

厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業

筋萎縮性側索硬化症の
病態の解明と治療に関する研究班

平成12年度 研究報告書

Annual Report of the Group Research
in the Pathogenesis and Pathomechanism
of Amyotrophic Lateral Sclerosis

— 2 0 0 0 —

主任研究者 糸山 泰人

Chairman : Yasuto Itoyama, M.D.
Department of Neurology, Tohoku University School of Medicine
Sendai, Japan

2 0 0 1 年 3 月 印刷

本研究班は神経難病の中でも最も過酷な疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病態の解明と新たな治療法の開発を目的とする。

次ページに掲げた分担研究者ならびに研究協力者による平成12年度の「筋萎縮性側索硬化症の病態の解明と治療に関する研究班」の研究報告を公表する。

2001年 3 月

筋萎縮性側索硬化症の
病態の解明と治療に関する研究班

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）

研 究 者 一 覽

筋萎縮性側索硬化症の病態の解明と治療に関する研究班
研究者一覧

	氏名	所属	職名	Tel/FAX
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	T 022-717-7187
				F 022-717-7192
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	T 06-6879-3421
				F 06-6879-3429
	廣川 信隆	東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻 細胞生物学解剖学教室	教授	T 03-5841-3336
				F 03-5689-4856
	野本 明男	東京大学大学院医学系研究科微生物学教室	教授	T 03-5841-3407
				F 03-5841-3374
阿部 康二	岡山大学医学部神経内科	教授	T 086-235-7365	
			F 086-235-7368	
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	T 06-6879-3783	
			F 06-6879-3789	
研究協力者	中野 亮一	新潟大学医学部附属病院神経内科	講師	T 025-227-0666
				F 025-223-6646
	菊地 誠志	北海道大学大学院医学研究科神経内科学	助手	T 011-700-5375
				F 011-700-5356
	道勇 学	名古屋大学医学部神経内科	講師	T 052-744-2391
				F 052-744-2394
	吉野 英	国立精神・神経センター国府台病院神経内科	医長	T 047-372-3501
				F 047-372-1858
	川上 倫	北里大学医学部生理学教室	教授	T 042-778-8819
				F 042-778-9841
	高橋 良輔	理化学研究所脳科学総合研究センター 運動系神経変性研究チーム	チーム リーダー	T 048-467-9702
				F 048-462-4796
	郭 伸	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻 神経内科学	助教授	T 03-5800-8672
				F 03-5800-6548
井上 正康	大阪市立大学大学院医学系研究科分子病態学部門	教授	T 06-6645-3722	
			F 06-6645-3721	
内海 英雄	九州大学大学院薬学研究科機能分子解析学	教授	T 092-642-6621	
			F 092-642-6626	
中野 今治	自治医科大学神経内科	教授	T 0285-58-7352	
			F 0285-44-5118	
佐古田 三郎	大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学 神経機能医学講座神経内科学	教授	T 06-6879-3571	
			F 06-6879-3579	
加藤 丈夫	山形大学医学部第三内科	教授	T 023-628-5316	
			F 023-628-5318	
下濱 俊	京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座 臨床神経学	講師	T 075-751-3767	
			F 075-751-9541	

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. トランスジェニックラットを用いた新しいALSモデル	7	
東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科額分野		糸山 泰人
2. 筋萎縮性側索硬化症における変異SOD蛋白質の酸化、糖化の関与の検討	9	
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
3. 神経細胞内物質輸送の分子機構に関する研究	11	
東京大学大学院医学系研究科		
分子細胞生物学専攻細胞生物学解剖学教室		廣川 信隆
4. ポリオウィルスベクターによるマウス中枢神経系でのBDNF発現	12	
東京大学大学院医学系研究科微生物学教室		野本 明男
5. フリーラジカルによるラット腰髄培養神経細胞死	14	
岡山大学医学部神経内科		阿部 康二
6. HGFのALSに対する機能解析	16	
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
研究報告（研究協力者）		
1. I113T変異SOD1トランスジェニックマウスの作製および解析	19	
新潟大学医学部附属病院神経内科		中野 亮一
2. 孤発性筋萎縮性側索硬化症の発症に関与する疾患感受性遺伝子の検討	21	
新潟大学医学部附属病院神経内科		中野 亮一
3. ALSにおけるglycationの関与	23	
北海道大学大学院医学研究科神経内科		菊地 誠志
4. 筋萎縮性側索硬化症における運動ニューロン発現遺伝子プロファイル解析に関する研究	25	
名古屋大学医学部神経内科		道勇 学
5. ALS及び免疫性神経疾患における髄液中nitrotyrosineの検討	27	
国立精神・神経センター国府台病院神経内科		吉野 英

6. 脳由来神経栄養因子 (BDNF) による運動神経軸索輸送促進機序	29
北里大学医学部生理学教室	川上 倫
7. 運動ニューロン特異的遺伝子発現・ノックアウトシステムの確立に関する研究	31
理化学研究所脳科学総合研究センター	
運動系神経変性研究チーム	高橋 良輔
8. 筋萎縮性側索硬化症に疾患特異的 mRNA 異常の単一運動ニューロンを用いた解析	32
東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学	郭 伸
9. ミトコンドリア機能と活性酸素代謝病態	34
大阪市立大学大学院医学系研究科分子病態学部門	井上 正康
10. ESRI・MRI 法による多ラジカル種の分別画像解析システムの開発	36
九州大学大学院薬学研究科機能分子解析学	内海 英雄
11. GDNF 発現 AAV ベクターによる ALS 遺伝子治療	37
自治医科大学神経内科	中野 今治
12. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の脊髄における HGF-cMet system の発現に関する研究	40
自治医科大学神経内科	中野 今治
13. 家族性 ALS の治療法に関する研究	42
大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学	
神経機能医学講座神経内科学	佐古田 三郎
14. Galectin-1 は ALS spheroid や conglomerate inclusion の構成成分である	44
山形大学医学部第三内科	加藤 丈夫
15. 培養脊髄運動ニューロンに対するホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害剤の保護効果に関する研究	46
京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学	下濱 俊
研究成果一覧 (分担研究者)	49
平成 12 年度班会議プログラム	55

總 括 研 究 報 告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症の病態の解明と治療に関する研究

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。本研究班は変異 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を主体にして関連の研究を行っている。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。神経細胞内で変異 Cu/Zn SOD は正常の SOD に比べ糖化反応を受け易く、かつミトコンドリアやペルオキシゾーム膜への結合力が低下することなど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 マウスを作成してマウスの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）

廣川信隆（東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻細胞生物学解剖学）

野本明男（東京大学大学院医学系研究科微生物学）

阿部康二（岡山大学医学部神経内科）

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）

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める有効な治療法が確立していない。本研究班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を基礎医学的方向から行い、有効な治療法の確立に資すること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

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。主として運動二

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。本研究班は研究の主神を変異 Cu/Zn SOD 運動ニューロン死の機序の解明に置き、それに関連した病態の解明と治療法の確立の研究を行う。

①Cu/Zn SOD 関連の研究

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。1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 がいかにして細胞障害をきたすのかを Cu/Zn SOD の糖化反応の異常とミトコンドリアやペルオキシゾーム膜結合性の異常から検討する。

②神経栄養因子に関する研究

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。また、HGF をはじめとした各種の神経栄養因子をいかにしてヒト ALS の病変部位である中枢神経に作用させるかの目的性のもとにそれらの投与方法を検討する。一つはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて筋肉内投与から神経軸索経路にて運動ニューロンへ致達させる方法であり、もう一つは選択的運動ニューロン感染性をもつポリオウイルスをベクターとして運動ニューロンへ作用させる研究である。

③グルタミン酸毒性に関する研究

ALS の剖検脊髄からレーザーマイクロディセクターにて単一運動ニューロンを切り出し、グルタ

ミン酸受容体の AMPA/kainate 型受容体の GluR2 mRNA を測定する。また、培養実験系にてグルタミン酸毒性による運動ニューロン死の治療的効果を示す薬剤の検討を行う。

④神経細胞内とくに軸索輸送に関する研究

神経細胞内での物質輸送のメカニズムの解明を motor 分子の観点から明らかにしてきているが、今回は脳特異的に発現しているキネシンスーパーファミリータンパク KIFI7 の機能とそれが輸送する蛋白について検討する。又、培養系にて軸索輸送を促進する効果が知られている BDNF の作用機序を検討する。

(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

①変異 Cu/Zn SOD に関する研究

(1) 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ニューロン障害をきたした。病理学的にも脊髄前角の運動ニューロンの消失とグリオシスが認められ、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。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、本研究班では Cu/Zn SOD の蛋白質糖化反応の異常や細胞内オルガネラでの局在異常による細胞死の機序に研究の重点を置いている。変異 Cu/Zn SOD Tg マウスの脊髄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。また Cu/Zn SOD は、細胞内での活性酸素産生の場合であるミトコンドリアやペルオキシゾームの膜に局在しているが、変異 Cu/Zn SOD はその結合性が低下していることが明らかにされた。この変化はミトコンドリアやペルオキシゾームでの細胞内活性酸素の消去不全をきたし、活性酸素による細胞障害を誘発させる可能性を示唆している。

②神経栄養因子に関する研究

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-I、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、その効果を見た。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。

実際のヒト ALS の治療応用に向けていかに神経栄養因子を変性運動ニューロンへ作用させるかの研究も重要である。AAV ベクターは安全に神経細胞や筋細胞に導入でき、かつ長期の遺伝子の発現が可能である。AAV ベクターに GDNF 遺伝子を組み込み、マウスの腓腹筋に導入したところ、GDNF は筋線維細胞の細胞膜に沿って発現し、かつ対応する髄節の前角運動ニューロン内にも GDNF が確認され、今後の治療応用の可能性が示された。もう一つの新しい試みとして選択的な運動ニューロン感染性を持つポリオウイルス (PV) ベクターの開発が行われている。PV ゲノムに BDNF 遺伝子を組み入れウイルス複製可能な BDNF 発現ベクターを作り、PV 感受性 Tg マ

ウスの脳内へ接種したところ、ウイルスの複製と同様に BDNF の発現も認められ、新たな治療応用の可能性がひらかれた。

③グルタミン酸毒性と運動ニューロン死

運動ニューロン死の病態の一つとして、細胞外の慢性的なグルタミン酸濃度の上昇が GluR2 欠失の AMPA/kainate 型受容体を介して細胞内への Ca 流入をまねき細胞死を引き起こす考えがある。ALS の脊髄前角では GluR2 mRNA 発現および編集率が低下していることが示されているが、この変化が前角運動ニューロン自体に生じているか否かは重要な点である。2例という少数例ではあるが ALS 患者の剖検脊髄よりレーザーミクロディセクターにて単一運動ニューロンを切り出し検索したところ GluR2 mRNA 編集率が ALS で低下している結果が得られた。また、in vitro の実験系ではあるがグルタミン酸の曝露による運動ニューロン死が AMPA/kainate 型 glutamate receptor antagonist やホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害剤で抑制されることも示され、グルタミン酸による運動ニューロン死の病態解明と治療の可能性が示された。

④神経細胞内とくに軸索輸送に関連する成果

ALS における脊髄前角細胞の形態学的な初期変化としてニューロフィラメントの核周部や軸索への異常蓄積があげられている。したがって神経細胞内物質輸送のメカニズムの解明とその病的変化を明らかにすることは ALS の運動ニューロン死の病態を知るうえで重要である。今までに軸索流、なかでも fast transport では 30 以上の motor 分子が明らかにされてきているが、今回新たにキネシンスーパーファミリータンパク KIF17 が発見された。KIF17 は脳特異的に発現しており、しかもグルタミン酸受容体の NMDA 受容体を含

有する vesicle に結合して細胞内を輸送することが明らかにされた。

培養運動ニューロンにおける軸索流をビデオ増感顕微鏡を用いて検索したところ、BDNF が順行性と逆行性の軸索流に対して促進作用があることが示された。この促進作用は神経細胞体に発現している Trk B 受容体を介し、チロシキナーゼを活性化させて生じると考えられた。

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の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。本研究班はこのテーマを研究の中心に置き、神経栄養因子、グルタミン酸神経毒性および神経細胞内輸送に関連した研究を行っている。

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検索を飛躍的に展開させる 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班では変異型 Cu/Zn SOD では病的に糖化反応を受け易い点と細胞内のミトコンドリアやペルオキシゾーム膜への結合性の低下の変化を発見している。これらの Cu/Zn SOD 機能変化が細胞障害へつながる次の機序の解明が急がれる。ALS の新たな治療を見

掘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 者

研 究 報 告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
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

主任研究者 糸山 泰人

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。

主任研究者 糸山 泰人

所属施設 東北大学医学部神経内科

職名 教授

研究協力者 青木正志、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

あり、発症以前から変化を追うことが可能である。Cu/Zn SOD 遺伝子の変異により患者の経過が異なることが知られているため、今回我々は古典的 ALS の経過をとる G93A 変異と、当科以前に発表している緩徐な進行経過をとる H46R 変異を導入して比較検討を試みた。

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 病態解明のためのモデルとする。これまでに変異 Cu/Zn SOD 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスがすでに報告されているが、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ため、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

B. 研究方法

PI-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。F1 ラットの脊髄を取り出し、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。病理は 4% パラホルムアルデヒド液で灌流固定後パラフィン包埋し検討した。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 抗体で行った。脊髄前根は摘出後、2% グルタルアルデヒドで前固定、1% 四酸化オスmiumで後固定、エポキシ樹脂で包埋し、トルイジンブルー染色を行った。

C. 研究結果

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。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。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 SOD 活性が低下し、G93A 変異を導入したラットでは導入蛋白が多いほど SOD 活性が増加した。2 種類の変異を持つラット共に導入された変異 Cu/Zn SOD 蛋白が多く発現した系統において発症が認められた。発症は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。発症したラットの腰髄前角では、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、ミクログリアが多数認められた。腰髄前角に残存した細胞には細胞内封入体が認められ、HE では中心がエオジン好性で周囲が淡明な Lewy Body-like Hyaline Inclusion に類似した封入体がみられ、ユビキチンおよび SOD 抗体で陽性に染色された。腰髄の前根は、有髄線維密度は減少し、ミエリンオポイドが認められた。

D. 考察

脊髄における SOD 活性は、導入した変異によって異なったが、どちらも Cu/Zn SOD 蛋白の発現が多い系統で運動ニューロン障害を発症した。発症したラットを比較すると、G93A 変異を持つトランスジェニックラットが H46R 変異を持つラットよりも Cu/Zn SOD 蛋白の発現量が少ないのに、発症時期が早くまた経過日数が少なかった。

E. 結語

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。このラットは髄腔内投与が容易であり新しい治療法の開発のために有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(ア) 論文発表 未

(イ) 学会発表

M. Nagai, M. Aoki, I. Miyoshi, T. Okamura, M. Kato, N. Kasai, Y. Itoyama. Transgenic mice with ALS-linked SOD1 mutant H46R. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況

未

研究要旨 家族性筋萎縮性側索硬化症(familial ALS)の発症のメカニズムとして、何らかの aging factorや、familial ALSの原因遺伝子である変異SODの翻訳後修飾が関与することが示唆されている。そこで重要なaging factorであり、かつ蛋白質を修飾す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を用いたin vivoの実験で、ALSで障害を受ける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

抗酸化酵素のCu/Zn-superoxide dismutase (SOD1)遺伝子は家族性筋萎縮性側索硬化症(familial ALS)の原因遺伝子の一つであり、発症のメカニズムとしてmutant SODが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。一方ALSが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。さらにmutant SODが何らかの翻訳後修飾をうけることにより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であり、かつ蛋白質を修飾す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

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、ALS様症状を呈するmutant SOD遺伝子 transgenic mouse の脊髄を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 SOD遺伝子(G93A, G37R, H13T)を昆虫細胞発現ベクターに組み込み、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と反応させ、SDS-PAGE後western blottingを行い、糖化の程度をanti-hexitol lysine抗体にて検出した。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。

C. 研究結果

mutant SOD遺伝子transgenic mouse の脊髄灰白質部に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。100mM 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。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。酸化ストレスではwild typeおよびmutant SOD蛋白質はともに、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48増加していた。しかし酸化修飾の受けやすさは、wild typeおよびmutant SOD蛋白質では今のところ差異は認めなかった。

D. 考察

mutant SOD transgenic mouseを用いたin vivoの実験で、ALSで障害を受ける脊髄において糖化が亢進していた。しかしどのような蛋白質が糖化されていたかは明らかではない。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。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。

神経細胞内物質輸送の分子機構に関する研究
分担研究者 廣川信隆 東京大学医学系研究科教授

研究要旨

キネシンスーパーファミリータンパクKIF17が、Lin10というアダプター分子と直接結合することによりNMDA型受容体を輸送することを明らかにした。

A 研究目的

神経細胞内の物質輸送のメカニズムを明らかにする。

B 研究方法

神経細胞内物質輸送にはモーター蛋白が重要な働きをしていることが予想されるので、神経細胞に発現しているモータータンパク質を見つけだし、さらにその機能を分子細胞生物学的に解析する。具体的にはPCR cloning 法でモーターを発見し、cDNA libraryを用いてfull cloningを行ない、recombinant蛋白を発現させて精製し、抗体を作成する。抗体を用いてその生体内での分布、挙動を形態学的観点と生化学的観点の両面から調べる。さらにyeast two hybrid法とsurface plasmon response法とpull down assay法を用いて相互作用する蛋白を同定し、生体内および試験管内での再構成の両面からその結合の意味付けを行なう。

C 研究結果

PCR cloningによって新しい微小管依存性モータータンパク質KIF17を発見した。脳cDNAライブラリーを用いて全長をcloningした結果1038アミノ酸からなる蛋白であり、脳特異的に発現していることが判明した。抗体を作成して生体内分布を調べたところ神経細胞の樹状突起及び細胞体に局在していた。生化学的にも灰白質に比較的多く、さらに一部細胞内輸送小胞に結合していた。yeast two hybrid法により輸送蛋白であるmLin10と直接結合することが判明し、結合は生体からの免疫沈降法およびsurface plasmon response法をもちいた試験管内再構成によっても確かめられた。Lin10はグルタミン酸受容体の輸送に関与することが下等動物において遺伝学的に示唆されているので、KIF17の輸送する小胞にNMDA受容体が含まれているかどうかを免疫沈降法および試験管内再構成で調べたところ、陽性の所見を得た。

D 考察

KIF17はLin complex (lin2, lin7, lin10)を介してNMDA受容体を含むvesicleに結合し、それらを神経細胞樹状突起のシナプス領域に輸送すると考えられる。

E 結論

グルタミン酸受容体とくにNMDA受容体は中枢神経におけるもっとも重要かつ量の多い神経伝達物質受容体の一つであり、筋萎縮性側索硬化症のみならずアルツハイマー病その他各種神経疾患の病体生理に深く関わっていることが報告されている。しかしこれまでNMDA受容体がどのように輸送されるかについての具体的な機構についてはまったく不明であった。この研究は神経細胞内の受容体輸送の実体を始めて報告したことにおいて画期的である。

F 研究発表

1 論文発表

Setou, M, T. Nakagawa, D.-H. Seog, and N. Hirokawa.

Kinesin Superfamily Motor Protein KIF17 and mLin-10 in NMDA Receptor-Containing Vesicle Transport. *Science*, 288: 1796 - 1802, 2000.

2 学会発表

Mitsutoshi Setou, Terunaga Nakagawa, Dae-Hyun Seog, and Nobutaka Hirokawa. KIF17 in NMDA receptor traffic.

40th Annual Meeting of ASCB, San Francisco, 2000. 12

Mitsutoshi Setou, Terunaga Nakagawa, Dae-Hyun Seog, and Nobutaka Hirokawa.

KIF17 and mLin-10 Complex in Receptor Sorting.

The 11th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience: COE

International Conference, Awaji-isl, 2000. 11

ポリオウイルスベクターによるマウス中枢神経系での BDNF 発現
分担研究者 野本 明男 東京大学大学院医学系研究科微生物学教室教授

研究要旨 ポリオウイルス (PV) が運動神経向性ウイルスであることを利用し、運動神経特異的に発現する PV ベクターを開発することを目的とする。そこで、PV ゲノムに BDNF 遺伝子を導入し、ウイルス複製可能な BDNF 発現ベクター (Mah/BDNF) を作製した。Mah/BDNF 株は、PV 野生株に比較して、細胞内および PV 感受性トランスジェニックマウス (Tg) 中枢神経内において増殖能が低くなっていた。培養細胞内における、Mah/BDNF 株の経代による遺伝子の安定性は高かった。培養細胞内および Tg 中枢神経内において、PV と BDNF 抗原分布は一致していた。したがって培養細胞内、Tg 中枢神経内において、Mah/BDNF は BDNF を発現することが確認された。

A. 研究目的

PV は運動神経向性ウイルスであることから、運動神経特異的に発現する PV ベクターを開発する。将来的には運動神経疾患の治療に用いることを目的とする。

B. 研究方法

PV 1 型強毒株 (Mahoney 株) ゲノムに BDNF 遺伝子を導入し、ウイルス複製可能なベクター (Mah/BDNF 株) を作製した。このベクターを用い、アフリカミドリザル腎細胞 (AGMK) 及び Tg における BDNF の発現、ウイルスの増殖能力、安定性を検討した。実験動物の取り扱いに関しては、動物愛護の観点から、中枢神経系へのウイルス接種は麻酔下で行い、殺処分においては頸椎脱臼により安楽死させた。細胞の蛍

光抗体染色法に関しては、細胞を 2% パラホルムアルデヒドで固定後、0.5% トライトン X-100 処理し、一次抗体としてマウス抗 PV 抗体とウサギ抗 BDNF 抗体で反応し、抗マウス FITC 抗体と抗ウサギ Texas Red 抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で検出した。組織の染色に関しては、一次抗体としてウサギ抗 PV または BDNF 抗体で反応し、ABC 法により染色し、光学顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

Mahoney 株に比較して、Mah/BDNF 株は、AGMK において形成するプラークが小さく、一段階増殖曲線において増殖能が低かった。AGMK において Mah/BDNF 株を経代後、ウイルス遺伝子の安定性を

PCR で確認したところ、3代経代後も遺伝的に安定に存在していた。AGMK および Mah/ BDNF 株を脳内接種した Tg の脳・脊髄内において、Mah/ BDNF 株の増殖が認められた。AGMK および Tg に Mah/BDNF 株を脳内接種後の脳・脊髄、筋肉内接種後の脊髄の神経細胞において、PV と BDNF の抗原分布が重なっていた。両抗原は Mah/BDNF 株投与後1週間で観られなくなった。

D. 考察

Mah/BDNF 株は、野生株に比較して、培養細胞内、Tg 中枢神経系内において増殖能が低くなっていた。したがって、PV 野生株ゲノムに BDNF 遺伝子を導入したことにより、ウイルス複製能力が低下したか、BDNF の効果によりウイルスの複製が阻害された可能性が考えられる。Mah/BDNF 株脳内接種後の Tg 中枢神経細胞内において PV 抗原が消失した後も組織破壊は観察されず、病原性は低いと考えられる。培養細胞内および Mah/BDNF 株脳内接種後の Tg 中枢神経細胞内での PV 抗原と BDNF 抗原分布が一致していた。したがって培養細胞内、Tg 中枢神経細胞内双方において、Mah/BDNF 株が BDNF を発現していることが確認された。

E. 結論

Mah/BDNF 株は、培養細胞、Mah/BDNF 株を脳内接種後の Tg 中枢神経系において複製が認められた。また、培養細胞内、Mah/BDNF 株を脳内接種後の Tg 中枢神経細胞内において、BDNF が発現してい

た。Mah/BDNF 株は培養細胞内で遺伝的に安定に存在することが示された。

F. 健康危険情報

本研究は P2 実験室で行っている。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

Fengyi Liang, Tutome Hashikawa, and Qingmei Jia. Expression of Brain-derived Neurotrophic Factor in the Central Nervous System of Mice by Poliovirus-based Vector. 29th Annual Meeting, Society for Neuroscience. Florida. October 22-28, 1999.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし