

## 筋萎縮性側索硬化症（ALS）のバイオマーカーの開発

大阪急性期・総合医療センター 脳神経内科

清水 幹人

### 1. 諸言

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、主に脊髄の運動神経細胞を選択的かつ不可逆進行性に障害する原因不明の致死的神経変性疾患である<sup>1)</sup>。いまだ十分な治療法のない疾患であり、その開発・研究のために早期診断や病勢把握に役立つバイオマーカーの開発が急がれている。以前からよく研究されている分子として、**neurofilament** や血中クレアチン値、尿酸など多くの研究があるが<sup>2)</sup>、これらは病態を直接調節している分子ではないことが判明している。

今回着目した **RGMa** (**Repulsive Guidance Molecule A**) は、細胞骨格制御に影響し軸索伸長を反発的に調節する分子であり、細胞骨格を制御する分子の中でも可溶型として生体内で働くという特徴をもつため<sup>3)</sup>、血液や脳脊髄液中での測定が可能であり、バイオマーカーとしての利用が容易であった。また、細胞骨格制御の異常は ALS の病態機序としてコンセンサスが得られており<sup>1)</sup>、これまでのバイオマーカーと比べてより病態・病勢にリンクしたものになると考えられた。

われわれはすでに、ALS 患者の脳脊髄液で **RGMa** の濃度が上昇し、さらに呼吸機能と **RGMa** 濃度が相関するという重要な知見を得ており、**RGMa** は診断のバイオマーカーのみでなく、病勢把握も可能な分子であると考えた。そこで本研究では、**RGMa** のバイオマーカーとしての可能性をより厳密に検討し、最終的には ALS を悪化させるメカニズムの解明につなげていくことを目的とした。

### 2. 方法

まず **RGMa** の ALS におけるバイオマーカーとしての確度を上げるため、得られた検体の受信者動作特性 (ROC) 曲線を計算した。

また前項で記載した通り、**RGMa** は ALS 病態を修飾する能力を持ったバイオマーカーとなる可能性が示唆されているため、今回の研究ではその機序を解明する方針とした。まず **RGMa** は **glycosylphosphatidylinositol (GPI)** アンカー蛋白質として膜表面に存在するが、可溶型になる際に 3 種の **variants** に分かれることが知られている (図 1)。レセプターである

Neogenin (Neo1) に結合する部位は C 末端にあるため、同部位を含む RGMa full-length variants (Variant Full) がヒト髄液中に含まれているかどうかの確認を行った。

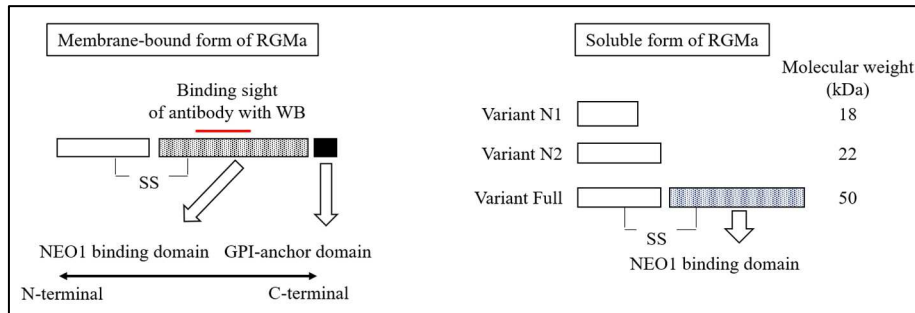


図1 RGMa の構造と可溶性 RGMa の3種類の variants

また RGMa が ALS 病態にどのような影響を与えるかを検討するため、ALS の病態研究で最も使用されている、G93A 変異を導入した mutated SOD1 (Cu/Zn superoxide dismutase) マウス (mSOD1 マウス) で検討を行った。mSOD1 マウスの脳脊髄液を採取し、RGMa の ELISA を行って mSOD1 マウスの病期の進行と RGMa の関連を明らかにするとともに、RGMa 中和抗体を mSOD1 マウスに投与することで、病態がどのように修飾されるかを検討した。

### 3.結果

RGMa のバイオマーカーとしての意義を確立するため、ALS と other neurodegenerative disorders (ONDs)、ALS と non-neurodegenerative disorders (NDs) を比較し ROC カーブを作成したところ、その他の疾患との鑑別に有意なツールとなる可能性が示唆された (図2)。

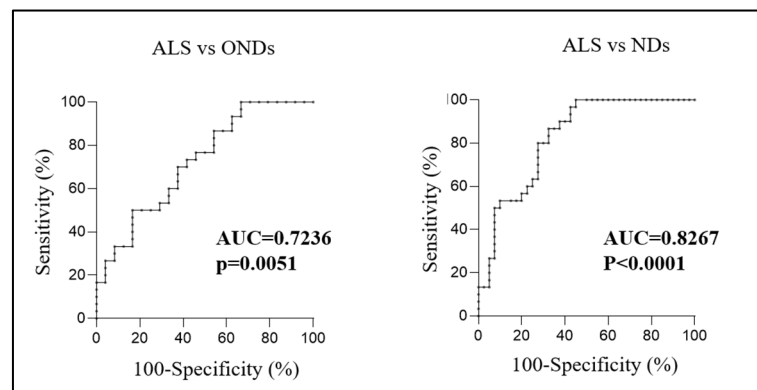


図2 脳脊髄液中 RGMa 濃度の ROC 曲線

前項で述べた通り、RGMa は可溶性になる際に、3つの variants を生成することが知られ

ているが、ヒト髄液に対して C 末端特異的に結合する抗体で Western blot (WB) を行ったところ、ALS 脳脊髄液中で Neo1 と結合することができる Variant Full が特異的に増大していることが判明した (図 3)。

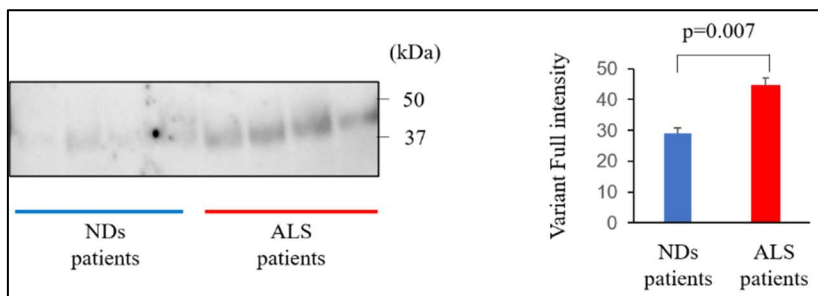


図 3 脳脊髄液中 RGMa 濃度の ROC 曲線

また mSOD1 マウスの髄液で RGMa 濃度を測定したところ、日齢が進むにつれて増大することが確認され、RGMa が ALS 病態の進行と関連していることが示唆された (図 4)。また RGMa 中和抗体を投与することで ALS 臨床症状 (Body weight、Rotarod test) を改善し、また生存期間を延長することが判明した (図 5A)。さらに、mSOD1 マウスの脊髄における運動神経の形態と個数を検討したところ、RGMa 中和抗体を使用した個体のほうが運動神経の縮小化が認められず、正常な形状の運動神経が多く残存していた (図 5B)。

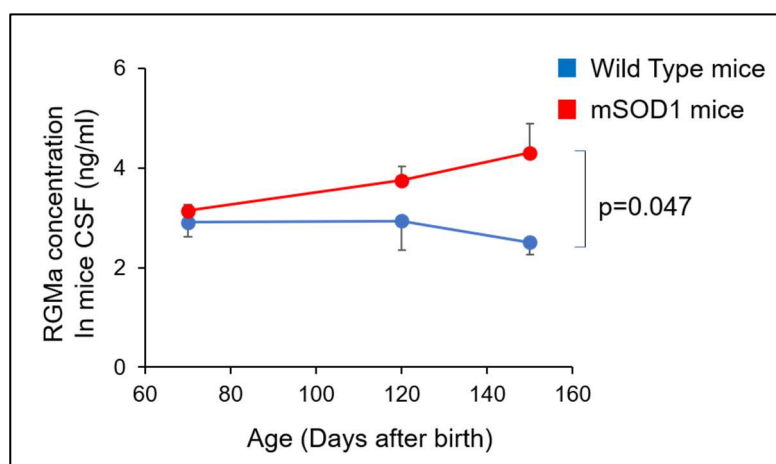


図 4 mSOD1 マウス脳脊髄液中の RGMa 濃度の増大

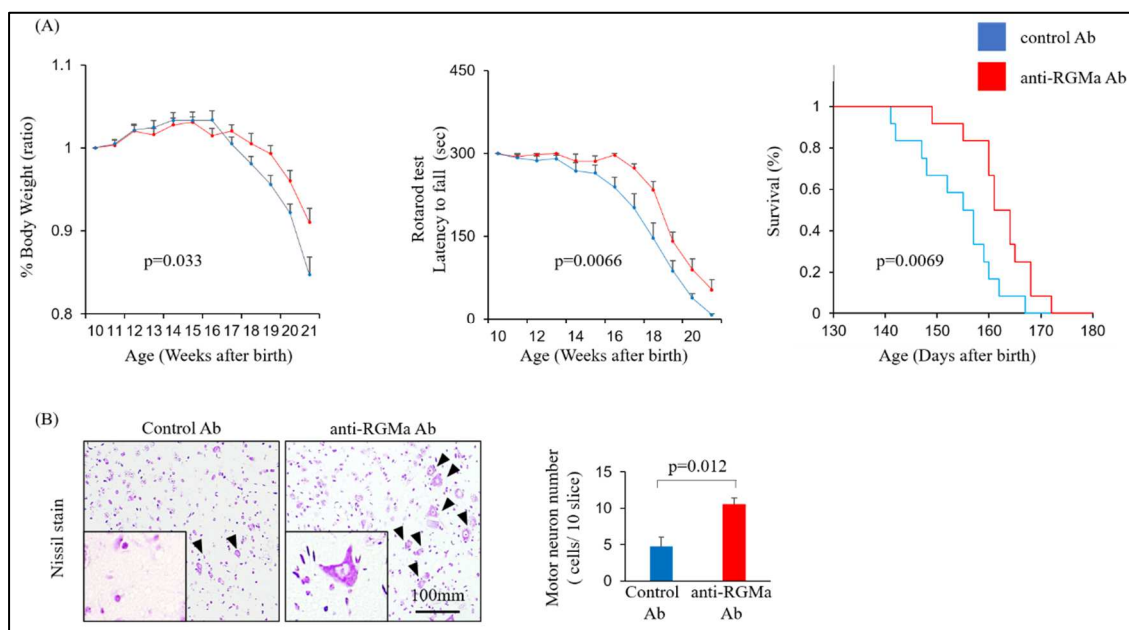


図 5 RGMa 中和抗体投与による mSOD1 マウスの臨床的・組織学的な ALS 病態抑制

#### 4. 考察

ALS は、興奮性アミノ酸説、ミトコンドリア機能異常説、酸化ストレス説、神経筋接合部障害、蛋白質異常凝集、RNA 代謝異常、神経免疫異常など様々な原因が考えられており、細胞骨格制御異常はその提唱されている機序の一つとして知られている<sup>1)</sup>。例えば、Sema3A、EphrinA などの軸索ガイダンス因子と ALS の関係は以前から研究されており<sup>4)</sup>、NOGOA などはその中和抗体の治験なども行われている<sup>5)</sup>。今回注目した RGMa も、その他の軸索ガイダンス因子と同様に ALS の病態に関わっている可能性があると考えられる。

また非常に興味深いことに、近年 RGMa は軸索ガイダンス因子としてだけではなく、T 細胞の活性化の促進や、血管新生の阻害、さらにアポトーシスの促進<sup>3)</sup>を行うなど、生体内の様々な役割が同定されており、非常に多くの疾患との関連が示唆されてきている。例えば軸索ガイダンス因子としては、動物の脊髄損傷モデルにおいて、RGMa 中和抗体による下流のシグナルの抑制により、機能予後の改善が得られている<sup>6)</sup>。また、多発性硬化症や視神経脊髄炎における免疫システムの異常な活性化を、中和抗体により抑制することで、病態の改善が得られることが判明している<sup>7,8)</sup>。神経変性疾患ではパーキンソン病において、RGMa の阻害によりモデルマウスの機能が改善することが示された<sup>9)</sup>。このような細胞骨格制御以外の多様な作用も、ALS の病態を修飾している可能性があるのではないかと考えている。

#### 5. 結語

RGMa は ALS の脳脊髄液中で特異的に増大し、ROC 曲線の検討でもバイオマーカーとし

て有用な分子である可能性があると考えられた。またさらに、脳脊髄液中の RGMA はレセプターである Neo1 と結合する能力があり、その下流の刺激を通して ALS の病態の活性化を引き起こしている可能性があった。このため、RGMA シグナルの阻害は ALS 病態の進行を遅らせ、治療ターゲットとなる可能性を秘めており、事実、mSOD1 マウスの検討で RGMA シグナルの阻害はモデルマウスの病勢を抑制することが明らかとなった。これらの結果から、RGMA は ALS の診断・病勢の把握に有用なバイオマーカーとしてだけでなく、ALS 病態進行の上流の分子である可能性があり、治療ターゲットとしても有用な可能性があると考えられた。

## 6.文献

- 1) Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;377(2):162-172. doi:10.1056/NEJMra1603471
- 2) Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis : why so many negative trials and how can trials be improved? *Lancet Neurol.* 2014;13(11):1127-1138. doi:10.1016/S1474-4422(14)70129-2
- 3) Siebold C, Yamashita T, Monnier PP, Mueller BK, Pasterkamp RJ. RGMs: Structural Insights, Molecular Regulation, and Downstream Signaling RGMs: A Small Gene Family with Widespread Effects. *Trends Cell Biol.* 2017;27(5):365-378. doi:10.1016/j.tcb.2016.11.009
- 4) Van Battum EY, Brignani S, Pasterkamp RJ. Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2015;14(5):532-546. doi:10.1016/S1474-4422(14)70257-1
- 5) Meininger V, Genge A, van den Berg LH, Robberecht W, Ludolph A, Chio A, et al. Safety and efficacy of ozanezumab in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 2017;16(3):208-216. doi:10.1016/S1474-4422(16)30399-4
- 6) Nakagawa H, Ninomiya T, Yamashita T, Takada M. Treatment With the Neutralizing Antibody Against Repulsive Guidance Molecule-a Promotes Recovery From Impaired Manual Dexterity in a Primate Model of Spinal Cord Injury. *Cereb Cortex.* 2019;29(2):561-572. doi:10.1093/cercor/bhx338
- 7) Muramatsu R, Kubo T, Mori M, Nakamura Y, Fujita Y, Akutsu T, et al. RGMA modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 2011;17(4):488-494. doi:10.1038/nm.2321
- 8) Harada K, Fujita Y, Okuno T, Tanabe S, Koyama Y, Mochizuki H, et al. Inhibition of RGMA alleviates symptoms in a rat model of neuromyelitis optica. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-9. doi:10.1038/s41598-017-18362-2
- 9) Oda W, Fujita Y, Baba K, Mochizuki H, Niwa H, Yamashita T. Inhibition of repulsive guidance

molecule-a protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* 2021;12(2):181. doi:10.1038/s41419-021-03469-2

## 7.成果発表

上記のように、現時点ではいまだ RGMa と ALS の関連をより詳細に検討している途中であるため、まだ有意な研究成果を得られていない。しかし、今回得られた結果は、RGMa が ALS におけるバイオマーカーとして有用であるばかりでなく、治療ターゲットとしても考慮される分子であることがわかった。今後それらを解明することで、論文や学会での発表に努めるだけでなく、特許の申請などを行い、最終的には治療薬開発などを目標に研究を進めていきたい。