

厚生科学研究費補助金 脳科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症の  
病態解明と治療法の開発に関する研究

平成12年度 研究報告書

主任研究者 糸山泰人  
東北大学医学部神経内科  
平成13年3月 印刷

# 目 次

## 研究者一覧

総括研究報告 .....	1
	糸山 泰人

## 研究報告（分担研究者）

1. 蛋白質糖化反応および酸化ストレスの筋萎縮性側索硬化症への関与の検討 .....	4
大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学生化学	谷口 直之

2. ALSに対するHGFの機能解析：ダブルトランスジェニックマウスを作成して .....	8
大阪大学医学部附属バイオメディカル 教育研究センター・腫瘍生化学教室	船越 洋

3. トランスジェニックラットを用いた新しいALSモデルに関する研究 .....	12
東北大学医学部附属病院神経内科	青木 正志

## 研究成果一覧

# 研 究 者 一 覽

筋萎縮性側索硬化症の病態解明と治療法の開発に関する研究

研究者一覧

	氏名	所属	職名
主任研究者	糸山 泰人	東北大学大学院医学系研究科神経学講座神経内科学	教授
分担研究者	谷口 直之	大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学生化学	教授
	船越 洋	大阪大学医学部附属バイオメディカル 教育研究センター・腫瘍生化学教室	助手
	青木 正志	東北大学医学部附属病院神経内科	助手

# 總 括 研 究 報 告

# 厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

## 総括研究報告書

### 筋萎縮性側索硬化症の病態解明と治療法の開発に関する研究

主任研究者 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野 教授

#### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病因研究で 20 世紀最大の発見は家族性 ALS における病因遺伝子 Cu/Zn SOD の同定とその変異遺伝子導入トランスジェニック（Tg）マウスの作成である。本研究グループは変異 Cu/Zn SOD がいかんして運動ニューロン死を引き起こすかの機序解明に主眼を置いて研究を行っている。Cu/Zn SOD 変異と運動ニューロン死の機序解明研究をよりダイナミックに行うために変異 Cu/Zn SOD 遺伝子導入 Tg ラットを完成させた。この Tg ラットは神経栄養因子などの薬剤を髄腔内へ直接投与出来る利点もあり、今後治療実験にも期待が持たれている。変異 Cu/Zn SOD Tg マウス脳には異常に糖化された SOD の存在が示唆され、かつ *in vitro* で変異 Cu/Zn SOD は正常の SOD に比べ糖化反応を受け易くなることが示されているので、この糖化反応が細胞機能障害に関係しているものと考えられる。現状では多くの神経栄養因子がその臨床応用で失敗しているが、肝細胞増殖因子（HGF）は新規の栄養因子として注目されている。In vivo の HGF の効果を明らかにする目的で HGF Tg マウスと変異 Cu/Zn SOD 導入の ALS Tg マウスのダブル Tg マウスを作成して、ALS Tg マウスに比べてダブル Tg マウスでは寿命延長と運動機能の改善を認めたことは、今後の ALS 治療に大きな期待をいだかせるものである。

#### 分担研究者

谷口直之（大阪大学大学院医学系研究科生化学）、

船越 洋（大阪大学大学院医学系研究科バイオ  
メディカル教育研究センター・腫瘍  
生化学）

青木正志（東北大学医学部附属病院神経内科）

める有効な治療法が確立していない。本研究グループでは神経難病のなかでも最も過酷な疾患と考えられる ALS の病因と病態の解明と有効な治療法の確立を研究の目的とする。

#### B. 研究方法

ALS の成因と病態解明の研究において 20 世紀最大の発見は、一部の家族性 ALS の病因遺伝子が細胞内のフリーラジカルスカベンジャーである Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) であることを明らかにし、かつこの変異 Cu/Zn SOD 遺伝子を導入したトランスジェニック（Tg）マウスにて ALS の動物モデルが作成されたことである。本

#### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は病因が不明の進行性難治性神経筋疾患である。主として運動ニューロンの選択的細胞死が惹起されて全身の筋萎縮をきたし、最終的には呼吸筋の麻痺をきたすという予後が極めて不良な疾患であり、未だ筋萎縮の進行を止

研究グループは研究の主眼を変異 Cu/Zn SOD 運動ニューロン死の機序の解明に置き、ALS の病態の解明と治療法の確立の研究を行う。

変異 Cu/Zn SOD と運動ニューロン死の研究には大きく2つの方法論でのぞむ。一つは ALS の動物モデルを Tg マウスに加えて Tg ラットを作成して病因・病態解明の研究をよりダイナミックに行い、かつ薬剤の髄腔内投与を行い易くする。もう一つは、神経細胞内での変異 Cu/Zn SOD がいかんして細胞障害をきたすのかを Cu/Zn SOD の糖化反応の異常から検討する。

ALS の治療薬の開発には新しい神経栄養因子の開発が重要と考えられている。神経細胞死の強い抑制効果と神経突起伸長効果をもつ新規の神経栄養因子である肝細胞増殖因子 (HGF) の *in vivo* の効果を明らかにする為に、HGF Tg マウスと変異 Cu/Zn SOD 導入 ALS Tg マウスを交配したダブル Tg マウスを作成して検討を行う。

#### (倫理面への配慮)

各研究施設における倫理委員会規程に従い、十分なインフォームド・コンセントを施行し、動物実験に際しては倫理的動物実験指針に従い実験を行った。

### C. 研究結果と考察

#### E. 変異 Cu/Zn SOD Tg ラットの作成

変異 Cu/Zn SOD が運動ニューロン死を惹起させる機序の解明は Tg マウスを用いて病理学的及び生化学的に行われてきているが、マウスの個体としてのサイズの小ささは病態解明や治療実験の応用に大きな障害であった。今回、新たな病態解明研究の展開を目的にヒト変異 Cu/Zn SOD 遺伝子導入ラットの作成を行った。H46R 変異と G93A を持つ Cu/Zn SOD 遺伝子を導入した SD ラットで変異

SOD 蛋白が多く発現した系統において、後肢の脱力から始まる運動障害をきたした。病理学的にも脊髓前角の運動ニューロンの消失とグリオーシスが認められ、残存した細胞にはユビキチンと SOD に染色される封入体も確認された。また臨床経過では G93A 変異を持つ Tg ラットは H46R 変異を持つ Tg ラットに比較して発症時期が早く、また急速な経過を示した。これはヒト ALS での Cu/Zn SOD の変異とその臨床型との関係の類似性を示すものであり、今後その病態を検討してゆく必要がある。この Tg ラットの ALS 動物モデルの完成により新たな Cu/Zn SOD 変異と運動ニューロン死の機序解明と神経栄養因子 (なかでも BDNF や HGF) の髄腔内投与の治療実験が可能になった。

#### (2) 細胞内での変異 Cu/Zn SOD の病的意義

変異 Cu/Zn SOD がどのような機序で細胞死を引き起こすかは重要な研究テーマである。今まで peroxynitrite 産生説、SOD 凝集産生説、遊離 Cu による oxidative stress 説等が考えられてきているが、本研究グループでは ALS の発症年齢が中年以降であることより aging factor を考察して、Cu/Zn SOD の蛋白質糖化反応の異常から細胞死の機序を解明する研究に重点を置いている。

変異 SOD (G37R) Tg マウスと wild type SOD Tg マウスの脳の抽出物で糖化をうけた蛋白質を比較した結果、分子量 22Kd あたりに変異 SOD Tg マウスのみを検出されるバンドが認められ、これは SOD の分子量に一致した。また、変異 Cu/Zn SOD Tg マウスの脊髓灰白質においては免疫組織学的に wild type のマウスは認められない糖化の異常亢進が認められた。現状ではどの蛋白が糖化されているかは同定できないが、*in vitro* の系では精製した変異 Cu/Zn SOD は wild type に比べて2~5倍糖化されやすいことが明らかになった。ヒト ALS の

脊髄での残存運動ニューロンでも異常糖化反応が確認されていることより Cu/Zn SOD を含めた蛋白質の糖化反応が ALS の発症に関与する可能性がある。

### (3) ALS Tg マウスに対する神経栄養因子の効果

神経栄養因子は運動ニューロン死を抑制し軸索の再生を促す作用があり、ALS の治療薬剤として期待されている。しかし、CNTF、BDNF、IGF-1、GDNF 等では期待される臨床効果が得られておらず、新規の神経栄養因子の導入が期待されている。そのなかで HGF は強力な神経栄養因子であることが明らかにされ、その ALS への治療応用が期待されている。

HGF の臨床応用での有用性を調べる目的で神経特異的 HGF 発現 Tg マウスを作成し、これと変異 Cu/Zn SOD を導入した ALS Tg マウスと交配してダブル Tg マウスを作成した。即ち ALS モデルマウスにおける変性運動ニューロンに直接的長期間に HGF 遺伝子を発現させ、その効果をみた。その結果 HGF/ALS ダブル Tg マウスは ALS Tg マウスに比べ麻痺の発現が遅れ、寿命が大幅に延長するとともに運動機能が改善した。この HGF 有効性の作用機序としては、運動ニューロンに対する直接の神経栄養因子作用に加えて ALS Tg マウスに生じているグリア細胞のグルタミン酸トランスポーターの発現低下を改善する二重のメカニズムが働いていると考えられている。

## D. 結論

ALS の病因研究における最大の疑問は「何故ある一定年齢に達して運動ニューロンに選択的な一次性的神経細胞死が生じるか？」である。長年の ALS

研究において最も確かな病因につながる発見は、家族性 ALS にみられる変異 Cu/Zn SOD と運動ニューロン死の関係と考えられる。

変異 Cu/Zn SOD に関する研究では、従来まで研究に使用されていた Tg マウスに比べて、病理学的、生化学的および酵素学的な検索が飛躍的に展開すると期待される Tg ラットの完成が特筆される。この Tg ラットは経時的に脳脊髄液の採取検査も可能であり、更には神経栄養因子などの髄腔内投与療法も可能にするものである。変異 Cu/Zn SOD がいかにして運動ニューロン死をきたすかに関しては、peroxynitrite 説、遊離 Cu 説、変異 SOD 凝集産生説などに加えて本研究グループでは変異型 Cu/Zn SOD では異常に糖化反応を受け易くなる点に注目している。これらの Cu/Zn SOD 機能変化が細胞障害へつながる詳細な機序の解明が急がれる。ALS の新たな治療を見据えて新規の神経栄養因子である HGF が注目されているが、今回初めて神経特異的 HGF 発現 Tg マウスと ALS Tg マウスのダブル Tg マウスの作成がなされ、HGF が明らかに ALS の進行を抑制することが示された。この発見により ALS の新たな治療法の可能性が示された。

## E. 健康危険情報

特記すべきことなし。



# 分 担 研 究 報 告

筋萎縮性側索硬化症の病態解明と治療法の開発に関する研究

蛋白質糖化反応および酸化ストレスの筋萎縮性側索硬化症への関与の検討

分担研究者 谷口直之 大阪大学大学院医学系研究科 生化学 教授

**研究要旨** 家族性筋萎縮性側索硬化症(familial ALS)の原因遺伝子の一つがCu/Zn-superoxide dismutase (SOD1)遺伝子であることが発見され、発症のメカニズムとしてmutant SODが何らかの細胞障害作用を有することが明らかとなったがその詳細は不明である。しかし何らかのaging factorや、変異SODの翻訳後修飾が発症に関与することが示唆されている。そこで重要なaging factorである蛋白質糖化反応や酸化ストレスがmutant SODにどのような影響を及ぼすかを検討した。mutant SOD transgenic mouseの脳には、wild type SOD transgenic mouseには認められない分子量約22Kd糖化蛋白質がwestern blottingにて検出された。またmutant SOD transgenic mouseの脊髄において糖化が亢進していた。またin vitroの実験ではmutant SOD蛋白質はwild typeより2-5倍糖化されやすことが明らかとなった。以上のことからALSにおいてSODを含めた蛋白質の糖化反応の亢進が発症に関与する可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症の10-15%は家族性であり、その中の20-25%に抗酸化酵素の代表でsuperoxideの除去を担うCu/Zn-superoxide dismutase (SOD1)遺伝子の点突然変異が発見された。発症のメカニズムとしては、単純なSOD1活性の低下ではなく、mutant SODが何らかの細胞障害作用を有すること(toxic gain of function)が明らかとなったがその詳細は不明である。一方ALSが40-50歳の中年以降に発症することから、何らかのaging factorが病態に関与すると考えられている。蛋白質糖化反応は糖尿病の病態の他に、老人性白内障、動脈硬化、皮膚コラーゲンの機能障害などの生理的老化、さらにAlzheimer病やParkinson病などの神経変性疾患にも深く関与していることが知られている。さらにfamilial ALSの神経細胞内ではSOD免疫陽性の不溶性の封入体が認められること、さらに最近のmutant SODの培養細胞での発現実験の報告等から、mutant SODは何らかの翻訳後修飾をうけ不溶性になることで細胞障害性を獲得する可能性が示唆されている。そこで重要なaging factorである蛋白質糖化反応や酸化ストレスがmutant SODにどのような影響を及ぼすか、またALSの発症にどのように関与するかを明らかにすることを研究目的とする。

B. 研究方法

in vivoの検討には生後6ヵ月よりALS様症状を呈するmutant SOD1 (G93A, G37R) 遺伝子 transgenic mouseを用いた。mutant SOD1 (G37R) 遺伝子 transgenic mouseとwild type SOD1 遺伝子 transgenic mouseの脳の抽出物をSDS-PAGE後anti-hexitol lysine抗体を用いてwestern blottingを行い、両者で糖化の程度の異なる蛋白質を検出した。さらにALSで障害される脊髄において蛋白質糖化反応が増強されているかを検討するため、mutant SOD1 (G93A) 遺伝子 transgenic mouseとwild type SOD1 遺伝子 transgenic mouseの脊髄をパラホルムアルデヒドで固定後、anti-hexitol lysine抗体にて免疫染色を行った。in vitroでの検討は、wild typeおよびmutant SOD1 遺伝子(G93A, G37R, I113T, H46R)を昆虫細胞発現ベクター (PSV 1392)に組み込み、sf21昆虫細胞に過剰発現させ、wild typeおよびmutant SOD蛋白質をイオン交換カラム、ゲルろ過カラムにて精製した。精製蛋白質を100mM glucose、fructoseと2週間反応させ、SDS-PAGE後anti-hexitol lysine抗体を用いてwestern blottingを行い、糖化の程度を検討した。また酸化ストレスとしてCu, Zn, Ni, Fe, Mnなどの重金属および過酸化水素と精製蛋白質を反応させ、SDS-

PAGEを行い、移動度を検討した。さらにどのような酸化修飾を受けたかを予測するため、酸化修飾を受けたSOD蛋白質の分子量をMALDI-TOF Mass-spectrometryにて測定した。

### C. 研究結果

mutant SOD (G37R)遺伝子transgenic mouseとwild type SOD 遺伝子transgenic mouseの脳の抽出物で糖化をうけた蛋白質を比較した結果、分子量22Kdあたりにmutant SOD transgenic mouseにのみ検出されるバンドが認められ、これはSODの分子量に一致した(図1)。またmutant SOD遺伝子transgenic mouseの脊髄灰白質部にdiffuseにanti-hexitol lysine抗体免疫強陽性が認められたが、wild type SOD遺伝子transgenic mouseには観察されなかった。wild typeおよびmutant SOD蛋白質は精製した段階で糖化を受けていたが、糖化の程度はmutant SODがwild typeの2-5倍亢進していた。それぞれの蛋白質を100 mM glucoseと2週間反応後では、糖化の程度はmutant SODがwild typeの2-5倍亢進していた。(図2)。さらにglucose以外の還元糖であるfructoseとの反応においても同様の結果が得られた。SOD蛋白質の酸化ストレスに対する影響を調べたところ、wild typeおよびmutant SOD蛋白質はともに、Zn, Mn, Fe, Co, Ni, Mgでは影響をうけないが、Cu、過酸化水素と反応させることによりSDS-PAGEで一本のバンドであった精製蛋白質が2本のバンドに分離され、酸化により何らかの修飾を受けたことが示唆された。酸化修飾された蛋白質を抽出しMass spectrometryで解析すると、nativeなものに比較し分子量が44増加していた(図3)。しかし酸化修飾の受けやすさは、wild typeおよびmutant SOD (H46R, G93A)蛋白質では今のところ差異は認めなかった(図4)。

### D. 考察

mutant SOD transgenic mouseの脳には、wild type SOD transgenic mouseには認められない糖化蛋白質がwestern blottingにて検出された。mutant SOD transgenic mouseの脳で特異的に糖化の亢進していた蛋白質の分子量は約22Kdであり、SOD蛋白質の分子量に一致しmutant SOD蛋白質の糖化が亢進している可能性が示唆されるが、糖化蛋白質を精製し、その本体を確認する必要がある。さらにmutant SOD transgenic mouseの脊髄においては糖化が亢進していることがanti-hexitol lysine抗体を用いた免疫組織法にて確認された。昆虫細胞系で発現させ精製したwild typeおよびmutant SOD蛋白質を用いたin vitroの実験ではmutant SOD蛋白質は還元糖によりwild typeより2-5倍糖化されやすことが明らかとなった。mutant SOD蛋白質がwild typeと比較して、一分子中で糖化を受けるlysineのsiteが増加するのか、あるいはlysineのsiteは同じであっても多くの分子が糖化を受けるのかを検討する必要がある。またwild typeおよびmutant SOD蛋白質はともにCu、過酸化水素により酸化を受けやすいが、両者に差異はいまのところ認めない。mutant SOD transgenic mouseの脊髄においてSODを含めたいかなる蛋白質が糖化を受けているかを検討するとともに、糖化反応の亢進がいかなるメカニズムで運動神経細胞死を引き起こすかを解明する必要がある。

### E. 結論

今回の研究より、ALSにおいてSODを含めた蛋白質の糖化反応の亢進が発症に関与する可能性が強く示唆された。治療法の開発にむけて蛋白質糖化反応を抑制する薬剤がALS発症を抑えるかの検討が必要である。

F. 健康危険情報  
特記すべきことなし。

G. 研究発表  
1. 論文発表

A. Matsumoto, T. Myint, J. Fujii and N. Taniguchi.  
Gain in function of mutant Cu,Zn-superoxide  
dismutase as a causative factor in familial  
amyotrophic lateral sclerosis: less reactive oxidant  
formation but high spontaneous aggregation and  
precipitation. Free Radical Res. 33, 65-73, 2000.

2. 学会発表

日本生化学会 家族性筋萎縮性側索硬化症にお  
ける変異Cu,Zn-SODの糖化のこう進

メイラード研究会 家族性筋萎縮性側索硬化症  
における変異Cu,Zn-SODの糖化のこう進

10th Biennial Meeting of the Society for Free Radical  
Research International FALS associated Cu,Zn SOD  
mutations have high susceptibility to glycation  
reaction

H. 知的財産権の出願、登録状況  
特記すべきことなし。

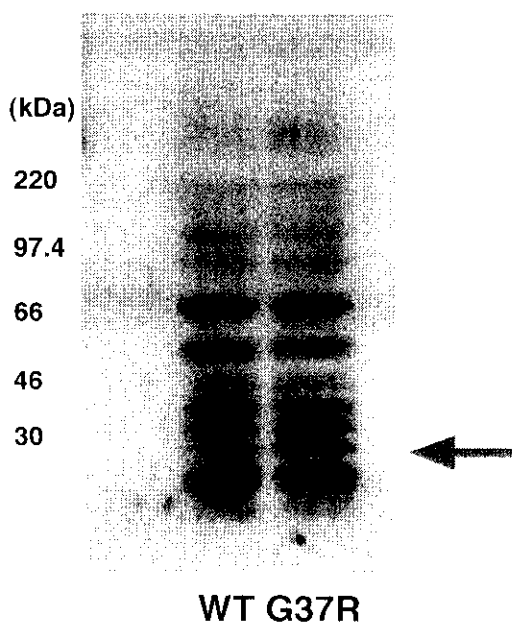


図1

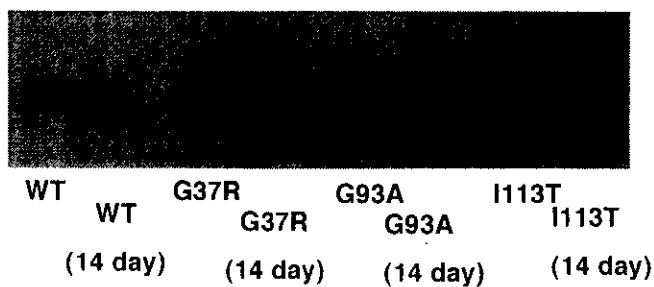


図2

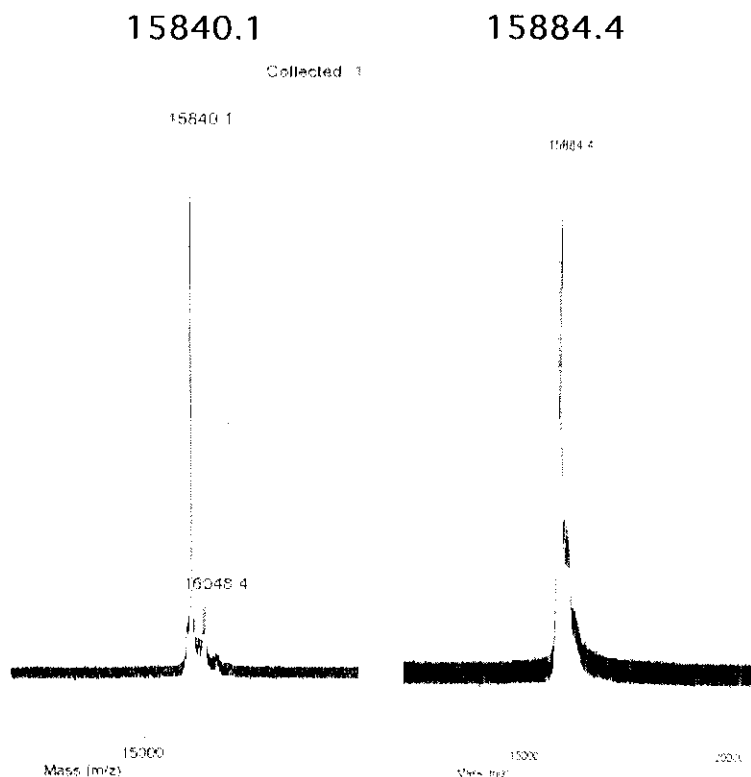


図3



## 厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

### 分担研究報告書

#### 筋萎縮性側索硬化症の病態解明と治療法開発に関する研究

##### ： ALS に対する HGF の機能解析

##### —ダブルトランスジェニックマウスを作成して

分担研究者 船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科バイオメディカル教育研究センター  
一腫瘍生化学研究部助手

**研究要旨** 筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、神経変性疾患の中でも治療法がない難病であり、運動ニューロンの特異的細胞死とその軸索変性による運動機能不全による個体死を起こす重大な疾患である。本研究では、運動ニューロンに対する強力な神経栄養作用をもつ HGF による ALS の疾患進行抑制作用とその作用機構について評価した。HGF の供給には、まず神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス（HGF-Tg）を作成し、これと ALS モデルトランスジェニックマウス（ALS-Tg）を交配することで、ALS モデルマウスの神経細胞に直接長期間 HGF 遺伝子を発現させる戦略をとった。HGF/ALS-Tg マウスは、ALS-Tg マウスに比べ麻痺の発症が遅れ、寿命が大幅に延長すると共に、運動機能が改善した。HGF の作用機構としては、HGF の運動ニューロンに対する直接神経栄養作用に加え、グリア細胞に働きグルタミン酸トランスポーターの発現低下を抑えることでグルタミン酸毒性を緩和する 2 重のメカニズムが働いていることが示唆された。以上から、HGF は ALS に対する有効な治療薬となると期待される。

#### 研究目的

**[ 研究背景 ]** 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、海馬・中脳ドーパミン作動性・小脳顆粒・運動・感覚および交感ニューロンに対し *in vitro* で非常に強力な神経栄養作用を示すことが明らかとなってきた。さらに砂ねずみ一過性脳虚血モデルにおいては、リコンビナント HGF の投与が海馬の遅発性神経細胞死を抑制することから、その作用は *in vitro* に留まらず *in vivo* においても証明されるに至った。これらから、HGF のもつ強力な神経細胞死阻止および神経突起伸長作用等の神経栄養作用は、難治性神経変性疾患の病態の中心である神経細胞死を阻止

すると共に、神経線維変性を阻止し、神経ネットワーク再構築による機能再建に寄与するものと大いに期待されている。

**[ 研究目的 ]** これらの背景を基に、神経疾患の中でも運動ニューロンが特異的進行性に变性し、運動神経細胞死とその軸索変性により運動機能不全をきたす致死性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）に着目し、ALS 進行抑制に対する HGF の果たす役割を解析すると共に、その成果を基盤とした新しい治療法開発をめざしている。本年度は、昨年度までに既に作成した神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス（HGF-Tg）の解析と、これと ALS-Tg との交配によるダブルトランスジェニックマウスの機能解析—HGF による ALS の進行

抑制作用の解析一に向け以下の2点を研究目標とした。

①HGF および c-Met/HGF 受容体の ALS 進行過程における発現制御を、ALS のモデルマウス (ALS-Tg: ヒトの ALS 原因変異遺伝子 (Superoxide Dismutase-1(SOD-1):G93A) を高発現する ALS モデルトランスジェニックマウス) を用いて解析する。

②HGF を神経細胞に特異的に供給することで ALS の進行を阻止できるかどうかを HGF-Tg と ALS-Tg のダブル Tg-マウスを作成して解析する。特に HGF の作用機構についても解析を加える。

## 研究方法

(1) ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) 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を行う。その方法として、

①Quantitative-competitive RT-PCR 法 (HGF および *c-met* mRNA)、②免疫染色法 (HGF、c-Met および GFAP) を施行する。

(2) HGF-Tg の分析

HGF の神経系発現の特異性および発現レベルを RNase プロテクションアッセイ法、免疫染色法、in situ ハイブリダイゼーション法 および ELISA 法 で経時的に解析する。HGF 過剰発現による運動神経系の発生過程における修飾の有無を、脳、脊髄、筋肉について 湿重量の解析を行うと共に組織学的に形態および神経細胞数の計測を行い確認する。運動機能の修飾の有無に関しては後肢反射テスト、Rotorod テストおよび foot print テストで野生型マウスと比較することで確認し、HGF-Tg の中でより理想的なマウス line を選別する。

(3) HGF-Tg と ALS-Tg の交配によるダブルトランスジェニックマウスの作成と解

析 (Wildtype, HGF, ALS, HGF/ALS の4つのグループについての解析)

① 定量的な競合的 RT-PCR 法による HGF および *c-met* mRNA の定量、②HGF 蛋白質量の ELISA 法による定量、③ 組織染色法 (Cresil violet およびトルイジンブルー染色) と免疫染色法 (HGF、c-Met、GFAP、 $\beta$ tubulinIII =TuJ1、ヒト SOD-1、ニューロフィラメント、リン酸化ニューロフィラメント、リン酸化 tubulin およびカスパー1)、④ウエスタンブロット法 (HGF、c-Met、GFAP、Bcl-2、Bcl- xL/S、Akt、リン酸化 Akt およびグリア細胞特異的グルタミン酸トランスポーター EAAT2)、⑤In situ hybridization 法 (HGF および *c-met* mRNA)、⑥運動機能解析 (後肢反射テスト、footprint テストによる歩幅解析および Rotorod テスト) および寿命に関して解析する。さらに HGF のグリア細胞に対する解析に際しては、野生型と ALS-Tg からアストロサイトの初代培養を行い HGF のアストロサイトに対する作用を直接ウエスタンブロット法にて解析する。

## 研究結果

(1) ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) 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。脊髄において、野生型マウスでは c-Met/HGF 受容体に対する免疫染色性を主に運動ニューロンに認めるのに対し、HGF に対する免疫染色性は弱い。ALS-Tg においては、生後2ヶ月までは HGF および c-Met の免疫染色性は野生型マウスと同じである。生後6ヶ月を過ぎて ALS の病態が進行し反応性アストロサイトが脊髄前角を中心に増加してくると、運動ニューロンにおける HGF と c-Met の免疫染色性が強く

なると共に、アストロサイト様細胞において *c-Met* に対する強い免疫染色性を示すことが明かとなった。また、競合的定量的 RT-PCR 法の解析結果、脊髄における HGF と *c-met* mRNA 量は共に ALS-Tg において、ALS の進行につれて（末期に特に）増加することが明かとなった。以上から、HGF/*c-Met* 系が ALS の進行過程で協調して発現制御を受けることが明かとなった。

(2) HGF-Tg の分析. HGF-Tg は、9 ライン得られたが、この中で神経特異的に HGF を発現し、生後 HGF が誘導されることで運動神経細胞数、筋肉湿重量および解析した運動機能テストで Wildtype と差を示さない理想的 HGF-Tg ラインを選別した。

(3) HGF-Tg と ALS-Tg の交配によるダブルトランスジェニックマウスの作成と解析 (Wildtype, HGF, ALS, HGF/ALS の4つのグループについての解析). 選別した HGF-Tg と ALS-Tg を交配しダブル Tg-マウスを作成した。この解析結果、HGF/ALS (+/-) マウスは ALS (+/-) マウスに比べ麻痺の発症が大幅に遅れさらに寿命が1ヶ月延長した。ALS (++) ホモマウスは、ALS (+/-)ヘテロマウスに比べ、より重篤でALS (+/-) マウスに比べ寿命が約半分である。HGF/ALS (++) マウスにおいては ALS (++) に比べ麻痺発症が大幅に遅れ寿命も1ヶ月延長した。脊髄における HGF 蛋白質発現量は、ALS マウスに比較して HGF/ALS マウスでは一貫して高いが、ALS マウスでも HGF が誘導される末期の HGF/ALS (+/-) マウスにおいては HGF の発現量が高いものの、ALS (+/-) マウスの末期に誘導される HGF レベルとの差が極端に小さくなっていた。HGF の寿命に対する効果が ALS のホモとヘテロマウスで同程度であったのは、このことが原因して

いる可能性がある。運動機能も、後肢反射テスト、Rotorod テストおよび foot print による歩幅解析を行った結果、いずれの機能テストでも HGF/ALS マウスが ALS マウスに比べ優れていることが明かとなった。これらの結果は、HGF が ALS の進行を抑制し機能改善に寄与することを意味している。次いで HGF が ALS の進行過程のどの過程を修飾するかを解析した。その結果、HGFはALSの初期段階に起こるヒト mutant SOD-1 の沈着には関与しないが、ALS の比較的早い時期に起こる運動ニューロンへのカスパー1の誘導を抑制すること、脊髄における Akt のリン酸化を促進するが、一方脊髄において Bcl-2 や Bcl-xL の誘導は起こさないことが明かとなった。さらに脊髄における反応性アストロサイトの増加を抑制した。ALS 末期にはグリア細胞特異的グルタミン酸トランスポーター (EAAT2) の発現低下が起こり、このことがグルタミン酸毒性から運動ニューロンを保護するのに不利になっていると考えられているが、HGFがALS末期に起こる EAAT2 の低下を抑制できることが明かとなった。この作用がアストロサイトに対する直接作用か否かを明らかにするため、ALS-Tg から培養したアストロサイトの EAAT2 産生量に対する HGF の効果を解析した。HGF は培養アストロサイトの EAAT2 レベルを増加させた。このことから、ALS 末期における EAAT2 レベル低下の *in vivo* 抑制作用は、HGF のアストロサイトに対する直接作用である可能性が示唆された。

## 考察

HGF の運動ニューロンに対する神経生存促進活性は、GDNF や BDNF とほぼ等しく、その作用は既知の神経栄養因子の中で



最も強い分子の1つと考えられている (HGF が最強との報告もある)。運動ニューロンおよびその神経突起が特異的に変性し、運動機能不全、さらには個体死を引き起こす ALS に対する効果的治療法は依然ない。しかし HGF は運動ニューロンの神経生存を促進するのみならず強力な神経突起伸長作用も示すことから、ALS に効果的であることが期待されている。ただ、その解析にあたっては以下の2点を克服する必要がある。(1) ALS は他の神経変性疾患と同様長期間を経て病態が完成するため、長期投与が必要であること。(2) 血液脳関門の存在による全身の運動神経細胞への薬剤供給の難しさがあること。

以上の2点に対して、私達は HGF を神経系に高発現するトランスジェニックマウスを作成し、このマウスと ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) を交配することで、ALS-Tg の神経細胞に直接 HGF 遺伝子を長期間発現させた際の効果を評価する戦略をとった。この結果、HGF を効率良く ALS-Tg の神経細胞に特異的に発現させることに成功し、その結果 ALS の麻痺の発症を遅延させ、ALS-Tg の寿命を大幅に延長することに成功した。本研究結果明かとなった点で注目すべき点は、HGF が、ALS の比較的早い時期に起こる運動ニューロンへのカスパーズ-1 の誘導を抑制し、運動機能の低下を早い時期から改善する効果があることが明らかになった点である。さらに HGF は期待された運動ニューロンに対する直接神経栄養作用に加えて、ALS の末期におこるグリア細胞特異的グルタミン酸トランスポーター (EAAT2) の低下を抑えるという通常神経栄養因子に知られていない作用をも介して、恐らく運動ニューロンへのグルタミン

酸毒性の抑制に働いている事が示唆された。HGF のグリア細胞に対する作用は神経栄養因子による ALS 治療の可能性へ加えより有利な作用とも考えられ、HGF は従来の神経栄養因子と同様、またそれ以上の ALS の治療効果を発揮するできるものと期待される。

## 結語

HGF 遺伝子を神経細胞に直接供給することで、HGF が運動ニューロンに対する神経栄養因子として機能するのみならず、グリア細胞に働きグルタミン酸トランスポーターの発現低下を抑制し、ALS モデルマウスの麻痺の発症を遅延し寿命を大幅に延長することが明らかとなった。HGF は他の神経栄養因子に比較してもより有効な ALS に対する治療薬となる可能性が示唆された。

## 共同研究者

大阪大学大学院医学系研究科バイオメディアカル教育研究センター腫瘍生化学研究部教授 中村 敏一

## 倫理面への配慮

動物実験に際しては倫理面に十分配慮し、大阪大学医学部動物実験指針に従い実験を施行した。

## 参考文献

1. Nakamura T et al., Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*. 342(6248):440-3, 1989.
2. 船越 洋他. HGF の神経系における機能と神経疾患治療への展望. *神経研究の進歩*. 44, 414-422, 2000.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

トランスジェニックラットを用いた新しい ALS モデルに関する研究  
分担研究者 青木 正志

研究要旨 ヒト変異 Cu/Zn SOD 遺伝子導入トランスジェニックラットを用いた新しい ALS のモデルを作製した。変異 Cu/Zn SOD 蛋白が多く発現した系統において、後肢の脱力から始まる運動ニューロン障害を来し、また病理学的にも ALS に類似した所見が得られた。G93A 変異を持つトランスジェニックラットは、H46R 変異を持つトランスジェニックラットと比較して発症時期が早くまた急速な経過を示した。

分担研究者 青木 正志  
所属施設 東北大学医学部神経内科  
職名 助手  
研究協力者 糸山泰人、永井真貴子、  
加藤昌昭、神位りえ子、東北大学医学部  
神経内科  
笠井憲雪、三好一郎、同動物実験施設

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子の一つである銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ (Cu/Zn SOD) 遺伝子の変異型を導入したトランスジェニックラットを作成し、ALS の病態解明のためのモデルとする。

1993 年に一部の家族性 ALS の原因遺伝子として Cu/Zn SOD 遺伝子が同定された。翌 1994 年には Gly93→Ala (G93A) 変異 Cu/Zn SOD 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが作製された。変異 Cu/Zn SOD 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは運動ニューロン障害を来し、変異 Cu/Zn SOD 蛋白が新たに獲得した神経毒性が ALS の病態であることが示された。

一方、家族性 ALS 患者の Cu/Zn SOD 遺伝子異常の検索が進み、変異により ALS の発症やその経過が異なることが分かってきた。例えば、当科で報告した His46→Arg (H46R) 変異は、 $16.8 \pm 6.8$  年に渡る緩徐な進行経過をとるに対して、G93A 変異は  $2.2 \pm 1.5$  年の古典的 ALS の経過をとる。現在まで 70 種類の変異が報告されており、*in vitro* では変異の場所によって Cu/Zn SOD 活性が異なることが分かっているが、経過と活性の間に相関はない。

トランスジェニックマウスがをすでに作製されているが、今回ラットを作成した理由として以下の点が挙げられる。(1) ALS の主な病巣は脊髄前角にあるが、マウスでは個体の大きさの点から解析に十分な蛋白や RNA が抽出できず、研究発展の障害となっている。(2) ラットでは髄腔が広いので、治療実験において髄腔内投与が可能になり、ヒトに応用する際に有益な情報が得られる。(3) 髄液の採取が可能であり、発症以前から変化を追うことで発症前診断につながる可能性がある。また、Cu/Zn SOD 遺伝子の変異の違いによる発症時期

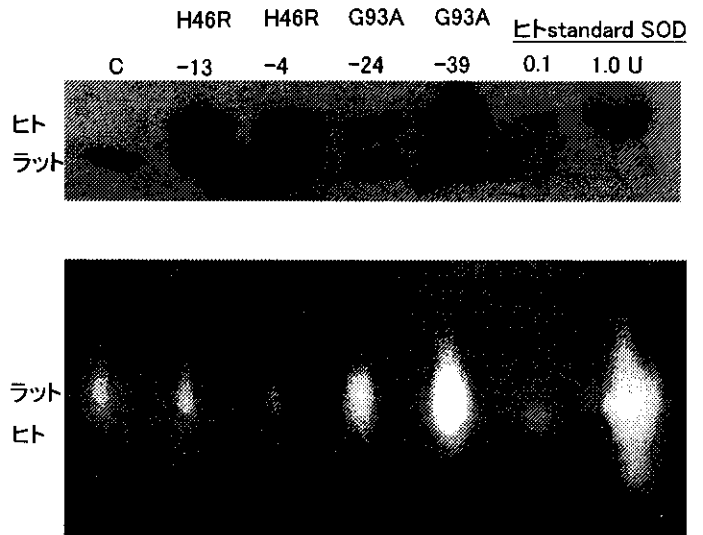
の違いを比較検討するため G93A 変異と H46R 変異を選び導入したトランスジェニックラットを作製した。

## B. 研究方法

P1-derived artificial chromosomeライブラリーよりヒト Cu/Zn SOD 遺伝子を単離クローニングし、これに H46R 変異と G93A 変異を導入した。変異を持つ Cu/Zn SOD 遺伝子を Sprague Dawley (SD)ラット受精卵にマイクロインジェクションした。生まれたラットの尾から DNA を抽出し、遺伝子の導入を確認した。遺伝子導入が確認されたファウンダーラットに SD ラットに交配し、得られた F1 ラットの脊髄から蛋白を抽出した。内因性のラット Cu/Zn SOD および導入したヒト変異 Cu/Zn SOD を共に認識する抗ヒト Cu/Zn SOD 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。脊髄での導入蛋白の発現が多い系統に関しては、大脳、小脳、脊髄、腎臓、肝臓、心臓、肺、骨格筋の各臓器の蛋白を抽出し、抗ヒト Cu/Zn SOD 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。また、脊髄における Cu/Zn SOD 酵素活性を、ニトロブルーテトラゾリウム還元法により計測した。

トランスジェニックラットとコントロールをエーテル麻酔後、生理食塩水および 4% パラホルムアルデヒド液で灌流固定した。脳および脊髄を摘出し、さらに 4% パラホルムアルデヒドで固定後アルコール脱水、キシレン置換しパラフィン包埋した。切片は 5 $\mu$ m の厚さで作製し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン-エオジン染色および免疫染色を行った。免疫染色は抗ユビキチン抗体、抗ヒト Cu/Zn SOD 抗体を用いた。脊髄前根は摘出後、2%グルタルア

図 脊髄におけるSOD蛋白発現とSOD活性



ルデヒドで前固定し、1%四酸化オスミウムで後固定後、アルコール脱水、プロピレンオキシド置換しエポキシ樹脂で包埋した。切片は 0.5 $\mu$ m の厚さで薄切し、トルイジンブルー染色を行った

## C. 研究結果

ファウンダーラットの尾の DNA を抽出し PCR 法およびサザンブロッティング法で導入遺伝子の有無を検出した。H46R 変異を導入したトランスジェニックラットは 5 系統、G93A 変異を導入したトランスジェニックラットは 7 系統得られた。導入遺伝子の多い系統を確立し、F1 ラットの脊髄の蛋白を抗 Cu/Zn SOD 抗体を用いて導入遺伝子の脊髄における蛋白発現をみた。導入したヒト変異 Cu/Zn SOD 蛋白の発現量は、H46R-4 でもっとも多く、内因性のラット Cu/Zn SOD との比をとると 6 倍であった。同様に導入ヒト Cu/Zn SOD と内因性

ラット Cu/Zn SOD との比は H46R-13 は 2.5 倍、G93A-24 は 0.8 倍、G93A-39 は 2.5 倍であった。抗 Cu/Zn SOD 抗体を用いて各臓器の蛋白について行ったウェスタンブロッティングでは、中枢神経、特に脊髄において導入した変異 Cu/Zn SOD 蛋白が多く発現した。

Cu/Zn SOD 活性については、H46R 変異を導入したラットでは導入蛋白量が多いほど Cu/Zn SOD 活性が低下した。同じ蛋白量あたりのコントロールラット脊髄における Cu/Zn SOD 活性との比を取ると H46R-4 で 20%、H46-13 で 40%であった。G93A 変異を導入したラットでは導入蛋白量が多いほど Cu/Zn SOD 活性が増加し、G93A-24 で 200%、G93A-39 で 300%であった (図)。

H46R 変異および G93A 変異を持つトランスジェニックラット共に導入された変異ヒト Cu/Zn SOD 蛋白が多く発現した系統 (H46R-4 および G93A-39) において運動ニューロン病の症状の発現が認められた。発症は、二つの変異を導入したトランスジェニックラットとも後肢の筋力低下で始まり、対麻痺、四肢麻痺へと進行し死に至った。H46R-4 は  $144.7 \pm 6.4$  日で発症し、 $24.2 \pm 2.9$  日の経過で死亡した。G93A-39 は  $118.6 \pm 14.1$  日で発症し、 $8.3 \pm 0.7$  日の経過で死

亡した。導入した変異 Cu/Zn SOD 蛋白の発現が少ない、H46R-13 および G93A-24 では 8 ヶ月の経過後も発症は見られていない (表)。脊髄における Cu/Zn SOD 活性と発症の時期や経過についての相関は認められなかった

発症したトランスジェニックラットの神経病理では主な障害部位は脊髄前角であった。腰髄前角では、大型の運動ニューロンがほとんど消失し、アストロサイト、ミクログリアの増生が認められた。また、前角内には腫大し蛇行した軸索が認められた。ヘマトキシリン-エオジン染色では、腰髄前角のニューロピル、残存する神経細胞およびアストロサイトに、中心がエオジン好性で周囲が淡明な細胞内封入体が認められた。この封入体は、ALS 患者の脊髄前角で見られる Lewy body-like hyaline inclusion に類似しており、抗ユビキチン抗体および抗ヒト Cu/Zn SOD 抗体による免疫染色で陽性に染色された。抗ユビキチン抗体および抗ヒト Cu/Zn SOD 抗体を用いた免疫組織化学では、細胞内封入体に加えて腫大した軸索が斑状に染色された。

腰髄の前根は有髄線維密度が減少し、ミエリンオボイドが認められた。

表 トランスジェニックラットの発症と経過

	発症	経過
H46R-4	$144.7 \pm 6.4$ 日	$24.2 \pm 2.9$ 日
H46R-13	-	-
G93A-39	$118.6 \pm 14.1$ 日	$8.3 \pm 0.7$ 日
G93A-24	-	-

#### D. 考察

ラットにおいてもヒト変異 Cu/Zn SOD 遺伝子を導入することで、運動ニューロン障害を来すことを示した。症状は後肢の筋脱力で発症し、四肢麻痺へと進行した、ヒト ALS 患者においては発症部位は下肢とは限らないが、症状の進行経過は類似していると思われた。また、早期から筋萎縮を伴うこと、筋力の低下した後