



2024年7月22日

報道関係者各位

慶應義塾大学
公益財団法人がん研究会

筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者の体液由来細胞外小胞における タンパク質組成の特徴とロピニロール塩酸塩投与による変化 —ALS 病態と治療メカニズムの探索と説明—

慶應義塾大学再生医療リサーチセンターの岡野 栄之 センター長/教授（研究当時：慶應義塾大学医学部生理学教室・教授）、慶應義塾大学医学部5年生の加藤 玖里純、慶應義塾大学殿町先端研究教育連携スクエアの森本 悟 特任准教授（研究当時：慶應義塾大学医学部生理学教室・専任講師）ならびに公益財団法人がん研究会がんプレジジョン医療研究センターの植田 幸嗣 プロジェクトリーダーらの共同研究グループは、ロピニロール塩酸塩（ROPI；注1）の第I/IIa相医師主導治験（ROPALS試験；注2）に参加した筋萎縮性側索硬化症（ALS；注3）患者由来の血液ならびに脳脊髄液（CSF；注4）に含まれる細胞外小胞（EVs；注5）におけるタンパク質組成の経時的かつ網羅的定量を行い、体液由来EVsのタンパク質組成が孤発性ALS（SALS）患者において健常者と異なること、また、その変化が経時的なSALS病態進行においても同様に起こること、ROPI投与によってこの変化が抑制されることを見出しました。加えて、人工多能性幹細胞（iPSC；注6）由来アストロサイト（iPast；注7）を用いた研究により、ROPIがD2R-CRYAB経路（注8）という神経炎症を抑制する経路を活性化している可能性が示唆されました。さらに、機械学習モデル（注9）を用いたバイオマーカー探索によって、予後予測ならびに診断において有用と推定されるタンパク質群をそれぞれ同定しました。

EVsは、ほとんどの細胞種から血液やCSFなどの体液中に分泌され、タンパク質や核酸などを内包していることから、細胞間の生体物質伝達に関わっているとされており、悪性腫瘍やSALSなどの神経変性疾患において疾患への寄与やバイオマーカーとしての有用性が推定されています。しかし、SALSにおける経時的かつ網羅的なEVタンパク質組成や、予後予測において有用なバイオマーカーはよく分かっていませんでした。また、ROPALS試験にて病態進行抑制効果が示唆されたROPIによるEVタンパク質組成変化は不明でした。今回、共同研究グループは、ROPALS試験のリバーストランスレーショナル研究（reverse translational research, rTR；注10）として本研究を行い、経時的な患者由来体液を用いた網羅的なEVタンパク質組成を調べ、これらを明らかにしました。

この研究成果は、SALS病態とROPIによる治療メカニズムの一端を明らかにし、SALSの疾患理解や治療戦略において重要な知見であると考えます。本研究成果は、2024年7月12日午後7時（日本時間）に、日本炎症・再生医学会（Japanese Society of Inflammation and Regeneration [JSIR]）の公式国際誌 *Inflammation and Regeneration* 誌に掲載されました。

1. 本研究のポイント

- 血液ならびにCSFを、健常者より定点的に、SALS患者より経時的に採取し、EVタンパク質組成を網羅的に定量しました。
- SALS患者由来EVタンパク質組成は、健常者のものと比して炎症に関与するタンパク質群が上昇し、タンパク質品質管理機構に関与するタンパク質群が減少していました。
- SALS患者における経時的なEVタンパク質組成変化は、健常者-SALS患者比較で認められた変化

と概ね一致していました。

- 一方 ROPI は、健常者-SALS 患者比較における変化ならびに SALS 患者における経時的変化を抑制しました。
- iPast を用いた研究によって、ROPI は D2R-CRYAB 経路と呼ばれる神経炎症抑制に重要な経路を活性化することで、EV タンパク質組成変化を惹起している可能性が示唆されました。
- 機械学習モデルを用いたバイオマーカー探索によって、予後予測ならびに診断において有用と推定されるタンパク質群をそれぞれ同定しました。

2. 研究背景

EVs は、ほとんどの細胞種から血液や CSF などの体液中に分泌され、内部にタンパク質や核酸などを有していることから、細胞間の生体物質伝達に関わっているとされており、悪性腫瘍や SALS などの神経変性疾患において疾患への寄与が推定されています。しかしながら、SALS における経時的かつ網羅的な EV タンパク質組成はよく分かっていませんでした。

また、ROPI は、ドーパミン D2 (D2R) 受容体アゴニスト (注 11) でパーキンソン病治療薬として用いられている薬剤で、慶應義塾大学医学部生理学教室において ALS 患者由来 iPSC より作成した下位運動ニューロン (注 12) を用いた既存薬 1,232 種を対象としたドラッグスクリーニング (注 13) により同定された ALS 治療候補薬です (Fujimori K, et al. Nat Med 2018)。ROPI の第 I/II a 相医師主導治験として、慶應義塾大学医学部内科学教室 (神経) との共同研究のもと 20 名の SALS 患者を対象とした ROPALS 試験が行われました。その結果、ROPI は SALS 患者における病態進行を有意に抑制することがわかり、ROPI における ALS 治療薬としての有効性が示唆されました (Morimoto S, et al. Cell Stem Cell 2023)。

今回、共同研究グループは、SALS 発症ならびに進行における EVs の寄与や、SALS 病態の理解、ならびに ROPI の作用メカニズム解明を目的として、ROPALS 試験に参加した 20 名の SALS 患者より血液ならびに CSF を経時的に採取し、EV における網羅的なタンパク質組成を解析しました。

3. 研究内容・成果

(1) SALS 患者由来 EV タンパク質組成は、健常者のものと異なっていました。

血液由来 EVs (serum-EVs; sEVs ; 注 14) と CSF 由来 EVs (CSF-EVs; cEVs) において、全サンプルから検出されたタンパク質群について uniform manifold approximation and projection (UMAP ; 注 15) 解析を行ったところ、sEVs と cEVs は大きく異なっていた一方で、健常者群と SALS 患者群の分布は sEVs ならびに cEVs の群内でそれぞれ異なっていることがわかりました (図 1A)。

次に、健常者群と ROPI 未投与の SALS 患者群の sEVs と cEVs のタンパク質組成を比較しました (図 1B)。sEVs と cEVs の双方で SALS 患者群において上昇したタンパク質群は、補体・凝固経路と関連しており、減少したタンパク質群はアクチン重合やタンパク質品質管理機構と関連していました (図 1C)。

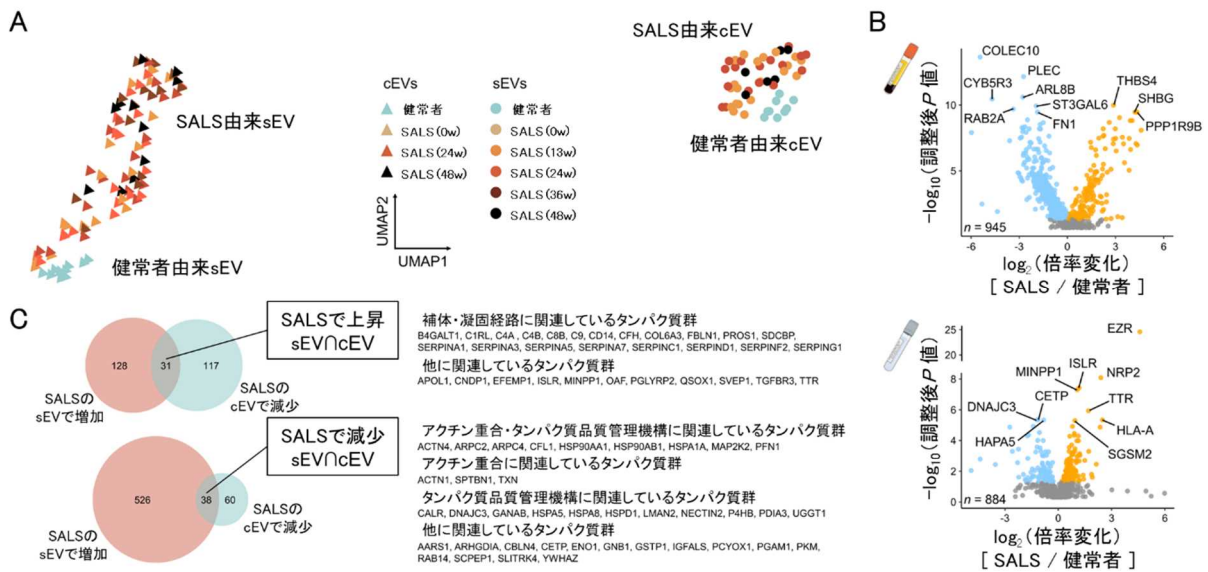


図1 健康者ならびに SALS 患者由来 EV タンパク質組成の比較

A. UMAP 解析の結果を示した散布図。

B. sEVs (上段) ならびに cEVs (下段) における健康者-SALS 患者の比較結果。各プロットはタンパク質を表し、縦軸は $-\log_{10}$ 変換した調整後 P 値を、横軸は \log_2 変換した倍率変化 (fold change) を表す。なお、血清と髄液は以降の図でも採血管のイラストにて区別しています。

C. sEVs ならびに cEVs の SALS 患者由来 EVs で増加ないし減少していたタンパク質群を比較したベン図 (左) と、各タンパク質カテゴリーに含まれるタンパク質群のリスト (右)。

(2) SALS 患者における EV タンパク質組成は経時的に変化しましたが、ROPI 投与によって当該変化が抑制されました。

ROPALS 試験では、13名の ROPI 群と7名のプラセボ群に分けられました。本解析では、プラセボ群のデータを使用して、EV タンパク質組成の経時的変化を調べました。プラセボ群における0週目と各サンプリング時点の EVs 内のタンパク質の差分変化に対するクラスタリング分析を用いて、各タンパク質の変化を「経時的に増加 (図2A, B 赤色)」「経時的に低下 (図2A, B 青色)」「経時的に比較的变化なし (図2A, B 灰色)」3つのグループに分類しました。

次に、ROPI 群におけるこれらのタンパク質群の変動を調べました (図2A, B)。プラセボ群において経時的に増加したタンパク質群は ROPI 投与によって増加が抑制され、また、経時的に減少したタンパク質群は ROPI 投与によって減少が抑制されました (いずれも $P < 0.001$)。一方で、「経時的に比較的变化なし」として分類されたタンパク質群は、ROPI 投与による変化はほとんど認められませんでした (sEVs で $P = 0.7154$ 、cEVs で $P = 0.4247$)。

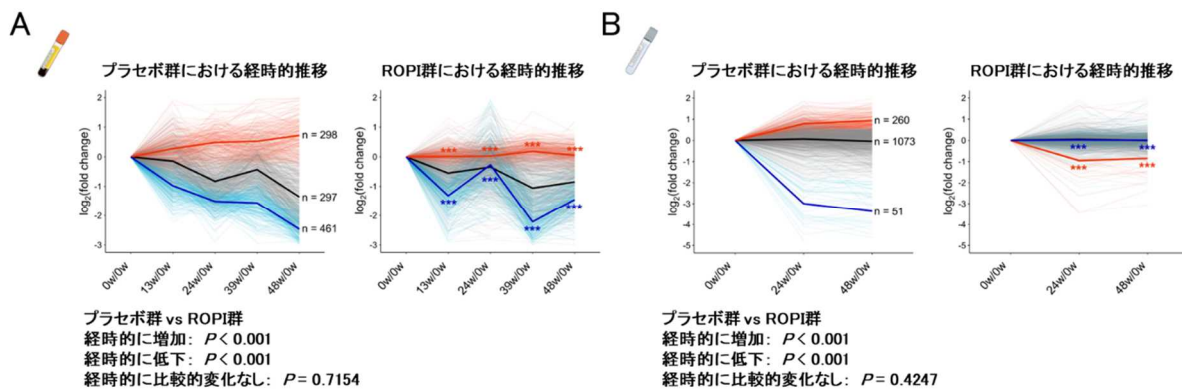


図2 SALS患者由来EVタンパク質組成の経時的比較

A, B. EVsにおける各タンパク質の増減を示したグラフ。細い線は各タンパク質の推移を示し、太い線は各分類における平均推移を示す。プラセボ群における経時変化のクラスタリング分析に基づいて、全てのタンパク質は「経時的に増加（図2赤色）」「経時的に低下（図2青色）」「経時的に比較的变化なし（図2灰色）」3つのグループに分類された。プラセボ群（左）とROPI群（右）で分けて示している。*** ; $P < 0.001$ 。

(3) SALS患者に対するROPI投与により、SALS患者における健常者との差ならびに経時変化が比較的特異的に抑制されました。

ROPI投与によるタンパク質組成変化を明らかにするため、まずプラセボ群とROPI群で比較を行いました。その後、コサイン類似度分析（注16）により、健常者-SALS患者比較、SALS患者内の経時解析で同定されたタンパク質群との比較を行いました。その結果、ROPIによって、SALS患者において健常者と比して増加、ないし経時的に増加していたタンパク質群が抑制され、逆にSALS患者において健常者と比して減少、ないし経時的に減少していたタンパク質群が増加しました（図3A）。さらに、これらのタンパク質群の機能解析を行ったところ、SALS患者において増加しROPIで減少するタンパク質群は炎症に、また、SALS患者において減少しROPIで増加するタンパク質群はタンパク質品質管理機構に関連していました（いずれも $P < 0.05$ ）。SALSでは、運動ニューロンの細胞質にTDP-43と呼ばれるタンパク質が凝集体を形成することが知られており、その原因の1つとしてタンパク質品質管理機構の破綻（プロテオスタシスの破綻；注17）が提唱されています。さらに、タンパク質品質管理機構に関与するタンパク質は、EVによって他細胞に供給され得ることと、供給先の細胞においてその機能を発揮し、凝集タンパク質の分解に寄与することが報告されています（Takeuchi T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2015）。よって、EVsに含まれるタンパク質品質管理機構に関与するタンパク質群の減少は、運動ニューロンへの供給低下によりTDP-43凝集が促進され、SALS発症ならびに病態進行に寄与している可能性が想定されました。

さらに、SALS 患者において健常者と比して増減、ないし経時的に増減していたタンパク質群について、各サンプルにおける含有量を調べ、散布図を作成しました (図 3B)。プラセボ群においては、経時的に健常者からデータ分布が乖離していきますが (図 3B 灰色プロット)、ROPI 群では、健常者からのデータ分布の乖離が抑制されていました (図 3B 赤色プロット)。よって ROPI は、EV タンパク質組成の SALS における変化を抑制する効果を持つことがわかり、抗 ALS 効果が示唆されました。

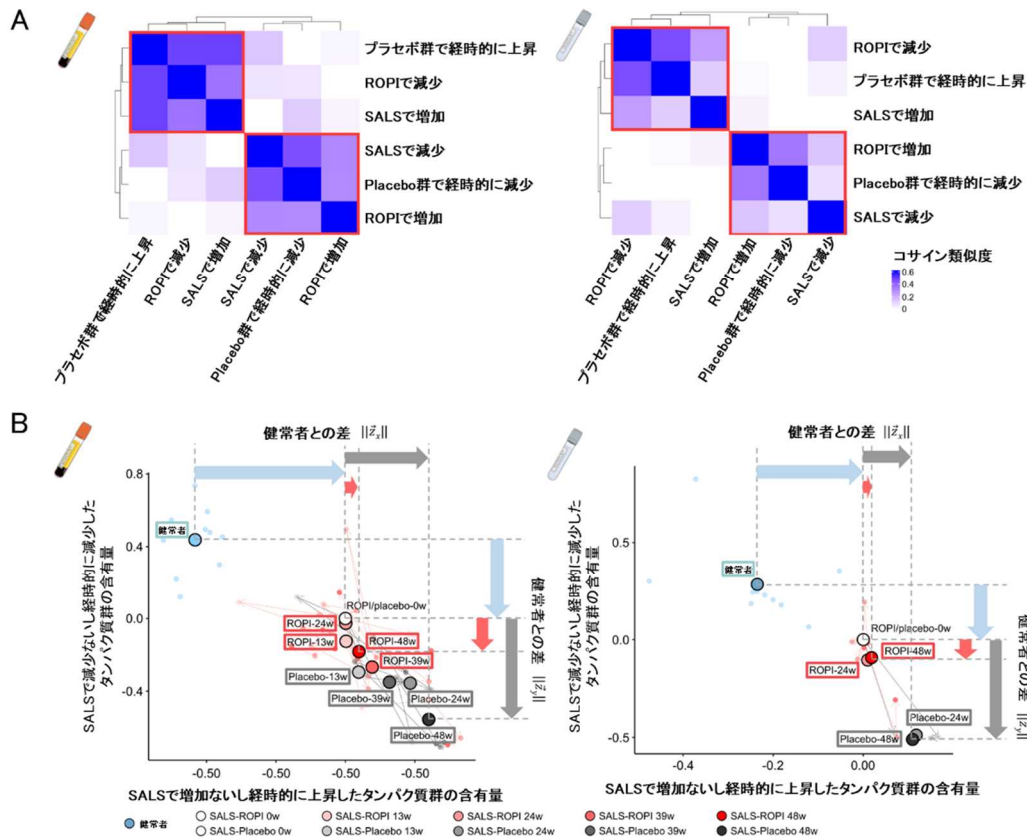


図 3 健常者-SALS 患者比較、SALS 患者内の経時的変化、ROPI 投与による変化の比較
 A. 健常者-SALS 患者比較、SALS 患者内の経時的変化、ROPI 投与による変化について、それぞれのタンパク質群に対してコサイン類似度分析を行った結果を示したヒートマップ。
 B. SALS 患者において健常者と比して増減、ないし経時的に増減していたタンパク質群について、各サンプルにおける含有量の散布図。各プロットはサンプルを、大きいプロットは各群の平均値を表す。

(4) iPast を用いた研究により、ROPI は D2R-CRYAB 経路を活性化し、神経炎症を抑制する効果を持つ可能性が示唆されました。

健常人由来の iPast を作製、ROPI 投与/非投与条件下で培養し RNA-seq (注 18) を行い、比較しました。その結果、iPast では ROPI 投与によって *CRYAB* の発現が有意に上昇し、神経炎症に関与する *CXCL14* と *CCN2* の発現が低下しました (図 4A)。ROPI は、D2R 作動薬であることから、D2R の下流で神経炎症抑制に寄与すると考えられている D2R-CRYAB 経路を活性化している可能性が示唆されました (図 4B)。

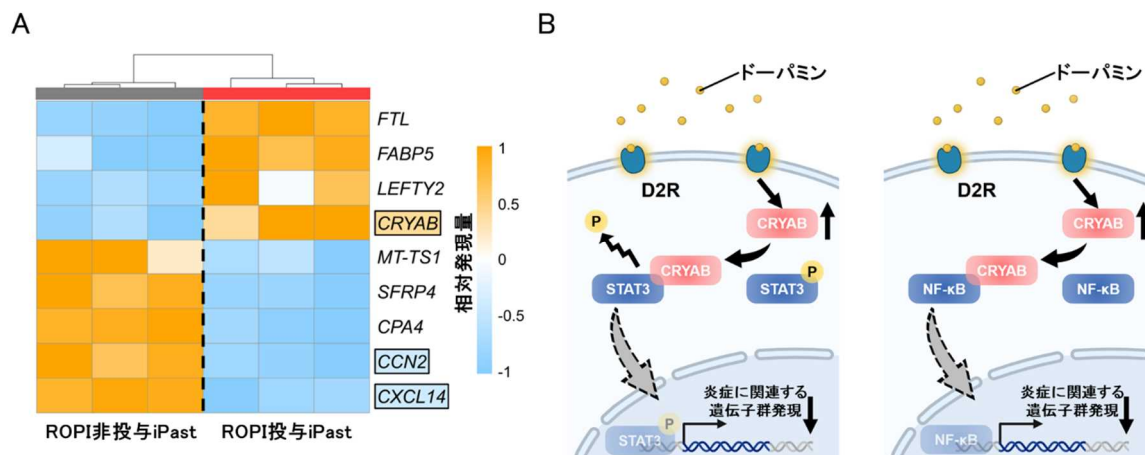


図4 ROPIはiPastにおけるD2R-CRYAB経路を活性化している可能性

- A. iPastにおけるROPI投与/非投与条件下におけるトランスクリプトームの比較結果を示したヒートマップ。
- B. D2R-CRYAB経路の模式図。CRYABはD2R刺激によってSTAT3やNF-κBと結合し、これらの核内移行を抑制することによって、炎症に関連する遺伝子群の発現を抑制し、神経炎症を抑制すると考えられている。(Qiu J, et al. J Neuroinflammation 2016, Zhang Y, et al. Stroke 2015)

(5) 機械学習モデルを用いた研究により、予後予測において有用と推定されるタンパク質群を同定しました。

ROPALS試験で収集された詳細な臨床データに基づき、EVs内のタンパク質を用いてALSの臨床指標となるバイオマーカーを探索しました。その結果、治験開始0週目におけるsEVsのオステオグリシン(OGN)とcEVsのFERM And PDZ Domain Containing 1(FRMPD1)が、それぞれ予後を最もよく反映する予後予測マーカーとして同定されました。

さらに、機械学習モデルを用いたバイオマーカー探索によって、sEVsでは155個のタンパク質群が選択され、90.4%の精度を示し、cEVsでは19個のタンパク質群が選択され、80.3%の精度を示しました。

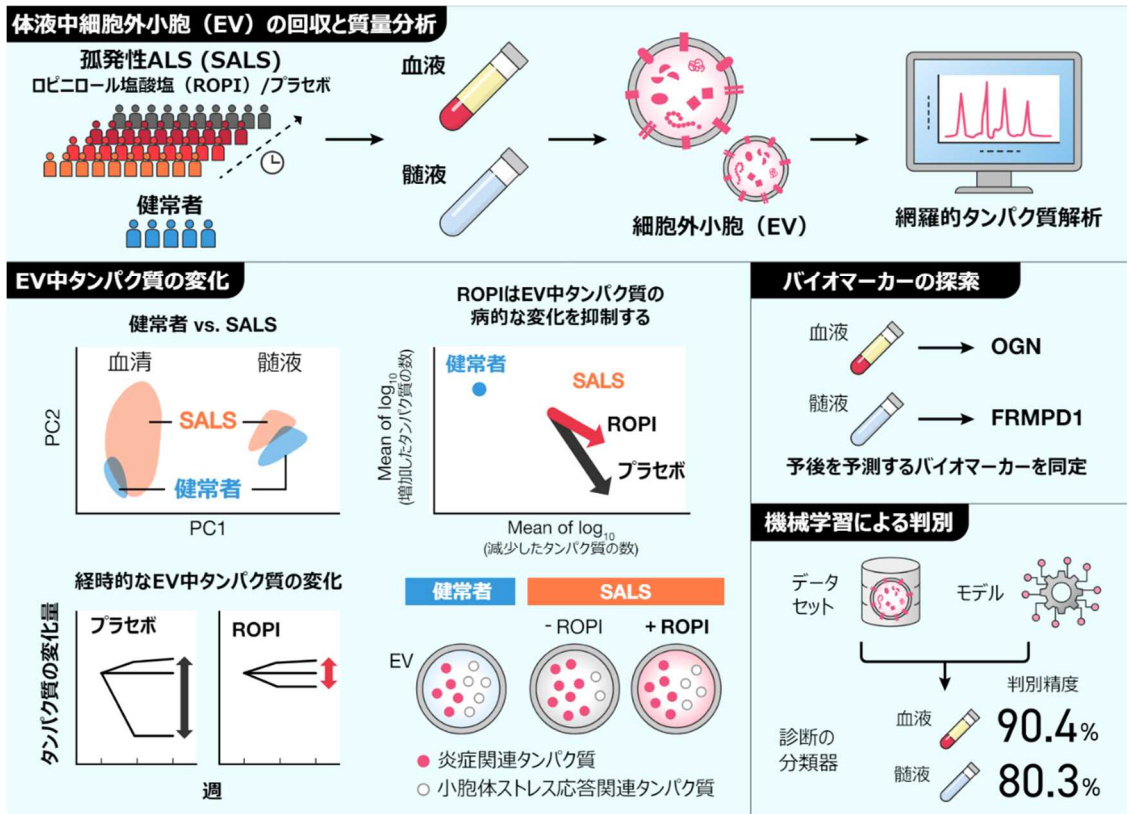


図5 本研究成果のまとめ

4. 今後の展開

本研究成果は、EVs に内包されているタンパク質群が SALS 発症ならびに病態進行に寄与している可能性を示唆しており、ROPI によってそれら病的変化が抑制されることがわかりました。今後、EVs を用いた ALS 治療や、神経炎症抑制ないしプロテオスタシスの向上が ALS 治療戦略として有用である可能性が広がりました。

5. 特記事項

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 難治性疾患実用化研究事業 疾患特異的 iPS 細胞創薬に基づいた筋萎縮性側索硬化症(ALS)治療における薬剤応答性評価技術の開発、難治性疾患実用化研究事業 iPS 細胞創薬に基づいた新規筋萎縮性側索硬化症(ALS)治療薬であるロピニロール塩酸塩の実用化第 1/2a 相試験、再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 神経疾患特異的 iPS 細胞を活用した病態解明と新規治療法の創出を目指した研究、再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム 筋萎縮性側索硬化症における病態回避機構の解明と治療に資する層別化技術開発、再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム 革新的 RNA 編集技術を用いた筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療開発、脳とこころの研究推進プログラム 孤発性筋萎縮性側索硬化症の双方向トランスレショナル研究による病態介入標的の同定と核酸医薬の開発研究、ゲノム創薬基盤推進研究事業 RNA 標的医薬創出に資する、疾患 RNA 分子完全長一次構造に関するデータ基盤の構築、難治性疾患実用化研究事業 患者レジストリを活用した沖縄型神経原性筋萎縮症のエビデンス創出研究、JSPS 科学研究費助成事業 (科研費) JP20H00485, JP21H05278, JP22K07500, JP22K15736、宮田幸比古記念 ALS 研究助成基金、日本 ALS 協会小出良夫基金、公

益財団法人第一三共生命科学研究振興財団、UBE 学術振興財団の研究助成を受けて実施されました。

ROPALS 試験にご参加くださった患者さん、ご家族の方々に心より感謝申し上げます。

<参考文献>

Fujimori K, et al. Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat Med.* 2018 Oct;24(10):1579-1589.

Morimoto S, et al. Phase 1/2a clinical trial in ALS with ropinirole, a drug candidate identified by iPSC drug discovery. *Cell Stem Cell.* 2023 Jun 1;30(6):766-780.e9.

Qiu J, et al. Sinomenine activates astrocytic dopamine D2 receptors and alleviates neuroinflammatory injury via the CRYAB/STAT3 pathway after ischemic stroke in mice. *J Neuroinflammation.* 2016 Oct 10;13(1):263.

Takeuchi T, et al. Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 May 12;112(19):E2497-506.

Zhang Y, et al. Activation of Dopamine D2 Receptor Suppresses Neuroinflammation Through α B-Crystalline by Inhibition of NF- κ B Nuclear Translocation in Experimental ICH Mice Model. *Stroke.* 2015 Sep;46(9):2637-46.

<原論文情報>

英文タイトル : Proteomic Insights into Extracellular Vesicles in ALS for Therapeutic Potential of Ropinirole and Biomarker Discovery

タイトル和訳 : 細胞外小胞におけるタンパク質解析によるロピニロール塩酸塩の治療メカニズムとバイオマーカー探索

著者名 : Chris Kato,* Koji Ueda,* Satoru Morimoto,*†, Shinichi Takahashi,* Shiho Nakamura, Fumiko Ozawa, Daisuke Ito, Yugaku Daté, Kensuke Okada, Naoki Kobayashi, Jin Nakahara, Hideyuki Okano†

*Equally contributed

†Co-corresponding author

掲載雑誌 : *Inflammation and Regeneration*

DOI : <https://doi.org/10.1186/s41232-024-00346-1>

<用語説明>

(注 1) ロピニロール塩酸塩 (ROPI) : ドーパミン D2 受容体に対して結合し、受容体を作動させる効果を持つ。ドーパミンが不足することで知られているパーキンソン病治療薬として広く用いられている薬剤。

(注 2) ROPALS 試験 : ROPI における第 I / II a 相医師主導治験。SALS 患者 20 名を対象とし、ROPI

(ROPI 群 ; 13 名) またはプラセボ (プラセボ群 ; 7 名) を 24 週間投与し、その後さらに 24 週間にわたって全例に対して ROPI を投与し、評価した。

(注 3) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) : 神経難病の 1 つで、**amyotrophic lateral sclerosis** の略。運動ニューロンが比較的特異的に変性・脱落することが特徴的であり、患者は全身の筋力低下を主症状とする。呼吸筋を含めた筋力が低下するため、未治療では発症後余命が 2-5 年とされる。

(注 4) 脳脊髄液 (CSF) : 頭蓋内において、脳や脊髄を包んでいる液体。**SALS** において変性・脱落する運動ニューロンは脳と脊髄に存在するため、**CSF** において病的変化が出やすいとされている。

(注 5) 細胞外小胞 (EVs) : 脂質二重膜を持ち、体液中を循環している小胞。タンパク質、核酸、脂質などを内包しており、ほぼ全ての細胞から分泌され、他細胞へと受け渡されている。細胞間の生体物質伝達に関与し、細胞間コミュニケーションに寄与していると考えられている。

(注 6) 人工多能性幹細胞 (iPSC) : 細胞に特定の操作をすることによって得られる細胞で、体を構成するほぼ全ての細胞に分化することができる多能性と、無限に増殖することができる幹細胞性を併せ持った特殊な細胞。

(注 7) アストロサイト : 脳や脊髄を構成する細胞の 1 つで、ニューロンの周囲に存在している細胞。ニューロンに対して栄養を供給したり、ニューロンの形状を保つなどの機能が知られており、最近では神経炎症における役割も重要視されてきている。

(注 8) **D2R-CRYAB** 経路 : ドーパミン **D2** 受容体 (**D2R**) の下流の経路で、神経炎症抑制において重要とされている。**D2R** の刺激によって、**CRYAB** が細胞質において **STAT3** や **NF- κ B** と呼ばれるタンパク質に結合することによって、これらの核内移行が阻害され、神経炎症に寄与するケモカインなどの発現が抑制されることが報告されている (図 4B 参照)。

(注 9) 機械学習モデル : 入力されたデータについて、データを解析し、判定や評価を行って出力する仕組みのこと。

(注 10) リバーストランスレーショナル研究 (reverse translational research, rTR) : 臨床現場において得られた知見をもとに、基礎研究を展開する手法のこと。疾患理解や治療法開発において強力な推進力を持つと考えられている。

(注 11) アゴニスト : 受容体に結合し、当該受容体を作動させる効果を持つ薬剤のこと。

(注 12) 下位運動ニューロン : 主に脊髄に存在する運動ニューロンのこと。ヒトは、大脳にある上位運動ニューロンから、脊髄にある下位運動ニューロンに情報が伝えられ、下位運動ニューロンが筋肉と接続することで、運動の司令が大脳から筋肉に伝わる。

(注 13) ドラッグスクリーニング : 創薬研究において、既存薬ないし新規物質から、期待する薬効を発揮する物質を選ぶプロセスのこと。

(注 14) 血液由来 EV (serum-EV) : 本研究では、正確には患者血液より血清を取り出し、EV を抽出した。本稿では読者の混乱を避けるため、血液と表記した。血清は、血液を遠心分離して得られる上澄みのこと。

(注 15) **uniform manifold approximation and projection (UMAP)** : 次元削減手法の 1 つで、高次元データ (ここではタンパク質組成) を低次元 (ここでは 2 次元) に落とし込む手法。高次元上で類似しているデータは、低次元上においても近い距離でプロットされる。

(注 16) コサイン類似度分析 : 2 つのベクトルの類似度を示す尺度であるコサイン類似度を用いた分析。1 であれば 2 つのベクトル (ここではタンパク質群) 同士が完全に一致しており、-1 であれば全く一致していない、となる。

(注 17) プロテオスタシス : タンパク質における恒常性 (ホメオスタシス) のことで、細胞内外におけるタンパク質が安定して機能する性質のこと。

(注 18) **RNA-seq** : **ribonucleic acid sequencing** の略。DNA から RNA が作られ、タンパク質が作られるが、このうち RNA を対象に網羅的に配列情報を読み取る手法。各 RNA 種の発現量 (存在量) を定量することができる。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

- ・研究内容についてのお問い合わせ先

慶應義塾大学 再生医療リサーチセンター センター長 岡野 栄之 (おかの ひでゆき)

TEL : 044-276-2388 FAX : 044-276-2388 E-mail : hidokano@a2.keio.jp

公益財団法人がん研究会 がんプレジジョン医療研究センター

がんオーダーメイド医療開発プロジェクト プロジェクトリーダー 植田 幸嗣 (うへだ こうじ)

TEL : 03-3570-0658 FAX : 03-3570-0644 E-mail : koji.ueda@jfcr.or.jp

- ・本リリースの配信元

慶應義塾広報室 (向坂) TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640

E-mail : m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>

- ・公益財団法人がん研究会 取材のお問い合わせ先

社会連携部 広報課 TEL: 03-3570-0775 FAX: 03-3520-0141 E-mail : ganken-pr@jfcr.or.jp