JY., Jung, H. (2007) Antioxidant and Chemosensitizing Effects of Flavonoids with Hydroxy and / or Methoxy Groups and Structure-Activity Relationship. *J Pharm Pharm Sci.* 10, 537-546.
 33. An, S. M., Koh, J. S. & Boo, Y. (2010) C. p-coumaric acid not only inhibits human tyrosinase activity in vitro but also melanogenesis in cells exposed to UVB. *Phyther. Res.* 24, 1175-1180.

34. Prasanna, N., Krishnan, D. N. & Rasool, M. (2013) Sodium arsenite-induced cardiotoxicity in rats: Protective role of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol. *Toxicol. Mech. Methods.* 23, 255–262.
35. Kang, SW., Kang, SI., Shin, HS., Yoon, SA., Kim, JH., Ko, HC., Kim, SJ. (2013) Sasa quelpaertensis Nakai extract and its constituent p-coumaric acid inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells through activation of the AMPK pathway. *Food Chem. Toxicol.* 59, 380-385.
36. Yoon, SA., Kang, SI., Shin, HS., Kang, SW., Kim, JH., Ko, HC., Kim, SJ. (2013) Biochemical and Biophysical Research Communications p -Coumaric acid modulates glucose and lipid metabolism via AMP-activated protein kinase in L6 skeletal muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 432, 553-557.
37. Li, X., Wu, C., Chen, N., Gu, H., Yen, A., Cao, L., Wang, E., Wang, L. (2016) PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget.* 7, 33440-33450.
38. Kong, C. S., Jeong, C. H., Choi, J. S., Kim, K. J. & Jeong, J. W. (2013) Antiangiogenic effects of P-coumaric acid in human endothelial cells. *Phyther. Res.* 27, 317-323.
39. Lim, MA., Selak, MA., Xiang, Z., Krainc, D., Neve, RL., Kraemer, BC., Watts, JL., Kalb, RG. (2012) Reduced activity of AMP-activated protein kinase protects against genetic models of motor neuron disease. *J. Neurosci.* 32, 1123-1141.
40. Watanabe, S., Komine, O., Endo, F., Wakasugi, K. & Yamanaka, K. (2018) Intracerebroventricular administration of Cystatin C ameliorates disease in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice. *J. Neurochem.* 145, 80-89.
41. Perera, ND., Sheean, RK., Lau, CL., Shin, YS., Beart, PM., Horne, MK., Turner, BJ. (2018) Rilmenidine promotes MTOR-independent autophagy in the mutant

- SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis without slowing disease progression. *Autophagy*. 14, 534-551.
42. Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M. & Nukina, N. (2011) Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol. Cell*. 44, 279-289.
 43. Kim, SH., Jung, SY., Lee, KW., Lee, SH., Cai, M., Choi, SM., Yang, EJ. (2013) Bee venom effects on ubiquitin proteasome system in hSOD1G85R-expressing NSC34 motor neuron cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 1.
 44. Kabuta, T., Suzuki, Y. & Wada, K. (2006) Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 281, 30524–30533.
 45. Chakraborty, J., Rajamma, U., Jana, N. & Mohanakumar, K. P. (2015) Quercetin improves the activity of the ubiquitin-proteasomal system in 150Q mutated huntingtin-expressing cells but exerts detrimental effects on neuronal survivability. *J. Neurosci. Res.* 93, 1581-1591.
 46. Vehviläinen, P., Koistinaho, J. & Goldsteins, G. (2014) Mechanisms of mutant SOD1 induced mitochondrial toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 8, 126.
 47. D'Amico, E., Factir-Litvak, P., Santella, R. M. & Mitsumoto, H. (2013) Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med.* 65, 509-527.
 48. Rakhit, R., Cunningham, P., Furtos-Matei, A., Dahan, S., Qi, XF., Crow, JP., Cashman, NR., Kondejewski, LH., Chakrabartty, A. (2002) Oxidation-induced Misfolding and Aggregation of Superoxide Dismutase and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis *J Biol Chem.* 277, 47551-47556.

49. Ueda, T., Ito, T., Kurita, H., Inden, M. & Hozumi, I. (2019) P-coumaric acid has protective effects against mutant copper–zinc superoxide dismutase 1 via the activation of autophagy in n2a cells. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1-13.
50. Liu, KX., Edwards, B., Lee, S., Finelli, MJ., Davies, B., Davies, KE., Oliver, PL. (2015) Neuron-specific antioxidant OXR1 extends survival of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 138, 1167-1181.
51. Bond, L., Bernhardt, K., Madria, P., Sorrentino, K., Scelsi, H., Mitchell, CS. (2018) A metadata analysis of oxidative stress etiology in preclinical Amyotrophic Lateral Sclerosis: Benefits of antioxidant therapy. *Front. Neurosci.* 12, 1-13.
52. Urushitani, M., Kurisu, J., Tsukita, K. & Takahashi, R. (2002) Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 83, 1030-1042.
53. Ikawa, M., Okazawa, H., Tsujikawa, T., Matsunaga, A., Yamamura, O., Mori, T., Hamano, T., Kiyono, Y., Nakamoto, Y., Yoneda, M. (2015) Increased oxidative stress is related to disease severity in the ALS motor cortex. *Neurology.* 84, 2033-2039.
54. Okada, M., Yamashita, S., Ueyama, H., Ishizaki, M., Maeda, Y., Ando, Y. (2018) Long-term effects of edaravone on survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *eNeurologicalSci.* 11, 11-14.
55. Tada, N., Cui, L., Okubo, H., Miura, T. & Itoh, A. (2010) A facile catalyst-free synthesis of gem-dihydroperoxides with aqueous hydrogen peroxide. *Chem. Commun.* 46, 1772-1774.
59. Kuranaga, Y., Yamada, N., Kashiwaya, M., Nakamura, M., Cui, L., Kumazaki,

- M., Shinohara, H., Sugito, N., Taniguchi, K., Ito, Y., Nakayama, T., Uno, B., Itoh, A., Akao, Y. (2016) Anti-Oncogenic gem-dihydroperoxides induce apoptosis in cancer cells by trapping reactive oxygen species. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 71.
60. Bosco, DA., Morfini, G., Karabacak, NM., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, BA., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., Frosch, MP., Agar, JN., Julien, JP., Brady, ST., Brown, RH Jr. (2010) Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat. Neurosci.* 13, 1396-1403.
61. Forsberg, K., Jonsson, PA., Andersen, PM., Bergemalm, D., Graffmo, KS., Hultdin, M., Jacobsson, J., Rosquist, R., Marklund, SL., Brännström, T. (2010) Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients. *PLoS One* 5, 1-9.
62. Shaw, BF., Lelie, HL., Durazo, A., Nersissian, AM., Xu, G., Chan, PK., Gralla, EB., Tiwari, A., Hayward, LJ., Borchelt, DR., Valentine, JS., Whitelegge, JP. (2008) Detergent-insoluble aggregates associated with amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice contain primarily full-length, unmodified superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 283, 8340-8350.
63. Deng, HX., Shi, Y., Furukawa, Y., Zhai, H., Fu, R., Liu, E., Gorrie, GH., Khan, MS., Hung, WY., Bigio, EH., Lukas, T., Dal Canto, MC., O'Halloran, TV., Siddique, T. (2006) Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 7142-7147.
64. Furukawa, Y., Kaneko, K., Yamanaka, K. & Nukina, N. (2008) Complete Loss of Post-translational Modifications Triggers Fibrillar Aggregation of SOD1 in the Familial Form of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Biol Chem.* 283, 24167-

- 24176.
65. Vallarola, A., Sironi, F., Tortarolo, M., Gatto, N., De Gioia, R., Pasetto, L., De Paola, M., Mariani, A., Ghosh, S., Watson, R., Kalmes, A., Bonetto, V., Bendotti, C. (2018) RNS60 exerts therapeutic effects in the SOD1 ALS mouse model through protective glia and peripheral nerve rescue. *J Neuroinflammation*. 15, 1-22.
 66. Preeti, Doharea., María, C.. Hyzinski-Garcíaa, Aarshi, Vipania., Nicole, H. Bowensa, J. W., Nalwalka, Paul J. Feustela., Richard W. Keller Jr.a, David Jourd'heuilb, and A. A. & Mongina. (2014) The neuroprotective properties of the superoxide dismutase mimetic tempol correlate with its ability to reduce pathological glutamate release in a rodent model of stroke. *Free Radic Biol Med*. 77, 168-182.
 67. Oh, Y. K., Shin, K. S., Yuan, J. & Kang, S. J. (2008) Superoxide dismutase 1 mutants related to amyotrophic lateral sclerosis induce endoplasmic stress in neuro2a cells. *J. Neurochem*. 104, 993-1005.
 68. Wenzhi, Tan., Piera, Pasinelli, and D. T. (2014) Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 1842, 1295-1301.
 69. Tafuri, F., Ronchi, D., Magri, F., Comi, G. P. & Corti, S. (2015) SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Front Cell Neurosci*. 9, 1-12.
 70. Daniel, B., Green, O., Viskind, O. & Gruzman, A. (2013) Riluzole increases the rate of glucose transport in L6 myotubes and NSC-34 motor neuron-like cells via AMPK pathway activation. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener*. 14, 434-443.

71. Mancuso, R., del Valle, J., Modol, L., Martinez, A., Granado-Serrano, AB., Ramirez-Núñez, O., Pallás, M., Portero-Otin, M., Osta, R., Navarro, X. (2014) Resveratrol Improves Motoneuron Function and Extends Survival in SOD1 G93A ALS Mice. *Neurotherapeutics*. 11, 419-432.
72. Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Imamura, K., Egawa, N., Yahata, N., Okita, K., Takahashi, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Watanabe, K., Kadoya, C., Nakano, R., Watanabe, D., Maruyama, K., Hori, O., Hibino, S., Choshi, T., Nakahata, T., Hioki, H., Kaneko, T., Naitoh, M., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Hata, R., Ueno, S., Seki, T., Kobayashi, K., Toda, T., Murakami, K., Irie, K., Klein, WL., Mori, H., Asada, T., Takahashi, R., Iwata, N., Yamanaka, S., Inoue, H. (2013) Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*. 12, 487-496.
73. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, LW., Robey, PG., Shi, S. (2003) SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5807-5812.
74. Fujii, H., Matsubara, K., Sakai, K., Ito, M., Ohno, K., Ueda, M., Yamamoto, A. (2015) Dopaminergic differentiation of stem cells from human deciduous teeth and their therapeutic benefits for Parkinsonian rats. *Brain Res.* 1613, 59-72.
75. Inoue, T., Sugiyama, M., Hattori, H., Wakita, H., Wakabayashi, T., Ueda, M. (2013) Stem cells from human exfoliated deciduous tooth-derived conditioned medium enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A*. 19, 24-29.
76. Yamagata, M., Yamamoto, A. & Kako, E. (2013) Human Dental Pulp-Derived

- Stem Cells Protect Against Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Mice. *Stroke*. 44, 551-554.
77. Matsubara, K., Matsushita, Y., Sakai, K., Kano, F., Kondo, M., Noda, M., Hashimoto, N., Imagama, S., Ishiguro, N., Suzumura, A., Ueda, M., Furukawa, K., Yamamoto, A. (2015) Secreted Ectodomain of Sialic Acid-Binding Ig-Like Lectin-9 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Promote Recovery after Rat Spinal Cord Injury by Altering Macrophage Polarity. *J. Neurosci.* 35, 2452-2464.
78. Mita, T., Furukawa-Hibi, Y., Takeuchi, H., Hattori, H., Yamada, K., Hibi, H., Ueda, M., Yamamoto, A. (2015) Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* 293, 189-197.
79. Wakayama, H., Hashimoto, N., Matsushita, Y., Matsubara, K., Yamamoto, N., Hasegawa, Y., Ueda, M., Yamamoto, A. (2015) Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating acute lung injury in mice. *Cytotherapy*. 17, 1119-1129.
80. Izumoto-Akita, T., Tsunekawa, S., Yamamoto, A., Uenishi, E., Ishikawa, K., Ogata, H., Iida, A., Ikeniwa, M., Hosokawa, K., Niwa, Y., Maekawa, R., Yamauchi, Y., Seino, Y., Hamada, Y., Hibi, H., Arima, H., Ueda, M., Oiso, Y. (2015) Secreted factors from dental pulp stem cells improve glucose intolerance in streptozotocin-induced diabetic mice by increasing pancreatic β -cell function. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 3, 1-9.
81. Kikuchi, H., Almer, G., Yamashita, S., Guégan, C., Nagai, M., Xu, Z., Sosunov, AA., McKhann, GM 2nd, Przedborski S. (2006) Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 6025-6030.

82. Halon-Golabek, M., Borkowska, A., Kaczor, JJ., Ziolkowski, W., Flis, DJ., Knap, N., Kasperuk, K., Antosiewicz, J. (2018) hmSOD1 gene mutation-induced disturbance in iron metabolism is mediated by impairment of Akt signalling pathway. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 9, 557-569.
83. Yin, X., Ren, M., Jiang, H., Cui, S., Wang, S., Jiang, H., Qi, Y., Wang, J., Wang, X., Dong, G., Leeds, P., Chuang, DM., Feng, H. (2015) Downregulated AEG-1 together with inhibited PI3K/Akt pathway is associated with reduced viability of motor neurons in an ALS model. *Mol. Cell. Neurosci.* 68, 303-313.
84. Ionescu, A., Gradus, T., Altman, T., Maimon, R., Saraf, Avraham N., Geva, M., Hayden, M., Perlson, E. (2019) Targeting the Sigma-1 Receptor via Pridopidine Ameliorates Central Features of ALS Pathology in a SOD1 G93A Model. *Cell Death Dis.* 10. 210.
85. Allodi, I., Comley, L., Nichterwitz, S., Nizzardo, M., Simone, C., Benitez, JA., Cao, M., Corti, S., Hedlund, E. (2016) Differential neuronal vulnerability identifies IGF-2 as a protective factor in ALS. *Sci. Rep.* 6, 1-14.
86. Imamura, K., Izumi, Y., Watanabe, A., Tsukita, K., Woltjen, K., Yamamoto, T., Hotta, A., Kondo, T., Kitaoka, S., Ohta, A., Tanaka, A., Watanabe, D., Morita, M., Takuma, H., Tamaoka, A., Kunath, T., Wray, S., Furuya, H., Era, T., Makioka, K., Okamoto, K., Fujisawa, T., Nishitoh, H., Homma, K., Ichijo, H., Julien, JP., Obata, N., Hosokawa, M., Akiyama, H., Kaneko, S., Ayaki, T., Ito, H., Kaji, R., Takahashi, R., Yamanaka, S., Inoue, H. (2017) The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Transl. Med.* 9, 1-10.
87. Shimojima, C., Takeuchi, H., Jin, S., Parajuli, B., Hattori, H., Suzumura, A., Hibi, H., Ueda, M., Yamamoto, A. (2016) Conditioned Medium from the Stem

- Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 196, 4164-4171.
88. Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S. A. & Gronthos, S. (2008) Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells.* 26, 1787-1795.
89. Kieran, D., Kalmar, B., Dick, JR., Riddoch-Contreras, J., Burnstock, G., Greensmith, L. (2004) Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat. Med.* 10, 402-405.
90. Kalmar, B., Novoselov, S., Gray, A., Cheetham, ME., Margulis, B., Greensmith, L. (2008) Late stage treatment with arimoclomol delays disease progression and prevents protein aggregation in the SOD1G93A mouse model of ALS. *J. Neurochem.* 107, 339-350.
91. Benatar, M., Wu, J., Andersen, PM., Atassi, N., David, W., Cudkowicz, M., Schoenfeld, D. (2018) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of arimoclomol in rapidly progressive SOD1 ALS. *Neurology.* 90, e565-e574.
92. Chen, HJ., Mitchell, JC., Novoselov, S., Miller, J., Nishimura, AL., Scotter, EL., Vance, CA., Cheetham, ME., Shaw, CE. (2016) The heat shock response plays an important role in TDP-43 clearance: Evidence for dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 139, 1417-1432.
93. Wen, D., Cui, C., Duan, W., Wang, W., Wang, Y., Liu, Y., Li, Z., Li, C. (2019) The role of insulin-like growth factor 1 in ALS cell and mouse models: A mitochondrial protector. *Brain Res. Bull.* 144, 1-13.
94. Ahn, SW., Kim, JE., Park, KS., Choi, WJ., Hong, YH., Kim, SM., Kim, SH., Lee, KW., Sung, JJ. (2012) The neuroprotective effect of the GSK-3 β inhibitor and influence on the extrinsic apoptosis in the ALS transgenic mice. *J. Neurol.*

- Sci.* 320, 1-5.
95. Koh, SH., Kim, Y., Kim, HY., Hwang, S., Lee, CH., Kim, SH. (2007) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 suppresses the onset of symptoms and disease progression of G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Exp. Neurol.* 205, 336-346.
 96. Lee, SH., Kim, S., Lee, N., Lee, J., Yu, SS., Kim, JH., Kim, S. (2019) Intrathecal delivery of recombinant AAV1 encoding hepatocyte growth factor improves motor functions and protects neuromuscular system in the nerve crush and SOD1-G93A transgenic mouse models. *Acta Neuropathol. Commun.* 7, 96.
 97. Lee, SH., Lee, N., Kim, S., Lee, J., Choi, W., Yu, SS., Kim, JH., Kim, S. (2019) Intramuscular delivery of HGF-expressing recombinant AAV improves muscle integrity and alleviates neurological symptoms in the nerve crush and SOD1-G93A transgenic mouse models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 517, 452-457.
 98. Kitamura, K., Fujiyoshi, K., Yamane, J., Toyota, F., Hikishima, K., Nomura, T., Funakoshi, H., Nakamura, T., Aoki, M., Toyama, Y., Okano, H., Nakamura, M. (2011) Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury. *PLoS One* 6. e27706.
 99. Okano, H., Yasuda, D., Fujimori, K., Morimoto, S. & Takahashi, S. (2020) Ropinirole, a New ALS Drug Candidate Developed Using iPSCs. *Trends Pharmacol. Sci.* 41, 99-109.
 100. Taghipour, Z., Karbalaie, K., Kiani, A., Niapour, A., Bahramian, H., Nasr-Esfahani, MH., Baharvand, H. (2012) Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model. *Stem Cells Dev.* 21, 1794-1802.
 101. Nakashima, M., Iohara, K., Murakami, M., Nakamura, H., Sato, Y., Ariji, Y.,

- Matsushita, K. (2017) Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 1-13.
102. Nakashima, M. & Iohara, K. (2017) Recent Progress in Translation from Bench to a Pilot Clinical Study on Total Pulp Regeneration. *J. Endod.* 43, S82–S86.

略語

ALS	amyotrophic lateral sclerosis
FALS	familial ALS
SALS	sporadic ALS
BSA	bovine serum albumin
dbcAMP	dibutyryl cyclic AMP
DMEM	dulbecco's Modified Eagle Medium
EBGP	eEthanol extraction Brazilian green propolis
FBS	fetal bovine serum
AKT	protein Kinase B
AMPK	AMP protein kinase
m-TOR	mammalian target of rapamycin
p-AMPK	phospho-AMPK
p-m-TOR	phospho-m-TOR
N2a	neuro 2a
PBS	phosphate Buffered Saline
ROS	reactive oxygen species
SOD 1	superoxide dismutase 1
SDS	sodium dodecyl sulfate
LC-3	microtubule-associated protein1 light chain 3
p62	p62/SQSTM1
3-MA	3-methyladenine
CQ	chloroquine
Bip	binding immunoglobulin protein
Chop	C/EBP homologous protein

p-CA	p-coumaric acid
artC	artepillin C
UPS	ubiquitin proteasome system
DHPs	gem-dihydroperoxides
SHED	stem cells from Human Exfoliated Deciduous
Fb	fibro blast
CM	conditioned medium
RTK array	phospho-receptor tyrosine kinase array
HGF	hepatocyte growth factor
IGF	insulin-like growth factor
HSP	heat shock protein
Pi-mu	Pifithrin mu
RTK	receptor tyrosine kinase
GSK-3 β	glycogen synthase kinase 3
iPS	induced pluripotent stem cells