

厚生省科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

HGF の神経系における発現・機能解析とその適用

分担研究者： 船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科腫瘍生化学研究部・助手

研究要旨

HGF は各種神経細胞に対し *in vitro* で神経栄養活性を示した。加えて神経変性疾患、中でも難治性致死性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対し、大幅な進行遅延作用をもつことが明らかとなった。作用メカニズムとしては神経栄養因子一般に認める神経への直接作用に加え、HGF 独自のグリア細胞への作用を介して 2 重に貢献することが明らかとなった。今後より多くの神経疾患で HGF の機能解析が進むことが期待される。

A. 研究目的

- (1) HGF は初め肝細胞再生の本体として精製・クローニングされたが、神経系において特異的な発現パターンを示し、*In vitro* で神経栄養作用を示すことが明らかとなってきた。本研究では、HGF およびその受容体 (c-Met) の発現を解析するとともに、HGF の神経栄養作用を *in vitro* /*in vivo* で解析することにより HGF および HLP(HGF-like protein)とその遺伝子変異体による神経疾患治療への適用性について解析する。
- (2) 生体のホメオスタシス維持には、スカベンジャー受容体等による異物や死細胞の除去が重要な意義をもつ。逆にこの系の崩壊は老化を促進すると危惧される。神経系で重要な新しいスカベンジャー受容体のクローニングを目的とする。

B. 研究方法

コンベンショナルとテトラサイクリン調節系を用いた神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス (NS-HGF-Tg-マウス/Tet-HGF-Tg-マウス) の作成と解析。

- (1) ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS モデル Tg-マウス) における HGF および c-Met の発現と疾患進行過程との

相関関係の解析。

- (2) ヒト胎盤 cDNA ライブラリーから yeast two-hybrid 法を用いて、新規スカベンジャー受容体の部分配列を得、これをプローブとしてヒトおよびマウス胎盤 cDNA ライブラリーより新規スカベンジャー受容体の全長クローニングを行う。

- (*) 解析には; RNase protection assay 法, RT-PCR 法, ELISA 法, Western Blot 法, Southern Bot 法, 免疫組織染色法, *In situ* ハイブリダイゼーション法, 初代神経細胞, 神経節 & 神経組織片培養法, 各種生化学, 遺伝子工学的的手法, 各種運動機能解析法を用いた。

C. 研究結果

- (1) 神経特異的に HGF を発現するマウスを作成し、HGF 発現部位を解析した。またこのマウスと ALS モデル Tg-マウスの交配による HGF-ALS-ダブル Tg-マウスの作成を開始した。
- (2) ALS モデル Tg-マウスにおいて、HGF および c-Met/HGF 受容体が疾患進行により誘導を受けること、また、神経特異的 HGF-Tg マウスと交配したダブル Tg マ

ウスでは、ALS の疾患進行の遅延、生命予後の延長を認めた。この際運動ニューロン死および運動神経軸索変性が改善した。

- (3) HGF の ALS 進行遅延作用は、運動ニューロンへの直接作用に加え、グリア細胞の反応性増殖やグリア細胞でのタンパク質発現調節を介した作用を介していることが明らかとなった。
- (4) 新規スカベンジャー受容体 (SRCL) のクローニングに成功した。この分子は脳で発現していると共にマクロファージの cell line に加えて初代培養ミクログリアに発現していた。

D. 考察

HGF は、初め肝細胞増殖因子の本体として同定されたが、新しい神経栄養因子として注目されてきている。今回 HGF 遺伝子の神経系への供給により難治性神経変性疾患の1つである ALS の発症遅延、生命予後が改善されることを明らかとなった。HGF は、運動ニューロンに留まらず、パーキンソン病やアルツハイマー病で重要とされる中脳ドーパミン作動性ニューロン、大脳皮質や海馬ニューロンに対して神経栄養作用をもつことから、今後これらの疾患にも HGF が貢献できることが明かとなっていくと期待される。また今回の解析結果、HGF が従来の神経栄養因子の示す神経細胞への直接作用に加え、グリア細胞への作用をもつことが明かとなった。従って、HGF は、他の神経栄養因子に比べ、多くの神経変性疾患で問題とされるグルタミン酸毒性についてより有利であると考えられる。現在他の神経疾患に対する HGF の in vivo における機能解析を進めており、その解析結果とそれに基づく応用研究が多くの神経疾患患者さんの福音となる日が近くくること期待している。

一方、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患はアミロイド斑等の沈着が問題と

され、アミロイド (A_β) に対する免疫療法や、セクレターゼ阻害薬の開発に力が入れているが、ミクログリアを介した除去機構の応用はもう一つのアプローチとして注目している。その除去の中心は一連のスカベンジャー受容体群のいずれかが担うと考えられているが、既知のものとは異なる可能性が示唆されている。私達は今回神経系にも発現する新しいスカベンジャー受容体をクローニングすることに成功した。今後この解析もあわせて行っていきたい。

E. 結論

HGF は神経栄養作用に加え、グリア細胞に対する作用も介し ALS に寄与することが明かとなった。更に HGF は神経損傷や変性疾患で発現調節を受けることから、今後多くの神経疾患に対する新しい神経栄養因子として期待される。

F. 研究発表

- 1.K. Nakamura, H. Funakoshi, K. Miyamoto, F. Tokunaga and T. Nakamura (2001) Molecular cloning and functional characterization of a scavenger receptor with C-type lectin, a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem Biophys Res Commun*, in press
- 2.W. Sun, H. Funakoshi, K. Matsumoto and T. Nakamura (2000) A sensitive quantification method for evaluating the level of hepatocyte growth factor and c-met/HGF receptor mRNAs in the nervous system using competitive RT-PCR. *Brain Res Protoc* 5(2):190-7.
- 3.W. Sun, H. Funakoshi and T. Nakamura (1999) Differential expression of hepatocyte growth factor and its receptor, c-Met in the rat retina during development. *Brain Res.* 851, 46-53.
4. K.Kosai, K.Matsumoto, H.Funakoshi et al, (1999) *Hepatology*, 30, 151-159.
5. Funakoshi H, Risling M, Carlstedt T, Lendahl U, Timmusk T, Metsis M, Yamamoto Y, Ibanez CF.

(1998) Targeted expression of a multifunctional chimeric neurotrophin in the lesioned sciatic nerve accelerates regeneration of sensory and motor axons. Proc Natl Acad Sci USA. 28;95(9):5269-74.

6. 船越 洋他、(1999) 日本臨床、821-826、.

7. 船越 洋他、(1999) 脳の科学、21、537-542、.

II. 学会発表

1. W.Sun, H.Funakoshi et al,(2000) 北米神経科学会.

2.Y.Kishi, H.Funakoshi et al,(2000)北米神経科学会.

4. W.Sun, H.Funakoshi et al, (1999)日本生化学大会.

5. W.Sun, H.Funakoshi et al,(1999)日本神経科学会.

6. 船越 洋 (1999) ALS 夏のシンポジウム

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌の時は雑誌名，巻号 数，論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Transgenic mice with an expanded CAG repeat controlled by the human AR promoter show polyglutamine nuclear inclusions and neuronal dysfunction without neuronal cell death. Hum Mol Genet , in press	2001	Oxford University Press	Adachi H, <u>Sobue G</u> , et al
Gene expression profile in Alzheimer's brain screened by molecular indexing. Mol Brain Res , 87:1-11	2001	Elsevier Science	Doyu M, Sawada K, Mitsuma N, Niwa J, Yoshimoto M, Fujii Y, <u>Sobue G</u> , Kato K
Differential effects of LAR on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant protein. J Biol Chem , in press	2001	Cadmus Professional Communication	Shanlou Q, Iwashita T, Furukawa T, Yamamoto M, <u>Sobue G</u> , Takahashi M
Evidence of both inter- and intra-molecular cooperation for full catalytic activity of RET kinase. Cancer Res , in press	2001		Kato M, Iwashita T, Akhand AA, Kawamoto Y, Senga T, <u>Sobue G</u> , Yamamoto M, Hamaguchi M, Takahashi M, Nakashima I
Painful alcoholic polyneuropathy with predominant small-fiber loss and normal thiamine status. Neurology , in press	2001	Lippincott-Raven	Koike H, Mori K, Misu K, Hattori N, Ito H, Hirayama M, <u>Sobue G</u>

<p>Immunoglobulin therapy for idiopathic chronic sensory ataxic neuropathy. Neurology, 54: 1008-1010</p>	2000	Lippincott-Raven	Takeuchi H, Misu K, Hattori N, Nagamatsu M, <u>Sobue G</u>
<p>Chaperones, Hsp70 and Hsp40, suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. J Biol Chem, 275(12): 8772-8778</p>	2000	Cadmus Professional Communication	Kobayashi Y, Kume A, Li M, Doyu M, Hata M, Ohtsuka K, <u>Sobue G</u>
<p>Anticipation in early-but not late onset familial amyloid polyneuropathy (TTR Met 30) in Japan. Neurology, 55: 451-452</p>	2000	Lippincott-Raven	Misu K, Hattori N, Ando Y, Ikeda S, <u>Sobue G</u>
<p>Detection of triplet repeat expansion in the human genome by use of hybridization signal intensity. Analytical Biochem, 286: 59-66</p>	2000	Academic Press	Sawada K, Doyu M, Tanaka F, <u>Sobue G</u> , Kato K
<p>CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. Hum Mol Genet, 9: 2197-2202</p>	2000	Oxford University Press	McC Campbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, <u>Sobue G</u> , Fischbeck KH
<p>Differential somatic CAG repeat instability in variable brain cell lineage in dentatorubral pallidoluysian atrophy (DRPLA): a laser-captured microdissection (LCM)-based analysis. Hum Genet, 107: 452-457</p>	2000	Springer-Verlag	Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Riku S, Yoshida M, Hashizume Y, <u>Sobue G</u>

<p>An axonal forms of Charcot-Marie-Tooth disease showing distinctive features in association with mutations in the peripheral myelin protein zero gene (Thy124Met or Asp75Val). J Neurol Neurosurg Psychiatry, 69: 806-811</p>	2000	BMA House	<p>Misu K, Yoshihara T, Shikama Y, Awai E, Yamamoto M, Hattori N, Hirayama M, Takegami T, Nakashima K, <u>Sobue G</u></p>
<p>Mutations in the peripheral myelin protein zero and connexin 32 genes detected by non-isotopic RNase cleavage assay and their phenotype in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease. Hum Mut, 16:177-8</p>	2000	WILEY-LISS	<p>Yoshihara T, Yamamoto M, Doyu M, Misu K, Hattori N, Hasegawa Y, Mokuno K, Mitsuma T, <u>Sobue G</u></p>
<p>Tissue-specific somatic mosaicism in spinal and bulbar muscular atrophy is dependent on CAG-repeat length and Androgen receptor-gene expression level. Am J Hum Genet, 65: 966-973</p>	1999	University of Chicago Press	<p>Tanaka F, Reeves M F, Ito Y, Matsumoto M, Li M, Miwa S, Inukai A, Yamamoto M, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Terao S, Mitsuma T, <u>Sobue G</u></p>
<p>Late onset familial amyloid polyneuropathy type I (transthyretin Met-30-associated familial amyloid polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan Clinicopathological and genetic features. Brain, 122: 1951-1962</p>	1999	Oxford University Press	<p>Misu K, Hattori N, Nagamatsu M, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Takei Y, Hanyu N, Usui Y, Tanaka F, Harada T, Inukai A, Hashizume Y, <u>Sobue G</u></p>

<p>Diabetic nephropathy is not associated with dinucleotide repeat polymorphism upstream of aldose reductase (ALR2) gene but with erythrocyte ALR2 content in Japanese subjects with type 2 diabetes. Diabetes 48:420-422</p>	<p>1999</p>	<p>The American Diabetes Association</p>	<p>Maeda S, Haneda M, <u>Yasuda H</u>, Tachikawa T, Isshiki K, Koya D, Terada M, Hidaka H, Kashiwagi A, Kikkawa R</p>
<p>The 3'-untranslated region polymorphism of the gene for skeletal muscle-specific glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 in the type 2 diabetic Japanese population. Diabetes 48:1469-1472</p>	<p>1999</p>	<p>The American Diabetes Association</p>	<p>Maegawa H, Shi K, Hidaka H, Iwai N, Nishio Y, Egawa K, Kojima H, Haneda M, <u>Yasuda H</u>, Nakamura Y, Kinoshita M, Kikkawa R, Kashiwagi A</p>
<p>Effect of aldose reductase inhibitor on cutaneous nerve fiber length in diabetic patients. Diabetes Care 23:705</p>	<p>2000</p>	<p>The American Diabetes Association</p>	<p><u>Yasuda H</u>, Hirai A, Joko M, Terada M, Kawabata T, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R,</p>
<p>Evaluation of a new care system provided to diabetic patients in the outpatient clinic. Intern Med 39:783-787</p>	<p>2000</p>	<p>The Japanese society of Internal Medicine</p>	<p>Hidaka H, Terada M, Maegawa H, Kojima H, Koya D, Nishio Y, Haneda M, <u>Yasuda H</u>, Kashiwagi A, Kikkawa R,</p>

<p>xpression of Rho-family GTPases (Rac,cdc42,RhoA) and their association with p-21 activated kinase in adult peripheral nerve. J Neurochem</p>	in press	International Society of Neurochemistry	Terashima T, <u>Yasuda H</u> , Terada M, Kogwa S, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R,
<p>Effects of 15 months aldose reductase inhibition with fidarestat on the experimental diabetic neuropathy in rats. Diab Res Clin Pract. 50: 77-85</p>	2000	Elsevier Publ, Official J. Western Pacific Region of World Diabetes Association	Kato N, Mizuno K, Makino M, Suzuki T, <u>Yagihashi S</u>
<p>Effects of OPB-9195 on the peripheral neuropathy in STZ-induced diabetes. Eur J Clin Invest</p>	in press	Blackwell	Wada R, Nishizawa Y, Yagihashi N, Ishikawa, S, Yasui T, <u>Yagihashi S</u>
<p>Utility of the transgenic mouse in diabetes research. In; Chronic Complications in Diabetes. 71-96</p>	2000	Harwood Academic Publ.	<u>Yagihashi S</u> , Yamagishi S, Nishimura C
<p>Differential expression of hepatocyte growth factor and its receptor, c-Met in the rat retina during development. Brain Res. 851, 46-53</p>	1999	Elsevier Science Ltd	W. Sun, <u>H. Funakoshi</u> , T. Nakamura
<p>Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. Hepatology, 30, 151-159</p>	1999	The American Association for the study of Liver Diseases	Kosai K, Matsumoto K, <u>Funakoshi H</u> , Nakamura T

<p>A sensitive quantification method for evaluating the level of hepatocyte growth factor and c-met/HGF receptor mRNAs in the nervous system using competitive RT-PCR. Brain Res Protoc, 5(2):190-7</p>	2000	Elsevier Science Ltd	W. Sun, <u>H. Funakoshi</u> , K. Matsumoto, T. Nakamura
<p>Molecular cloning and functional characterization of a scavenger receptor with C-type lectin, a novel member of a scavenger receptor family. Biochem Biophys Res Com, 280(4): 1028-1035</p>	2001	Academic Press	K. Nakamura, <u>H. Funakoshi</u> , K. Miyamoto, F. Tokunaga, T. Nakamura
<p>HGFの神経系における機能と神経疾患治療への展望 神経進歩44(3):414-422</p>	2000	医学書院	船越 洋 松本邦夫 中村敏一

Transgenic mice with an expanded CAG repeat controlled by human AR promoter show widespread but tissue-selective polyglutamine nuclear inclusions and neuronal dysfunction without neuronal cell death

by

Hiroaki Adachi, Akito Kume, Mei Li, Yuji Nakagomi¹, Hisayoshi Niwa, Jun Do, Chen Sang, Yasushi Kobayashi, Manabu Doyu and Gen Sobue

from

Department of Neurology, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, 466-8550, Japan and ¹Laboratory of Electron Microscopy, Aichi Medical University, Aichi, 480-1195, Japan

Address correspondence, Gen Sobue, MD, Department of Neurology, Nagoya University School of Medicine, 65 Tsurumai-cho Showa-ku, Nagoya, 466-8550, Japan

Tel: +81-52-744-2385, Fax: +81-52-744-2384

E-mail: sobueg@tsuru.med.nagoya-u.ac.jp

Abstract

We generated transgenic mice that expressed a highly expanded 239 polyglutamine (polyQ) repeat under the control of human androgen receptor promoter. These transgenic mice developed progressive neurological phenotypes of muscular weakness and ataxia, small body size and short life-span. PolyQ nuclear inclusions (NIs) were remarkable and widespread but found in selective regions of the central nervous system (CNS) such as the spinal cord, cerebrum and cerebellum as well as in selective peripheral visceral organs. This distribution pattern somewhat resembled that of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), but was more widespread. In the neuronal tissues, NIs were present in the astrocytes as well as the neurons. Cytoplasmic and axonal inclusions were not observed. In the CNS regions with abundant NIs, neuronal populations were well preserved, and neither neuronal cell death nor reactive astrogliosis nor microglial invasions were detected. These findings suggested that polyQ alone can induce the neuronal dysfunction which precedes gross neuronal degeneration, and provides a clue to investigate the molecular mechanism that underlies the pathway to neuronal dysfunction from polyQ expansion, particularly of SBMA mutation.

Introduction

Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is a late-onset X-linked motor neuron disease caused by an expansion of polyglutamine (polyQ) repeat in androgen receptor (AR) (1), one of the neurodegenerative disease caused by a polyQ expansion such as Huntington's disease, SCA1, 2, 3, 6, 7 and dentatorubral-pallidoluysian atrophy (2,3). The major neuropathological finding of SBMA is neuron loss of bulbar and spinal motor neurons showing progressive limb muscular atrophy and difficulty in swallowing and speech. Mild sensory impairment due to mild sensory neuron degeneration (4,5), testicular atrophy, gynecomastia and feminized skin change are also present (4,5). An inverse correlation between age of onset and expansion of CAG repeats has been reported (6-8). Nuclear inclusions (NIs) consisting of mutant and truncated AR with expanded polyQ in combination with many components of ubiquitine-proteasome and molecular chaperone pathways are found in the residual motor neurons in the brain stem and spinal cord as well as in the skin, testis, kidney, heart and some other visceral organs of the SBMA patients (9,10).

A neuronal cell line expressing truncated AR with expanded-polyQ, was found to present nuclear aggregates of mutant AR and apoptosis by TUNEL staining (11). However, only extremely truncated AR with highly expanded polyQ induced NIs and apoptosis, suggesting that the expanded polyQ plays an essential role in aggregate formation and apoptosis. Both NIs and apoptosis were well prevented by co-expression of molecular chaperons Hsp 70, Hsp 40 and others with truncated AR harboring a highly expanded polyQ (11,12), also suggesting that the expanded polyQ plays a central role in cell toxicity. In many other *in vitro* models of CAG repeat diseases, NIs and apoptosis have also been demonstrated, but aggregate formation and apoptosis are not necessarily linked (13,14). However, a functional impairment without apoptosis can be present in these *in vitro* models (15).

An *in vivo* transgenic mouse model with a transgene harboring expanded CAG repeats for HD, SCA1, SCA3 and SCA7 driven by potent promoters (16-23) showed evidence of neuronal degeneration and neuron loss accompanied by apparent astrogliosis (17-21,23).

20000172

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。