

# 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 —

竹内 英之 丹羽 淳一 石垣 診祐 菱川 望 伊藤 隆  
道勇 学 祖父江 元

### はじめに

家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) のうち約 10～20 % が SOD1 の点変異に起因する<sup>(1)</sup>。しかしながら、変異 SOD1 の酵素活性度と重症度との間には相関関係がみられず、その神経細胞死の機序としては gain of function が想定されているが<sup>(2)</sup>、その実態は未だ不明である。

我々は、FALS における変異 SOD1 の細胞毒性発現の場を検討するため、変異 SOD1-EGFP 発現培養神経細胞においてオルガネラ局在モデルを構築し、その効果を解析した<sup>(3,4)</sup>。また、我々が ALS 患者脊髄前角組織から同定した変異 SOD1 の E3 ligase である dorfin<sup>(5)</sup> は、変異 SOD1 をユビキチン化することで分解を促進し細胞死抑制効果を発揮するが<sup>(6)</sup>、この dorfin の細胞死抑制効果との関連についても検討を行った。

### 方法

(1) 変異 SOD1 培養神経細胞モデルの作製： human SOD1 cDNA wild type, mutant G93A および G85R を pEGFP-N1 (Clontech 社) へ subcloning した局在シグナルのないコンストラクト (Cyto-WT, G93A, G85R)<sup>(1)</sup> の他に、pShooter/nuc, ER, mito (Invitrogen 社) への subcloning によって、核、小胞体、ミトコンドリアの局在シグナルを各々付加したコンストラクト (Nuc-WT, G93A, G85R, ER-WT, G93A, G85R, Mito-WT, G93A, G85R) を作成した。これを mouse neuroblastoma cell line 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学講座

である Neuro2a 細胞へ transfect する事で SOD1-EGFP 融合蛋白のオルガネラ局在性一過性発現系を作製した<sup>(4)</sup>。

(2) 細胞分画：transfection 後 12, 24, 48 時間の時点で、細胞を氷冷した buffer (250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA および protease inhibitor cocktail) に回収し、Dounce 型 ホモジェナイザーにてホモジェナイズした。ホモジェネートを 600 × g で 10 分間遠心後、沈渣を核分画とした。上清を 10,000 × g で 10 分間遠心後、沈渣をミトコンドリア分画とした。上清を 100,000 × g で 60 分間遠心後、沈渣をマイクロゾーム分画とした。さらに、上清を 300,000 × g で 60 分間遠心後、沈渣を細胞質分画とした。各々の沈渣は TNES buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM EDTA, 0.1% sodium dodecyl sulfate および protease inhibitor cocktail) へ再懸濁した。各々の細胞分画の純度および各コンストラクトの分画への局在確認は、各オルガネラマーカー (核分画：Sp1, ミトコンドリア分画：cytochrome c oxidase, ミクロゾーム分画：GRP78, 細胞質分画：β-actin) を用いて、Western blot および免疫組織学的に確認した。

(3) 細胞内凝集体形成の経時的解析：細胞内凝集体形成の解析を、transfection 後 12, 24, 48 時間の時点で経時的に施行した。細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、propidium iodide にて核染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡 (MRC1024, Bio-Rad 社) にて観察した。細胞内凝集体形成頻度は、全 EGFP 陽性細胞中の細胞内凝集体陽性細胞の割合として計算した。

(4) 細胞死、細胞傷害度の経時的解析：細胞死については transfection 後 12, 24, 48 時間での propidium iodide 色素排除法にて経時的に解析した。また、細胞傷害度については同様の時点での MTS assay にて経時的に解析した。

(5) 細胞死シグナルの経時的解析：cytochrome c (Cyt. c) の細胞質への漏出は、細胞質分画での抗 Cyt. c 抗体による Western blot にて transfection 後 12, 24, 48 時間で経時的に解析した。また、caspase-9, -3 (Casp9, 3) の活性化についても、全 cell lysate での抗 Casp9, 3 抗体による Western blot を transfection 後 12, 24, 48 時間で経時的に解析した。Sample 量は各 well 当たり 20  $\mu$ g とし、信号強度は densitometry にて解析した。

(6) Dorfin の cotransfection の系の作製：先に作製してある Dorfin/HisMax<sup>(5)</sup> を Cyto-WT, G93A, G85R と cotransfect する事で、SOD1-EGFP 融合蛋白と Dorfin との一過性共発現系を作製した。Mock DNA としては pCMV- $\beta$ Gal を用いた。

## 結果

(1) 細胞内凝集体形成、細胞死および細胞傷害度の頻度 (図 1)：細胞分画法により、SOD1-EGFP 融合蛋白は Cyto-WT, G93A, G85R では全分画にびまん性に存在し、Nuc, ER, Mito-WT, G93A, G85R ではほぼ各オルガネラ分画にのみ存在することが確認された。Cyto-G93A, G85R でのみ凝集体形成がみとめられ、Nuc, ER, Mito ではいずれも有意な凝集体形成は認められなかった。細胞死、細胞傷害度の経時的増加は、Cyto-G93A, G85R で有意に、Mito-G93A, G85R ではさらに有意に認められた。核、小胞体の局在モデルでは有意な細胞死、細胞傷害は認められなかった。

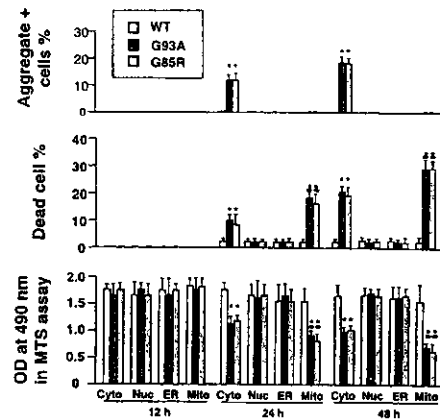


図 1. 凝集体形成、細胞死、細胞傷害度の経時的変化：  
\* $p < 0.05$  vs WT. \*\*  $p < 0.05$  vs Cyto.

(2) 細胞死シグナルの経時的解析 (図 2, 3)：Western blots により、Cyto-G93A, G85R で有意に、Mito-G93A, G85R ではさらに有意に Cyt. c 放出、Casp9, 3 活性の経時的増加が認められた (図 2)。この Casp9, 3 活性は汎 Casp 阻害剤のみならず Casp9 阻害剤でも完全に抑制され、細胞死、細胞傷害も抑制された (図 3)。

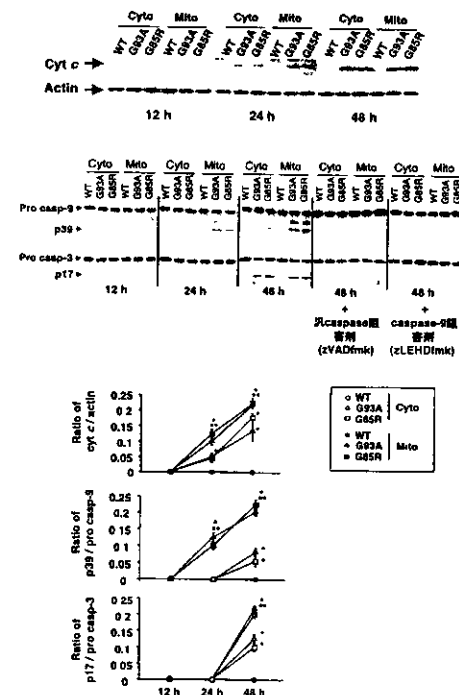


図 2. Cyt. c 放出、Casp9, 3 活性の経時的変化：  
\* $p < 0.05$  vs WT. \*\*  $p < 0.05$  vs Cyto.

## 考察

本研究では、核、小胞体の局在モデルでは有意な細胞死は認められず、ミトコンドリア局在モデルでのみ、局在シグナルなしのモデル以上の細胞死、Cyt. c 放出、Casp 9, 3 の活性化が認められた。そして、この細胞死は、特異的 Casp 9 阻害剤にても汎 caspase 阻害剤と同程度まで抑制された。また、ミトコンドリア局在モデルでは、細胞質内凝集体をほとんど呈さず、神経細胞死との相関は認められなかった。

以上より、変異 SOD1 による神経細胞毒性は、凝集体形成によるものではなく、変異 SOD1 のミトコンドリア局在により惹起された Cyt. c 放出から Casp 9, 3 の活性化に至る cascade を main stream とする細胞死シグナル系によるものと考えられた。

また、本研究では、細胞質に局在する dorfins がミトコンドリアの変異 SOD1 を低減させることが示された。これについては、dorfins は細胞内全体の変異 SOD1 の分解を促進することで結果的に変異 SOD1 のミトコンドリア蓄積量を低減させ、細胞死抑制効果を発揮している可能性が考えられた。

以上の点から、dorfins は今後 FALS の治療法としての利用の可能性が期待される。

## 文献

- (1) Rosen, D. R., et al: *Nature* **362**, 59–62, 1993.
- (2) Yim, M. B., et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5709–5714, 1996.
- (3) Takeuchi, H., et al: *Brain Res.* **949**, 11-22, 2001.
- (4) Takeuchi, H., et al: *J Biol. Chem.* **277**, 50966-72, 2002.
- (5) Niwa, J., et al: *Biochem. Biophys Res. Commun.* **281**, 706-13, 2001
- (6) Niwa, J., et al: *J. Biol. Chem.* **277**, 36793-8, 2001

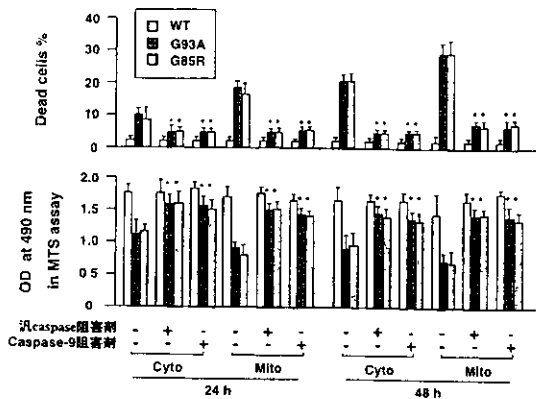


図 3. Casp 阻害剤による細胞死、細胞傷害抑制効果：  
\* $p < 0.05$  vs non treated.

(3) Dorfin による細胞死、細胞傷害抑制効果 (図 4) :  
Cyto-WT, G93A, G85R と Dorfin とを cotransfect した系では有意な細胞死、細胞傷害抑制効果が認められた。Dorfin の deletion mutant を cotransfect した系では抑制効果は認められなかった。

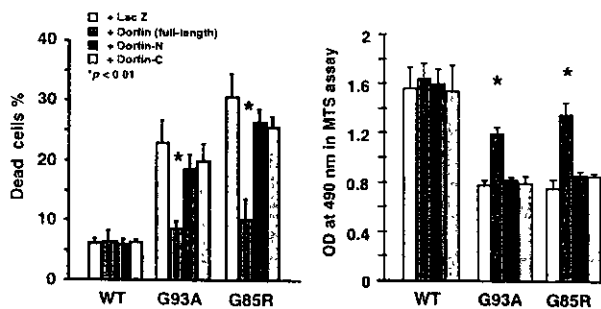


図 4. Dorfin による細胞死、細胞傷害抑制効果

(4) Dorfin による変異 SOD1-EGFP 融合蛋白のミトコンドリア蓄積量の低減効果：Cyto-G93A + dorfin および Cyto-G85R + dorfin の系では、ミトコンドリア分画での変異 SOD1-EGFP 融合蛋白が低減していることが示された。

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  
分担研究報告書

VEGF と運動ニューロン死

分担研究者 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教授

研究要旨：Vascular endothelial growth factor (VEGF)と運動ニューロン死との関連性について調べるために、G93A 変異型 SOD1 マウスに低酸素刺激を与えて VEGF の誘導を検出した。VEGF は正酸素下では脊髄運動ニューロンに軽度に発現しており、G93A マウスでその発現は少し亢進していた。低酸素刺激にて VEGF は non-transgenic littermates では約 10 倍に上昇したが、G93A マウスでは各週齢でほとんど誘導されなかった。VEGF の誘導障害は、低酸素環境下などで運動ニューロン死を助長する可能性がある。

A. 研究目的

VEGF は血管内皮細胞の増殖因子であり、発生期、腫瘍増殖や糖尿病網膜症における血管形成に重要な役割を果たしている。VEGF はニューロン保護作用をグルタミン酸毒性に対して、および虚血に対して発揮することが示されている。さらに、VEGF プロモーター領域にある HRE (hypoxia-response element) を欠失させたマウスでは、慢性的な運動ニューロン変性が生じることが報告されている(1)。変異型ヒト SOD1 マウスは ALS のモデル動物とみなされているが、運動ニューロン死の機序については明らかではない。我々は、G93A SOD1 変異マウスにおける運動ニューロン死に VEGF が関与している可能性を探るために、低酸素環境にマウスを曝露して脊髄における VEGF 誘導を調べた。

B 研究方法

変異型 human SOD1(G93A) transgenic mice (Tg) は、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)より購入し、C57B/L の background で維持した。このマウスは 22 週齢以降で病理学的変化が始まるが、両下肢の脱力症状は 32-34 週齢ごろに発症し、36-38 週齢で死亡する。そこで、G93A マウスは、12 週齢 (asymptomatic)、24 週齢 (early symptomatic)、36 週齢 (late symptomatic) の各週齢を用い、対照群は non-transgenic littermate (Wt) を用いた。

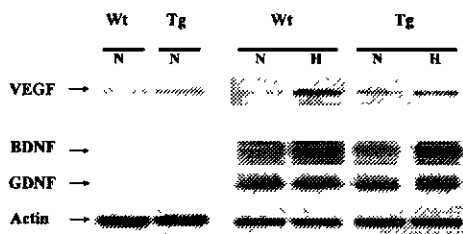
動物は、密閉容器に入れて O<sub>2</sub> 8% (92% nitrogen) に 2 時間曝露し、その 0, 1, 3, 6, 12, 24 時間後に sacrifice して腰部脊髄を取り出して、4% paraformaldehyde 固定したのち凍結薄切標本を作製した。また、低酸素曝露を与えない動物群を Tg と Wt で用意し、同様に標本を作った。

切片は 1:500 の濃度の rabbit anti-

VEGF antibody (sc-152, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) に反応させ、ビオチン化 2 次抗体続いて ABC reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) をかけたのち、DAB にて発色した。

さらに、発現量の定量的のために Western blotting を施行した。マウス腰髄組織を homogenize したのち遠心上清をとってタンパク濃度を測定。サンプルは 12 % SDS-PAGE にて分離した後に PVDF membrane に transfer した。Membrane をブロックしたのちに、anti-VEGF (1:1000; sc-152, Santa Cruz), anti-BDNF (1:2000; sc-546, Santa Cruz) または anti-GDNF (1:1000; sc-328, Santa Cruz) にて反応させ、ECL 法 (Pierce, Rockford, IL, USA) で X-ray film (X-OMAT, Kodak) に発光した。Blot は scanner で読み込んで、NIH image 1.62 にて定量化した。

Figure 1



### C. 研究結果

免疫組織化学法による VEGF の検索では、正酸素環境の Wt マウス腰髄では VEGF 発現はほとんど見られなかったのに対し、Tg マウスにおいては腰髄運動ニューロンの細胞質に VEGF の発現がみられた。低酸素曝露によって Wt マウスで

は運動ニューロンを中心に著明な VEGF の発現誘導が認められた。時間経過では hypoxia 後 6 時間で最も発現が強かった。対照的に、Tg マウスの腰髄においては低酸素曝露によって VEGF はほとんど変化がなかった。これらの結果は調べた全ての週齢で同様に観察された。

Western blotting による定量的分析では、hypoxia 後 6 時間に VEGF は Wt マウス脊髄にてピークに達した (normoxia の約 9 倍)。しかしながら、Tg マウスでは全ての週齢において有意な増加は認められなかった。BDNF および GDNF は、hypoxia で発現が増加したが、Tg と Wt マウスの間で違いはなかった (Fig. 1)。

### D. 考察

VEGF は血管新生のみならずニューロン保護作用を示すことが *in vitro* (2) および *in vitro* (3) で報告されている。また、HRE 欠損マウスにおいて運動ニューロン変性が惹起されることから (1)、VEGF は運動ニューロンの生存維持に必要であると推定される。今回の実験結果において、12 週から 36 週齢の G93A Tg マウス脊髄の運動ニューロンでは、正酸素下で VEGF がやや上昇しているのに対して、hypoxia 曝露で VEGF が誘導されなかった。神経組織は microcirculation の変化によって hypoxia に曝される可能性があり、VEGF 誘導によるニューロン保護作用が重要と考えられる。さらに、グルタミン酸毒性によるニューロン死は VEGF によって防がれることから、ALS における運動ニューロン死の機序として想定されているグルタミン酸毒性に発揮にも

VEGF の調節障害が関与する可能性が示唆される。正酸素下の Tg マウスで VEGF がやや上昇していたことは、組織の循環障害に対する代償作用、SOD1 変異マウス神経組織で産生が亢進している炎症性サイトカインによる誘導、または proteasome の機能障害によって HIF-1 や VEGF 自身の breakdown が遅延していることなどが推定される。いずれにせよ病理変化がみられない 12 週齢の若年 Tg マウスにおいても VEGF 誘導障害が観察されたことは、この現象が運動ニューロン死に先行して起こることが示唆され、SOD1 変異マウスにおける運動ニューロン死の一因となる可能性が考えられる。VEGF の誘導障害を補正することで運動ニューロン死を防ぐことができるかを今後検討する予定である。

ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 887-895.

#### E. 文献

1. Oosthuyse B, Moons L, Storkebaum E, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001; 28: 107-108.
2. Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, et al. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity. *FASEB J* 2001; 15: 1218-122-.
3. Hayashi T, Abe K, Itoyama Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat after transient

# 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—

分担研究者：大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野 助教授 船越 洋

## 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を代表とする神経変性疾患は、神経細胞とその軸索の特異的変性を共通病態とする。したがって、これらの疾患でおこる神経細胞変性を阻止し、神経ネットワークを再建できれば有用である。私達は、この観点から新しい神経栄養因子としての HGF およびそのファミリー分子 (HGF-like protein: HLP) の機能解析を進めた。HGF 遺伝子を ALS モデル Tg マウスの神経系に高発現させると、これまで報告してきたより早い時期の運動機能障害 (後肢反射テストの障害) をも改善することが明らかとなった。この HGF の作用分子機構は検討中であるが、これまで既に明らかになっている病態中期以降の HGF の作用メカニズムに加えて、より早い時期におこる ALS 病態にも機能できること、すなわち HGF が ALS の病態の比較的早期から末期に至るまで多段階で機能し、運動機能の改善と寿命の大幅な改善を期待できる内因性の増殖因子であることが明らかとなった。一方、HLP については、昨年までに神経栄養作用をもつこと明らかにしてきたが、本年度は HLP がミクログリアに作用し、その遊走を促進する活性があることを明らかにした。この結果は、HLP が ①傷害ストレス時に神経細胞に対し保護作用を示すと同時に、② 傷害部位にすみやかにミクログリアを遊走・集積させ、神経系のリモデリング (再構築) を促進している可能性を示唆する。今後 HGF に加えて、HLP の神経疾患における機能解析がすすむことが期待される。

## 1. 目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンの特異的変性により運動麻痺を発症する致死性進行性神経変性疾患である。比較的若くして発症し、知能障害を伴わないために麻痺進行を自身で自覚しながら享受していく必要がある現時点で有効な治療法がない悲惨な疾患である。家族歴のある家族性 ALS (Familiar ALS: FALS) と家族歴のない特発性 ALS (Sporadic ALS: SALS) があるが、前者は遺伝解析研究の成果、原因として Superoxide dismutase 1 (SOD1) と ALS2 の遺伝子変異が同定された。このような遺伝解析の成果の著しい進歩とは裏腹に、治療法開発は依然未解決の問題である。もちろん SALS についてはいうまでもない。両者は原因を異にするが、運動ニューロン死とその神経軸索変性で発症し死に至るという点は共通である。逆に運動神経細胞死を抑制し、神経軸索再生し神経ネットワークの再建ができれば ALS の治療法開発に繋がると期待される。本研究の目的は、数ある神経栄養作用を持つ分子の中でも運動ニューロンに対する生存と突起伸長作用がより強力な肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) (私達の研究室の中村教授らが 1989 年世界に先駆けて精製・クローニングに成功した増殖因子) に注目し、ALS における HGF およびその受容体 (c-Met) の機能とその作用分子機構を解析することである。昨年までに、HGF を ALS-Tg マウスに直接発現させると ALS-Tg における運動ニューロン死と軸索変性による運動機能障害を抑制し寿命を延長するこ

とを明かしてきた。この作用機序として、HGF が ALS-Tg における病態中期に運動ニューロンに直接作用し、カスベース 1 や NOS の発現誘導を抑制することによって、また ALS の病態末期には反応性アストロサイトに機能し、グリア細胞特異的グルタミン酸トランスポーターの発現低下を抑制することで運動ニューロンに対するグルタミン酸毒性を間接的に抑制していることを明らかにしてきたが、ALS 病態初期の HGF の機能は不明であった。本年は、これまで行ってきた運動機能解析法 (foot print および Rotorod テスト等) に比べずっと運動機能障害に対する感度の高い後肢反射テストを用いて ALS/HGF ダブル Tg マウスと単独の Tg マウスおよび野生型マウスを比較した。

また、HGF のファミリー分子である HGF-like protein (HLP) について、HGF 同様の機能解析をすすめることにある。本研究では、HLP が別名 Macrophage stimulating protein とも呼ばれていることに着目し、昨年までに報告したの神経栄養作用に加え、HLP が神経系では、ミクログリア (神経系におけるマクロファージ様細胞) で機能している可能性が高い。そこでミクログリアに焦点を絞り HLP の機能解析をすすめた。

## 2. 研究方法

(1) ALS-HGF ダブルトランスジェニックマウスの作成と解析：神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス (HGF-Tg) とヒト ALS の原因変異遺伝子 (SOD1G93A) を発現し、ヒト ALS と同様の病態を示す ALS モデルトランスジェニ

ックマウス (ALS-Tg) を交配することで、HGF 遺伝子を ALS-Tg の神経に直接発現させた際の ALS 病態進行に対する HGF の効果を以下の項目につき解析した。① 運動ニューロン数 (Cresyl violet 染色) ② 脊髄前根・後根における運動、感覚神経繊維の解析 (トルイジンブルー染色) ③ 筋肉湿重量 ④ hindlimb reflex test (運動機能解析) ⑤ Rotorod test (運動機能解析) ⑥ Footprint (運動機能解析) ⑦ 発症時期 ⑧ 寿命 ⑨ 免疫染色 (c-Met, Tuj1, NSE, GFAP, Mac1) ⑩ ウェスタンブロット (c-Met, GFAP)

## (2) HLP のミクログリアにおける機能解析

HLP の受容体 (Ron) の神経系における発現を、マウス初代培養大脳皮質ニューロン、培養アストロサイト、培養ミクログリアについて

① 定量的 Real-time PCR 法 (ron)、② 免疫染色法 (抗 Ron 抗体およびミクログリアのマーカー Mac1 抗体)、③ ウェスタンブロット法 (抗 Ron 抗体) を用いて解析した。次いで HLP のミクログリアに対する機能解析について、④ 生存 (Calcein-AM と Propidium Iodide の 2 重染色: 前者は生細胞を緑色に蛍光染色、後者は死細胞の核を赤色に蛍光染色)、⑤ 増殖 (Calcein-AM と Propidium Iodide の 2 重染色)、⑥ 細胞遊走促進活性: Transwell chamber の上側のカップにミクログリアを培養し、下のカップに HLP を添加した際に両カップの間の蛍光遮断膜にあいた穴を通して下側に遊走する細胞数を Calcein-AM で蛍光ラベルし、蛍光顕微鏡で観察解析した。

\* すべての遺伝子操作は DNA 組替え実験指針に従い、また動物実験は動物愛護面に配慮しかつ利用動物数を減らすように努めた。倫理面は大坂大学医学部動物実験指針に従った。

## 3. 研究結果及び考察

(1) HGF-ALS ダブル Tg マウスの解析: 運動機能障害に対する感度の高い後肢反射テストを用いて ALS/HGF ダブル Tg マウスと単独の Tg マウスおよび野生型マウスを比較した。その結果、ALS-Tg におこる運動機能障害が生後 5 ヶ月目より観察された。一方 ALS/HGF-Tg においては ALS 病態末期まで後肢反射テストで運動機能障害をほとんど認めなかった。この結果は、HGF が病態の初期においても機能できること、すなわち、HGF は ALS の初期から末期まで多段階で様々な作用分子機構を介し機能していることが示唆された。今後 HGF の ALS 病態初期における作用分子機能を明らかにしていく必要がある。

## (2) HLP の神経系における機能

HLP の受容体 (Ron) は、神経系細胞の内、マウス初代培養ニューロン、アストロサイト、ミクログリアいずれにおいても発現することが定量的 Real-time PCR 法により明らかとなった。

- ① HLP はミクログリアの生存を促進しない。 ミクログリアを血清非存在下で培養すると培養 2 日で約半数が死滅する。HLP の有無でこのミクログリアの生存細胞数は影響を受けなかった。
- ② HLP はミクログリアの増殖を促進しない。 マウス培養ミクログリアに HLP を添加しても増殖は促進されなかった。
- ③ HLP はミクログリアの遊走を促進する。 Transwell を用いたミクログリアの遊走アッセイを施行した結果、HLP 添加により遊走ミクログリアの細胞数が増加することが明らかとなった。HLP がミクログリアの生存、増殖を修飾しないことから、HLP はミクログリアの遊走を直接促進していると考えられる。以上から、HLP は神経細胞の生存や突起伸長を促進することで神経保護に働くと同時に、ミクログリアがすみやかに損傷部位に遊走・集積することを促進させることでミクログリアが効率良く機能することを助ける新しい神経栄養因子であると示唆された。今後 HGF に加えて HLP の神経疾患における機能解析が進むことが期待される。

## 4. 結論

HGF は ALS モデル Tg マウスの病態進行過程で多段階で機能し、その寿命大幅に延長することが明らかとなった。また、HLP が神経細胞に加えミクログリアにも機能できることを明らかとした。

## 5. 共同研究者

大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野: 鈴木 芳典、中村 敏一

## 6. 研究発表

1. Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matsumoto K, and 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.* 68(2): 150-160, 2002
2. Kishi Y, Funakoshi H, Matsumoto K, and Nakamura T; Molecular cloning, expression and partial characterization of Xksy, Xenopus member of the Sky family of receptor tyrosine kinases. *Gene* 288, 29-40, 2002.
3. Sun W, Funakoshi H, and 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.* 103.36-48, 2002.
4. Sun W, Funakoshi H, and Nakamura T. Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J. Neurosci.* 22:6537-48, 2002.
5. Funakoshi H, and Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clin Chim Acta* 327:1-23, 2003.
6. 船越 洋、中村 敏一 (2002) 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, No.1, 245-253
7. 中村健二、船越洋、中村敏一 (2003) 神経再生因子としての肝細胞増殖因子 (HGF). 108-115, *脳の科学* (増刊号: 神経の再生) .



# 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	論文タイトル名	掲載誌名	巻ページ	出版年
Matsuno K, Ito M, Hori K, Miyashita F, Suzuki S, Kishi N, Artravanis-Tsakonas S, 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 BS, 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, Miura M	Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK	Nature Cell Biol	4 705-710	2002
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 15194-9	2002
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(1) 14-23	2002
Adachi H, Katsumo M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G	HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein	J Neurosci	in press	2003

著者	論文タイトル名	掲載誌名	巻ページ	出版年
Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa N, Yoshikawa H, Ohnishi A, Hayasaka K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G and the Study Group for Hereditary Neuropathy in Japan	Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients	Brain	126(1) 134-151	2003
Takeuchi H, Kobayashi Y, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G	Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis	J Biol Chem	277(52) 50972	2002
Koike H, Misu K, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Ando E, Yamamoto M, Hattori N, Sobue G	Type I (transferrin Met30) familial amyloid polyneuropathy in Japan: early- vs late-onset form	Arch Neurol	59(11) 1771-1776	2002
Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, Doyu M, 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	80 158-167	2002
Ishigaki S, Liang Y, Yamamoto M, Niwa J, Ando Y, Yoshihara T, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G	X-linked inhibitor of apoptosis protein is involved in mutant SOD-1 mediated neuronal degeneration	J Neurochem	82 576-584	2002
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	35 843-854	2002

著者	論文タイトル名	掲載誌名	巻ページ	出版年
Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, Doyu M, Murata S, Tanaka K, Taniguchi N, Sobue G	Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity	J Biol Chem	277(39) 36793-8	2002
Sasaki S, Warita H, Abe K, Iwata M	nNOS immunoreactivity in the spinal cord of transgenic mice with G93A mutant SOD1 gene	Acta Neuropathol	103 421-427	2002
Manabe Y, Warita H, Murakami T, Shiote M, hayashi T, Omori N, Nagano I, Shoji M, Abe K	Early decrease of the immunophilin FKBP52 in the spinal cord of a transgenic model for ALS	Brain Res	935 124-128	2002
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	7 329-334	2002
Warita H, Manabe Y, Murakami T, Shiote M, Shiro Y, hayashi T, nagano I, Shoji M, Abe K	Tardive decrease of astrocytic glutamate transporter protein in transgenic mice with ALS-linked mutant SOD1	Neurol Res	24 577-581	2002
Ilieva H, Nagano I, Murakami T, Shiote M, Manabe Y, Abe K	Change in superoxide dismutase 1 protein localization towards mitochondria: an immunohistochemical study in transgenic G93A mice	Neurosci Lett	332 53-56	2002
Nagano I, Murakami T, Manabe Y, Abe K	Early decrease of survival factors and DNA repair enzyme in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice that express a mutant SOD1 gene	Life Sci	72 541-548	2002
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	117 139-146	2003

著者	論文タイトル名	掲載誌名	巻ページ	出版年
Funakoshi H and Nakamura T	Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications	Clin Chim Acta	327 36182	2003
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 6537-48	2002
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	103 36-48	2002
Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, 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	68 150-60	2002
Kishi YA, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T	Molecular cloning, expression and partial characterization of Xksy, Xenopus member of the Sky family of receptor tyrosine kinases	Gene	288 29-40	2002

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社	巻ページ	出版年
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 1622-7	2002
永井真貴子、青木正志 糸山泰人、三好一郎 笠井憲雪	筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新しいモデルとしてのトランスジェニックラットの作製		アニテックス	研成社	14 189-192	2002
Sawamoto K, Okano H	Direct isolation of mesencephalic precursor cells and dopaminergic neurons	Calne, DB, Mizuno Y	Recent Res. Devel. Mol. Cell Biol.	Research Signpost	243-253	2002
船越 洋、中村 敏一	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	2003
中村 健二、船越 洋 中村 敏一	神経再生因子としての肝細胞増殖因子 (HGF)		脳の科学		108-115 (増刊号： 神経の再生)	2003
永野 功、村上哲郎、 塩手美冬、阿部康二	SOD1変異マウスにおけるVEGF誘導異常	赤池紀扶、東英穂、 阿部康二、久保千春	脳機能の解明 — 生命科学の主流 —	ガイア出版会	307-310	2002

研 究 協 力 者

研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金研究報告  
(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班)

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  
辻 幸子, 菊地誠志 北海道大学医学部神経内科

〈研究要旨〉

ALS 患者の病理像に見いだされるユビキチン陽性封入体の存在からユビキチン・プロテアソーム系異常に着目し, プロテアソーム阻害剤の運動ニューロンに対する作用を検討した. 運動ニューロンはプロテアソーム阻害剤 (Lactacystin) に対し脆弱であったが, 同濃度では後角ニューロンは傷害されなかった. グルタミン酸受容体阻害剤で拮抗されたことから, Lactacystin の運動ニューロンに対する毒性はグルタミン酸毒性が関与していると考えられた.

A. 研究目的

近年, 多くの神経変性疾患でユビキチン陽性封入体が見いだされ, ユビキチン・プロテアソーム系 (ubiquitin proteasome system; UPS) 障害の関与が疑われている. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) においても, Lewy body like inclusionはユビキチン陽性であり, UPS 障害が関与している可能性がある. UPS障害により各種細胞で細胞死がもたらされることが報告されているが, その詳細な機序は諸説あり解明されていない部分も多い.

そこで, 今回我々はラットでの脊髄組織培養 (organotypic slice culture) を確立し, 特異的プロテアソーム阻害剤であるLactacystinの脊髄組織に対する作用について検討した.

B. 研究方法

1. slice culture の作成

生後6日目ラット新生仔 (Sprague-Dawley rat) をケタミン麻酔後断頭, 脊髄を採取し400  $\mu$ mにスライスした. 培養液1ccを満たした35mm培養皿中におかれた培養膜 (Millicell-CM) 上におき, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>下で培養し, 週2回培養液を交換した. 培養10日目 (10DIV)

に各濃度のLactacystinおよびグルタミン酸受容体阻害剤に暴露し, 72時間後に免疫染色し, 生存細胞数を評価した.

2. 評価

免疫組織染色し生存細胞数を測定した.

Motor neuronは, 前角に存在する20  $\mu$ m以上のSMI 32陽性大径細胞と定義した. 後角neuronの指標としてcalretininを用いた.

3. 倫理面の配慮

本研究は北海道大学医学部動物実験に関する指針に基づいて行った.

C. 研究結果

コントロール培養では脊髄前角にSMI 32 陽性・calretinin 陰性大径ニューロンが集簇していた. 後角は主にcalretinin 陽性またはSMI 32 陽性小型ニューロンで占められていた. 少数だが, SMI 32・calretinin 共陽性大径ニューロンが存在した.

運動ニューロンは1  $\mu$ M Lactacystin 暴露で生存細胞数が有意に減少したが, 後角SMI 32 陽性ニューロンは保たれていた. calretinin 陽性後角ニューロンで



は 5 $\mu$ M でも有位な細胞脱落はみられなかった。

グルタミン酸受容体阻害剤である CNQX, MK801, Ifenprodil で細胞死は抑制される傾向にあった。

#### D) 考察

脊髄運動ニューロンは特にプロテアソーム阻害剤による傷害に脆弱であったことから、この系は ALS の病理像の特徴である運動ニューロン選択性と、ユビキチン化蛋白の蓄積の要件を満たし、孤発性 ALS のモデルとなりうると考えられた。

Lactacystin による運動ニューロン傷害の機序は今後詳細に解明すべきであるが、今回、グルタミン酸受容体阻害薬で拮抗され、calretinin を豊富に発現している後角 neuron は傷害を逃れたことから、興奮性アミノ酸毒性とそれに伴う細胞内 Ca<sup>2+</sup>代謝が関与しているこ

とが推測された。

Slice culture は個々の細胞形態や免疫染色に加え、組織内での位置情報も得られるため、運動ニューロン評価に有利な培養系であることが示された。

#### E) 結論

Lactacystinは脊髄motor neuronに対し毒性を示したが、同濃度では後角neuronに対する毒性は確認されなかった。

#### F) 健康危険情報

なし

#### G) 研究発表

1. 論文発表 未
2. 学会発表 未

#### H) 知的財産権の出願・登録状況

予定なし

厚生省研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

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

研究協力者 谷口直之

研究要旨 家族性筋萎縮性側索硬化症(familial ALS;FALS)の原因遺伝子の一つが Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1)である。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 と正常 SOD1 のリコンビナント蛋白質を精製し、それらの糖化反応性を比較検討した。変異 SOD1 は正常 SOD1 に比較し、生理的低濃度のグルコースやフルクトースによる非酵素的糖化反応が亢進していた。また糖化反応の過程で発生する活性酸素も増加していた。以上のことはグルコースやフルクトースなどの還元糖によって非酵素的糖化反応をうけた変異 SOD1 により、細胞内局所に酸化ストレスが誘導され、神経細胞死が惹起される可能性を示唆する。

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子が SOD1 であることが報告されて以来、現在まで 90 以上の変異が報告されている。変異 SOD1 が toxic な作用を有することは様々な実験で明らかにされているが、その毒性の本体、さらにはいかなるメカニズムで運動神経細胞を障害するかは全く不明である。我々は 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、生理的加齢変化、糖尿病の合併症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。さらに非酵素的糖化反応中に発生する活性酸素が変異 SOD1 において増加しているか否かを検討した。

B. 研究方法

精製した正常と変異 SOD1(G93A, G37R, I113T) を 1mM、10mM のグルコースあるいはフルクトースと 1 週間反応させ、SDS-PAGE 後 western blotting を行い、抗ヘキシトールリジン抗体あるいは抗フルクトースリジン抗体にて糖化の程度を検討した。さらにグルコースあるいはフルクトースとの反応中に発生するヒドロキシラジカル、過酸化水素をそれぞれ DMPO スピントラップ法および過酸化水素測定キットにて測定した。

C. 研究結果

変異 SOD1(G37R, G93A,I113T) および正常 SOD1 を 100mM のグルコースと 2 週間反応させ糖化の程度を検討した。いずれの変異 SOD1 も正常 SOD1 と比較すると糖化反応が亢進していた。次に精製した SOD1 から糖化をうけたタンパク質をボロン酸カラムで除去し、1mM、

10mM のグルコースと反応させ、糖化の程度を検討した。1mM の低濃度のグルコースにより変異 SOD1 は糖化を受けていたが、正常 SOD1 はほとんど糖化を受けていなかった。10mM のグルコース濃度では正常 SOD1 はわずかに糖化を受けていたのに対して、変異 SOD1 は高度に糖化をうけていた。同様の実験を 1mM、10mM のフルクトースで行ったが、グルコースで得られた結果とほぼ同じ結果が得られた。G93A SOD1 と正常 SOD1 を 100mM グルコースあるいは 1mM フルクトースと 7-14 日反応させた後ヒドロキシラジカル、過酸化水素を測定した。G93A SOD1 と正常 SOD1 ともグルコース、フルクトースとの反応によってヒドロキシラジカルの発生を確認できなかった。一方、G93A SOD1 はグルコース、フルクトースとの反応によって正常 SOD1 の約 2 倍の過酸化水素が発生していた。

#### D. 考察

変異 SOD1 の糖化反応性の亢進は、変異 SOD1 は不安定な立体構造をとることに起因すると考えられる。1mM のグルコース濃度でも変異 SOD1 は強く糖化反応をうけることから、生理的条件においても変異 SOD1 の糖化反応は亢進すると考えられる。今回用いた系では、糖化反応により発生したスーパーオキシドは SOD1 により過酸化水素に変換されたと考えられ、過酸化水素の量が発生したスーパーオキシド量を反映すると考えられる。変異 SOD1 の糖化がさらに亢進し、タンパク質に結合している銅イオンが遊離すると、変異 SOD1 周辺の微少環境において発生した過酸化水素と遊離銅がフェントン反応を起こし、ヒドロキシラ

ジカルを発生し、神経細胞に障害をもたらし、細胞死を引き起こすことが示唆される。

#### E. 結語

今回、精製したリコンビナントの変異 SOD1、正常 SOD1 を用いて検討した結果、変異 SOD1 の糖化反応性の亢進、反応産物の過酸化水素の発生の増加が明らかとなった。糖化反応の亢進は変異 SOD1 の構造の不安定性に由来すると考えられる。過酸化水素の発生の増加、さらにはヒドロキシラジカルの発生が神経細胞死に関与する可能性が示唆される

#### F. 研究発表

##### (1) 論文発表

Takamiya R, Takahashi M, Myint T, Park YS, Endo T, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Miyamoto Y, Fujii J, Taniguchi N. Facilitated glycation in mutated Cu, Zn Superoxide dismutase related to familial amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J.* in press, 2003.

##### (2) 学会発表

高宮里奈、高橋素子、朴用軾、藤原範子、宮本泰豪、谷口直之、家族性筋萎縮性側索硬化症における変異 Cu,Zn-SOD 高発現神経細胞における細胞骨格変化、生化学会、京都、2002年 10月

Fujiwara N, Miyamoto T, Taniguchi N. H46R mutant Cu, Zn superoxide dismutase linked with familial amyotrophic lateral sclerosis of which cases progress slowly is more stable than other mutants. The 15<sup>th</sup> Naito conference on molecular biological approaches for intractable diseases [III] October 2-5, 2002

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・病態にかかわる新規治療法の開発に関する研究班  
研究報告書

ALS に対するエダラボンをを用いたオープン臨床試験

研究協力者 吉野 英 国立精神・神経センター国府台病院 神経内科医長

**研究要旨** 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において、酸化ストレスが運動神経細胞死に関わっていることが知られている。今回 ALS 患者にフリーラジカルスクベベンジャー、エダラボンを投与する臨床試験を行った。安全性については肝機能、腎機能とも臨床的に問題となる検査異常はみられなかった。多くの患者は本剤投与後も症状は進行したが、一部に症状の進行が遅くなったと考えられる症例もみられた。本剤投与期間中の短期的な ALS 症状の改善効果について現在二重盲検試験中であり、長期的な効果についても検証試験が必要である。

A. 研究目的

近年 ALS をはじめとする神経変性疾患において、酸化ストレスによる神経障害が大きな役割を果たしていることが知られてきた。昨年度までに本研究において、フリーラジカル・スカベンジャーであるエダラボンを ALS 患者に投与したところ、酸化ストレスのマーカーとして知られている 3-nitrotyrosine(3NT)の髄液中の値が低下したことがわかった。今回エダラボン投与により実際に臨床的な効果が期待できるか、検討した。

B. 対象及び方法

対象は、国府台地区倫理委員会において承認された臨床試験「筋萎縮性側索硬化症を対象としたフリーラジカルスカベンジャー (エダラボン) の有効性と安全性の検討 (1)」に参加した ALS 患者である。主要評価項目は、投与半年後の ALSFRS-R (Revised ALS Functional Rating Scale) であり、本邦においても ALS の進展度評価尺度としてバリデーションがなされている。安全性については、臨床症状、臨床検査値について検討した。

エダラボンは 14 日間連日で 30mg/日投与し、剤追加投与が行われても差し支えないものとした。

(倫理面への配慮) 本研究は国府台地区倫理委員会において被験者の安全性、科学的妥当性について十分審議を重ねて承認を受けている。

C. 研究結果

安全性については、投与前→後で GOT 26.7→24.4(n=47)、GPT 33.2→26.8(n=47)、 $\gamma$ -GTP 38.7→34.8 (n=43)、BUN 13.0→13.0(n=46)、Creatinin 0.47 → 0.47(n=36)、CK 168 → 137(n=48)と、投与後に臨床検査値が上昇することはなく、また個々の症例についても臨床的に問題となる変動はみられなかった。

平成 14 年 12 月までに投与を行った 47 症例の ALSFRS-R は開始時平均 24.7 (正常 48)、投与後に 6 ヶ月以内に死亡・ないし人工呼吸器装着に至った症例は 9 例であった。多くの症例において投与後も ALSFRS-R は低下したが、一部の症例では症状の進行が遅くなったと思われる症例もみられた。

D. 考察

エダラボンは発症後 24 時間以内の急性期脳梗塞のみに現在承認されている薬剤である。本剤投与により髄液中 3NT 値が低下したことから、ALS 治療薬としての可能性が期待できる。本剤は脳梗塞対象でも 14 日間が承認された最大限の日数であるため、今回は 14 日間という短期間投与にとどめた。安全性については問題はみられなかった。有効性については、多くの症例では 6 ヶ月後には進行したものの、一部の症例では進行が抑制されたと考えられる症例も認められた。

ALS 治療においてもっとも重要であるのは長期の進行抑制であるが、現在までのデータの中でどのような症例に対し本剤により進行が抑制されていると推定されるか検討し、無作為化比較試