

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

井上正康 大阪市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨 FALS 変異 SOD は活性酸素産生の主座であるミトコンドリア及びペルオキシソーム膜への親和性が低下し、これによりミトコンドリアなどで活性酸素消去不全が起こる可能性を見いだした。この可能性を検証するために、FALS のモデルマウスを用いてミトコンドリア病態を解析した。また、ミトコンドリア膜保護作用を有するカルニチンが本病態マウスの神経・筋機能を保護し、寿命延長効果があることを明らかにした。

A. 研究目的

FALS の発症に Cu/Zn-SOD の点突然変異が関与することが判明したが、その分子機構は不明である。SOD 変異が分子構造維持に関与する部位に集中していることから、その細胞内局在性変化を検討し、正常 Cu/Zn-SOD がミトコンドリアやペルオキシソームなどに濃縮局在していること、および変異 SOD では両膜への結合性が低下していることを明らかにした。本疾患は他の臓器に比較してミトコンドリア依存性の高い運動神経が特異的なターゲットとなることから、FALS ではミトコンドリア局所での活性酸素病態が増強し、アポトーシスを誘起する可能性を示唆した。さらに、ミトコンドリア依存性アポトーシスでは、長鎖脂肪酸が重要であることを解明し、FALS にも長鎖脂肪酸毒性が関与している可能性が示唆された。本研究では、FALS におけるミトコンドリア障害の関与、及び長鎖脂肪酸をエネルギーに変換するカルニチンによる治療効果を検討した。

B. 研究方法

1. G93A FALS トランスジェニックマウス (Tg) の脊椎および筋の脂質過酸化物質 (4-HNE) 及び 8OH-dG を経時的に解析した。
2. PC12 細胞のミトコンドリア膜脱分極及びミトコンドリア依存性アポトーシスに及ぼすカルニチンの保護作用を検討した。
3. カルニチン (400 mg/kg/day) を含む飲水を Tg に与え、運動能力、発症時期、進行速度、及び寿命に対するカルニチンの作用を検討した。

(倫理面への配慮)

動物の扱いに関しては、本学動物実験規定に従った。

C. 研究結果

(1) FALS Tg の酸化障害解析

Tg の脊椎と腓腹筋の脂質過酸化を検討した結果、進行に伴い過酸化レベルが上昇していた。また、8OH-dG レベルも上昇していた。

(2) PC12 細胞のミトコンドリア膜脱分極におけるカルニチンの影響

血清除去により PC12 細胞のミトコンドリア膜は脱分極するが、カルニチン添加により脱分極とアポトーシスが抑制された。

(3) カルニチンの生体内作用

Tg にカルニチン (400 mg/kg/day) を飲水摂取させ、ロタロッドによる運動能力の評価、発症時期、進行速度、寿命に対する影響を検討した。カルニチン投与群では運動能力の低下時期はコントロールに比較して約 1 ヶ月半も遅延し、寿命も約 1 ヶ月延長した。

D, E. 考察及び結論

現在までに FALS 患者で見られた変異部位は SOD 分子の立体構造に影響する特性が強く、変異 SOD1 の多くは分子構造特性が変化していることが示唆される。SOD による O_2^- の細胞内消去反応は拡散律速で起こらなければならない。したがって、本研究で見いだしたごとく、SOD1 が活性酸素産生の主座であるミトコンドリアやペルオキシゾーム膜表面に結合局在化していることは極めて重要である。これにより、両オルガネラから細胞質側にリークしてくる O_2^- をその膜表面で効率良く消去していると考えられる。FALS の変異 SOD1 のオルガネラへの結合能が低下していることより、変異 SOD1 の局在性変化が細胞内 O_2^- の消去不全を誘起し、活性酸素傷害が蓄積しうる可能性が示唆された。実際、FALS はミトコンドリア依存性の高い神経や骨格筋に特異的に症状がでること、及びトランスジェニックマウスでの検討により、症状の進行に伴い酸化障害が増加していた。

また本研究では、神経細胞のミトコンドリア依存性細胞死がカルニチンにより著明に抑制されることおよび FALS トランスジェニッ

クマウスの臨床病態が著明に軽減することも判明した。この所見は、FALS 患者でもカルニチンの保護作用をテストしてみる意義があることを示唆する。今後、この点に注目し、病態動物モデルおよび FALS 患者におけるさらなる病態軽減法を開発したい。

F. 健康危機情報：特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishikawa. M, Nagatomi. H et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 387(1): 78-84, 2001.
2. Nishikawa M, Nshiguchi S et al., *Cancer Research.* 61: 1843-1845, 2001.
3. Inoue M, Sato E et al., *Free Rad. Res.* 33: 757-770, 2001.
4. Nishikimi A, Kira Yet al, *Biochem J.* 356: 621-626, 2001.
5. Furuno T, Kanno T et al, *Biochem Pharmacol.* 62: 1037-1046, 2001.
6. Wang Y, Kashiba M et al, *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR.* 33: 29-39, 2001.
7. Inoue M, *The Liver: Biology and Pathobiology.* 281-290, 2001.
8. Tuchiya M, Asada A et al, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 165: 54-60, 2002.
9. Imada I, Sato E et al, *CRC Press LLC.* in press, 2002.
10. Kira Y, Sato E et al, *Arch. Biochem. Biophys.* in press, 2002.

2. 学会発表

1. Kira Y, sato E et al. 10th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International. P181, 2000.

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

内海 英雄 九州大学大学院薬学研究科 機能分子解析学分野

生体内におけるフリーラジカル反応を解析する手法の一つに生体計測 ESR/スピンプローブ法がある。当研究室では、種々のスピンプローブ剤を用いて血液滞留性 PEG-PROXYL、細胞膜低透過性 Carbamoyl-PROXYL、および細胞内滞留性 AMC-PROXYL の 3 種類のスピンプローブを新たに合成し、病態モデルでの生体内フリーラジカル反応の解析に用いてきた。今回、家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の原因遺伝子の 1 つである G93A-変異型 SOD1 を導入したトランスジェニックマウス (G93A-Tg) および一過性脳虚血ラットに対して、これらのプローブを用いたフリーラジカル反応解析を行った。その結果、G93A-Tg では AMC-PROXYL を用いた場合に FALS の発症時期に先だつてフリーラジカル反応が亢進する傾向が認められた。一方、一過性脳虚血ラットでは、血液滞留性プローブである PEG-PROXYL によりフリーラジカル反応の亢進が認められ、また、PEG-PROXYL により脳浮腫の改善が認められた。以上の結果より、動態の異なるスピンプローブと生体計測 ESR の併用により脳内のフリーラジカル反応解析がより詳細に可能になるものと考えられた。

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の成因の一つとして、抗酸化酵素である Cu/Zn-SOD (SOD1) の遺伝子異常が明らかにされ、その発症に、酸化ストレスが関与する可能性が示唆されている。この関与を明らかにするためには、活性酸素・フリーラジカルが脳および脊髄のどこで・どの程度産生しているかを解析することが望まれる。我々は、これらの問題点を解決するため、スピンプローブ剤ならびに装置の開発を試みてきた。本研究では、確立した生体計測 ESR/スピンプローブ法を変異型 SOD1 遺伝子導入マウスおよび一過性脳虚血ラットに適用し、フリーラジカル反応の場合および時期について検討した。

B. 研究方法

Hetero ヒト変異 SOD1(G93A) 過剰発現マウス (G93A-Tg) および Hetero ヒト正常 SOD1 マウス (SOD1-Tg) は、Jackson Lab より購入した。全てのマウス (雌性、4 - 11 ヶ月齢) はネブタール麻酔下でスピンプローブを尾静脈内投与し (0.125 mmol/kg 体重)、頭部における ESR スペクトルを経時的に測定し、シグナル強度の片対数プロットの傾きからシグナルの減衰速度を求めた。

酸化ストレス負荷モデル動物として、ラットの中大脳動脈をナイロン糸で一定時間虚血した後、再灌流することで、一過性脳虚血を調製した。

C. 研究結果及び考察

スピンプローブとして、PEG-PROXYL (MW, 5 kDa)、Carbamoyl-PROXYL、および AMC-PROXYL を用いた。脳内における酸化ストレス亢進モデルである一過性脳虚血に対して PEG-PROXYL および Carbamoyl-PROXYL を用いてフリーラジカル反応の解析を行ったところ、虚血-再灌流に伴うシグナル減衰速度の亢進が観察された。また、この亢進は、いずれも SOD1 の同時投与により抑制された。とりわけ、PEG-PROXYL は PEG の特性として細胞への接着・取り込みを受け難く、また、血液-脳関門を通過し難いことから、脳血管内腔および血管内皮細胞系でフリーラジカル反応の亢進が起きていることが考えられた。

AMC-PROXYL は容易に細胞膜を透過し、細胞内のカルボキシエステラーゼにより加水分解を受け膜非透過性の Carboxyl-PROXYL に変換される。この特性に

より、我々は AMC-PROXYL が細胞内滞留性スピンプローブであり、血液-脳関門を通過し、脳実質系に移行することを明らかにしている (Free Radic. Biol. Med., 28(6), 959-969 (2000))。SOD1-Tg および G93A-Tg に対して AMC-PROXYL および Carbamoyl-PROXYL を用いて脳内におけるフリーラジカル反応の解析を行った。いずれのプローブにおいても、SOD1-Tg では、6 ヶ月齢から 11 ヶ月齢までの期間における有意なシグナル減衰速度の変動は観察されなかった。一方、G93A-Tg では、4 ヶ月齢から 11 ヶ月齢まで解析を行った結果、Carbamoyl-PROXYL ではシグナル減衰速度の有意な変動は認められなかったが、AMC-PROXYL を用いた系において FALS の発症時期 (およそ生後 250 日) に先だつて一過性にシグナル減衰速度が亢進する傾向が認められた。興味深いことに、この時期は、本モデル系において報告されている 8-OH-dG の上昇時期と一致した。

D. 結論

一過性脳虚血では血管内腔におけるフリーラジカル反応亢進の可能性が示唆された。また、変異型 SOD1 過剰発現マウスの脳実質において、FALS の発症に先立ち一過性ではあるがフリーラジカル反応の亢進が起きている傾向が観察された。

E. 研究発表

1. 論文発表

Monji A, Utsumi H, Ueda T, Imoto T, Yoshida I, Hashioka S, Tashiro K, Tashiro N. The relationship between the aggregational state of the amyloid- β peptides and free radical generation by the peptides. *J Neurochem.* 2001, 77(6), 1425-32.

Monji A, Utsumi H, Yoshida I, Hashioka S, Tashiro K, Tashiro N. The relationship between A β -associated free radical generation and A β fibril formation revealed by negative stain electron microscopy and thioflavine-T fluorometric assay. *Neurosci Lett.* 2001 May 18;304(1-2):65-8.

2. 学会発表

村上君代、矢川裕子、徳本誠治、内海英雄、In vivo ESR を用いた Cu/Zn-SOD 遺伝子導入 (野生型・変異型) マウスでの生体内レドックス変動の影響、第 6 回 In vivo ESR 研究会 (大阪)。

研究者 中野今治 自治医科大学神経内科教授

研究要旨 SOD1 遺伝子異常を有する FALS における細胞死のメカニズムの一つとして、SOD1 (おそらく、SOD1 遺伝子異常に基づく変異 SOD1) がメイラード反応を受けたため、AGE 化された不溶性の granule-coated fibril が凝集し、細胞内を占拠することで、正常な細胞機能が維持できなくなり破綻をきたすことが判明した。また、AGE 修飾 granule-coated fibril 自身が持つ細胞毒性のために、細胞死を惹起させると考えられた。さらに granule-coated fibril が凝集し、封入体を形成していく過程で、細胞内に存在する正常構成蛋白、成長因子、CCS 等の細胞機能維持に必要な蛋白を取り込むことも、細胞死に拍車をかける要因であることが明らかになった。

中野今治¹、加藤信介²、堀内正公³、佐古田三郎⁴、船越洋⁵、中村敏一⁵、加藤丈夫⁶、平野朝雄⁷、加藤雅子⁸、大浜栄作²

¹自治医科大学神経内科、²鳥取大学脳神経病理、³熊本大学第二生化学、⁴大阪大学神経内科、⁵大阪大学バイオメディカル教育研究センター腫瘍生化学、⁶山形大学第三内科、⁷Montefiore Medical Center 神経病理、⁸鳥取大学病院病理

A. 緒言

SOD1 遺伝子異常を伴う FALS における細胞死のメカニズムの 1 つに aggregation toxicity が提唱されている。これら FALS やヒト G85R SOD1 遺伝子導入トランスジェニック (G85R-Trns) マウスに出現する細胞内封入体である neuronal Lewy body-like hyaline inclusion (LBHI) や astrocytic hyaline inclusion (Ast-HI) は、病理形態学的には aggregation toxicity を支持する所見と考えることが出来る。そこで我々は、これら細胞内封入体形成過程を介して、細胞死のメカニズムを病理形態学的に解析した。

B. 研究結果

1. SOD1 陽性の granule-coated fibril は SOD1 遺伝子異常の形態的 hallmark である

SOD1 遺伝子異常を伴う FALS の 4 家系 8 剖検例全例に neuronal LBHI が出現し、10 年以上の

長期生存 2 剖検例には多数の Ast-HI も存在していた。Neuronal LBHI 及び Ast-HI は両者ともに SOD1 に強陽性で、超微形態的には 15-25 nm 径の granule-coated fibril より成っていた。G85R-Trns マウスにおいても、両封入体が出現して SOD1 強陽性を呈した。超微形態的には、両者ともその本体は 15-25 nm 径の granule-coated fibril であり、ヒト FALS のそれと同一であった。免疫電顕的手法を用いて、ヒト及びマウスの SOD1 陽性細胞内封入体を解析してみると、granule-coated fibril そのものが SOD1 陽性を示した。即ち、SOD1 遺伝子異常が存在すると、ヒトでもマウスでも SOD1 陽性の granule-coated fibril が形成され、神経細胞内に生ずると LBHI として、アストロサイト内に生ずると Ast-HI として観察されることが判明した。

2. Granule-coated fibril 形成過程の超微形態像

Ast-HI における granule-coated fibril の形成過程を、超微形態学的に経時的に観察してみた。初期の封入体は、その構成成分はほとんどが顆粒成分 (granular material) であるが、その中には必ず granule-coated fibril が観察された。封入体は成長するに従い、granular material の成分が少なくなり、その構成成分は granule-coated fibril が主体となっていく。さらに、granule-coated fibril が細胞内

に増加してゆくと、生体はこの granule-coated fibril を不要な蛋白として認識し、ライソゾームによる蛋白溶解機構をもって消化しようとするが、この granule-coated fibril は消化されることなく細胞内で増加していく。また細胞は、ユビキチンシステムによる蛋白溶解機構をも利用して、granule-coated fibril を溶解しようとする。しかし、granule-coated fibril は溶けることなく増加してゆく。最終的には、細胞内はほとんど granule-coated fibril によって占拠され、正常細胞内小器官はほとんど観察されない状態に陥る。このような細胞は、正常な細胞機能はもはや果たし得ず、やがては細胞死に至るものと考えられた。この経時的超微形態像は、aggregation toxicity 仮説に基く細胞死のメカニズムを反映していると考えられる。

3. Granule-coated fibril の形成過程にはメイラード反応（糖化反応最終産物[AGE]形成反応）が関与している

AGE 化された蛋白は、不溶性でなおかつ細胞毒性を持ち、その上、SOD1 は最もメイラード反応を受けやすい蛋白の一つである。ヒト FALS や G85R-Trns マウスの SOD1 遺伝子異常の形態学的特徴である LBHI と Ast-HI は、光顕的には AGE の修飾を受けていた。超微形態学的にも、両封入体の本体である granule-coated fibril は、AGE により修飾されていた。即ち、ライソゾーム系とユビキチン系の2つの消化過程を経ても分解されずに増加する、SOD1 を主構成蛋白として持つ granule-coated fibril の形成過程には、メイラード反応が関与していることが判明した。

4. 細胞内蛋白の封入体形成に伴う凝集

Granule-coated fibril が神経細胞内で LBHI として凝集する際には、神経細胞に特異的な細胞構成蛋白として、phosphorylated

neurofilament protein (pNFP), non pNFP, synaptophysin, NSE が封入体に取り込まれる。また、granule-coated fibril がアストロサイト内で Ast-HI として凝集する際には、アストロサイト関連蛋白として、 α B-crystallin, metallothionein, glutamine synthetase, S100 が封入体に取り込まれる。また、神経細胞とアストロサイトに共通の構成蛋白である tubulin や tau も、封入体形成時に取り込まれる。即ち、細胞維持に必要な細胞構成蛋白が封入体形成に伴い取り込まれることにより、細胞は正常機能の維持に必要な構成蛋白が減少し、正常機能の維持が出来なくなり細胞死に拍車をかけると考えられる。

神経細胞自身が発現する成長因子である HGF は、LBHI として凝集する際に取り込まれ封入体は HGF に陽性となるが、神経細胞内には HGF は減少してしまい神経細胞自身は HGF 陰性となる。アストロサイトが有する成長因子である bFGF も、Ast-HI として凝集する際に取り込まれ、細胞内では減少していく。これら成長因子の封入体への取り込みに伴う細胞内量の減少も、成長因子による autocrine, paracrine による細胞維持機能に破綻を来たし、細胞死を加速する一因となる。

SOD1 に特異的に銅を与える CCS は、正常状態では主に神経細胞体内に存在する。神経細胞内に LBHI が形成されると、CCS は LBHI に取り込まれ、LBHI は CCS に陽性となる。このことから、CCS が特異的に SOD1（おそらく変異 SOD1）と結合することにより、SOD1 凝集による封入体形成をより増強すると考えられる。また、CCS が LBHI に取り込まれることにより胞体内量が減少し、SOD1 に効果的に銅を運ぶことが出来なくなり、SOD1 の機能が有効に発揮できなくなるために、細胞死をさらに早めると考えられる。

ALS の遺伝子治療—SOD1 マウスでの実験—

中野今治

【研究要旨】 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) は神経線維投射先の組織で産生される神経栄養因子であり、脊髄運動ニューロンや中脳ドパミンニューロンに対して強力な保護栄養作用を有する。GDNF の投与により軸索損傷に伴う運動ニューロン死や運動ニューロンの programmed cell death が軽減されることが動物実験で見だされている^{1), 2)}。この作用は胎生期の動物の運動ニューロンのみでなく、成獣のニューロンでも認められる^{3), 4)}。また、家族性筋萎縮性側索硬化症のモデル動物の骨格筋にGDNF 遺伝子を組み込んだ筋芽細胞を導入すると、下位運動ニューロンの生存率が改善することが示されている⁵⁾。これら実験結果は、ALS で代表される運動ニューロン疾患に対し、GDNF が有効である可能性を示すものである。

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは、神経細胞や筋細胞のような非分裂細胞にも導入されうること、長期の遺伝子発現が可能なこと、細胞毒性や免疫反応惹起性が無いこと、導入された細胞内で増殖能力を取り戻す危険性がほとんどないことが利点である。骨格筋細胞で治療遺伝子を発現させることを主眼としている本研究には適したベクターである。

昨年われわれは GDNF 遺伝子を組み込んだ AAV ベクター (AAV-GDNF) を筋肉に注入して下位運動ニューロンを保護する治療実験の基礎データを提示した。本年度は ALS モデルマウスでの治療実験の結果を報告する。

共同研究者：王 立軍¹⁾、Lu Yanyan¹⁾、村松慎一¹⁾、池口邦彦¹⁾、藤本健一¹⁾、岡田尚巳²⁾、水上浩明²⁾、松下 卓³⁾、花園 豊²⁾、久米晃啓²⁾、永津俊治⁴⁾、小澤 敬也²⁾

所属：1) 自治医科大学神経内科、

2) 自治医科大学分子病態研究センター

3) 自治医科大学ウイルス学、

4) 藤田保健衛生大学総合医学研究所

【材料と方法】

1) ベクター：組換え AAV type 2 をベクターとして使用し、治療遺伝子として GDNF 遺伝子を、内因性 GDNF と識別するために GDNF 遺伝子の下流に tag として FLAG の遺伝子を組み込んだ (AAV-GDNF-FLAG)。コントロールベクターとして AAV-LacZ を使用した。

2) LS モデルマウス：SOD1(G93A)トランスジェニック・マウスを使用した。

① AAV-GDNF 治療群 (治療群 A) (n=12) とコントロール群にわけ、後者はさらに AAV-LacZ 注射群 (n=6) と vehicle 投与群 (n=5) に分け

て治療群、コントロール群とも 9 週齢でその四肢 (左右下腿三頭筋と左右上腕二頭筋) に注射した。AAV-LacZ 群と vehicle 群では臨床病理学的に同一の態度を示したので、解析には 1 つのコントロール群として扱うことにした。必要に応じて、野生マウス (野生群) も検索比較した。

②もう 1 つの AAV-GDNF 治療群 (治療群 B) (n=7) では、左前・後肢に AAV-GDNF ベクターを、右前・後肢に AAV-LacZ を注入した。

3) 動能力：Rotarod 上に留まっていられる時間で運動能力を定量的に判定した。発症の定義として、20 回転/分で回転している rotarod 上に 7 分以上留まっていられない状態とした。

4) 処理：処理 1 週間前にコレラ毒素サブユニット B (CTB) を neural tracer として筋肉注射し、処理時に麻酔下で下腿三頭筋を摘出して凍結固定し -80℃ で保存した。筋摘出後、4% paraformaldehyde で灌流固定し、脊髄を取り出して同一固定液内で 4 時間再固定した。

5) GDNF ELISA：摘出凍結した筋肉を

homogenize し、ELISA にて筋内の GDNF を測定した。

6) 組織検索：筋は抗 FLAG 抗体、ロダミン結合 α -bungarotoxin を使って染色し、脊髄は抗 SMI-32 抗体、抗 CTB 抗体、抗 FLAG 抗体で染色し、いずれも共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。その他に HE 染色、Nissl 染色を施して、筋と脊髄の組織所見を調べ、KS400 image analysis software (Carl Zeiss) を使って形態計測を行った。

【結果】

1) 群 A は対照群に比し発症が有意に遅れ (114.0 ± 4.0 days versus 101.3 ± 5.4 days; $p < 0.01$)、平均寿命が有意に延長した (138.9 ± 9.2 days versus 122.3 ± 5.7 days; $p < 0.01$)。しかしながら、罹病期間には有意差が見られなかった (24.0 ± 3.5 days versus 21.0 ± 3.5 days; $p > 0.05$)。

2) 110 日齢 (注射 7 週目) における下腿三頭筋内の GDNF 濃度は、治療群 A では対照群より 120 倍以上の高値を示した (7985.0 ± 874 pg/mg protein versus 62.2 ± 20.5 pg/mg protein; $p < 0.01$)。治療群 A の死亡時にはこの値は 3281.7 ± 667.0 pg/mg protein) と低下傾向を示した。

3) Transgenic GDNF の筋内分布：治療群 A では、110 日齢時と死亡時の両方において多数の筋線維が抗 FLAG 抗体により強く染色された。筋線維内では FLAG は細胞膜近傍に分布し、 α -bungarotoxin との二重染色では FLAG は α -bungarotoxin と共存する傾向を有することが判明した。

4) 治療群での筋線維の保存：110 日齢時における下腿三頭筋筋線維の横断面積は治療群 A、対照群、野生群においてそれぞれ $2252.8 \pm 1035.2 \mu\text{m}^2$ 、 $1053.8 \pm 581.02 \mu\text{m}^2$ 、 $3517.62 \pm 613.5 \mu\text{m}^2$ であり、治療群ではコントロール群に比し明らかに保存されていた。

5) Transgenic GDNF の軸索内逆行輸送：腰髄を抗 FLAG 抗体と抗 SMI-32 抗体で二重免疫染色した結果、治療群 A の前角内 SMI-32 陽性ニューロンの多くが FLAG 陽性であるのに対しコ

ントロール群では FLAG 陰性であること、治療群 B では AAV-GDNF-FLAG 注入肢側の前角でのみ SMI-32 陽性ニューロンが FLAG 陽性であることが観察された。

6) GDNF による前角ニューロンの保持：110 日齢時に処理した治療群 B において、AAV-GDNF-FLAG 注入肢側の前角運動ニューロンは AAV-LacZ 注入肢側のそれよりも有意に多く残存していた (Nissl stain: 17.1 ± 3.2 versus 10.3 ± 1.1 , $p < 0.01$; SMI-32: 15.6 ± 1.8 versus 8.8 ± 3.2 , $p < 0.01$)。

7) CTB 陽性前角運動ニューロン：110 日齢時では治療群 A ではコントロール群に比して CTB 陽性前角ニューロンの比率が有意に高く ($20.7 \pm 4.9\%$ versus $11.02 \mu\text{m}^2$ 2.5%, $p < 0.01$)、その細胞体面積も有意に大であり ($605.8 \pm 248.22 \mu\text{m}^2$ versus $353.12 \pm 173.82 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$)、面積分布も大きい側に保たれていた。

【考察】

本研究では正常マウスと同様、ALS モデルマウスでも AAV-GDNF の単回筋内注射により導入した GDNF 遺伝子が広範かつ長期に発現することが示された。ALS は慢性に進行する疾患であり、その進行を遅らせるためには GDNF が恒常的にかつ長期に渡って下位運動ニューロンに作用することが要求される。この点、ALS の臨床治験を視野に入れた場合、今回の手法は適切な方法であると言える。

筋内に発現した GDNF が運動ニューロン軸索を逆行輸送されてその保護作用が発揮されると推測されているが、遺伝子治療の際にも同様の機序が働くのか否かの明確なデータはこれまで示されていない^{6), 7)}。今回、FLAG tag を使用することにより、外来の GDNF も内在性のものと同様、軸索内を逆行輸送されて運動ニューロン細胞体に達することが示された。筋線維内に発現した GDNF が神経筋接合部に優位に分布して見られたことも逆行輸送には好都合である。

治療群 B において、AAV-GDNF 注入肢側の

方が、残存前角運動ニューロン数とそのニューロン面積の両者において AAV-LacZ 注入肢側よりも有意に大であることが示された。さらには、neural tracer である CTB の投与実験により AAV-GDNF 注入側では少なくとも軸索逆行輸送が保たれているニューロンが多いことも証明された。すなわち、骨格筋内の transgenic GDNF がその筋を支配している運動ニューロンを保護したものである。

これらの所見を反映したものが、治療群 A においてみられた発症の遅延と寿命の延長であると考えられる。このように、われわれが行っている遺伝子治療は将来の臨床応用を視野に入れうる治療法とみなしうる。ただ、今回の治療実験では罹病期間の延長はできなかった。この点が今後に残された課題である。

文献

1) Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, et al.: GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle [see comments]. *Science* 266(5187): 1062-1064, 1994

programmed cell death among motoneuron subtypes. *J Neurosci.* 20: 5001-11, 2000

3) Li L, Wu W, Lin LF, et al.: Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9771-5, 1995

4) Yan Q, Matheson C, Lopez OT: In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons [see comments]. *Nature* 373: 341-344, 1995

5) Mohajeri MH, Figlewicz DA, Bohn-MC: Intramuscular grafts of myoblasts genetically modified to secrete glial cell line-derived neurotrophic factor prevent motoneuron loss and disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Gene Ther* 10: 1853-1866, 1999

6) Mohajeri MH, Figlewicz DA, Bohn MC: Intramuscular grafts of myoblasts genetically modified to secrete glial cell line-derived neurotrophic factor prevent motoneuron loss and disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Gene Ther* 10: 1853-1866, 1999

7) Alisky JM, Davidson BL: Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis and other motoneuron diseases. *Hum Gene Ther* 11: 2315-2329, 2000

2) Oppenheim RW, Houenou LJ, Parsadanian AS, et al.: Glial cell line-derived neurotrophic factor and developing mammalian motoneurons: regulation of

G93A/ヒト正常 SOD1 ダブルトランスジェニックマウスの臨床的・生化学的検討

研究協力者 大阪大学神経内科 教授 佐古田 三郎

（研究要旨）家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）のモデル動物である G93A-SOD1 のトランスジェニックマウス（G93A マウス）とヒト正常型 SOD1（hWT-SOD1）のトランスジェニックマウス（hWT マウス）とを掛けあわせると臨床経過が増悪するという結果が報告されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、免疫沈降法、質量分析法および ELISA 法を用い、G93A-SOD1 および hWT-SOD1 のダブルトランスジェニックマウス（G93A/hWT マウス）では G93A マウスに比べ G93A-SOD1 濃度が上昇していることを示した。G93A-SOD1 濃度は罹病期間と相関し、病状増悪の主因であると考えられた。G93A-SOD1 が、導入された hWT-SOD1 とヘテロダイマーを形成し安定化した可能性が考えられる。またメタロチオネイン濃度は G93A/hWT マウスの脊髄で増加しているのに対し、脳・腎臓では上昇していなかった。このことから病変の主座である脊髄で銅イオン関連の酸化ストレスが生じていることが示唆された。

A.研究目的

変異 SOD1 には変異 SOD1 同士あるいは正常 SOD1 とのダイマーを有効に形成できる安定型変異 SOD1 とダイマー形成が出来ない不安定型変異 SOD1 があることを我々は報告してきた。そして、前者は半減期が長いこと細胞内を移動して銅イオンを遊離し、結果的に銅イオン関連の酸化ストレスが細胞内の広い範囲で生じるが、後者は翻訳後すぐに degradation されるため、銅イオンの遊離については銅イオン関連の酸化ストレスが特定の位置に局限するという仮説を提唱した。

FALS のモデル動物である変異 SOD1 トランスジェニックマウスとヒト正常型 SOD1 のトランスジェニックマウス（hWT マウス）との掛けあわせ実験では、G85R マウスでは臨床経過に変化は見られないが G93A マウスでは臨床経過が増悪するという予想に反した相異なる結果が報告されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では G93A-SOD1 蛋白が、導入された hWT-SOD1 蛋白と安定したヘテロダイマーを形成することによりその毒性が増加する可能性を考え、G93A-SOD1 および hWT-SOD1 のダブルトランスジェニックマウス（G93A/hWT マウス）の G93A-SOD1 濃度とメタロチオ

ネイン（MTs）濃度を測定し、臨床経過との関係について検討した。

B.研究方法

G93A マウスと hWT マウスを掛けあわせて G93A/hWT マウスを作成し、臨床経過を観察した。G93A マウスと G93A/hWT マウスの SOD1 濃度は免疫沈降法、質量分析法および ELISA 法で測定した。

マウスの管理は大阪大学医学部動物実験施設のガイドラインに準拠し、屠殺はペントバルビタール麻酔下で行った。

C.研究結果

臨床経過は G93A マウスと G93A/hWT マウスで、発症が 206±26 日 vs.193±19 日、寿命が 248±29 日 vs.217±21 日、罹病期間が 40.2±6.5 日 vs.24.0±11.6 日であり、後者で罹病期間の有意な短縮を認めた (Table)。G93A/hWT マウスでの hWT-SOD1 と G93A-SOD1 の濃度比は肝臓で 3.16±0.36、脊髄で 1.70±0.33、脳で 1.53±0.05、赤血球で 0.15 以下であり、蛋白合成が盛んな肝臓で最大、蛋白合成を持たない赤血球で最小であった。これは G93A-SOD1

Table 各トランスジェニックマウスの臨床経過、G93A-SOD1濃度およびメタロチオネイン濃度

Mice	Clinical course (days)			G93A-SOD1 concentration (μg/mg protein)		MTs concentration (μg/g tissue)		
	Onset	Endpoint	Duration	Spinal cord	Brain	Spinal cord	Brain	Kidney
hWT	-	-	-	-	-	17.6 ± 2.8	28.7 ± 5.5	2.2 ± 0.4
G93A	208 ± 26	248 ± 29	40.2 ± 6.5	1.66 ± 0.89	0.85 ± 0.24	36.4 ± 7.3*	34.0 ± 6.2	1.8 ± 0.3
G93A/hWT	193 ± 19	217 ± 21	24.0 ± 11.6§	7.05 ± 1.87†	5.59 ± 1.47†	61.0 ± 9.0**	31.0 ± 4.6	2.4 ± 0.5

§: p<0.01 (G93Aマウスvs.G93A/hWTマウス) †: p<0.001 (G93Aマウスvs.G93A/hWTマウス) *: p<0.005 (hWTマウスvs.G93Aマウス) **: p<0.01 (G93Aマウスvs.G93A/hWTマウス) 統計学的解析は Mantel-Cox 分析 (発症および寿命) および Student t テスト (罹病期間、G93A-SOD1 濃度およびMTs 濃度)で行った。

がhWT-SOD1 に比べて不安定なためと考えられる。

脊髄 G93A-SOD1 濃度は G93A マウスで $1.66 \pm 0.89 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ に対し, G93A/hWT マウスでは $7.05 \pm 1.87 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ と有意に上昇しており, G93A-SOD1 が hWT-SOD1 の導入により安定化したものと考えられる(Table). 脊髄 G93A-SOD1 濃度は寿命・罹病期間と相関し(図1), G93A-SOD1 濃度の上昇がG93A/hWT マウスでの臨床症状の増悪の主因であると考えられる. 脊髄 MTs 濃度はhWT マウスで $17.6 \pm 2.8 \mu\text{g}/\text{g tissue}$, G93A マウスで $36.4 \pm 7.3 \mu\text{g}/\text{g tissue}$, G93A/hWT マウスで $61.0 \pm 9.0 \mu\text{g}/\text{g tissue}$ と G93A マウスおよび G93A/hWT マウスで上昇していた(Table). 脊髄 MTs 濃度は G93A-SOD1 濃度と相関し(図1), 銅イオン関連の酸化ストレスが G93A-SOD1 濃度に応じて増加していることが示唆された. しかし, 脳・腎臓 MTs 濃度は各トランスジェニックマウス間で差を認めなかった.

D.E.考察ならびに結論

G93A/hWT マウスでの臨床症状の増悪は G93A-SOD1 濃度の上昇が主因であることを示した. G93A-SOD1 が, 導入された hWT-SOD1 とヘテロダイマーを形成し安定化した可能性が考えられる. 一方 G85R-SOD1 は hWT-SOD1 と混合しても半減期は変化しないことが in vitro で報告されており, hWT-SOD1 と安定したダイマー形成ができないものと推察される. このため G85R マウスに hWT-SOD1 を導入しても G85R-SOD1 濃度は上昇せず, 臨床経過が変化しなかったものと考えられる. G93A-SOD1 と G85R-SOD1 のダイマー形成能の違いがかけあわせ実験の相異なる結果の原因と考えられ, このことは目的で述べた仮説の裏付けとなる.

MTs が G93A/hWT マウスの脊髄で増加しているのに対し, 脳・腎臓では上昇していなかった. このことは病変の主座である脊髄で銅イオン関連の酸化ストレスが生じていることを示唆する.

以上より変異 SOD1 は各種変異により微妙にその毒性が異なる可能性が示唆される.

F.健康危機情報 特記事項なし

G.研究発表

1.論文発表

Stabilization of mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) protein by coexpressed wild SOD1 protein accelerates the disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis mice; Fukada K, Nagano S, Satoh M, Tohyama C, Nakanishi T, Shimizu A, Yanagihara T, Sakoda S *European Journal of Neuroscience* 14:2032-2036,2001

Copper chaperone for superoxide dismutase is co-aggregated with superoxide dismutase 1 (SOD-1) in neuronal Lewy body-

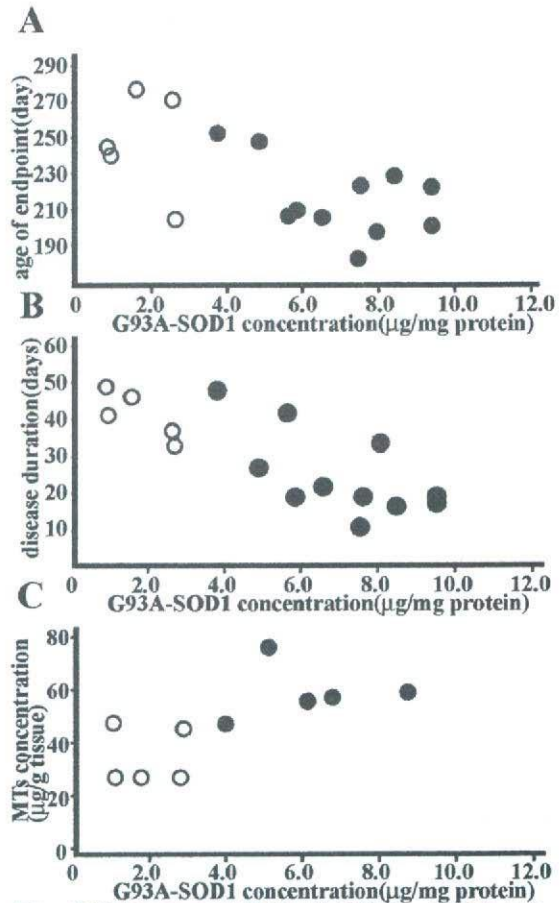


図1 脊髄中G93A-SOD1濃度と臨床経過・脊髄中メタロチオネインとの関係 脊髄中G93A-SOD1濃度は寿命・罹病期間と相関し(A, B; 相関係数はそれぞれ0.637, 0.804), 脊髄中メタロチオネイン濃度とも相関した(C; 相関係数は0.693). ○G93Aマウス ●G93A/hWTマウス

like hyaline inclusions: an immunohistochemical study on familial amyotrophic lateral sclerosis with SOD-1 gene mutation; Kato S, Akamaru-Sumi H, Fujimura H, Sakoda S, Kato M, Hirano A, Takikawa M, Ohama E *Acta Neuropathol. (Berl)* 102 233-238,2001

Formation of advanced glycation endproduct- modified superoxide dismutase 1 (SOD-1) in one of the mechanisms responsible for inclusions common to familial amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 gene mutation, and transgenic mice expressing human SOD1 gene mutation; Kato S, Nakashima K, Horiuchi S, Nagai R, Cleveland DW, Liu J, Hirano S, Takikawa M, Kato M, Nakano I, Sakoda S, Asayama K, Ohama E *Neuropathol.* 21 67-81,2001

2.学会発表

第42回 日本神経学会総会

第42回 日本神経病理学会

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1.特許取得 筋萎縮性側索硬化症治療薬(出願中)

2.実用新案登録

研究協力者 加藤 丈夫 山形大学医学部第三内科教授
飛澤 晋介 山形大学医学部第三内科

研究要旨：変異型SOD1と細胞内異常凝集塊形成との関連性を細胞レベルで明らかにするために、培養細胞への遺伝子導入発現系を用いて、変異型SOD1の細胞内局在および細胞小器官との関連性を検討した。野生型および4種(G37R, G85R, G93A, S134N)の変異型SOD1遺伝子を発現効率の異なる2種の発現ベクターを用いてCOS7細胞に導入した。高発現効率ベクターを用いた系において、変異型SOD1蛋白による凝集塊形成が核周囲に認められ、この凝集塊は小胞体マーカーの局在と一致した。凝集塊形成に伴い、ミトコンドリアおよび微小管は核周囲への集簇像を呈し、アクチン線維には量的減少が認められた。一方、低発現ベクターの系においては凝集塊の形成は認められなかったが、プロテアソーム阻害剤の添加により、高発現ベクターを用いた場合と同様の凝集塊が核周囲に形成された。これらの結果より、変異型SOD1はプロテアソームによる分解処理能力を超えて産生された場合、小胞体内に凝集塊として蓄積する可能性が示唆された。また凝集塊形成に伴いミトコンドリアや他の細胞小器官の機能障害が多面的に起こりうることが示唆された。

A.研究目的

一部の家族性ALSの原因遺伝子としてスーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)遺伝子変異が発見されたが、運動ニューロン変性機序は依然不明である。一方、家族性ALS脊髄の残存運動ニューロンには、抗SOD1抗体および抗ユビキチン抗体陽性の封入体や、ニューロフィラメントの異常な蓄積が認められる。ALSに出現する異常構造物(凝集塊)の形成過程にSOD1が関与し、その結果ユビキチン・プロテアソーム分解系や軸索輸送機構の障害が惹起される可能性が推察される。本研究では、変異型SOD1と細胞内異常凝集塊形成との関連性を細胞レベルで明らかにするために、培養細胞への遺伝子導入発現系を用いて、変異型SOD1の細胞内局在および細胞小器官との関連性を検討した。

B.研究方法

健常成人白血球から全RNAを抽出しRT-PCR法によりヒトSOD1遺伝子のcDNAを増幅した。塩基配列を確認後、FLAGエピトープタグをコードするオリゴヌクレオチド(N末端側)と共に、プロモーター活性強

度の異なる2種の発現ベクター(pcDNA3, pEF-BOS)にサブクローニングした。Kunkel法により4種の点変異(G37R, G85R, G93A, S134N)を野生型SOD1cDNAに導入した。塩基配列解析により所定の場所に点変異があることを確認した。これらのプラスミドDNAをリポフェクション法を用いてCOS7細胞に導入し、48時間後にウエスタンブロット解析および免疫細胞化学解析を行った。ウエスタンブロット解析においては、マウス抗FLAG・M2抗体(Sigma-Aldrich)を用いて、FLAG融合蛋白質を検出した。免疫細胞化学解析においては、一次抗体としてマウス抗FLAG・M2抗体、ウサギ抗GRP78抗体(小胞体マーカー, Stressgen)、ウサギ抗SOD2抗体(ミトコンドリアマーカー, 産業医科大学・朝山光太郎博士提供)、ウサギ抗チューブリン抗体(新潟大学・桑野良三博士提供)を使用した。蛍光染色にはAlexa488あるいはAlexa546標識抗マウスIgG抗体(Molecular Probes)を使用した。更に小胞体マーカーとしてER-Tracker(Molecular Probes)、ゴルジ体マーカーとしてBODIPY FL-C5 ceramide(Molecular Probes)、アクチンマーカーとしてAlexa568

phalloidin (Molecular Probes)を使用した。プロテアソーム阻害剤である Lactacystin(BIOMOL Research Laboratories)は、遺伝子導入24時間後に10 μ Mとなるように添加し、その24時間後に免疫細胞化学解析を行った。形態学的解析は蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

C. 研究結果

ウエスタンブロット解析では、用いた2種のベクター間の発現量に大きな差が認められた。蛋白泳動量およびデンシトメトリーによる黒化度の換算により、高発現効率ベクター(pEF-BOS)では低発現効率ベクター(pcDNA3)と比べ野生型において約8.8倍、変異型において約2.0-8.3倍の発現量増加と見積もられた。また、pEF-BOSベクターを用いた場合、変異型の発現は野生型の約16-49%であり、変異型の発現は常に抑制されていた。pcDNA3ベクターではこのような変異型の発現抑制は顕著ではなかった。変異型の中で比較的発現効率のよいG93A変異型について超遠心分画分離を行うと、野生型はほとんどが可溶性画分に検出されるのに対し、G93A変異型では全体の約30%が不溶性画分に認められた。免疫細胞化学解析では、高発現ベクターであるpEF-BOSを用いた系において変異型SOD1 蛋白による凝集塊形成が核周囲に認められた。凝集塊は今回用いた2種の小胞体マーカの局在と一致した。このうち小胞体シャペロン蛋白であるGRP78の免疫染色強度は野生型発現細胞と比べ増強していた。ゴルジ体には変化は認められなかった。凝集塊形成に伴い、ミトコンドリアは核周囲に集簇し、一部は膨化像を呈した。チューブリンも核周囲に集簇像を呈した。アクチン線維には量的減少が認められた。一方、低発現ベクターである pcDNA3の系では凝集塊の形成は認められなかったが、Lactacystinの添加により、核周囲に凝集塊

が形成され、高発現系の場合と同様に小胞体マーカの局在と一致した。

D. 考察

ウエスタンブロット解析より、変異型SOD1 蛋白質は溶解性の低下により不溶性画分に検出される比率が高くなることが明らかとなり、アミノ酸置換によりSOD1蛋白質のコンフォメーションが変化する可能性が示唆された。免疫細胞化学解析における結果と考え合わせると、このような構造変化を生じた変異型SOD1は、細胞内において許容された分解処理能力を超えて産生されると、凝集塊となって蓄積されると考えられた。この凝集塊がGRP78の局在と一致し、かつ免疫染色強度がコントロールに比べ著明に増強している所見から、変異型SOD1が小胞体内において変性蛋白質と認識されている可能性が示唆された。一方、Lactacystinを用いたプロテアソーム阻害実験から、低発現条件下においても変異型SOD1の凝集塊が形成されたことから、分解能が低下した場合においても同じような凝集塊が形成されると考えられた。ウエスタンブロット解析における変異型SOD1の発現抑制は変異型SOD1の小胞体内蓄積に伴い蛋白質の翻訳抑制が作動している可能性が示唆された。

以上の結果は、変異型SOD1と小胞体ストレスおよび蛋白質品質管理機構との関連性を強く示唆する所見と考えられた。また変異型SOD1の小胞体内蓄積に伴い、ミトコンドリアや細胞骨格系の機能障害が二次的に惹起される可能性が示唆された。

E. 結論

家族性ALSの病態には、小胞体ストレスおよび蛋白質品質管理機構の関与が強く示唆され、今後更に検討を要すると考えられる。

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

下濱 俊, 中溝知樹 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

研究要旨 ラット脊髄初代培養系に慢性的にグルタミン酸を曝露した際に認められる選択的運動ニューロン死が PDE 阻害剤の投与により抑制された。この保護効果には PDE5 または未同定の(新規の)アイソザイムが関与していると考えられた。PDE 阻害剤の ALS 治療薬としての可能性が示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する有効な治療法が切望されている。我々はすでに cGMP アナログが急性ラジカル毒性から運動ニューロンを保護すること、及び、PDE 阻害薬の投与により慢性グルタミン酸毒性による運動ニューロン死が抑制されることを見出し、PDE 阻害薬による ALS の新たな治療法の可能性を提案している。本研究では、ラット脊髄初代培養系を用いて各種 PDE アイソザイム選択的阻害剤の運動ニューロン保護効果を解析し、より選択的な ALS 治療の可能性について検討する。

B. 研究方法

胎生 16 日目のラット胎児より脊髄腹側を取り出し、トリプシン処理したあと、ピペッティングにて細胞を分散し、ポリエチレンイミンでコートしたカバースリップの上に撒いた。培養開始後 1, 4, 6, 8 日目に培地を交換し、11 日目にグルタミン酸+グルタミン酸トランスポーター阻害薬を含む培地に 24 時間曝露した。14 日目に固定し免疫染色に供した。SMI32 抗体を用いることにより、運動ニューロンを同定した。全ニューロンの同定には抗 MAP2 抗体を用いた。顕微鏡下で生存細胞数を計数し、無処置対照群に対する百分率としてその生存を評価した。

(倫理面への配慮)

動物は NIH の実験動物の使用に関するガイドライ

ンを遵守して扱われた。

C. 研究結果

培養脊髄ニューロンを低濃度(30 μ M)のグルタミン酸とグルタミン酸トランスポーター阻害薬に 24 時間曝露すると、選択的運動ニューロン死が認められた。このとき培地中にアイソザイム非選択的 PDE 阻害剤であるアミノフィリンを加えておくと、濃度依存性に、この運動ニューロン死が抑制された。同様の保護効果は PDE5,6,7,8,10,11 の選択的阻害薬ジピリダモールや PDE5,6 選択的阻害薬ザプリナストにも認められたが、PDE1 の選択的阻害薬ビンポセチン、PDE2 の選択的阻害薬 EHNA、PDE3 の選択的阻害薬ミルリノン、PDE4 の選択的阻害薬ロプリラムには認められなかった。

D 考察

PDE には多数のアイソザイムが存在し、一大スーパーファミリーを形成している。現在知られているだけで PDE1~11 のファミリーが存在し、今後さらに新規のアイソザイムが発見される可能性もある。各ファミリーには 1 から数個の遺伝子が存在し、そのそれぞれについて複数の splice variant が存在する。このうち、cGMP を分解するのは PDE1,2,5,6,9,10,11 の 7 つのファミリーである。

PDE のアイソザイム選択的阻害薬を用いた我々

の実験結果から運動ニューロン保護に関係すると思われるアイソザイムの候補を薬理的にしぼると、(現在までに同定されているアイソザイムのうちでは) PDE5 または 6 であると予想される。しかるに PDE6 は網膜に特異的に発現する酵素であることから、運動ニューロン保護効果には PDE5 もしくは未同定の(新規の)アイソザイムが関与していることが示唆される。今後、このアイソザイム、さらには splice variant を決定し、これに特異的な阻害剤を開発することで、ALS に対する新しい治療法につながるものが期待される。

E. 結論

PDE 阻害剤には運動ニューロン保護効果があり、ALS 治療薬としての可能性が示唆された。この保護効果には PDE のアイソザイムのうち、PDE5 もしくは未同定の(新規の)アイソザイムが関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Urushitani M, Inoue R, Nakamizo T, Sawada H, Shibasaki H, Shimohama S. Neuroprotective effect of cyclic GMP against radical-induced toxicity in cultured spinal motor neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:443-448
- 2) Nakamizo T, Urushitani M, Inoue R, Shinohara A, Sawada H, Honda K, Kihara T, Akaike A, Shimohama S. Protection of cultured spinal motor neurons by estradiol. *Neuroreport*. 2000;11:3493-3497.
- 3) Urushitani M, Nakamizo T, Inoue R, Sawada H, Kihara T, Honda K, Akaike A, Shimohama S. *N*-methyl-*D*-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca^{2+} overload in acute excitotoxic

motor neuron death: A mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca^{2+} influx. *J Neurosci Res* 2001;63: 377-387

- 4) Oeda T, Shimohama S, Kitagawa N, Kohno R, Imura T, Shibasaki H, Ishii N. Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Gen.* 2001; 10: 2013-23
- 5) Urushitani M, Shimohama S. The role of nitric oxide in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2001; 2: 71-81
- 6) Urushitani M, Nakamizo T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S. Protective effect of cyclic GMP against acute, but chronic oxidative injury of spinal motor neurons. In *Molecular Mechanisms and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis* (ed. by Abe K.) Elsevier, 325-331, 2001

2. 学会発表

- 1) 中溝知樹, 下濱 俊, 神吉理枝, 本田和弘, 木原武士, 澤田秀幸, 柴崎 浩, 赤池昭紀. サイクリックヌクレオチドと培養脊髄運動ニューロン保護効果. 第 42 回日本神経学会総会 東京, 2001 年 5 月
- 2) 大江田知子, 下濱 俊, 北川尚之, 井村徹也, 柴崎 浩. 酸化ストレスと Familial ALS: トランスジェニック *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) を用いて. 第 42 回日本神経学会総会 東京, 2000 年 5 月
- 3) 中溝知樹, 下濱 俊, 漆谷 真, 本田和弘, 木原武士, 澤田秀幸, 柴崎 浩, 井上亮拓, 赤池昭紀. 培養脊髄運動ニューロンの慢性グルタミン酸毒性に対するエストラジオールの保護効果. 第 41 回日本神経学会総会 松本, 2000 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

いまのところ予定なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

(分担研究者)

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻ページ	出版年
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	21 9246-54	2001
Kato M, Aoki M, Ohta, M, Nagai M, Ishizaki F, Nakamura S, Itoyama Y	Marked reduction of the Cu/Zn superoxide dismutase polypeptide in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis with the homozygous mutation	Neurosci. Lett	312 165-8	2001
Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, Nonaka I, Arahata K, Brown RH Jr.	The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle	Hum Mol Genet	10 1761-1766	2001
Aoki M, Liu J, Richard I, Keers SM, Marchand S, Bourg N, McKenna-Yasek D, Arahata K, Bushby K, Beckmann J and Brown RH Jr,	Genomic organization and novel mutations in dysferlin gene in Miyoshi myopathy and limb girdle dystrophy type 2B	Neurology	57 271-278	2001
Trotti D, Aoki M, Pasinelli P, Berger UV, Danbolt NC, Brown RH Jr, Hediger MA	Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity	J Biol Chem	276 576-82	2001

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻ページ	出版年
Tsuchiya K, Matsunaga T, Aoki M, Haga C, Ooe K, Abe K, Ikeda K, Nakano I	Familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column degeneration and basophilic inclusion bodies: a clinical, genetic and pathological study	Clin Neuropathol	20 53-9	2001
青木 正志、永井真貴子、加藤昌昭、糸山泰人	トランスジェネティック動物によるALSモデル	脳と神経	53 799-807	2001
Hirokawa, N., Y. Noda	Preparation of recombinant kinesin superfamily proteins using the baculovirus system	Methods Mol Biol	164 57-63	2001
Kikkawa, M., E. P. Sablina Y. Okada, H. Yajima R. J. Fletterick N. Hirokawa	Switch-based mechanism of kinesin motors	Nature	411 439 - 445	2001
Zhao C., J. Takita Y. Tanaka, M. Setou T. Nakagawa, S. Takeda W.-Y. Hong, S. Terada	Charcot-Marie-Tooth Disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bb	Cell	105 587-597	2001
Miki, H., M. Setou K. Kanashiro, N. Hirokawa	All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human	Proc Natl Acad Sci U S A	98 7004-7011	2001
Teng, J., Y. Takei A. Harada, T. Nakata J. Chen, N. Hirokawa	Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization	J Cell Biol	155 65-76	2001

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻ページ	出版年
Noda, Y., Y. Okada N. Saito, M. Setou Y. Xu, Z. Zhang, N. Hirokawa	KIFC3, a microtubule minus end-directed motor for the apical transport of annexin XIIIb-associated Triton-insoluble membranes	J Cell Biol	155 77-88	2001
Nakajima K., Y. Takei Y. Tanaka, T. Nakagawa T. Nakata, Y. Noda M. Sctou, N. Hirokawa	Molecular motor KIF1C is not essential for mouse survival and motor-dependent	Molecul Cellul Biol	22 866-873	2002
Jia, Q., Hogle, J. M., Hashikawa, T., Nomoto, A.	Molecular genetic analysis of revertants from a poliovirus mutant that is specifically adapted to the mouse spinal cord	J Virol	75(23) 11766-11772	2001
Koyama, A. H., Irie, H. Ueno, F., Ogawa, M. Nomoto, A., Adachi, A.	Suppression of apoptotic and necrotic cell death by poliovirus	J Gen Virol	82(Pt 12) 2965-2972	2001
Ohka, S., Nomoto, A.	The molecular basis of poliovirus neurovirulence	Dev Biol (Basel)	105 51-58	2001
Ohka, S., Nomoto, A.	Recent insights into poliovirus pathogenesis	Trends Microbiol	9(10) 501-506	2001
Ohka, S., Ohno, H. Tohyama, K., Nomoto, A.	Basolateral sorting of human poliovirus receptor alpha involves an interaction with the mu1B subunit of the clathrin adaptor complex in polarized epithelial cells	Biochem Biophys Res Commun	287(4) 941-948	2001

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻ページ	出版年
Y. Manabe, J.M. Wang, T. Murakami, H. Warita, T. Hayashi, M. Shoji K. Abe	Expressions of nitrotyrosine and TUNEL immunoreactivities in cultured rat spinal cord neurons after exposure to glutamate, nitric oxide, or peroxynitrite	J Neurosci Res	65 371-377	2001
H. Warita, Y. Manabe, T. Murakami, Y. Shiro, I. Nagano K. Abe	Early decrease of survival signal-related proteins in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene	Apoptosis	6 345-352	2001
Y. Manabe, H. Warita, Murakami, M. Shiote, T. Hayashi I. Nagano, M. Shoji, K. Abe	Early decrease of redox factor-1 in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene	Brain Res	915 104-107	2001
H. Warita, T. Murakami Y. Manabe, K. Sato, T. Hayashi, T. Seki, K. Abe	Induction of polysialic acid-neural cell adhesion molecule in surviving motoneurons of transgenic amyotrophic lateral sclerosis	Neurosci. Lett	300 75-78	2001
T. Murakami, I. Nagano, T. Hayashi, Y. Manabe, M. Shoji, Y. Setogushi, K. Abe	Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated E. Coli LacZ gene in the mice carrying mutant SOD1 gene	Neurosci. Lett	308 149-d	2001
T. Murakami, H. Warita, T. Hayashi, K. Sato, Y. Manabe, S. Mizuno, K. Yamane, K. Abe	A novel SOD1 gene mutation in familial ALS with low penetrance in females	J Neurol Sci	189 45-47	2001
Sun W, Funakoshi H, Nakamura T	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
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

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻ページ	出版年
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
Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matumoto K, 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
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
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
船越 洋、中村 敏一	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	Vol.34. 245-253	2002