

厚生労働科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業

筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に  
関わる新規治療法の開発に関する研究班

平成14年度 研究報告書

Annual Report of the Group Research  
on the Pathogenesis of and New Treatment  
for Amyotrophic Lateral Sclerosis

— 2 0 0 2 —

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 3 年 3 月 印刷

# 序 文

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）の病因・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14年度の「筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新規治療法の開発に関する研究班」の研究報告を公表する。

2003年3月

「筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新規治療法の開発に関する研究」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）

筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新規治療法の開発に関する研究班  
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	岡野 栄之	慶應義塾大学医学部生理学	教授	T 03-5363-3747 F 03-3357-5445
	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
	祖父江 元	名古屋大学大学院医学系研究科神経内科	教授	T 052-744-2391 F 052-744-2394
	阿部 康二	岡山大学医歯学総合研究科神経病態内科学	教授	T 086-235-7365 F 086-235-7368
	船越 洋	大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生学分野	助教授	T 06-6879-3783 F 06-6879-3789
	研究協力者	菊地 誠志	北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野	助手
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
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
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
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	助教授	T 075-751-3771 F 075-751-3265
宮武 伸一		大阪医科大学脳神経外科	助教授	T 0726-83-1221 F 0726-83-4064
加藤 信介		鳥取大学医学部脳研神経病理	助教授	T 0859-34-8034 F 0859-34-8289
片山 泰一		大阪大学大学院医学系研究科 プロセッシング機能形態分野	助手	T 06-6879-3221 F 06-6879-3229
渡部 和彦		東京都神経科学総合研究所 分子神経病理研究部門	副参事 研究員	T 042-325-3881 F 042-321-8678

# 目 次

## I. 研究者一覧

## II. 総括研究報告

糸山 泰人

## III. 研究報告（分担研究者）

1. ALSトランスジェニックラットにおける神経前駆細胞の挙動とHGF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 糸山 泰人
2. ES細胞の神経分化  
慶應義塾大学医学部生理学教室 岡野 栄之
3. ベクターとしてのポリオウイルスに関する研究  
東京大学大学院医学系研究科微生物学教室 野本 明男
4. 変異 SOD1 の mitochondria 毒性と神経細胞変性  
—— Dorfin の細胞死抑制効果との関連 ——  
名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学講座 祖父江 元
5. VEGF と運動ニューロン死  
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学 阿部 康二
6. 新しい筋萎縮性側索硬化症（ALS）の治療法開発をめざして  
—— HGF およびそのファミリー分子（HLP）の機能解析 ——  
大阪大学大学院医学系研究科組織再生分野 船越 洋

## IV. 研究成果一覧（分担研究者）

## V. 研究報告（研究協力者）

1. ラット脊髄組織培養（slice culture）におけるプロテアソーム阻害剤の作用  
北海道大学大学院医学研究科神経内科 菊地 誠志
2. 変異 SOD1 の toxic gain of function の解析  
大阪大学医学系研究科生化学 谷口 直之
3. ALS に対するエダラボンを用いたオープン臨床試験  
国立精神・神経センター国府台病院神経内科 吉野 英
4. 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  
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
5. 筋萎縮性側索硬化症におけるAMPA受容体を介する神経細胞死のメカニズムに関する研究  
—— サブユニット mRNA 分子変化からの解析 ——  
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

6. ミトコンドリア膜保護剤による筋萎縮性側索硬化症の予防治療に関する研究  
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
7. ALS 遺伝子治療の基礎実験 —— AAV ベクターによる骨格筋への遺伝子導入の血清型による相違  
自治医科大学神経内科 中野 今治
8. 変異 SOD1 の安定性と LBI 形成 —— ヒト FALS とモデルマウスでの検討  
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
9. 筋萎縮性側索硬化症の皮膚病変と galectin - 1  
山形大学医学部第三内科 加藤 丈夫
10. 脊髄運動ニューロンに対するニコチンの神経保護効果に関する研究  
京都大学大学院医学研究科臨床神経学 下濱 俊
11. 「FGF-2 発現ベクターによる神経細胞死の抑制とその保護効果」ならびに「脊髄神経細胞への遺伝子導入用ベクターの新規開発」に関する研究  
大阪医科大学脳神経外科 宮武 伸一
12. SOD1 遺伝子異常を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) とトランスジェニックラット (H46R・G93A) とにおける SOD1 凝集とレドックス制御との関連に関する研究  
鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理 加藤 信介
13. SOD1 遺伝子異常を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) 及び G93A トランスジェニックマウスの肝組織における蛋白発現に関する研究：レドックス制御関連酵素を中心に前角細胞との比較検討  
鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理 加藤 信介
14. 筋萎縮性側索硬化症(ALS) 発症機構に対する小胞体ストレスの影響に関する研究  
大阪大学大学院医学系研究科プロセッシング機能形態 片山 泰一
15. 成体ラット運動ニューロン損傷に対する神経成長抑制因子 (GIF) 組換えアデノウイルスの保護効果  
東京都神経科学総合研究所分子神経病理研究部門 渡部 和彦
16. 変異 SOD 1 導入ラットにおける顔面神経損傷後に生じる運動ニューロン易傷害性：H46R ラットと G93A ラットの比較検討  
東京都神経科学総合研究所分子神経病理研究部門 渡部 和彦

## VI. 平成14年度班会議プログラム

# 總 括 研 究 報 告

筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新規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

神経難病のなかでも最も過酷な疾患とされる筋萎縮側索硬化症（ALS）は、その病因・病態の解明と新規治療法の開発が切望される。現在 ALS の病態研究としては家族性 ALS の原因である変異 SOD 遺伝子による運動ニューロン死の機序の解明が最も重要と考えられている。本研究班の目的は ALS の病因・病態解明を行いながらも ALS の治療薬と治療法を新たに開発することにある。本年度の成果としては①肝細胞増殖因子（HGF）を本研究班で開発された大型 ALS 動物モデルであるトランスジェニック（Tg）ラットに持続髄腔内投与療法を行い、臨床的に発症の遅延を認めるとともに組織学的に脊髄における運動ニューロンの有意な細胞死減少を認めた。この結果は ALS 患者の新たな治療の試みとして極めて重要なものと考えられる。②ALS の根本治療として遺伝子導入療法は極めて重要で、その為には有用なベクターの開発は必須である。ポリオウイルスは運動ニューロンに特異的に感染する特徴を持つために ALS 遺伝子導入治療のベクターとして有力視されている。現在、ベクターのゲノムを改変してポリオウイルスの特性を有しながら、どの程度の大きさの遺伝子が挿入可能かの検討を行い、ゲノムの改変により HGF を挿入可能であることが明らかとなった。③将来的な ALS の治療法として神経幹細胞移植療法は重要であるが、今回マウス ES 細胞からの培養において運動ニューロンないし運動ニューロンの前駆細胞への誘導が可能になり、かつそれらの細胞が培養レベルで myotube にコンタクトすることが明らかとなった。その他グルタミン酸の AMPA 受容体の GluR2 の遺伝子導入、ニコチン酸、カロニチン、エダラボンなどの薬剤が運動ニューロン細胞死の抑制ないしは ALS 治療での有用性の検討が報告されている。

## 分担研究者

岡野栄之（慶應義塾大学医学部生理学）

野本明男（東京大学大学院医学系研究科微生物学）

祖父江 元（名古屋大学大学院医学系研究科神経内科）

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・病態が不明の進行性の難治性神経疾患である。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極めて予後不良な疾患である。本研究班はこの神経難病の中でも最も過酷な疾患である ALS の病因と病態の解明を行いつつ、新規の治療薬や治療法を確立することが研究目的である。今までの本班の研究成果では、変異 Cu/Zn superoxide dismutase（SOD）遺伝子導入 ALS ラットを世界に先駆けて開発し、

このラットを用いての病因・病態解明ならびに治療法の開発が進められている。また新規治療薬としては本邦で発見開発された肝細胞増殖因子 (HGF) が ALS Tg マウスにおいて遺伝子工学的に治療が成功している。これらの研究成果の流れをくみ、新たに発足した研究班では、ALS の新規治療法を開発する目的のもとに、以下の 3 つを主な目的にして研究を行う。①現在 ALS の新規治療薬の候補として最も有力視されている HGF の有用性の確立と臨床への応用を検討する。②ALS 患者の変性しつつある脊髄前角細胞に薬剤を有効に導入する遺伝子治療のためのベクターの検討を行う。③将来的な ALS 治療において神経幹細胞の導入を検討する。

## B. 研究方法

ALS の病因・病態は不明であるが、いくつかの有力な病因仮説が存在する。なかでも SOD の遺伝子変異によるもの、興奮性アミノ酸であるグルタミン毒性による病因ならびに重金属毒性などが考えられている。これらの中でも SOD 病因論が最も重要なものと考えられ、現在では変異 SOD 遺伝子導入にて ALS 動物モデルが作成され、病態研究ないし本研究班の主要目的である新規治療法の開発研究に用いられている。

### 1. ALS 治療への肝細胞増殖因子 (HGF) の応用

HGF は神経栄養因子の中でも運動ニューロンに対し強い保護作用を持ち、遺伝子操作により ALS に対する効果が認められている。この HGF を新たに作製された ALS 動物モデルである Tg ラットに対し髄腔内投与を行い、その治療効果を臨床的および組織学的に確かめる。また、遺伝子操作により HGF を筋肉特異的プロモーター (MCK プロモーター) を用いて筋肉に特異的に HGF を発現する Tg マウスを作製し、その発現が ALS に対して治療効果を示すかを ALS Tg マウスとのダブル Tg マウスモデ

ルにて検討する。また、HGF 以外の神経栄養因子として神経成長抑制因子 (growth inhibitory factor :GIF) と塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) の神経保護作用の有無を調べるとともにこれらをベクターと組み合わせて動物モデルに対して治療応用可能かを検討した。

### 2. 遺伝子治療に向けてのベクターの開発

ALS の遺伝子治療の開発には候補治療薬が変性運動ニューロンに有効に到達することが重要である。これらの目的でアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが検討されてきた。

ポリオウイルスは運動神経細胞に特異的に感染しそこで複製する能力を有している。この特性を利用して ALS 遺伝子治療のベクターとして用いるべく研究開発を行う。ポリオウイルスをベクターとして用いるには導入する候補薬剤遺伝子のサイズのためどの程度ポリオウイルスゲノムを改変できるのかの点とポリオウイルス自体の持つ神経毒性をどの程度減らすかが問題になる。この点を明らかにするためにベクターとして用いるポリオウイルスゲノムの改変を検討した。

### 3. ALS 新規治療に対する神経幹細胞移植の可能性

ALS の将来的な治療として胚性幹細胞 (ES 細胞) からニューロスフェアを作成し、そこから運動ニューロンやその前駆細胞を誘導し、それらを細胞移植によって ALS を治療する方法が考えられる。これらの新規治療法を目指してマウスの ES 細胞から胚様体を経て多能性神経幹細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法を確立し、この過程で後方化因子であるレチノイン酸を作用させ運動ニューロンの誘導が可能かどうかを検討した。

### 4. その他の新規治療の可能性

ALS の病因論にはグルタミン酸毒性があるが、その病態としては AMPA 受容体の GluR2



の編集率低下が考えられている。この病因仮説に従いGluR2を高発現させるTgマウスとALS TgマウスのダブルTgマウスを作成し、GluR2の運動ニューロン死の抑制効果を検討した。その他、神経保護作用を持つと考えられるvascular endothelial growth factor、カルニチン、ニコチン、フリーラジカルスカベンジャー(エダラボン)の変性運動ニューロンへの細胞保護効果を検索し、臨床応用の可能性を検討した。

(倫理面の配慮)

各研究施設における倫理委員会規定に従い十分なインフォームド・コンセントを施行し、動物実験に関しては倫理的動物実験指針に従い実験を行った。

## C.D. 研究結果と考察

### 1.HGFのALSへの治療応用

① Tgラットに対するHGF持続髄腔内投与の効果

TgラットにHGF低容量(40 $\mu$ g)と高容量(200 $\mu$ g)投与を行った結果、高容量群では臨床的に発症が約10日間延長した。また、腰髄レベルにおける運動ニューロン数を測定するとPBSのコントロール投与群に対してHGFでは容量依存性に運動ニューロンの数が保存されていることが明らかになった。

② MCKプロモーターを用いて作成したHGF Tgマウスにおいて、HGFのmRNAとタンパク質レベルをRPA法とELISA法で解析した結果、ラットHGFが筋肉特異的に発現するTgマウスのラインを3系統確認した。これらのラインの筋抽出液には外来性HGFタンパクが高レベルに発現していることが確認された。現在この筋肉HGF TgマウスとALS Tgマウスとを交配させ、ダブルTgマウスを作成し、筋肉HGFの運動ニューロン保護効果を検討中である。

### 2.ポリオウイルスベクターの開発

ポリオウイルスをALSの遺伝子治療のベクターとして用いるためにポリオウイルスゲノムはどこまで改変可能であるかを検討した。その結果、ウイルスゲノムのキャプシドタンパク質領域を約1.8kbまでの欠失させたRNAレプリコンはスタンダードウイルス株の重感染によりキャプシドタンパク質によりパッケージされることが明らかになった。現在のところ約3kbの外来mRNAの挿入が可能であることも明らかになっており、したがって新規の神経栄養因子であるHGFやXIAP(X-linked inhibitor of apoptosis factor)などのmRNAのコーディング領域はそれぞれ2184塩基、1491塩基であるので、ポリオウイルスのベクターとしての可能性は十分あるものと考えられた。

### 3.神経幹細胞移植の可能性

マウス胚性幹細胞からニューロスピア形成過程においてレチノイン酸を作用させることにより、マウスES細胞から運動ニューロンやその前駆細胞のマーカーであるHB9陽性細胞を高率に誘導することができた。これらの細胞をin vitroで筋芽細胞由来のmyotubeと共培養するとmyotubeとのコンタクトが観察された。現在マウス胎児への移植の方法を検討している。

一方、ALS Tgラットの腰髄では運動ニューロンの脱落前(15週例)からコントロールラットに比べて優位にBrdU陽性細胞が脊髄の後角、白質、中心管上衣細胞および前角後半に認められた。これらの多くは二重染色の結果アストログリア、マイクログリアなどのグリア系前駆細胞の可能性と考えられた。

### 4.その他の新規治療薬の開発

運動ニューロンにほぼ特異的にGluR2遺伝子を過剰発現するTgマウスが作成された。このTgマウスとG93A SOD1 TgマウスのダブルTgマウスでは発症時期で約19.3%、生存日数で約14.3%の遅延が認められ、このAMPA型受容体を介したCa<sup>2+</sup>流入は変異SOD毒性を助

長させる大きな要因であることが示された。また、ミトコンドリア膜保護作用を持つカルニチン酸を ALS Tg マウスに経口投与 (400 mg/kg/day) を摂取させ、臨床経過をロタロットによる運動能力や発症時期および寿命を検討したところ、カルニチン投与群ではコントロールと比較して約 1 ヶ月発症が遅延しその寿命も約 1 ヶ月延長した。またラット脊髄初代培養系を用いてグルタミン酸毒性による運動ニューロン死に対してニコチン酸を加えることにより濃度依存性に運動ニューロン死が抑制された。この保護効果は $\alpha 4$  および $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬に抑制された。したがってこれらのニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬が ALS 治療薬としての可能性があることが示唆された。

#### E. 考察

本研究班では ALS の病因解明を行いつつ新規治療法を開発することにある。HGF を本研究班にて開発された大型 ALS モデルである Tg ラットに髄腔内投与を行ったところ、臨床的に ALS の発症を遅らせることができ、かつ脊髄前角細胞の運動ニューロン死の抑制効果を認めた。このことは今後臨床応用の道を開くもので重要と考える。将来的に ALS の治療法として有望な遺伝子導入治療には、効率的なベクターの開発が重要と考えられる。運動ニューロンに特異的に感染し複製するポリオウイルスは、効率よく運動ニューロンに薬剤導入できる有効なベクターの候補である。本年度の研究においてポリオウイルスベクターは HGF の遺伝子導入に対しても十分その運動ニューロン特異感染性を発揮し、かつポリオウイルスの毒性を削除することが可能であることが明らかにされた。今後はポリオウイルスベクターを用いての遺伝子導入実験の展開が期待される。さらにもう一つの ALS の将来的治療としては神経幹細胞移植が有力視されている。マウスの ES 細胞から運動ニューロンないしその前駆細胞の誘

導が可能になり、かつそれらの細胞が myotube にコンタクトすることが明らかになった。このことは動物モデルにおいての神経細胞移植による ALS の治療実験の展開が可能であることを期待させる。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sun W, Funakoshi H, Nakamura T. Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci* 22 (2002) 6537-48

Sakakibara S, Nakamura Y, Koike M, Takano H, Uchiyama Y, Noda T, Okano H. RNA-Binding Protein Musashi Family, Roles for CNS Stem Cells and a Subpopulation of Ependymal Cells Revealed by Targeted Disruption and Antisense Ablation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 15194-15199

Katsuno M, Adachi H, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, Sang C, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G. Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 35 (2002) 843-854

Jia Q, Liang F, Ohka S, Nomoto A, Hashikawa T. Expression of brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system of mice using a poliovirusbased vector. *Journal of Neurovirology*, 8 (2002) 14-23

Manabe Y, Nagano I, Gazi MSA, Murakami T, Shiote M, Shoji M, Kitagawa H, Setoguchi Y, Abe K. Adenovirus-mediated gene transfer of

GDNF prevents motor neuron loss of transgenic model mice for ALS. *Apoptosis*, 7 (2002) 329-334

Nagano I, Murakami T, Shiote M, Abe K, Itoyama Y. Ventral root avulsion leads to downregulation of glur2 subunit in spinal motoneurons in adult rats. *Neuroscience* 117 (2003) 139-146

青木正志、永井真貴子、加藤昌昭、糸山泰人、新しい筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の動物モデル、最新医学、最新医学社、57 (2002) 1622-1627

青木正志、トランスジェニックラットによる新しい ALS モデル、*Clinical Neuroscience*、中外医学社 20 (2002) 858-859 他

## 2. 学会発表

Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH Jr, Itoyama Y. Transgenic rats carrying human mutant copper-zinc superoxide dismutase genes with amyotrophic lateral sclerosis, 54th Annual Meeting of American Academy of Neurology, Denver, April 13-20, 2002

青木正志、永井真貴子、加藤昌昭、神位りえ子、糸山泰人、三好一郎、笠井憲雪、変異 SOD1 導入トランスジェニックラットにおける運動ニューロン死の病態解析；第43回日本神経学会総会 2002.5 札幌

青木正志、加藤昌昭、永井真貴子、三好一郎、神位りえ子、石垣あや、笠井憲雪、糸山泰人、臨床的特徴のある Cu/Zn SOD 遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスによる ALS モデルの作製；第47回日本人類遺伝学会

2002.11 名古屋

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)

分 担 研 究 者

研 究 報 告

## ALS トランスジェニックラットにおける神経前駆細胞の挙動と HGF 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** ヒト変異 *CuZn SOD* トランスジェニックラット脊髄では、運動ニューロン脱落以前より神経系前駆細胞が有意に増殖していた。しかし、その多くはグリア系細胞に分化していることが示唆された。一方、同モデルラットに発症前より肝細胞増殖因子 (HGF) を持続的に髄腔内投与すると、HGF 用量依存性に脊髄運動ニューロン死が抑制され、発症遅延が認められた。

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

研究協力者・青木 正志<sup>\*</sup>、割田 仁<sup>†</sup>、永井真貴子<sup>\*</sup>、  
加藤 昌昭<sup>\*</sup>、石垣 あや<sup>\*</sup>、松本 有史<sup>\*</sup>、神位りえ子<sup>\*</sup>、  
船越 洋<sup>‡</sup>、中村 敏一<sup>‡</sup>

<sup>\*</sup>東北大学大学院医学系研究科神経内科

<sup>†</sup>国立療養所米沢病院神経内科

<sup>‡</sup>大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis 以下 ALS) は、病因病態の解明と有効な治療法確立が強く希求されている致死的神経変性疾患の代表である。1993 年 *CuZn superoxide dismutase (CuZn SOD)* 遺伝子が一部の家族性 ALS の原因遺伝子として同定されたが、なお *CuZn SOD* の異常がなぜ選択的運動ニューロン死をもたらすかは依然として不明である。

これまでに我々は ALS の新しい動物モデルとして、1) わが国で報告された特異な臨床的特徴を持つ His46Arg (H46R) と 2) すでにトランスジェニックマウスが普及している Gly93Ala (G93A) の 2 種類の変異を導入した変異 *CuZn SOD* トランスジェニックラット (Tg ラット) を確立してきた。

成体中枢神経の再生能が示されてきた近年、a) 外来性の神経細胞移植あるいは b) 内在性神経系前駆細胞を利用した再生医療が変性疾患に対する新

たな治療戦略として注目されている。実際、成体ラット脊髄においても生理的条件下で神経系前駆細胞が存在し、主にグリア系細胞を供給していることが報告されている。しかし、ALS のような変性疾患の病態下における脊髄神経系前駆細胞の挙動は不明である。我々は ALS における再生医療の開発を目的として、上述の b) の前段階としてだけでなく a) においても移植する組織環境 (niche) を知ることを目的に、本モデル病態下における神経系前駆細胞の挙動解析を開始した。

一方、これまでに大阪大学の船越らのダブルトランスジェニックマウス作製により、G93A 変異 *CuZn SOD* トランスジェニックマウスに対する肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) の発症遅延、寿命延長効果が報告され、ALS の有効な治療薬として HGF が期待されている。我々はその臨床応用を目的に Tg ラット髄腔内への HGF 持続投与を行い、その効果を検討した。

### B. 研究方法

**研究 1.** 発症前かつ脊髄運動ニューロン脱落前 (15 週齢) および発症後 (21 週齢) の H46R Tg ラットと週齢一致非 Tg littermate ラット (各群 n=5) に、bromodeoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg) を 7 日間連日腹腔内投与した。最終投与より 2 日後、灌流固定後凍結切片を作成した。抗 BrdU 抗体による免疫組織化学を行い腰髄一切片あたりの BrdU 陽性細胞を定

量した. さらに各種選択的細胞マーカー(NG2, APC, OX-42, GFAP,  $\beta$ III-tubulin)との二重染色を加えて BrdU との二重陽性細胞を観察した.

研究2. G93A Tg ラットを対象に浸透圧ポンプ(Alzet Model 2004)を用いて髄腔内にリコンビナントヒト HGF(rhHGF)を持続投与した. 吸入麻酔下に第3腰椎背側より椎弓小切除を行い, 同部位よりカテーテ

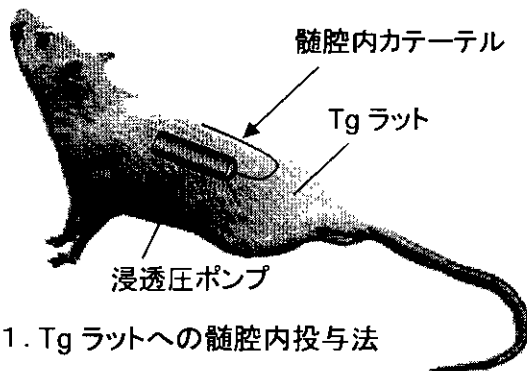


図1. Tg ラットへの髄腔内投与方法

ルを挿入, ポンプは皮下に留置して術創を閉鎖した(図1). 3群(各群 n=8)の Tg ラットにそれぞれ

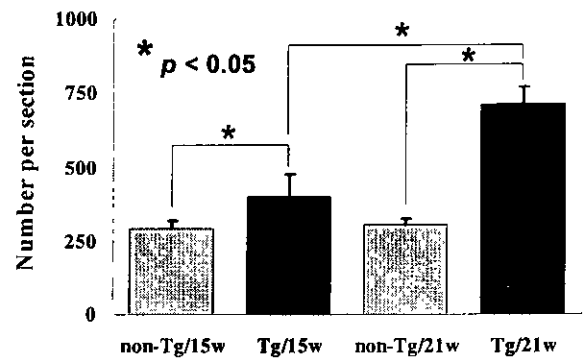


図2. BrdU 陽性細胞数

H46R Tg ラット腰髄では運動ニューロン脱落前の15週齢より有意に BrdU 陽性細胞が増加し(Tg/15w), 発症後の21週齢ではさらに増加していた(Tg/21w). non-Tg 非Tg ラット, Tg: Tg ラット, \*  $p < 0.05$

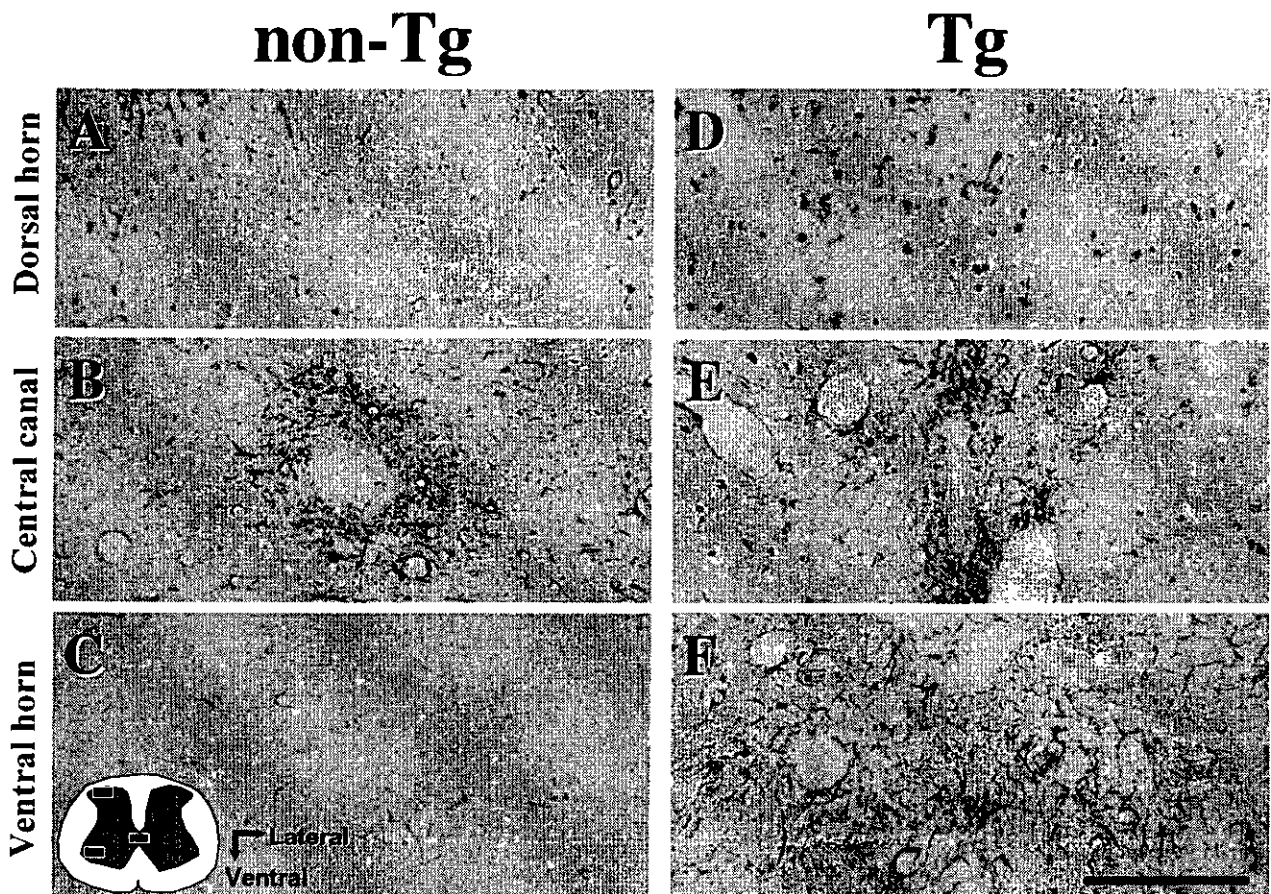


図3. 腰髄における BrdU・GFAP 免疫組織化学

非 Tg ラット(左列 A-C, non-Tg)腰髄において, BrdU 陽性細胞は後角(A), 中心管周囲(B)に散在したが, 前角(C)にはほとんど認められなかった. 21 週齢(発症後)の H46R Tg ラット腰髄(右列, Tg)では後角(D), 中心管周囲(E), 前角(F)のいずれにおいても BrdU 陽性細胞が非 Tg ラット(左列 A-C)に比較して増加していた. また Tg 前角(F)では GFAP 陽性の反応性アストロサイトが増殖しており, これらの多くは BrdU と二重陽性を示していた. Bar. 100  $\mu$ m

vehicle (PBS) および 40  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{g}$  の rhHGF を発症前の 100 日齢から 1ヶ月間にわたり投与後、灌流固定後パラフィン包埋切片を作成。Nissl 染色標本で腰髄一切片あたりの運動ニューロン数を定量した。

### C. 研究結果

研究1. 非 Tg ラット腰髄では主に後角、散在性に白質、ときに中心管周囲の上皮細胞に BrdU 陽性細胞が認められたが、週齢による有意な増減はなかった (図2)。これに対し、Tg ラット腰髄では運動ニューロン脱落前 (15 週齢) から非 Tg ラットに比して有意に BrdU 陽性細胞が増加していた。これはまた、病態の進行に伴ってさらに顕著となった (図2)。

Tg ラットにおける BrdU 陽性細胞の局在をみると、非 Tg ラットと同じ後角、白質、中心管上皮細胞だけでなく、前角も含めた灰白質と広汎にわたって認められた (図3)。二重染色の結果、Tg ラットにおける BrdU 陽性細胞の多くはアストログリア、マイクログリア、グリア系前駆細胞といった選択的細胞マーカーと二

重陽性を示していた。

研究2. HGF 投与群においては vehicle 投与群に比較して有意に腰髄運動ニューロン数が保たれていることが明らかとなり、このことは HGF 投与量に依存的であった (図4, 5)。また、高用量 (200  $\mu\text{g}$ ) 投与群では発症が約 10 日間延長した。

### D. 考察

研究1. 本モデルの病態下では、運動ニューロン脱落以前より神経系前駆細胞が広汎に増殖していると考えられたが、その多くはグリア系細胞へ分化している可能性が示唆された。その起源と運命についてはさらなる検索が必要である。

研究2. HGF の髄腔内持続投与は ALS に対する新しい治療法として有効である可能性が示された。今後は発症後投与での病態進行抑制効果、HGF 有効性のメカニズム、髄腔内投与における副作用の有無などについてもより詳細な検討が必要である。

### E. 結論

本 Tg ラットは従来のマウスモデルに比較して個体サイズが大きいことから、生化学的あるいは生理的な解析が容易である。さらに、脊髄運動ニューロンへ効率よく薬物を到達させ、しかも全身への副作用を軽減することができる髄腔内投与も、本 Tg ラットでは容易で

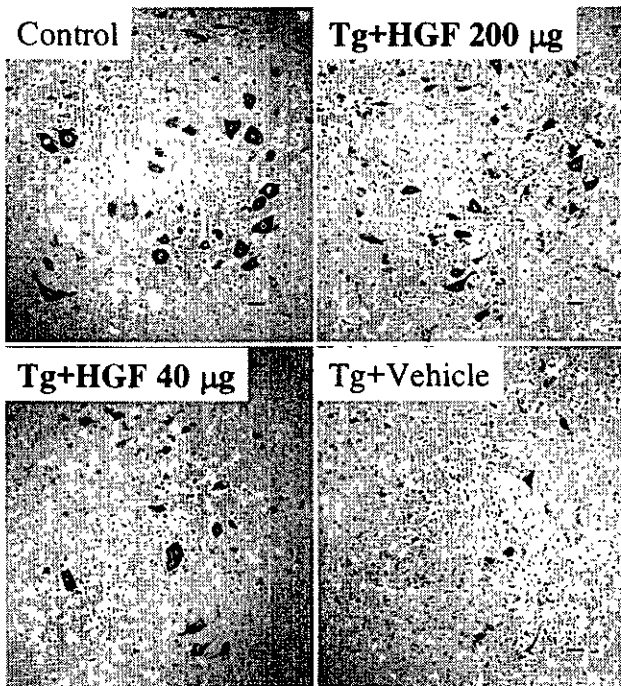


図4. 腰髄前角 (Nissl 染色)

Vehicle を投与した G93A Tg ラット (Tg+Vehicle) では非 Tg ラット (control) に比べ運動ニューロン脱落が著しい。これに対し、HGF を投与群では用量依存的に運動ニューロン脱落の抑制効果が認められた (Tg+HGF 40  $\mu\text{g}$  40  $\mu\text{g}$  投与群, Tg+HGF 200  $\mu\text{g}$  200  $\mu\text{g}$  投与群)。Bar: 40  $\mu\text{m}$

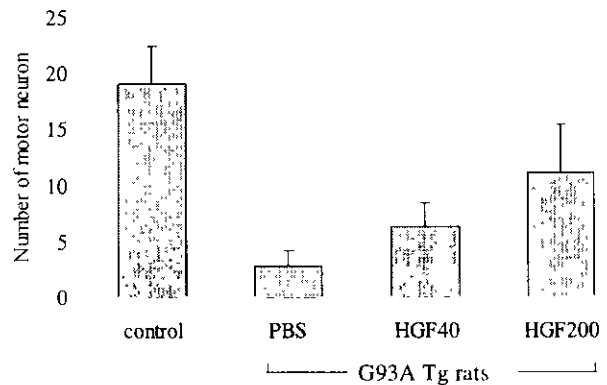


図5. 腰髄運動ニューロン数

Vehicle を投与した G93A Tg ラット (PBS) では非 Tg ラット (control) に比べ運動ニューロン脱落が明らかである。これに対し、HGF を投与した G93A Tg ラットでは用量依存的に運動ニューロン脱落の抑制効果が認められた (HGF40 40  $\mu\text{g}$  投与群, HGF200 200  $\mu\text{g}$  投与群)

ある。このような Tg ラットによる新しい ALS モデルは病態解析だけでなく、様々な薬物の有効性評価、将来的な遺伝子治療や神経幹細胞移植を含めた新しい治療法開発のために非常に有用と考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

青木正志、永井真貴子、加藤昌昭、糸山泰人、新しい筋萎縮性側索硬化症（ALS）の動物モデル、最新医学、最新医学社、57 (2002) 1622-1627

青木 正志、トランスジェニックラットによる新しい ALS モデル、Clinical Neuroscience、中外医学社 20 (2002) 858-859

### 2. 学会発表

Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH Jr, Itoyama Y. Transgenic rats carrying human mutant copper-zinc superoxide dismutase genes with amyotrophic lateral sclerosis, 54th Annual Meeting of American Academy of Neurology, Denver, April 13-20, 2002

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、第 42 回日本神経学会総会 2001.5 東京

永井真貴子、青木正志、加藤昌昭、三好一郎、笠井憲雪、糸山泰人変異 SOD1 を導入したトランスジェニックラットの作製；第 43 回日本神経学会総会 2002.5 札幌

青木正志、永井真貴子、加藤昌昭、神位りえ子、糸山泰人、三好一郎、笠井憲雪、変異 SOD1 導入トランスジェニックラットにおける運動ニューロン死の病態解析；第 43 回日本神経学会総会

2002.5 札幌

青木正志、加藤昌昭、永井真貴子、三好一郎、神位りえ子、石垣あや、笠井憲雪、糸山泰人、臨床的特徴のある Cu/Zn SOD 遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスによる ALS モデルの作製；第 47 回日本人類遺伝学会 2002.11 名古屋

## 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)



**研究要旨** 筋萎縮性側索硬化症(ALS)で選択的に障害される運動ニューロンやその前駆細胞をマウス胚性幹細胞から誘導する培養法を確立した。この細胞の *in vitro*、*in vivo* での性質を明らかにし、ALSの病態解析や細胞移植による治療法の研究に利用する。

#### A. 研究目的

マウス胚性幹細胞から運動ニューロンやその前駆細胞を誘導する培養法を確立し、誘導した運動ニューロンをALSの病態解析や薬剤スクリーニングに利用し、再生医療の見地から細胞移植などの新規治療法の開発を試みる。

#### B. 研究方法

我々はマウス ES 細胞から胚様体(Embryoid Body;EB)を経て、多能性神経幹細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法を確立してきた。この過程で後方化因子であるレチノイン酸(RA)を作用させることにより、神経管後方より発生する運動ニューロンを効率よく誘導することを試みる。分子生物学的手法、細胞培養法、免疫染色法を駆使し、誘導した細胞の *in vitro* での性質を明らかにし、超音波ガイド下にマウスの胎児に移植することで *in vivo* での細胞の生着とその動態を確かめる。また ALS モデル動物を用いて細胞移植治療を試みる。同時に傾斜台や3次元自動運動解析装置などを使った ALS モデル動物の治療効果判定法も確立する。

(倫理面への配慮)

本報告書の内容にはヒトを用いた研究は含まれていない。モデル動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。

#### C. 研究結果

ニューロスフェア形成過程において RA を作用させることにより、マウス ES 細胞から運動ニューロンやその前駆細胞のマーカーである HB9

陽性細胞を高率に誘導することができた。これらの細胞を *in vitro* で筋芽細胞株由来の myotube と共培養すると myotube とのコンタクトが観察された。またマウス胎児への移植も試みているところである。

#### D. 考察

誘導した細胞は運動ニューロンあるいはその前駆細胞のマーカーである HB9 を発現し、myotube との接触も認められたことから、生体内に生着し、機能し得るものであると考えられた。

#### E. 結論

マウス ES 細胞から運動ニューロンあるいはその前駆細胞を高率に誘導する方法を確立した。誘導した細胞を用いた *in vitro*、*in vivo* での機能解析が可能となり、今後 ALS モデル動物への移植実験も行っていく予定

である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Matsuno, K., Ito, M., Hori, K., Miyashita, F., Suzuki, S., Kishi, N., Artravanis-Tsakonas, S. and Okano, H. Involvement of a proline-rich motif and a RING-H2 finger in a function of Deltex as a regulator of Notch signaling. *Development* 129, 1049-1059 (2002)

Ogawa, Y., Sawamoto, K., Miyata, T., Miyao, S., Watanabe, M., Toyama, Y., Nakamura, M., Bregman, B.S., Koike, M., Uchiyama, Y., Okano, H.: Transplantation of *in vitro* expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J. Neurosci. Res.* 69, 925-933 (2002)

Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., Ichijo, H., Okano, H. and Miura, M. Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*. *Nature Cell Biol* 4 705-710 (2002)

Sakakibara, S., Nakamura, Y., Koike, M., Takano, H., Uchiyama, Y., Noda, T. and Okano, H. RNA-Binding Protein Musashi Family, Roles for CNS Stem Cells and a Subpopulation of Ependymal Cells Revealed by Targeted Disruption and Antisense Ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15194-15199 (2002)

他 14 編

##### 2. 学会発表

岡野栄之：パーキンソン病、ALS、脊髄損傷などへの展望 第43日本神経学会総会 札幌 2002年5月30日

岡田洋平、島崎琢也、岡本仁、祖父江元、岡野栄之：マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導の試み、第43回日本神経学会総会 札幌 2002年5月31日

他 多数

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

現在出願中 (1 件)

##### 2. 実用新案録

特になし

##### 3. その他

特になし

## 厚生労働省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

（筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新規治療法の開発に関する研究班分担）研究報告書

### ベクターとしてのポリオウイルスに関する研究

分担 研究者 野本 明男 東京大学大学院医学系研究科教授

小児マヒの病因であるポリオウイルスは、血流中または骨格筋に接種すると、中枢神経系に侵入、運動神経細胞に到達し、そこで複製する。このポリオウイルスの性質は、運動神経細胞特異的な疾患である筋萎縮性側索硬化症の治療を目的としたウイルスベクターとなる可能性を秘めている。今年度は、ポリオウイルスゲノムはどこまで改変が可能であるかを理解するための研究を行った。その結果、ウイルスのキャプシドタンパク質領域を約 1.8 kb 欠失させた RNA でも重感染させたスタンダードウイルスのキャプシドタンパク質によりパッケージされることを明らかにした。また約 3 kb の外来 mRNA の挿入が可能であること、神経病原性発現の主角と考えられる 2A プロテアーゼの欠失が可能であることなどを示唆する結果を得た。

#### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動神経細胞が損傷を受けた結果、発症する疾患である。一方、小児マヒの病因であるポリオウイルスは、運動神経細胞に特異的に感染し、複製する能力を有している。このウイルスの性質を利用し、ALS の進行を阻止、または ALS を治療する物質を運動神経細胞で発現させることが目的である。

ALS の進行を止める可能性のある物質としては、HGF (hepatocyte growth factor) と XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) の存在が知られている。これらの mRNA のコーディング領域は、それぞれ 2184 塩基および 1491 塩基である。ポリオウイルスのゲノムは約 7500 塩基であるので、上記の比較的長い外来 mRNA の発現が可能であるかが問題である。さらに運動神経細胞に対す

るポリオウイルス自身の毒性の問題も考えなくてはならない。そこで本年度は、ポリオウイルスゲノムの改変はどこまで可能であるかを検討した。

#### B. 研究方法

ポリオウイルス I 型の強毒マホニー株ゲノムの全長 cDNA の主にキャプシドタンパク質コーディング領域に相当する部分に種々の欠失変異を導入し、その cDNA から T7 RNA ポリメラーゼにより、*in vitro* で RNA を合成した。それらを HeLa 細胞にトランスフェクションすることにより、RNA レプリコンとしての活性を測定した。活性は <sup>32</sup>P 標識したプローブを使用して、ドットプロット法により測定した。また、RNA をトランスフェクションした細胞にスタンダードウイルス（マホニー）株を重感染さ

せ、スタンダードウイルスが産生するキャプシドタンパク質により、欠失変異を持つ RNA がパッケージされ、ウイルス粒子となるかを検討した。

(倫理面への配慮)

すべて *in vitro* の培養細胞系を使用した実験であり、倫理面に配慮する必要のない研究である。

### C. 研究結果

現在までの研究により、ポリオウイルスゲノムへの欠失変異導入は3塩基の倍数でなければならないことが知られていた。すなわち、欠失変異を導入しても、その下流の RNA は翻訳に関し、*in frame* でなければ RNA レプリコン活性は失われる。そこで、この点に注意しながら、キャプシドタンパク質コーディング領域に欠失変異を導入し、RNA レプリコン活性を調べた。その結果、キャプシドタンパク質コーディング領域は全域欠失させても RNA レプリコンとしての活性は維持されることが示唆された。さらにポリオウイルスによる細胞変性効果の中心的役割を演じる 2A プロテアーゼコーディング領域の一部を欠失させても、低いながら RNA レプリコン活性が観察されることが明らかとなった。この結果により、約 3 kb の外来 mRNA が理論的には挿入可能であることが示唆された。

次に、これらの RNA レプリコンをスタンダードウイルス (マホニー) 株の重感染により、ウイルス粒子へパッケージさせる実験を行った。その結果、欠失領域が 1.8kb までのものは粒子内にパッケージされたが、それ以上の欠失を持つもののパッケージは観察されなかった。以上のことは、ベクターを作製した場合、最終的な RNA サイズ

は最低でも 5.7 kb の長さが必要であることを示している。

### D. 考察

現在までに、当研究グループはポリオウイルスを用いた BDNF (brain-derived neurotrophic factor) 発現ベクターの作製に成功している。この場合には、外来 mRNA のサイズ (約 400 塩基) が比較的小さかったため、ゲノムの一部を欠失させることなく、外来 mRNA を挿入することが出来た。すなわち replication competent ウイルスベクターであった。この組換えポリオウイルスベクターを筋肉内接種すると中枢神経系の運動神経細胞体に到達し、そこで BDNF が発現することを証明した。骨格筋から神経軸索を経由する伝播経路は、ポリオウイルスに対する血中抗体の影響を受けにくいので、実用化するには非常に良い接種法である。

残念なことに、現在は、ALS 治療にとって BDNF の効果は否定されており、前記計画を中止した。それに替わり、発現の対象としているタンパク質は HGF および XIAP である。これらのタンパク質のサイズは BDNF に比べ大きく、ポリオウイルスベクターに挿入すべき外来 RNA のサイズを考慮すると、ゲノムに欠失変異を導入せざるを得ない。そこで、ゲノムの改変の限界を知ることが重要となった。結果的には基本的なウイルス複製に対する理解が深まり、ウイルス学にとっても貴重な知見が得られつつある。

第1の知見は、スタンダードウイルスによる改変ゲノムのパッケージングにとっては、スタンダードウイルスゲノムより長い改変ゲノムは不適當であり、継代により失

われてしまうことである。ポリオウイルスの特異的レプリカーゼによる RNA 合成の速度は一定であるため、短い RNA の分子数の方が多くなり、結果的にパッケージされる RNA は短い方が有利になるためと考えられる。この様な場合には、キャプシドタンパク質の供給は、スタンダードウイルスを使用するよりもまったく違う発現システムを使用する必要がある。現在、ワクシニアウイルス発現系の導入を検討している。

第2は、ウイルスゲノムとして粒子内にパッケージされるためには、最小でも 5.7 kb の長さが必要であるとの知見である。ポリオウイルス RNA 上のパッケージングシグナルは明らかにされていないが、この実験系を使用することにより解明される可能性がある。

第3は、ポリオウイルスの病原性発現の主たる役割を担う 2A プロテアーゼの約 3 分の 1 を欠失させても RNA レプリコン活性が観察できたことである。2A プロテアーゼの知られている機能は、1) ウイルスの前駆体タンパク質のプロセッシング、2) 細胞側タンパク質合成（キャップ依存的タンパク質合成）の阻害、3) ポリオウイルス IRES (internal ribosome entry site) の活性化、および 4) 細胞変性効果として知られる細胞の丸形化現象を引き起こすことである。もしも 2A プロテアーゼがポリオウイルスの RNA レプリコン活性にとって必須のタンパク質ではないとすれば、病原性を持たないポリオウイルスベクターの開発が成功する可能性がある。現在、2A プロテアーゼを持たないポリオウイルスを作製中である。

## E. 結論

ポリオウイルスを発現ベクターとして利用し、ALS 治療に有効と思われるタンパク質の mRNA を脊髄の運動神経細胞に送り込むことを目的に、基本的なゲノム改変のルールを理解するための研究を展開した。今なお、確かめなければならない点が多く存在するが、約 3 kb の外来 mRNA を挿入することは可能と思える結果を得た。さらにポリオウイルスの運動神経細胞に対する病原性を減弱させることが出来る可能性も出てきた。

## F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Qingmei Jia, Fengyi Liang, Seii Ohka, Akio Nomoto & Tsutomu Hashikawa (2002) Expression of brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system of mice using a poliovirus-based vector. *J. NeuroVirology* 8(1): 14-23.

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし