

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

神経系における HGF の機能解析と新しいスカベンジャー受容体の同定

—高齢者の神経再生治療をめざして—

分担研究者 船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科助手（医学部内講師）

研究要旨

私達は、多くの神経細胞に対し強い神経栄養作用をもつ肝細胞増殖因子（HGF）を神経特異的に発現するトランスジェニック（Tg）マウスを作成し、筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデル Tg マウスと交配し、HGF を ALS マウスの神経細胞に長期間供給した効果を解析した。その結果 ALS マウスの寿命が著明に延長することが明らかとなった。これに加え、筋肉特異的 HGF 発現 Tg マウスを作成し、筋肉に HGF を供給した際の効果の解析をすすめている。一方、神経系に発現する新しいスカベンジャー受容体のクローニングに成功した。この受容体は、培養ミクログリアに発現しており、高齢者に重要なニューロパチーや神経変性疾患において重要な機能を持つことが示唆された。

A. 研究目的

HGF は新しい神経栄養因子として多くの重要な神経細胞に対して生存促進作用や神経突起伸長作用を示すこと、また HGF は多機能性因子として神経栄養以外の作用による効果を期待できることから、私達は HGF の神経変性疾患に対する機能解析を進めている。本研究では、HGF を神経特異的に発現するトランスジェニックマウス（HGF-Tg）と ALS モデル Tg マウス（ALS-Tg）とのダブル Tg マウスを作成することで、HGF を ALS-Tg に長期間供給した効果を解析するとともに、Tg-マウスからグリア細胞や神経細胞を培養し、HGF の ALS に対する作用メカニズムを詳細に解析した。一方、神経変性疾患や高齢者におこるニューロパチーでは、アミロイド班や Lowy 体等の沈着物や変性神経を、年齢に従い除去しきれなくなることが、重大であると考えられている。私達は、ミクログリアに発現する新しいスカベンジャー受容体のクローニングを行い、その機能解析を進めた。

B. 研究方法

(I) HGF の神経変性疾患に対する機能解析

(1) 神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス（HGF-Tg）と変異 SOD1 発現トランスジェニックマウス（ALS-Tg）を交配し、ダブル Tg マウスを作成、寿命、運動機能、神経細胞死、軸索変性、HGF、c-Met 他各種分子について組織染色、免疫染色、ウエスタンブロットや行動解析法を用い

て解析した。HGF の作用メカニズムを、Tg-マウスからグリアおよび神経細胞を精製・培養し解析した。

(II) 新しいスカベンジャー受容体のクローニング

(1) ヒト胎盤 cDNA ライブラリーから新規スカベンジャー受容体をクローニングした。
(2) 培養細胞へ遺伝子導入を行い、機能解析を行った。

(III) Gas6 の神経栄養作用の解析と末梢神経損傷時における発現制御の解析

(1) 初代培養神経細胞を用いた Gas6 の神経栄養活性の解析（FDA/PI 2 重染色）
(2) Gas6 とその受容体ファミリーの神経損傷時における解析（RNase Protection Assay）

C. 研究結果

(I) HGF の ALS-Tg の運動ニューロン死を抑制作用と寿命延長効果。

(1) ALS-Tg と HGF-Tg を交配すると、ALS-Tg の運動ニューロン死が抑制され、運動機能の改善、寿命延長効果が得られた。

(2) HGF は運動ニューロンへのカスパーゼ-1 と iNOS の誘導を抑制し、アストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーター（EAAT2）のレベルを維持した。

(3) 筋肉特異的 HGF 発現 Tg マウスの作成
筋肉特異的プロモーターを用いて HGF 発現 Tg マウスを作成した。この内筋肉特異的発現パターンを示した 3 ラインは、

HGF レベルが骨格筋で非常に高く、心筋でも有意に高かったものの、他の組織ではコントロールと同等であった。

(II) 新規スカベンジャー受容体 (SRCL) のクローニングと機能解析

(1) ヒト胎盤からレクチンドメインをもつ新しいタイプのスカベンジャー受容体 (SRCL: SRCL/II) をクローニングした。引き続きマウスより SRCL ホモログのクローニングに成功した。

(2) SRCL はスカベンジャー受容体として細菌結合能を示した。加えて神経変性疾患に重要な分子と結合能をもつことを明らかとした。

(III-a) Gas6 の神経栄養因子としての同定

Gas6 を神経栄養因子として、培養海馬ニューロンを用い始めて同定した。Gas6 とその受容体は、末梢神経損傷時神経自体のみならずシュワン細胞においても発現制御を受けていた。末梢神経再生のために Gas6 と受容体が協調して神経栄養作用に加えてシュワン細胞で機能していることが示唆された。

(III-b) Sky ファミリー受容体の分子クローニングと機能解析

(1) アフリカツメガエルから新規 Sky ファミリー受容体 "Xksy" をクローニングした。

D. 考察

本研究において、HGF が ALS の病因遺伝子を発現する ALS-Tg に対する治療効果をもつことを、神経特異的 HGF-Tg を用い明らかとした。HGF を長期間 ALS-Tg 神経細胞へ供給すると、ALS-Tg マウスの運動神経細胞死と軸索変性が抑制され、寿命が延長した。この効果は人に換算すると約 6 年に相当した。

一方、HGF の寿命延長効果が約 1 ヶ月でなぜ弱まったかを明らかにすることは、治療戦略上重要である。HGF レベルは、疾患末期に、ALS-Tg と ALS/HGF-Tg の間で差が小さくなった。従って HGF の供給を維持できれば、効果をより延長できることを示唆する。私達は、HGF 供給法を検討している。

一方、今回ミクログリアに発現する新しいスカベンジャー受容体 (SRCL) のクローニングに成功した。また、新しく神経栄養因子

として Gas6 を同定した。Gas6 は、末梢神経において神経栄養作用に加えシュワン細胞に対しても重要な機能をもつことが示唆された。

E. 結論

HGF および今回神経栄養因子として新たに同定した Gas6 は、神経変性疾患や高齢者末梢神経損傷・ニューロパチーの治療薬として期待される。

一方、ミクログリアに発現する新しいスカベンジャー受容体の神経変性疾患における機能も今後明らかになっていくものと期待される。

F. 共同研究者

宣雄 大阪大学大学院医学系研究科
中村敏一 大阪大学大学院医学系研究科

G. 研究論文発表

(1) Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matumoto K, Nakamura T, Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. *J Neurosci Res*, in press.

(2) Kishi YA, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T, Molecular cloning, expression and partial characterization of Xksy, a *Xenopus* member of the Sky family of receptor tyrosine kinases. *Gene*, in press.

(3) Funakoshi H, Nakamura T. Identification of HGF-like protein as a novel neurotrophic factor for avian dorsal root ganglion sensory neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 283(3): 606-612, 2001.

(4) Nakamura K, Funakoshi H, Tokunaga F, Nakamura T. Molecular cloning of a mouse scavenger receptor with C-type lectin (SRCL)(1), a novel member of the scavenger receptor family. *Biochim Biophys Acta*. 1522(1): 53-58, 2001.

(5) Nakamura K, Funakoshi H, Miyamoto K, Tokunaga F, Nakamura T. Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem Biophys Res Commun*. 280(4): 1028-1035, 2001.

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
(祖父江 元) Familial transthyretin type amyloid polyneuropathy in Japan: clinical and genetic heterogeneity. Neurology , in press	2002	Lippincott - Raven	Ikeda S, Nakazato M, Ando Y, Sobue G
Repair by Src Kinase of Function-Impaired RET-MEN2A with Mutations at Tyrosines in the Carboxyterminal Kinase Domain1. Cancer Res , in press	2002	American Association for Cancer Research	Kato M, Takeda T, Kawamoto Y, Iwashita T, Akhand AA, Senga T, Yamamoto M, Sobue G, Hamaguchi M, Takahashi M, Nakashima I
Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy presenting with features of GBS. Neurology , in press	2002	Lippincott - Raven	Mori K, Hattori N, Sugiura M, Koike H, Misu K, Ichimura M, Hirayama M, Sobue G
Parallel expression of neurotrophic factors and their receptors in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Muscle & Nerve , in press	2002	Wiley	Yamamoto M, Ito Y, Mitsuma N, Li M, Hattori N, Sobue G
Progression and prognosis in multiple system atrophy: An analysis of 230 Japanese patients. Brain , in press	2002	Oxford University Press	Watanabe H, Saito Y, Terao S, Ando T, Kachi T, Mukai E, Aiba I, Abe Y, Tamakoshi A, Doyu M, Hirayama M, Sobue G
ABO-incompatible auxiliary orthotopic liver transplant for late-onset familial amyloid polyneuropathy. J Neurol Sci , in press	2002	Elsevier Science B.V.	Watanabe H, Misu K, Kobayashi T, Hattori N, Doyu M, Yokoyama I, Ando Y, Nakao A, Sobue G
Anticipation in familial amyotrophic lateral sclerosis with SOD1-G93S mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry , in press	2002	BMJ Pub.	Iwai K, Yamamoto M, Yoshihara T, Sobue G
Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem , 80: 158-67	2002	Blackwell Science Ltd.	Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G
Pathology-related differential expression regulation of NGF, GDNF, CNTF, and IL-6 mRNAs in human vasculitic neuropathy. Muscle & Nerve , 24: 830-833	2001	Wiley	Yamamoto M, Ito Y, Mitsuma N, Li M, Hattori N, Sobue G

Painful alcoholic polyneuropathy with predominant small-fiber loss and normal thiamine status. Neurology , 56: 1727-1732	2001	Lippincott - Raven	Koike H, Mori K, Misu K, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G
Expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR alpha, LIFR beta, IL-6R alpha, and gp130) in human peripheral neuropathies. Neurochem Res , 26(1): 51-58	2001	The Sheridan Press	Ito Y, Yamamoto M, Mitsuma N, Li M, Hattori N, Sobue G
Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency. J Neurol Neurosurg Psychiatry , 71: 357-362	2001	BMJ Pub.	Koike H, Misu K, Hattori N, Ito S, Ichimura M, Ito H, Hirayama M, Nagamatsu M, Sasaki I, Sobue G
Preserved phosphorylation of RET receptor protein in spinal motor neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study by a phosphorylation-specific antibody at tyrosine 1062. Brain Res , 912: 89-94	2001	Elsevier Science B.V.	Yamamoto M, Li M, Mitsuma N, Ito S, Kato M, Takahashi M, Sobue G
Spinal cord magnetic resonance imaging demonstrates sensory neuronal involvement and clinical severity in neuronopathy associated with Sjögren's syndrome. J Neurol Neurosurg Psychiatry , 71: 488-492	2001	BMJ Pub.	Mori K, Koike H, Misu K, Hattori N, Ichimura M, Sobue G
Low cardiac ¹²³ I-MIBG uptake in late-onset familial amyloid polyneuropathy type I (TTR Met 30). J Neurol , 248: 627-629	2001	Springer-Verlag	Watanabe H, Misu K, Hirayama M, Hattori N, Yoshihara T, Doyu M, Sobue G
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 , 10: 1039-1048	2001	Oxford University Press	Adachi H, Kume A, Li M, Nakagami Y, Niwa H, Do J, Sang C, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G
A novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with late-onset Charcot-Marie-Tooth disease type 1. J Neurol Sci , 184: 149-153	2001	Elsevier Science B.V.	Yoshihara T, Kanda F, Yamamoto M, Ishihara H, Misu K, Hattori N, Chihara K, Sobue G
A novel centrosomal RING-finger protein, Dorfin, mediates ubiquitin ligase activity. Biochem Biophys Res Com , 281: 706-713	2001	Academic Press	Niwa J, Ishigaki S, Doyu M, Suzuki T, Tanaka K, Sobue G

Age of onset influences clinical features of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. J Neurol Sci , 184: 57-63	2001	Elsevier Science B.V.	Hattori N, Misu K, Koike H, Ichimura M, Nagamatsu M, Hirayama M, Sobue G
Differential effects of LAR on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant protein. J Biol Chem , 276: 9460-9467	2001	The American Society for Biochemistry and Molecular Biology	Qiao S, Iwashita T, Furukawa T, Yamamoto M, Sobue G, Takahashi M
(八木橋 操六) Enhanced in situ expression of aldose reductase in peripheral nerve and renal glomeruli in diabetic patients. Virchows Arch , 439: 46-54	2001	Springer-Verlag	Kasajima H, Yamagishi SI, Sugai S, Yagihashi N, Yagihashi S
Neuropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor. Brain , 124: 2448-2458	2001	Oxford University Press	Yagihashi S, Yamagishi SI, Wada R, Baba M, Hohman TC, Yabe-Nishimura C, Kokai Y
Effects of OPB-9195, anti-glycation agent, on experimental diabetic neuropathy. Eur J Clin Invest , 31: 513-520	2001	Blackwell Science Ltd.	Wada R, Nishizawa Y, Yagihashi N, Takeuchi M, Ishikawa Y, Yasumura K, Nakano M, Yagihashi S
Reduced beta cell mass in the pancreatic islet and expression of oxidative stress in Japanese type 2 diabetic patients. Diabetologia , 45, in press	2002	Springer-Verlag	Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Yagihashi S
糖尿病性神経障害--ポリオール代謝と最近の進歩--- 糖尿病性神経障害の病理 , 56-69	2001	現代医療社	八木橋 操六
糖尿病性腎症におけるポリオール代謝の役割 腎と透析 , 51 (増刊号) : 117-123	2001	東京医学社	八木橋 操六
合併症・成因の理解と治療戦略 2. 神経障害 Diabetes Frontier , 12: 61-66	2001		八木橋 操六
糖尿病性神経障害とサイトカイン Diabetes Frontier , 12: 603-610	2001		和田 龍一、 八木橋 操六
(安田 齋) Dinucleotide repeat polymorphism of matrix metalloproteinase-9 gene is associated with diabetic nephropathy. Kidney Int , 60: 1428-1434	2001	Blackwell Publishing	Maeda S, Haneda M, Guo B, Koya D, Hayashi K, Isshiki K, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R

Apoptosis and impaired axonal regeneration of sensory neurons after nerve crush in diabetic rats. Neuroreport , 11: 663-667	2000	Lippincott Williams & Wilkins	Kokawa S, Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kikkawa R
Evaluation of diabetic neuropathy through the quantitation of cutaneous nerves. J Neurol Sci , 172: 55-62	2000	Elsevier Science B. V.	Hirai A, Yasuda H, Joko M, Maeda T, Kikkawa R
H- and P-magnetic resonance spectroscopy and imaging as a new diagnostic tool to evaluate neuropathic foot ulcers in type 2 diabetic patients. Diabetologia , 43: 165-172	2000	Springer-Verlag	Suzuki E, Kashiwagi A, Hidaka H, Maegawa H, Nishio Y, Kojima H, Haneda M, Yasuda H, Morikawa S, Inubushi T, Kikkawa R
Usefulness of waveform analysis of popliteal artery in Type II diabetic patients using gated magnetic resonance 2D-cine-PC imaging and 31P spectroscopy. Diabetologia , 43: 1031-1038	2000	Springer-Verlag	Suzuki E, Kashiwagi A, Nishio Y, Kojima H, Maegawa H, Haneda M, Yasuda H, Morikawa S, Inubushi T, Kikkawa R
Effect of aldose reductase inhibitor on cutaneous nerve fiber length in diabetic patients. Diabetes Care , 23: 705	2000	American Diabetes Association	Yasuda H, Hirai A, Joko M, Terada M, Kawabata T, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R
Evaluation of a new care system provided to diabetic patients in the outpatient clinic. Intern Med , 39: 783-787	2000	The Japanese Society of Internal Medicine	Hidaka H, Terada M, Maegawa H, Kojima H, Koya D, Nishio Y, Haneda M, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R
(船越 洋) Localization and Functional Role of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its Receptor c-Met in the Rat Developing Cerebral Cortex. Mol Brain Res , in press	2002	Elsevier Science B.V.	Sun W, Funakoshi H, Nakamura T
Molecular cloning, expression and partial characterization of Xksy, a Xenopus member of the Sky family of receptor tyrosine kinases. Gene , in press	2002		Kishi YA, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T
Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. J Neurosci Res in press	2002	Wiley	Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matsumoto K, Nakamura T

<p>Identification of HGF-like protein as a novel neurotrophic factor for avian dorsal root ganglion sensory neurons. Biochem Biophys Res Commun, 283(3): 606-612</p>	2001	Academic Press	Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matumoto K, Nakamura T
<p>Molecular cloning of a mouse scavenger receptor with C-type lectin (SRCL)(1), a novel member of the scavenger receptor family. Biochim Biophys Acta, 1522(1): 53-58</p>	2001	Elsevier Science B.V.	Nakamura K, Funakoshi H, Tokunaga F, Nakamura T
<p>Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. Biochem Biophys Res Commun, 280(4): 1028-1035</p>	2001	Academic Press	Nakamura K, Funakoshi H, Miyamoto K, Tokunaga F, Nakamura T
<p>Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. Gene Ther, 8(3): 181-189</p>	2001		Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T
<p>21世紀の新しい治療医学-神経栄養因子による神経難病治療の可能性 現代医療, 34: 245-253</p>	2002	現代医療社	船越 洋、 中村 敏一

20010186

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P21－P25「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください