

20010620

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13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 1 —

主任研究者 糸山 泰人

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

2002年3月 印刷

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13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 1 —

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 2 年 3 月 印刷

本研究班は神経難病の中でも最も苛酷な疾患である  
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13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。

2002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科学講座 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 03-5841-3326
				F 03-5802-8646
	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 086-235-7362	
			F 086-235-7368	
船越 洋	大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻 組織再生医学講座分子組織再生分野	助手	T 06-6879-3783	
			F 06-6879-3789	
研究協力者	中野 亮一	新潟大学脳研究所臨床神経科学部門 神経内科学分野	講師	T 025-227-0664
				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 052-744-2386
				F 052-744-2393
	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 042-778-9159
				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 048-467-6072
				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. ラットによる新しいALSモデルの病態解析および髄腔内投与による治療法の開発 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	7	糸山 泰人
2. 変異SOD1のtoxic gain of function の解析 大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学生化学	9	谷口 直之
3. 神経細胞の形態形成における微小管関連蛋白質の分子遺伝学的研究 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解剖学教室	11	廣川 信隆
4. ポリオウィルス感受性の筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの作製と ポリオウィルスベクターの神経変性効果発現機構の解析 東京大学大学院医学系研究科微生物学教室	12	野本 明男
5. 筋萎縮性側索硬化症の病態と治療戦略 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学	14	阿部 康二
6. HGFの神経系における機能解析と新しい神経栄養因子の探索および同定 —— 神経変性疾患の新しい治療法開発をめざして —— 大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻 組織再生医学講座分子組織再生分野	16	船越 洋

## 研究報告（研究協力者）

1. 孤発性ALSの全ゲノム領域を対象とした関連解析 新潟大学医学部附属病院神経内科	19	中野 亮一
2. 培養脊髄ニューロンにおけるNO毒性に対するプロスタグランジンE1の保護作用 北海道大学大学院医学研究科神経内科	21	菊地 誠志
3. 変異SOD1トランスジェニックマウスにおける病態関連発現遺伝子プロファイル解析 に関する研究 名古屋大学医学部神経内科	23	道勇 学
4. 筋萎縮性側索硬化症における髄液中 nitrotyrosine に関する研究 国立精神・神経センター国府台病院神経内科	25	吉野 英

5. 培養脊髄運動ニューロンの軸索輸送に対するAMPA受容体作用と そのシグナル伝達 .....	27		
		北里大学医学部生理学教室	川上 倫
6. 変異SOD1のタンパク化学的異常によるプロテアソーム分解機能異常と 運動ニューロン死の関連について .....	30		
		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
7. AMPA受容体各サブユニットmRNA発現の定量的解析 —— 特にALSの病因との関連から脊髄運動ニューロンのGluR2サブユニットに 注目して —— .....	31		
		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
8. FALSにおけるミトコンドリア病態とカルニチンの保護作用解析 .....	33		
		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
9. 生体計測ESRを用いた変異型SOD1遺伝子導入マウスおよび一過性脳虚血 ラットでの脳内フリーラジカル反応の解析 .....	35		
		九州大学大学院薬学研究科機能分子解析学	内海 英雄
10. 家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における細胞死のメカニズム： 病理学的アプローチ .....	36		
		自治医科大学神経内科	中野 今治
11. ALSの遺伝子治療 —— SOD1マウスでの実験 —— .....	38		
		自治医科大学神経内科	中野 今治
12. G93A/ヒト正常SOD1ダブルトランスジェニックマウスの臨牀的・生化学的検討 .....	41		
		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
13. 家族性筋萎縮性側索硬化症に関連する変異型SOD1の細胞内凝集塊形成に 関する研究 .....	43		
		山形大学医学部第三内科	加藤 丈夫
14. 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) 阻害薬の保護効果 とそのアイソザイム選択性に関する研究 .....	45		
		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) .....	47		
平成13年度班会議プログラム .....	53		

# 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) の病因論として有力なものは幾つかあるが、その最も重要なものは家族性 ALS における病因遺伝子 Cu/Zn SOD が同定されたこととその変異遺伝子導入により ALS のモデルであるトランスジェニック (Tg) マウスが作製されたことである。本研究班は変異 Cu/Zn SOD がいかんにして運動ニューロン傷害を引き起こすかの機序解明を主に行い、それに関連した病態の解明と新規治療の開発の研究を行っている。細胞レベルでの神経細胞傷害に関係するメカニズムの解明として変異 Cu/Zn SOD 蛋白は正常の SOD に比べて糖化反応を受け易いこと、それに細胞内に変異 SOD 蛋白を発現させるとプロテアソームを介しての分解が亢進することが明らかにされた。一方、Cu/Zn SOD 変異と運動ニューロン傷害の機序解明と治療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 ラットを世界に先駆けて完成させた。この Tg ラットでは髄液のアミノ酸濃度の測定も可能であり、また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る。現在、肝細胞増殖因子 (HGF) の髄腔内投与による治療効果に期待が持たれている。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なかで、この HGF は新規の神経栄養因子として注目されているものである。今回、HGF Tg マウスと変異 Cu/Zn SOD 導入の ALS Tg マウスのダブル Tg マウスを作製して、HGF の導入がマウスの寿命を約 1 カ月 (ヒトに換算すると約 6 年) 延長させ運動機能を改善させる結果を得た。これは今後の ALS 治療に大きな期待をいだかせる。

#### 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 (岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学)

船越 洋 (大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野)

#### 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の神経筋疾患である。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予後が極めて不良な疾患である。残念ながら未だ筋萎縮の進行を止める有効な治療法は確立していない。本研究班では神経難病のなかでも最も苛酷な疾患と考えられる ALS の病因と病態の解明を行い、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 の病因と病態解明の研究において最も重要な発見は、家族性 ALS の遺伝子解析にてその病因遺伝子が細胞内のフリーラジカスカベンジャーである Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) をコードするもの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 の動物モデルが作製されたことである。本研究班は病因研究の主体を変異 Cu/Zn SOD と運動ニューロン傷害の機序の解明に置き、それに関連した病態の解明と新たな治療法の確立の研究を行う。

### 1. Cu/Zn SOD 関連の研究

変異 Cu/Zn SOD と運動ニューロン傷害の研究には大きく分けて2つの方法論でのぞむ。一つは ALS の動物モデルを従来の Tg マウスに加えて新たに Tg ラットを作製して病因・病態解明の研究をよりダイナミックに行い、かつ有用と考えられる新規の薬剤の髄腔内投与を行いその効果を検討する。もう一つは、神経細胞内で変異 Cu/Zn SOD がいかんして細胞傷害をきたすのかを明らかにする目的で、精製した変異 Cu/Zn SOD 蛋白の糖化反応の異常と細胞内で発現させた変異 SOD のプロテアソーム分解を検討する。

### 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の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 ALS の治療薬としての可能性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 マウスを作製して検討を行う。また、新たに作製された Tg ラットに BDNF や HGF を髄腔内投与してその臨床経過への影響を観察する。さらには、

ALS の患者に対して十分なインフォームド・コンセントを行い髄腔内に神経栄養因子の一つである Insulin-like Growth Factor (IGF-1) を投与する臨床試験を始めた。

一方では、HGF をはじめとした各種の神経栄養因子をいかんして ALS の病変部位である中枢神経系に作用させるかの目的性のもとにベクターの投与法の検討を行っている。なかでも選択的に運動ニューロンへの感染性を示すポリオウイルス (PV) をベクターとして運動ニューロンへ選択的にかつ直接作用させる研究である。具体的な方法としては PV 感受性の ALS マウスを作製することと、ベクターとしての PV の細胞毒性を減弱化する方法を検討している。

### 3. 神経障害に関わる神経細胞の形態形成と軸索輸送に関する研究

従来から神経細胞内での物質輸送のメカニズムの解明を多くの motor 分子の観点から明らかにしてきている。今回は神経細胞の形態形成に重要な微小管関連蛋白 (Microtubule-associated Proteins:MAPs) の MAP1A、MAP1B、MAP2、Tau の機能について検討する。

#### (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

#### ①ALS モデルラットの完成

従来の ALS モデル Tg マウスを用いての研究で制約されていた研究手法を打開する為に新たなヒト

変異 Cu/Zn SOD 遺伝子導入ラットの作製を行った。SD ラットに H46R 変異と G93A を持つ Cu/Zn SOD 遺伝子を導入した。それらのなかで変異 SOD 蛋白が多く発現した系統において生後約 140 日頃より後肢の脱力から始まる ALS の発症が認められ、多くは約 1 カ月で死亡した。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。この Tg ラットの ALS 動物モデルの完成により今までマウスでは不可能であった脊髄のホモジェネートでのカスパースの活性測定が可能になった。ALS ラットでは発症前にカスパース 1、3 が上昇し、発症後ではカスパース 3 のみが上昇していることが明らかになった。これは運動ニューロン傷害にアポトーシスが関与していることを示唆する結果と考えられた。又、脳脊髄液中のアミノ酸濃度の測定も可能になった。発症前の髄液中のアミノ酸濃度はすべてコントロール群と比べて有意差はなかった。発症後ではグルタミン酸濃度はコントロールと比べて有意差はないもののグルタミンの濃度は有意に上昇していた。

新たな ALS 治療法の開発の為に ALS モデルラットに対し、神経栄養因子の髄腔内持続投与を行った。BDNF (400 $\mu$ g) の投与では ALS 発症日数や生存日数には有意な延長は認められなかった。しかし HGF (100 $\mu$ g) の投与では PBS 投与のコントロール群比べて発症日の延長がみられた。現在、投与量を変えてみるとか実験ラット数を増やしての検討を行っている。

細胞傷害における変異 Cu/Zn SOD の病的意義

変異 Cu/Zn SOD がどのような機序で細胞傷害を引き起こすかは重要な研究テーマである。今まで wild type の SOD に比べ変異 SOD 蛋白は凝集化の

亢進や Cu の遊離亢進を確認してきており、それらの変化による oxidative stress が細胞傷害を引き起こすと考えてきている。今回は Cu/Zn SOD の蛋白質の糖化反応の異常や細胞内に発現した変異 SOD の分解異常に関係した研究を行った。in vitro の系では精製した変異 Cu/Zn SOD は wild type に比べて約 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。また変異 Cu/Zn SOD を Neuro 2a や SH-SY5Y 細胞に発現させると、wild type の SOD に比べて著明に細胞内で減少することが認められた。これはプロテアソームインヒビターにて抑制されることより、プロテアソームを介した分解が亢進していることが考えられた。これらは変異 SOD の立体構造結晶解析から構造自体の不安定性からくる変化の可能性が考えられている。

## 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開発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に長期間にわたって HGF を作用させ、その効果のみ

た。その結果 HGF/ALS ダブル Tg マウスは ALS Tg マウスに比べ約 1 カ月も麻痺の発現が遅れ、寿命が延長した。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 マウスに起こっ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という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投与方法の検討も重要な研究テーマである。新たな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。ALS モデルマウス (SOD1-G93A) と PV 感受性マウスとしての PV 受容体発現 Tg マウスを交配させて、それぞれの遺伝子をヘテロに持つ PV 感受性 ALS 疾患モデルマウスを作製した。現在、この PV 感受性 Tg マウスの ALS 発症を検討中である。一方で PV のウイルスベクターによる細胞毒性を減弱化する方法の検討も行っている。抗 PV 抗体や抗 PV 受容体抗体を培養ヒト神経芽細胞由来の SK-N-SH 細胞に作用させると細胞変性効果を抑制することが示され、その作用は PV の翻訳段階で抑制することが示された。これらの結果は PV の ALS 治療における細胞傷害性の少ないウイルスベクターの開発に重要な結果と考えられる。

### 3. 神経障害に関わる神経細胞の形態形成と軸索輸送に関する成果

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の形態形成と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。今回、神経細胞の形態形成に必須の役割を果たす MAP2 と MAP1B の役割を標的遺伝子組み換え法にて、それぞれの欠失マウスを作製して検討した。その結果、神経系の形態形成において MAP2 と MAP1B は機能的なグループをなし、微小管の organization を通じて樹状突起伸長と細胞移動に重要な役割を持つことが示された。

### 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、加えて病態と治療の研究には神経栄養因子および神経細胞内輸送に関連した研究を行っている。

細胞レベルで変異 Cu/Zn SOD がいかにして運動ニューロン障害をきたすかに関しては、peroxynitrite 説、遊離 Cu 説、変異 SOD 凝集産生説などがあるが、今回、新たに変異型 Cu/Zn SOD では wild type に比べて糖化反応を受け易い点と細胞内でプロテアソーム分解が亢進することを発見した。ALS の動物モデルにおける変異 Cu/Zn SOD に関する研究では、従来まで使用されていた Tg マウスでの病理学的、生化学的および酵素学的検索を飛躍的に展開させる Tg ラットが完成したことが特筆される。この Tg ラットは理論的には経時的に脳脊髄液の採取検査が可能である。実際にマウスでは不可能であった髄液中のアミノ酸濃度の測定が可能になり、ALS の発症後にはグルタミン濃度が上昇していることが明らかとな

なった。

ALS の新たな治療薬として新規の神経栄養因子である HGF が注目されている。今回、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 が約 1 カ月（ヒトに換算すると 6 年）も ALS の進行を抑制することが確認された。この結果から HGF の ALS に対する新たな治療法の可能性が示されわけであり、前述の ALS ラットに対して HGF の髄腔内投与を行い、現在 ALS ラットに対して発症日の延長と寿命の延長をきたす結果が得られつつある。

#### E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### F. 研究発表

論文発表

Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH Jr., Itoyama Y. Rats expressing human cytosolic Copper-Zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. J.Neurosci. 2001;21:9246-9254

他の論文発表や学会発表は別掲。

#### G. 知的財産の出願・登録状況

ラットを用いたALSモデル（出願済）

他は別掲。

分 担 研 究 者

研 究 報 告

ラットによる新しい ALS モデルの病態解析および髄腔内投与による治療法の開発

主任研究者 糸山 泰人 東北大学大学院医学系研究科神経内科 教授

研究要旨 昨年当科で作製した新しい ALS のモデルであるヒト変異 Cu/Zn SOD 遺伝子導入トランスジェニックラットの解析および神経栄養因子を用いた治療実験を行った。脳脊髄液のアミノ酸の濃度は、グルタミンがコントロールと比べて上昇していた。脊髄におけるカススペースの活性は発症前にカススペース 1、3 が上昇し、発症後はカススペース 3 が上昇しており運動ニューロンの障害にアポトーシスの関与が示唆された。

主任研究者 糸山 泰人

所属施設 東北大学神経内科

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、東北大学神経内科  
笠井憲雪、三好一郎、同動物実験施設

ALS における運動ニューロンの神経細胞死におけるアポトーシスの関与を検討する。最後に髄腔内に持続的に投与が可能なポンプを用いて、神経栄養因子（BDNF および HGF）の投与を行うことにより新しい治療法の開発を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

### 脊髄前角の病理

発症前から経時的にトランスジェニックラットの脊髄の病理を検討した。ヘマトキシリン-エオジン染色および抗ユビキチン抗体、抗 GFAP 抗体で免疫染色を行った。

### 髄液のアミノ酸濃度

発症前後のトランスジェニックラットおよびその同胞ラットを、笑気およびハロセンで深麻酔下にラットの大槽に 27 ゲージ針を穿刺し髄液を採取した。採取した髄液はトリクロロ酢酸を加えて蛋白を除去した後高性能液体クロマトグラフィーを用いてアミノ酸濃度を測定した。

### 脊髄におけるカススペース活性

発症前後のトランスジェニックラットとその同胞ラットの脊髄をバッファー中でホモジェナイズ後遠心し上清を抽出した。7-amino-4-methyl-coumarin (AMC)存在下で

## A. 研究目的

昨年当科では、家族性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病態解明のため、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製した。ALS の新しいモデルとしてトランスジェニックラットを作製した理由は、まず個体の大きさの点から解析に十分な蛋白や RNA が抽出できること、次に脳脊髄液の採取が可能であること、最後に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ることである。そこで、まず脊髄前角における病理変化について発症前から経時的に検討する。次にヒト ALS 患者において統一見解のない脳脊髄液中のアミノ酸濃度について解析を行う。また、カススペースの活性を発症前から発症後にかけて活性の測定を行うことにより

上清の蛋白を培養後、free AMC の蛍光を蛍光度計で測定した。

#### 神経栄養因子の髄腔内投与

BDNF 400 µg、HGF100µg、PBS を持続投与ができるポンプ(Alzet200)に入れ、生後 100 日のトランスジェニックラットの皮下に包埋した。ポンプにチューブを接続し、チューブの先端は髄腔内に留置した。ポンプは 1 ヶ月毎に交換し計 2 ヶ月投与した。

### C. 研究結果

#### 脊髄前角の病理

発症 2 ヶ月前から脊髄前角においてアストロサイト、ミクログリアの増生が認められた。また発症 1 ヶ月前には前角の神経細胞および軸索にユビキチン化が認められた。

#### 髄液のアミノ酸濃度

発症前の髄液中のアミノ酸値はすべてコントロールと比べて有意差が認められなかった。発症後の髄液中においてはグルタミン酸濃度はコントロールと比べて有意差がなかったが、グルタミン濃度の有意な上昇が認められた。

#### 脊髄におけるカスパー活性

生後 2 ヶ月ではコントロールとトランスジェニックラットの脊髄におけるカスパーの活性に有意な差はなかった。しかし発症前 1 ヶ月ではトランスジェニックラットの脊髄においてカスパー 1, 3 の活性の上昇が認められ、発症後の脊髄ではカスパー 3 の活性上昇が認められた。

#### 神経栄養因子の髄腔内投与

BDNF の投与では、発症日数、生存日数とも有意な延長は認められなかった。HGF の投与では発症日数の延長が認められた

### D. 考察

トランスジェニックラットの脊髄においては病理、カスパーの活性などが発症前から変化があることが分かった。また、カスパーの活性が変化していることは神経細胞死にアポトーシスが関与していることが示唆された。脳脊髄液におけるグルタミンの濃度上昇については脊髄における著明なグリオーシスの結果を反映していると考えられた。

### 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 のモデルの病態を解析した。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

#### 論文発表

Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH Jr., Itoyama Y. Rats expressing human cytosolic Copper-Zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. J.Neurosci. 2001;21:9246-9254

#### 学会発表

永井真貴子、青木正志、三好一郎、加藤昌昭、笠井憲雪、糸山泰人 H46R 変異導入による SOD1 トランスジェニックマウス 日本神経学会総会 2001.5 東京

### H. 知的財産権の出願・登録状況

ラットを用いた ALS モデル (出願済)



厚生省研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

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の開発に関する研究

変異 SOD1 の toxic gain of function の解析

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 FALS の病態解明、神経細胞障害メカニズムを解明するため、変異 SOD1 が有する特徴、機能の解析を行い、以下のことが明らかとなった。1) 変異 SOD1 は正常 SOD1 に比較し生理的な濃度のグルコースにより、早期に非酵素的糖化反応をうける。2) 変異 SOD1 は正常 SOD1 に比較し、分解を受けやすい。3) FALS で報告されている変異アミノ酸の側鎖は、SOD1 タンパク質の表面ではなく内部に存在する傾向がある。以上のことから、変異 SOD1 は正常 SOD1 より不安定な構造をとるため、糖化などの翻訳後修飾および分解を受けやすく、これらのことが FALS 発症の病態に関与する可能性が示唆された。

共同研究者 宮本泰豪、高橋素子、高宮理奈、  
大阪大学生化学  
藤原範子 長寿科学振興財団

SOD1 分子内でしめる立体構造上の位置に特徴があるか否かを溶媒露出表面積を指標として解析した。

#### A. 研究目的

FALS では変異 SOD1 が何らかの神経細胞障害作用を有する事が知られているが、その詳細は不明である。そこで我々は以下の3点に注目し検討を行った。1つは ALS は中年以降の発症であることから何らかの加齢変化が病態に関与すると考えられる。そこで生理的加齢変化や神経変性疾患への関与が示唆されているタンパク質の非酵素的糖化反応を、変異、正常 SOD1 で比較検討した。また FALS では SOD 免疫陽性の不溶性の封入体が形成される。つまり変異 SOD1 の分解系における異常が示唆されることから、変異 SOD1 の分解過程を検討した。さらに変異アミノ酸が

#### B. 研究方法

精製した wild type と mutant SOD1(G93A, G37R, I113T)タンパク質を 1mM、10mM のグルコースと 1週間反応させ、抗ヘキシトールリジン抗体にて糖化の程度を検討した。wild type と mutant SOD1(G93A, G37R, H46R, A4V) の cDNA を Neuro 2a、SH-SY5Y にトランスフェクションし、抗 SOD1 抗体にて細胞内の SOD1 量を検討した。SOD1 構成アミノ酸の側鎖の溶媒露出表面積(accessible surface area; ASA)と、そのアミノ酸側鎖に固有の ASA の比を求めることにより、FALS の変異部位のアミノ酸側鎖が SOD1 分子の表面に存在するのか、内部に存在するのかを検討した。

### C. 研究結果

mutant SOD1 タンパク質(G37R, G93A)は、1mM の低グルコース濃度によって糖化をうけた。一方、wild type SOD1 タンパク質は10mM の高グルコース濃度でわずかに糖化をうけた。従って mutant SOD1 は生理的濃度(5.5mM)においても十分糖化反応をうけることが明らかとなった。wild type および mutant SOD1 を Neuro 2a、SH-SY5 細胞に発現させた結果、両方の細胞において、2日目より mutant SOD1(A4V, G37R, G93A)の発現量が wild type に比較して著明に減少していた。FALS の中では緩徐な臨床経過をとることが知られている H46R mutant は発現の低下はわずかであった。プロテアソームインヒビター MG132 は濃度依存的に mutant SOD1 の発現量を上昇させた。そのことから mutant SOD1 は細胞内において、プロテアソームを介しての分解が亢進していることが明らかとなった。また FALS を発症する変異アミノ酸の側鎖は、それ以外のアミノ酸に比較して ASA 比が低く、側鎖が SOD1 分子の内部に存在し、変異 SOD1 が構造的に不安定であることが明らかとなった。

### D. 考察

変異 SOD1 が正常 SOD1 に比較して生理的グルコース濃度での非酵素的糖化反応性が亢進すること、またプロテアソーム系を介した分解も亢進することは、変異 SOD1 の構造的不安定性による可能性がある。変異 SOD1 における糖化亢進によってフリーラジカルが発生し、病態形成に関与する可能性がある。さら

に変異 SOD1 の分解が亢進することは、異常タンパク質を排除する生理的反応と考えられ、FALS の運動神経細胞に SOD1 免疫陽性の封入体が形成されることを考えあわせると、この分解系の破綻が病態形成に関与している可能性が考えられる。

### E. 結語

変異 SOD1 における糖化反応の亢進、分解の亢進が明らかとなった。FALS の病態解明、さらには治療法の開発には、これらがどのようなメカニズムで運動神経細胞障害を引き起こすかを検討する必要がある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### (1)論文発表

Miyamoto, Y. H. Ko, W. Che, Y. S. Park, N. Fujiwara, T. Ookawara, K. Suzuki and N. Taniguchi: Dysfunction of antioxidative enzymes and redox regulation under nitrosative stress and glycoxidative stress. , 7th International Symposium on the Maillard Reaction, Kumamoto, 2001.

#### (2)学会発表

日本生化学会 家族性筋萎縮性側索硬化症に関連した Cu,Zn,SOD 変異体のフルクトースによる糖化反応の亢進

### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

神経細胞の形態形成における微小管関連蛋白の分子遺伝学的研究

分担研究者 廣川信隆・東京大学医学系研究科教授

#### A 研究目的

神経細胞の形態形成の基本的メカニズムの解明

#### B 研究方法

神経細胞は、刺激を受容する樹状突起、細胞体、そして刺激を伝達する軸索及びシナプスというように高度に形態分化した細胞である。こうした特徴ある神経細胞の形態形成においては、細胞骨格系とりわけ微小管が必須の役割を果たす。微小管関連蛋白(Microtubule-associated Proteins: MAPs)は微小管に結合して存在する一群の蛋白であり、細胞内で微小管の形成、維持、ダイナミックな変化を調節すると予想されている。神経系において発現している主要なMAPsとして、MAP1A, MAP1B, MAP2, Tauが知られているが、それらの生体内での機能については不明な点が多い。我々はこれらの蛋白を欠失したキックアウトマウスを作成し、解析することを通じて、MAPsの生体内での機能についての知見を得ようと試みた。

(倫理面への配慮)

実験動物には麻酔薬等を用いて苦痛を与えぬ様に配慮した。

#### C 研究結果

今回我々は、これらの中で特にMAP2とMAP1Bに注目した。両者とも発達過程における樹状突起に多量に発現していることが免疫組織学その他の手法によって明らかにされており、樹状突起形成に何らかの形で関与していることが予想される。この問題についてin vivoでダイレクトに検討するために、標的遺伝子組み替え法を用いて作成したMAP2及びMAP1B欠失マウス、更に両者を欠失したダブルノックアウトマウスを作成し、細胞生物学的に詳細な解析を行った。ダブルノックアウトマウスは周産期において致死性であった。シングルノックアウトと比較してダブルノックアウトマウスの脳には重篤な構造異常が見いだされた。すなわち、神経細胞移動の障害による著明な層構造の形成異常と、神経突起(特に樹状突起)の伸長障害を呈した。これらの神経細胞の微小管では

成長円錐内部での束化及び突起内でのSpacingが障害されていた。以上から、神経系の形態形成においてMAP2とMAP1Bは機能的なグループをなし、微小管のorganizationを通じて樹状突起伸長と細胞移動に重要な役割を持つことが示された。

#### D, E 結論及び考察

1. 神経系の形態形成とりわけ樹状突起形成においてMAP2及びMAP1Bは機能的なグループをなす。
2. MAP2及びMAP1Bは神経細胞の成長円錐で微小管をorganizeし、tight arrayを形成する。
3. この過程が障害されると、成長円錐の運動性が低下し、神経突起の伸長障害を引き起こすと考えられる。
4. ダブルノックアウトマウスの脳では、神経細胞のmigrationの遅れが生じ、その結果、層構造が損なわれている。神経細胞がmigrationをする際に伸ばすleading processの伸長が不十分である可能性が考えられるが、この点については更に詳細な検討を必要とする。

微小管および微小管関連蛋白はALSのみならず種々の神経変性疾患の病態に深く関与していると考えられている。こうした蛋白群が実際に生体内で神経細胞の形態形成に必須の役割を果たしていることがこの研究から明らかになった。

#### F 研究発表

##### 1. 論文発表

Teng, J., Y. Takei, A. Harada, T. Nakata, J. Chen, and N. Hirokawa. Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *Journal of Cell Biology* 155(1): 65-76. 2001.

##### 2. 学会発表

Junlin Teng, Yosuke Takei, Akihiro Harada, Takao Nakata, Nobutaka Hirokawa. Synergistic Effects of MAP2 and MAP1B Knockout in Neuronal Migration, Dendritic Outgrowth, and Microtubule Organization. 41th Annual Meeting of ASCB, Washington DC, 2001. 12.

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

ポリオウイルス感受性の筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの作製と  
ポリオウイルスベクターの神経変性効果発現機構の解析  
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講座教授

研究要旨 ポリオウイルス (PV) は運動神経向性であることから、運動神経特異的ベクターとしての利用が考えられる。そこで、運動神経疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療・病因解明、および PV の細胞変性効果 (CPE) 発現機構解明を目的とする。具体的には、PV 感受性の ALS モデルマウスを作製し、病態を観察中である。また、PV による CPE を、抗 PV 抗体および抗 PV 受容体抗体が神経細胞特異的に抑制することを明らかにした。この CPE 抑制効果は、翻訳段階で制御されている可能性が高いことが示唆された。CPE が抑制された PV 感染細胞において、IRES (Internal ribosomal entry site) 依存的翻訳開始機構による PV 蛋白合成は抑制され、逆に Cap 依存的翻訳開始機構による細胞側蛋白合成は回復することが判明した。こうした蛋白合成制御は、両翻訳開始機構のスイッチングによって行われている可能性が示唆された。

#### 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、運動神経疾患の治療に用いることを目標とする。そのために必要なモデルマウスを作製する。また、PV による神経細胞変性発現機構を解明し、運動神経特異的な変性機構の理解を深めるとともに、ウイルスベクターによる細胞毒性を減弱化することを目的とする。

#### B. 研究方法

ALS 疾患モデルマウスとして、B6.Cg-TgN(SOD1-G93A)1Gur<sup>dl</sup> を、PV 感受性マウスとして PV 受容体 (PVR) 発現トランスジェニック (Tg) マウスを使用した。体外受精技術を用い、両者を交配させ、それぞれの遺伝子をヘテロに持つ、PV 感受性 ALS 疾患モデルマウスを作製した。

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞およびヒト神経芽細胞腫由来 SK-N-SH 細胞における CPE 発現機構を解析した。各細胞に、multiplicity of

infection (m.o.i.) 10 で PV 1 型強毒株 (Mahoney 株) を感染させ、感染 2 時間後に抗 PV 抗体および抗 PVR 抗体を添加し、感染 24 時間後の CPE 発現を観察した。また、感染各時間後に細胞を採取し、Northern blotting 法、Western blotting 法による解析を行った。Northern blotting 法のプローブとして、PV 5' 末端領域を用いた。Western blotting 法においては、抗 PV 2A プロテアーゼ抗体、抗 eIF4G 抗体で検出した。パルスラベル実験においては、<sup>35</sup>S 標識メチオニンを取り込ませた後、SDS ゲル電気泳動を行い、アイソトープ標識蛋白質を検出した。

実験動物の取り扱いに際しては、動物愛護の観点から、殺処分においては頸椎脱臼または二酸化炭素吸入により安楽死させた。

#### C. 研究結果

PV 感受性 ALS 病態モデルマウスについては、本実験に必要な体外受精技術を学び生産を開始したが、発症に長期間を要するために、