

「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

研究協力者 宮武伸一 大阪医科大学、脳神経外科、助教授

研究要旨：塩基性繊維芽細胞増殖因子(FGF-2)発現アデノウイルスベクターを構築し、ベクター投与により、神経保護、神経再生について実験的治療を行った。網膜神経細胞変性ラットの網膜下にウイルスを投与することにより、神経変性は抑止された。また砂ネズミ両側頸動脈遮断モデル作成3時間後に右側脳室より同ウイルスを感染させることにより、海馬における神経細胞死の抑制、海馬、脳室壁、皮質における神経再生を認めた。またラット中大脳動脈一時遮断モデル作成後、同ウイルスを側脳室内に投与することにより、梗塞巣の縮小、神経症状の改善を認めた。あわせて、ラット座骨神経に直接投与することにより、脊髄神経細胞に選択的に、安定して遺伝子を発現する組み換え型単純ヘルペスウイルスを作成し、ALS の治療用ベクターを構築中である。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症をはじめとする神経変性疾患の主病態は神経細胞死であり、この病態を改善するため様々なアプローチが用いられている。われわれは神経栄養因子を脊髄前角細胞に選択的に発現させることにより、この病態を改善させることを目的として、研究を行っているが、まず、神経栄養因子の一つとして、FGF-2 に着目し、この分子の神経保護効果を検討した。また、併せて、新規ウイルスベクターの開発も行っている。

B. 研究方法

ヒト FGF-2 発現アデノウイルスベクターを構築した。本ウイルスベクターを用い、以下の3種類の検討を齧歯類にて行った。

1) 網膜神経細胞変性ラット(RCS ラット)における神経変性抑止：RCS ラット網膜下に上記

ウイルスベクターを注入し、神経変性の抑止を検討した。

2) 砂ネズミ両側頸動脈結紮モデルにおける神経保護、神経再生効果：砂ネズミ両側頸動脈を5分間結紮し、3時間後に右側脳室より同ウイルスベクターを投与し、海馬における神経保護効果、脳内各部位での神経再生を調べた。

3) ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける神経保護効果：ラット右中大脳動脈閉塞、2時間後に再灌流し、同時に右側脳室より同ベクターを投与し、神経症状の改善、脳梗塞巣の広がりを検討した。

4) 脊髄神経細胞への遺伝子の導入：ICP34.5, 4, VP16 欠失、LAT promoter 制御下に LacZ gene 発現単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクターを構築し、座骨神経に直接投与することにより、脊髄前角神経細胞での遺伝子の発現を調べた。

C. 研究結果

1) 網膜神経細胞変性ラット(RCS ラット)における神経変性抑制:ウイルスベクター網膜下投与により、神経細胞層 (ONL) の非薄化は抑制され、ことに分泌型 FGF-2 発現ベクターの投与により、眼球全周性に ONL の変性が抑制された。

2) 砂ネズミ両側頸動脈結紮モデルにおける神経保護、神経再生効果:虚血作成3時間後に FGF-2 発現ウイルスベクターを脳室内投与することにより、海馬での遅発性神経細胞死は50%程度に抑制され、water maze test の成績も改善した。また、海馬、脳室周囲のみならず、大脳皮質でも BrdU 陽性かつ NeuN 陽性の神経細胞の再生を認めた。

3) ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける神経保護効果:前述(研究方法3)の処置により、ウイルス治療群では運動機能、感覚障害、反射等の神経症状は改善し、また治療24時間後の脳梗塞巣の広がりも未治療群の半分にまで縮小できた。

4) 脊髄神経細胞への遺伝子の導入:前述の組み換え HSV ベクターの座骨神経内投与により、腰部脊髄前角、後角の神経細胞に効率よく、マーカー遺伝子の発現を認めた。

D. 考察

以上の結果より、FGF-2 発現ウイルスベクターの投与により、生体の各部位で神経保護効果、神経再生効果が有ることが確認できた。砂ネズミ両側頸動脈結紮モデルにおける神経再生効果に関しては、大脳皮質においても神経再生を認めた。これが今までに定説となっている、海馬および脳室壁での神経幹細胞を活性化し、大脳皮質にまで遊走したものか、はたまた、大脳皮質自体に神経幹細胞が存在するのかまでは判明していない。また、ラッ

ト中大脳動脈閉塞モデルにおける神経保護効果に関しては、梗塞巣の縮小のみで神経症状の改善がおこるのか、あるいはいわゆる penumbra の神経細胞死を抑制する神経保護効果のみによる改善か、それとも神経再生による症状の改善か今後の検討を要する。

また、組み換え HSV により、末梢神経からの逆行性感染法により脊髄前角へ安定した遺伝子導入が可能なことも判明した。以上の結果より、現在 FGF-2, HGF, VEGF を candidate gene とし、これら遺伝子を発現する組み換え HSV ベクターを作成中である。今後この新規ベクターを用いて、ALS の治療研究を行う予定である。

E. 結論

以上の結果より、FGF-2 発現ウイルスベクターの投与により、生体の各部位で神経保護効果、神経再生効果が有ることが確認できた。

F. 健康危険情報

以上の研究は in vitro および実験動物を用いた研究であり、患者を用いた臨床研究ではない。

G. 研究発表

1. 論文発表

・Norihito Matsuoka, Kazuhiro Ishii, Masayuki Akimoto, Hirofumi Hamada, Nobuo Hashimoto, Shin-Ichi Miyatake. Overexpression of bFGF and Bcl-xL with adenoviral vectors protects primarily cultured-neurons against glutamate insult. Neurosurgery. 2002 Apr;50(4):857-863.

・Norihito Matsuoka, Kazuhiko Nozaki, Yasushi Takagi, Masaki Nishimura, Shin-Ichi Miyatake, Nobuo Hashimoto. Adenovirus-mediated Gene

Transfer of FGF-2 Promotes Neurogenesis after Forebrain Ischemia in Gerbils. Stroke in press.

2. 学会発表

・ 5th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy (June 5-9,2002 Boston)

Shin-Ichi Miyatake, et al: Adenovirus-mediated gene transfer of FGF-2 prevents neuronal death and promotes neurogenesis after forebrain ischemia in gerbils.

・ 第 61 回日本脳神経外科学会総会 平成14年10月3日

宮武伸一、黒岩敏彦：FGF-2 発現アデノウイルスベクターによる神経保護、神経再生の試み—脳梗塞の遺伝子治療

第 61 回日本脳神経外科学会総会 平成14年10月3日

野々口直助、黒岩敏彦、宮武伸一：新しい組換え型ヘルペスウイルスベクターを用いた中枢神経細胞への安定かつ効果的な遺伝子導入

第3回日本分子脳神経外科学会 平成14年8月31日

野々口直助、黒岩敏彦、宮武伸一：Stable and efficient gene transduction to CNS neurons by new recombinant HSV-1 vector (シンポジウム 1：中枢神経に対する遺伝子・細胞移植治療)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特に予定はない。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患研究事業）
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わる研究
研究報告書

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

研究協力者 加藤信介 鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門

研究要旨 SOD1 遺伝子異常を有する生体系において、過酸化水素を除去し細胞内レドックスシステム的一端を担う、ペルオキシレドキシシン(Prx)やグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)の発現にどのような変化が認められるのかを検討した。この目的のために、Prx ファミリーの中でも脳に発現量が多いとされる Prx2 に対する抗体を新たに作製した。ヒト及びラット正常脊髄では、GPx, Prx2 は共に神経細胞の胞体と樹状突起に発現し、neuropil も淡く染色された。Prx2 は一部の核にも発現を認めた。ヒト FALS (Ok1 家系, 米国 C 家系), トランスジェニックラット(H46R, G93A)には、neuronal Lewy body-like hyaline inclusions (LBHIs)が存在した。ほとんどの LBHIs は GPx, Prx2 に陽性を呈し、SOD1 にも陽性であった。このことは、変異 SOD1 凝集に伴って Prx2 と GPx が LBHIs 内にトラップされることにより、細胞内過酸化水素量のみならずレドックス制御システムのコントロールも不能に陥ることを意味する。即ち、このことが、変異 SOD1 の aggregation toxicity に基づく神経細胞死を更に増強させていることが示唆された。

共同研究者：佐伯有祐¹, 青木正志², 永井真貴子², 糸山泰人², 加藤雅子³, 平野朝雄⁴, 大浜栄作^{1,3}

¹鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門, ²東北大学大学院医学系研究科神経学講座神経内科学, ³鳥取大学医学部附属病院病理部, ⁴Monefiore Medical Center 神経病理 (USA)

A. 研究目的

生きている細胞は、生理的条件下や外的刺激により superoxide radicals (SRs)を産生する。SRs は細胞体内では SOD1 により H₂O₂ となり、ペルオキシレドキシシン(Prx)やグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)により水と酸素とに分解される。即ち、Prx と GPx は細胞内 H₂O₂ を直接コントロールすると同時に、細胞内レドックス制御の最初の反応ステップに関与し、細胞分化、免疫反応や細胞成長などの重要なシステムにリンクしている。SOD1 遺伝子異常を伴う生体系において、この一連の反応系の中に変異 SOD1 が入り込むことにより、レドックス制御機構

にどのような変化を与えるのかを検討した。

B. 研究方法

SOD1 遺伝子異常を伴うヒト FALS として、Ok1 家系(コドン 126 の 2 塩基欠失)² 症例と、米国 C 家系(A4V)³ 症例を使用した。ヒト変異 SOD1 遺伝子を導入したトランスジェニックラット(IrgR)として、end stage の H46R-IrgR と G93A-IrgR とを用いた。対照としては、ヒトでは正常 20 症例の脊髄(37-75 歳)を用いた。ラットでは H46R-及び G93A-IrgR の同胞と正常 SD ラットの脊髄を使用した。また Prx を同定するために、Prx ファミリーのうち脳に多く局在する Prx2(チオレドキシシンペルオキシダーゼ)に対する抗 Prx2 抗体を作製した。各組織材料から6μm 厚パラフィン切片を作製し、ルーチン染色と免疫組織化学染色とに供した。免疫組織化学染色は、一次抗体として抗 Prx2 抗体, 抗 GPx 抗体, 抗 SOD1 抗体を用い、ABC 法との組み合わせで DAB 発色にて行った。

C. 研究結果

正常脊髄においては、Prx2 と GPx とは、ヒト及びラット共に主として前角細胞をはじめとする神経細胞に強く局在すると同時に、neuropil にも存在し脊髄灰白質が淡く染色される neuropil pattern を示した。抗 GPx 抗体を用いると、ほとんどの神経細胞の胞体及び樹状突起がびまん性に染色され、核は染色されなかった。Prx2 の染色性に関しては、ほとんど全ての神経細胞体や樹状突起が染色されると同時に、核が染色される神経細胞も観察された。SOD1 遺伝子異常を伴う 2 家系 5 症例の FALS の全例に、神経細胞内 Lewy body-like hyaline inclusions (LBHIs) が認められ、また、end stage における H46R-及び G93A-TrgR においても LBHIs を多数認めた。FALS 及び TrgR に見られた LBHIs は HE 染色などのルーチン染色では両者同一像を呈し、また抗 SOD1 抗体に強陽性を示した。抗 Prx2 抗体を用いた解析では、FALS 及び TrgR に出現するほとんど全ての LBHIs は、Prx2 に強く染色された。同様に、GPx に関しても、FALS 及び TrgR における LBHIs のほとんどが GPx 陽性を示した。連続切片法で解析すると、LBHIs は、SOD1、Prx2、GPx の三者に対する抗体によって同時に強く染色された。

D 考察

SOD1 遺伝子異常の形態学的特徴である LBHIs が三者同時に陽性となる所見は、変異 SOD1 を有する生体系(即ち FALS とそのモデル動物である TrgR)の両方に、共通に認められた所見であった。SOD1 遺伝子異常を伴う FALS では、遺伝により両親の片方由来の変異 SOD1 が存在しており、TrgR では、強制的にヒト変異 SOD1 (H46R, G93A)が導入されている。つまり、両者共に in vivo 状態として、活性酸素消去/レドックス制御システムに変異 SOD1 が関与している状態となっている。今回の検索で、この両者において変異 SOD1 が凝集して LBHIs を形成してゆく過程で、Prx2 と GPx の両方が LBHIs の内に凝集してくることが判明した。このことは、Prx2 と GPx とが細胞内 H₂O₂ を直接コントロールしてい

ることを考慮した場合、変異 SOD1 凝集に伴って Prx2 と GPx との両者が LBHIs 内にトラップされることにより、細胞内 H₂O₂ 量の制御不能を招くことを意味する。さらに、Prx2 と GPx とは、細胞内レドックス制御システムを形成する重要な最初のステップを担っている。細胞内レドックス制御システムが、細胞分化、免疫反応、細胞成長、アポトーシスなどの細胞が生存するのに不可欠な重要なシステムにリンクしていることを併せ考えると、LBHIs への Prx2 と GPx の凝集は、この重要な細胞内レドックス制御システムの破綻を意味する。

E. 結論

変異 SOD1 を有する生体系においては、活性酸素種消去/レドックス制御システムに重大な障害を来すことにより、変異 SOD1 の aggregation toxicity に基づく神経細胞死をさらに増強させていることが解明できた。

F. 文献

1. Kato S. et al. Advanced glycation endproduct-modified superoxide dismutase-1 (SOD1)-positive inclusions are common to familial amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 gene mutations and transgenic mice expressing human SOD1 with a G85R mutation. *Acta Neuropathol* 2000; 100(5): 490-505
2. Kato S. et al. New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 (SOD1) gene mutations: Inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes. *ALS and other motor neuron disorders* 2000; 1(4): 163-184
3. Kato S. et al. Copper chaperone for superoxide dismutase co-aggregates with superoxide dismutase 1 (SOD1) in neuronal Lewy body-like hyaline inclusions: an immunohistochemical study on familial amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol* 2001; 102(3): 233-238
4. Kato S. et al. Formation of advanced glycation endproduct-modified superoxide dismutase-1 (SOD1) is 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. *Neuropathology* 2001; 21 (3): 67-81

5. Kato S. et al Formation of advanced glycation endproduct (AGE)-modified superoxide dismutase 1 (SOD1) is common to familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS) patients with SOD1 gene mutation and G85R transgenic mice. *Molecular Mechanism and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Edited by K. Abe. Amsterdam, Elsevier Science, 2001: pp265-271

厚生科学研究費補助金（特定疾患研究事業）
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
研究報告書

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

研究協力者 加藤信介 鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門

研究要旨: SOD1 遺伝子異常を伴う FALS 及び G93A トランスジェニックマウス(TrgM)の肝組織において、活性酸素消去系であるとともにレドックス関連酵素でもあるペルオキシレドキシシン(Prx)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)の発現について検討した。G93A TrgM の end stage における HE 染色では、正常対照と比較して、肝細胞の数は保たれていたが、Kupffer 細胞の数は減少していた。免疫組織化学的には、肝細胞、Kupffer 細胞共に、Prx, GPx の発現が低下していた。SOD1 遺伝子異常を伴う FALS の症例においても、Prx, GPx の発現が低下していた。ヒト FALS でも G93A TrgM でも、肝細胞、Kupffer 細胞には、神経細胞で見られるような Lewy body-like hyaline inclusions (LBHIs)は認められず、SOD1 の凝集物も明らかではなかった。しかしながら ubiquitin 染色では、一部の肝細胞内と Kupffer 細胞内に陽性物質が認められた。即ち、肝細胞においては、変異 SOD1 が生体内に入ることによって、レドックス制御機構の破綻が生じていることが判明した。更に、肝細胞内では変異 SOD1 凝集機構が働きにくい環境が推測され、この違いが total cell death のプロセスを歩む神経細胞との違いの一因となるものと考えられた。

共同研究者：加藤雅子¹、西野武士²、阿部靖子²、
大浜栄作^{1,3}
¹鳥取大学医学部附属病院病理部、²日本医科大学
生化学第 1 教室、³鳥取大学医学部附属脳幹疾患研
究施設脳神経病理部門

保たれ、神経細胞は減少することを明らかにする。
更にこのメカニズムを解明することによって、運動
ニューロンが選択的に障害されるメカニズムを解明
し、治療の新しい手がかりを見つけようとするもの
である。

A. 研究目的

活性酸素消去酵素である SOD1 に続く最初の過酸化水素の消去系酵素であるペルオキシレドキシシン(Prx)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)は、細胞内過酸化水素量を直接コントロールすると同時に、レドックス制御システムとして重要な細胞内シグナル伝達系にも関与している。今回、我々は、Prxファミリーのうち Prx1 と Prx2 に対する抗体を作製し、その肝臓組織内の詳細な局在を明らかにすると共に、これらのレドックス関連酵素の発現変化について検討することによって、前角細胞と同じことが肝細胞にも生じているにもかかわらず、肝細胞は

B. 研究方法

モデル動物としてG93Aトランスジェニックマウス (TrgM) (B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur^{dl})の end stage (n=5)と正常対照マウス (n=5)を用いた。さらにヒト剖検例として病期期間が11年に及ぶ FALS 長期生存例(Oki家系, frame-shift 126 mutation)を検索した。肝臓のパラフィンブロックを作製後、4μm厚切片を作製し、HE染色、免疫組織化学的染色に供した。一次抗体として、Prx1、Prx2、GPx、SOD1、ubiquitin、4-hydroxy-2-nonenal (HNE)、acrolein、8-hydroxy-deoxyguanosin (8-OHdG)に対する抗体を用い、ABC法

との組み合わせでDAB発色にて行った。

C. 研究結果

G93A TrgMのend stage群における肝臓のHE染色では、肝細胞に明らかな単一細胞壊死や封入体形成の所見はなく、胆汁うっ滞や炎症細胞浸潤、間質の線維化の所見も認められなかった。しかしながら詳細に検討すると、正常対照に比べて肝細胞の小型化、核の大小不同や2核の細胞の増加が認められた。量的解析として単位体積あたりの細胞数を比較してみると、肝細胞数には両者間で有意差がなかったが、Kupffer細胞数はG93A TrgM群において有意に減少していた。免疫組織化学的検索の結果、抗ヒトSOD1抗体による染色では、マウス正常対照肝細胞は陰性であったが、G93A TrgM群の肝細胞、Kupffer細胞はいずれも陽性を示した。しかし、SOD1陽性の凝集物は明らかではなかった。抗ubiquitin抗体を用いた解析では、正常対照とG93A TrgM群の両者共に、Kupffer細胞の胞体内の一部にubiquitin陽性の所見が認められたが、TrgMではその数が増加しており、さらに一部の肝細胞内の胞体内にもubiquitin陽性の顆粒状物質が認められた。レドックス関連酵素であるPrx1に関しては、正常対照マウスでは、肝細胞、Kupffer細胞の細胞質および一部の核が陽性を呈した。一方、G93A TrgMでは、細胞質、核の両者共に染色性が低下していた。Prx2もPrx1と同様の所見を示した。GPxは、正常対照マウスの肝細胞とKupffer細胞の細胞質に陽性を示したが、G93A TrgMの肝細胞及びKupffer細胞は細胞質の染色性の低下を認めた。脂質過酸化の指標としてのHNEの染色性については、正常対照マウスは陰性である一方、G93A TrgMでは、Kupffer細胞に強い陽性所見を示した。肝細胞は陰性であった。Acroleinも同様の所見を得た。8-OHdGは、G93A TrgM群のみにおいて、Kupffer細胞の核と細胞質の一部に陽性を示し、肝細胞は陰性であった。

SOD1遺伝子異常を伴うヒトFALS長期生存例の肝組織については、一部で脂肪変性が認められたが、肝細胞壊死、炎症細胞浸潤、線維化などの所見は認

められなかった。FALSにおいては、正常対照と比較してSOD1の染色性に若干の低下がみられ、一部のKupffer細胞と肝細胞内に顆粒状のubiquitin陽性物質が認められた。抗Prx1、Prx2及びGPx抗体染色では、正常対照が肝細胞、Kupffer細胞共に陽性を示したのに対し、FALSでは陰性を呈した。Acrolein、HNE、8-OHdGについては、いずれも正常対照では陰性であったが、FALSの長期生存例では、一部のKupffer細胞がHNEに弱陽性を示し、肝細胞及びKupffer細胞の一部が8-OHdG陽性を示した。

D. 考察

正常対照に比べて、G93A TrgMにおいては、肝細胞の数は保たれているにもかかわらずKupffer細胞の数が減少していた。これは、肝細胞とKupffer細胞の両者にPrx、GPxの発現低下がありレドックス制御機構の破綻が予想される上に、Kupffer細胞は自らfree radicalを産生することから、Kupffer細胞に一層その影響が強く生じたものと考えられる。実際、肝細胞は、HNE、acrolein、8-OHdGに陰性であったが、Kupffer細胞は陽性であり、かつて、強い酸化ストレス、DNA障害がKupffer細胞に加わったことを意味する。一方、肝細胞には、このような影響はあまり及んでいないことが推測された。

今回、肝細胞におけるレドックス関連酵素の発現を検討することによって、ヒトでもマウスでも、生体内に変異SOD1が入ることによって、肝細胞にも前角細胞と同様の変化、即ち、Prx、GPxの発現の低下が生じていることが初めて明らかになった。しかし、このようなレドックス制御システムの破綻があるにもかかわらず、肝細胞は保たれている。肝細胞には、ubiquitin陽性の凝集物が一部の細胞質内に認められたが、SOD1遺伝子異常を伴うFALS及びそのモデル動物に特徴的な所見であるLewy body like-hyaline inclusionは認められず、SOD1、Prx、GPx陽性の凝集物も認められない。このことから、肝細胞はaggregation mechanismが起こりにくい細胞内環境にあることが推測された。従って、このメカニズムを解明することによって、脊髄前角

細胞における変異SOD1凝集、即ちaggregation toxicityに基づく神経細胞死の阻止につながると考えられた。

E. 結論

肝細胞においては、変異SOD1が生体内に入ることによって、レドックス制御機構の破綻が生じていることが判明した。更に、肝細胞内では変異SOD1凝集機構が働きにくい環境が推測され、この違いがtotal cell deathのプロセスを歩む神経細胞との違いの一因となるものと考えられた。

F. 文献

Kato M. et al. Increased midkine expression in hepatocellular carcinoma: Immunohistochemical and in situ hybridization analyses. Arch Pathol Lab Med 124(6): 848-852, 2000

Kato M. et al. Immunohistochemical and in situ hybridization analyses of midkine expression in thyroid papillary carcinoma. Mod Pathol 13(10): 1060-1065, 2000

Kato M. et al. Divergent expression of midkine in the human fetal liver and kidney: An immunohistochemical analysis of developmental changes in hilar primitive Bile ducts and hepatocytes. Liver 20(6): 475-481, 2000

Kato M. et al. Immunohistochemical localization of truncated midkine in developing human bile ducts. Histol and Histopathol 18: 129-134, 2003

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」）

研究報告書

「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」

片山泰一、山岸覚、遠山正彌（大阪大学大学院医学系研究科・

プロセッシング機能形態）

加藤昌昭、青木正志、糸山泰人（東北大学・医学部・神経内科）

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は遅発性、進行性、一部が家族性、大部分が孤発性、特定の細胞（運動神経）が変性を受けるなどの点から、アルツハイマー病（AD）やパーキンソン病（PD）など他の神経変性疾患と類似性が高い。近年、ADやPDに見られる神経細胞死は小胞体（ER）を起源とする細胞死であることが報告されている。我々はこの点に着目し、ALS発症とERストレスとの関わりについて研究を開始した。ALSのモデル系として早期発症原因として知られているL84V SOD1を恒常的に発現するSK-N-SH細胞を作製し、この細胞にERストレスを負荷すると、1) SOD1が凝集体を作る、2) 凝集したSOD1がユビキチン化している、3) ゴルジ装置が崩壊する、というALS患者の運動神経における臨床学的知見と共通した点が観察されたため、ALS解析のモデルとして有用であることが示唆された。このモデル細胞において小胞体ストレスを負荷した際に観察されたSOD1が細胞内のどこで凝集しているかの検討を行った。その結果、凝集したSOD1はミトコンドリアやゴルジ装置においては共局在は観察されなかったが、一部分は小胞体に共局在していること、L84V SOD1細胞が、ERストレスに対し脆弱になっていることが明らかになった。更に詳細な検討から、L84V SOD1細胞はERストレスに対する応答性を解析したところ、XBP1のスパライシングやGRP78の誘導に差は認められなかったが、caspase-4の活性化及び、caspase-4自身の発現誘導がL84V SOD1細胞で高くなっているということが明らかとなった。

以上の結果から、L84V SOD1細胞は小胞体ストレスに対し脆弱になっているということが明らかになり、この脆弱性はcaspase-4に対する応答性の違いによってもたらされているものと思われる。さらには、ALSで見られる神経細胞死もERストレスが原因となって生じている可能性が示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は中高年期に発症し、大脳、脳幹、脊髄の運動ニューロンが選択的、かつ系統的に侵され2~5年で呼吸不全に至り、死にいたる可能性が非常に高い神経変性疾患である。現在考えられている発症原因としては、グルタミン酸が神経細胞の過興奮を引き起こすという説が有力であるが、なぜ中高年になり発症するのか、運動ニューロンのみが選択的に脱落するのかという、根源的な原因究明には至っていない。

我々はALSが遅発性、進行性かつ特定の細胞（運動神経）が変性を受ける点、一部

が家族性であるが大部分が孤発性である点から、アルツハイマー病（AD）やパーキンソン病（PD）など他の神経変性疾患と類似性が高い。近年、ADやPDに見られる神経細胞死は小胞体（ER）を起源とする細胞死であることが報告されている。我々はこの点に着目し、ALS発症とERストレスとの関わりについて研究を開始した。

B. 研究方法

ALSのモデル系としては早期発症の原因として知られているL84V SOD1を恒常的に発現するSK-N-SH細胞を作製し、この細胞にERストレスとして1 µg/mlのツニカマイシンを負荷し、次の項目について検討を行った。

1) 本細胞腫に ER ストレスを負荷した際、ALS 患者の運動神経における臨床学的知見と共通した点が観察されるか？

本細胞腫は α -MEM+10%FCS で飼育した。小胞体ストレスとしてツニカマイシン、サブシガルギンをそれぞれ、 $1\mu\text{g/ml}$ 、 $0.3\mu\text{M}$ 培養液中に添加し、刺激開始とした。使用した抗体は抗ユビキチン抗体 (ストレスジェン)、SOD1 抗体 (カルビオケム)、KDEL 抗体 (ストレスジェン)、mitotracker (モレキュラープローブ)、GM130 (ファーミンジェン) を用いた。

2) 細胞腫は正常細胞に比べて ER ストレスに対する感受性が增強しているか？

ER ストレスの濃度を変化させ負荷後、24 時間で培養上清を回収し、MTS アッセイキット (プロメガ) を用いた。

3) 2) の結果、增強しているとすればどのような機構が考えられるのか？

XBP1、GRP78、caspase-4 を特異的に増幅するプライマーを作成し、RT-PCR 法によって各々のバンドを検出した。Caspase-4 については特異的抗体 (シグナルトランスダクション社) の抗体を使用し、ウェスタンブロットを行った。

C 研究結果

1) 細胞腫に ER ストレスとしてツニカマイシン、或いはサブシガルギンを処置し、24 時間後細胞を固定し、SOD1 抗体及びユビキチン抗体で免疫染色を行った。その結果、SOD1 が凝集体を作り、凝集した SOD1 がユビキチン化されていることが明らかになった。また、ゴルジ装置のマーカーとして GM130 抗体を用いて同様に免疫組織化学的検討を行ったところ小胞体ストレス負荷前に比べてゴルジ装置が崩壊する、という ALS 患者の運動神経における臨床学的知見と共通した点が観察されたため、この L84VSOD1 発現 Cell line は ALS 解析のモデルとして有用であることが示唆された。

次にこのモデル細胞におい小胞体ストレスを負荷した際に観察された SOD1 が細胞内のどこで凝集しているかについて検討を行った。その結果、ER ストレスにより凝集した SOD1 がストレス負荷後ミトコンドリアやゴルジ装置において強く共局在されるような観察はされなかったが、一部分は小胞体に共局在していることが明らかとなった。

2) 84V SOD1 細胞が、コントロール細胞と比較して ER ストレスに対し脆弱になっているか否かをツニカマイシン、サブシガルギンの両薬剤を用いて検討した。その結果、normal SK 細胞に比して、L84V SOD1 細胞は両薬剤に対し脆弱になっているということが ER ストレス負荷後の経時的細胞死評価系 (MTS アッセイ) の後、明らかとなった。

3) 細胞の ER ストレスに対する応答性を解析したところ、小胞体ストレストランスデューサー IRE1 が小胞体ストレスを受けると活性化しスプライシングを受ける XBP1 のスプライシングやスプライスされた XBP1 が結合し転写因子として働く分子シャペロン GRP78 の誘導に差は認められなかったが、ヒトにおける小胞体ストレス特異的に活性化される caspase として我々が証明した caspase-4 の活性化及び、caspase-4 自身の発現誘導が L84V SOD1 細胞で高くなっているということが明らかとなった。

D 考察

SOD1 の変異体 L84V を定常的に発現する神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞を構築した。この細胞は継代するだけでは特に目立った変化を見せないが小胞体ストレス状態に置かれると 24 時間後には細胞質に多数の構造物を生み出した。しかしながら、SOD1 はもともと細胞質に存在する蛋白質であって小胞体を経由しないことを考えると、小胞体ストレスが加わった時見られるこの凝

集体は小胞体関連分解に異常をきたして間接的におきている現象であると考えられる。しかしながら、caspase-4 は L84V の存在は小胞体ストレスが加わると著しく発現自体が上昇した。このことは L84V が存在すると、小胞体ストレス状態を大きく受けやすくしている可能性を示している。即ち、細胞質に存在する L84VSOD1 が小胞体から運び出される不良蛋白質の処理能力を低下させ、小胞体内腔に異常蛋白質が蓄積しやすくなりその結果、caspase-4 の発現上昇につながっているのかもしれない。また、凝集物は免疫組織化学的検出方法ではユビキチン化されているように観察されたが、今後は小胞体、ユビキチン両方の抗体を用いてウェスタンブロットティングにより degradation された蛋白質を確認する必要があると考えられる。

E 結論

以上の結果から、L84V SOD1 細胞は小胞体ストレスに対し脆弱になっているということが明らかになり、この脆弱性は caspase-4 に対する応答性の違いによってもたらされているものと思われる。さらには、ALS で見られる神経細胞死も ER ストレスが原因となって生じている可能性が示唆された。今後は L84V SOD1 トランスジェニックマウスの motor neuron を用い、より in vivo に近い状況での検証を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

本研究に関する論文はまだありません。

2.学会発表

山岸覚 他、「筋萎縮性側索硬化症の発症メカニズムの解析」日本分子生物学会（横浜）2002年12月

H 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究報告書

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

研究協力者 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

研究要旨 成体ラット顔面神経核運動ニューロン損傷に対する、神経成長抑制因子(growth inhibitory factor: GIF)組換えアデノウイルスの保護効果について検討した。GIF-Myc 組換えアデノウイルスを作製し、12 週齢ラット右顔面神経を引き抜き除去後、同ウイルスを傷害側の茎乳突起に注入した。組換えウイルスの感染・逆行輸送により傷害側運動ニューロンが GIF, Myc 免疫染色で陽性となった。組換えウイルス接種により同ニューロン死が抑制され、同ニューロンの choline acetyltransferase 免疫反応性が改善、一酸化窒素合成酵素活性が抑制された。以上から、運動神経損傷や運動ニューロン疾患に対する GIF 投与の有効性が示唆された。

A. 研究目的

神経成長抑制因子(growth inhibitory factor: GIF)は metallothionein (MT) family に属する Zn,Cu 結合蛋白のひとつ(MT-III)であり、神経系に豊富に発現している。GIFは培養ニューロンに対するグルタミン酸、一酸化窒素(NO)、 β -アミロイドの神経毒性を軽減する。また、GIF をノックアウトした変異 SOD1 トランスジェニック・マウスは、GIF が正常な変異 G93A マウスに比べて運動機能低下の進行が早く生存期間が短縮する (Puttaparthi et al., 2002)。これらは GIF の神経栄養因子効果を示唆しているが、損傷運動ニューロンに対する外来性 GIF の保護効果は未だ検討されていない。我々はこれまで、成体ラット顔面神経核運動ニューロン損傷に対する各種神経栄養因子組換えアデノウイルスの保護効果について検討し、GDNF, BDNF, TGF β 2 組換えウイルスが有効であることを報告してきた。本研究では、GIF 組換えアデノウイルスを作製し、同運動ニューロン損傷に対する保護効果について検討した。

B. 研究方法

①組換えウイルス：ラット GIF cDNA は、3'端に

Myc-epitope を付加し、コスミドカセット pAxCawt に組み込んだ。これを親ウイルス DNA とともに 293 細胞に co-transfect し、継代後、精製ウイルスを得た (AxCaRGIFMyc)。この組換えウイルスを COS1 細胞に感染させ、3日後の total cell lysate および培養上清を回収し Myc に対する Western blot を行った。

②運動ニューロン損傷モデル：12 週齢 Fischer 344 雄ラット右顔面神経を引き抜き除去後、組換えウイルス(1×10^8 pfu)または PBS を傷害局所の茎乳突起に注入した。7日後、4% paraformaldehyde で灌流固定し脳幹部の凍結切片を作製、抗 Myc 及び抗 GIF 抗体を用いた免疫染色(ABC 法)を施行した。

③組換えウイルスによる保護効果の判定：損傷 4 週後の灌流固定パラフィン連続切片を作製し、5 枚毎の切片計 25 枚の Nissl 染色標本につき、顔面神経核において明瞭な核小体と Nissl 物質を有する運動ニューロンの数を算定した。また、凍結切片を用いて損傷運動ニューロンにおける choline acetyltransferase (ChAT) 抗原性の保持を抗 ChAT 抗体による免疫染色で検討した。さらに、損傷運動ニューロンにおける NO 合成酵素 (NOS) 活性を NADPH diaphorase 組織化学で検討した。

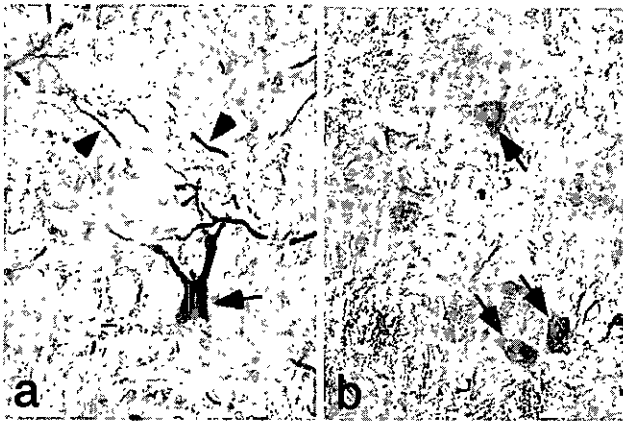


図1. 顔面神経引き抜き損傷, AxCArGIFMyc 接種7日後の障害側顔面神経核の Myc (a), GIF (b)免疫染色. 運動ニューロン(矢印)及びその突起(矢頭)が陽性.

C. 研究結果

AxCArGIFMyc の COS1 細胞感染により, GIF-Myc が細胞内で発現し培養上清に放出されることを Western blot で確認した. 同ウイルスを顔面神経引き抜き後の茎乳突孔に注入することにより, ウイルスの感染・逆行輸送によって傷害側顔面神経核運動ニューロンが Myc, GIF 各免疫染色で陽性となった(図1). 損傷4週後, 顔面神経核の運動ニューロン数を算定したところ, PBS 投与群(4週後対照の $30.2 \pm 6.0\%$, $n=8$)では傷害側顔面神経核運動ニューロンの脱落を認めたが, AxCArGIFMyc 投与群 ($54.6 \pm 7.4\%$, $n=8$)では脱落が有意に抑制された(図2). また, AxCArGIFMyc 投与により傷害側運動ニューロンにおける ChAT 免疫反応性が改善され, NOS 活性が抑制された(図3).

D. 考察

MT は細胞内 Zn, Cu 代謝に関わり, SOD1 を含む金属結合蛋白質への金属の供給に重要な働きをしている. また, MT は SH 基に富み, NO と結合しラジカルを消去する働きが想定されている. 本研究結果は GIF (MT-III)の成体損傷運動ニューロンに対する明瞭な神経保護効果を示しており, 成人における運動神経損傷や運動ニューロン疾患に対する GIF 投与の有効性を示唆するものと思われた.

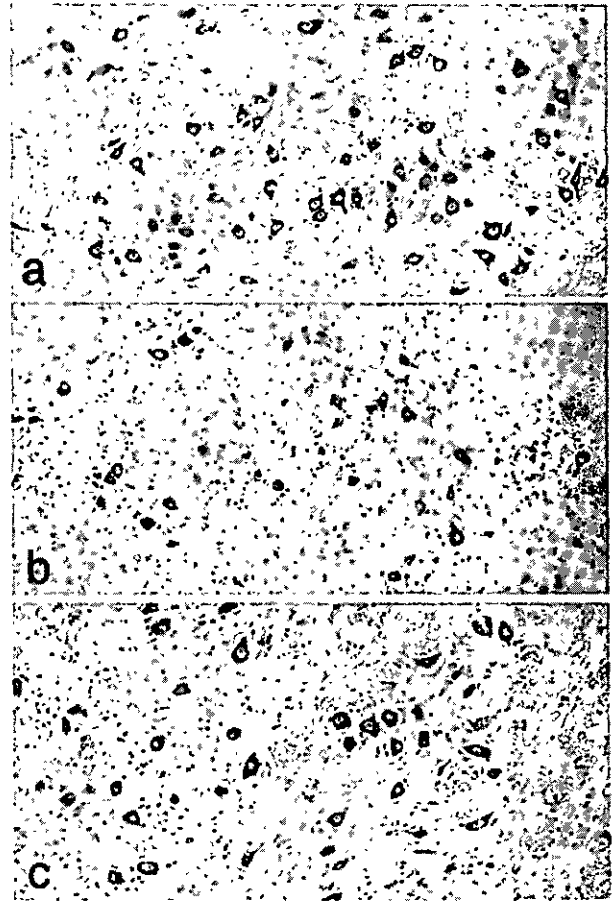


図2. 顔面神経引き抜き損傷4週後の Nissl 染色像. 健常側(a), 傷害側 PBS 投与(b), 傷害側 AxCArGIFMyc 投与(c).

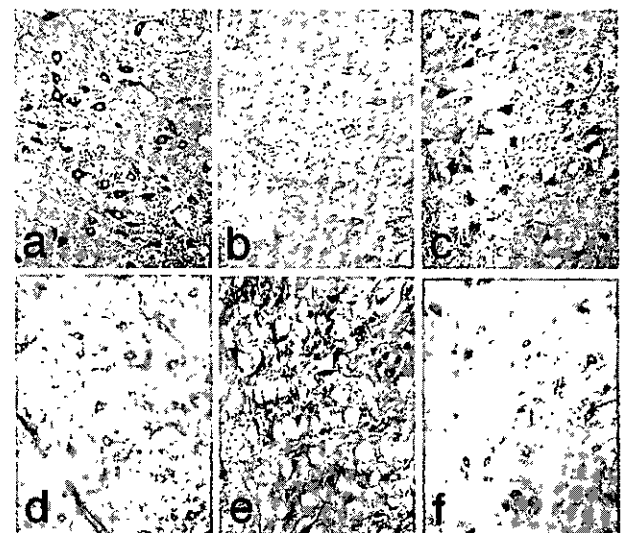


図3. 顔面神経引き抜き損傷1週後(a-c), 2週後(e-f)の ChAT 免疫染色(a-c)および NADPH diaphorase 組織化学(d-f). 健常側(a,d), 傷害側 PBS 投与(b,e), 傷害側 AxCArGIFMyc (c,f) 投与.

今後, 運動ニューロン変性に対する GIF の保護作用のメカニズムを詳細に検討することにより, 新

規治療法の開発に寄与しうる可能性が考えられた。

E. 結論

成体ラット顔面神経核運動ニューロン損傷に対する GIF 投与の有効性を認め、成人における運動神経損傷や運動ニューロン疾患に対する GIF の保護効果が示唆された。

本研究は、坂本 剛、川添陽子（東京都神経科学総合研究所分子神経病理）、内田洋子（東京都老人総合研究所老年病ゲノムグループ）、保住 功、犬塚 貴（岐阜大学医学部神経・老年学分野）、井上聖啓（東京慈恵会医科大学神経内科）との共同研究で行われた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sango K, Yamanaka S, Ajiki K, Tokashiki A, Watabe K. Lysosomal storage results in impaired survival but normal neurite outgrowth in dorsal root ganglion neurons from a mouse model of Sandhoff disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002; 28: 23-34.
2. Shen J-S, Watabe K, Meng XL, Ida H, Ohashi T, Eto Y. Establishment and characterization of spontaneously immortalized Schwann cells from murine model of globoid cell leukodystrophy (Twitchee). *J Neurosci Res* 2002; 68: 588-594.
3. Watabe K, Sakamoto T, Kawazoe Y, Michikawa M, Miyamoto K, Yamamura T, Saya H, Araki N. Tissue culture methods to study neurological disorders: Establishment of immortalized Schwann

cells from murine disease models. *Neuropathology* 2003;23: 64-74.

4. Saito K, Shiotani A, Watabe K, Moro K, Fukuda H, Ogawa K. Adenoviral GDNF gene transfer prevents motoneuron loss in the nucleus ambiguus. *Brain Res* 2003;962:61-67.
5. Sakamoto T, Kawazoe Y, Shen J-S, Takeda Y, Arakawa Y, Ogawa J, Oyanagi K, Ohashi T, Watanabe K, Inoue K, Eto Y, Watabe K. Adenoviral gene transfer of GDNF, BDNF and TGF β 2, but not CNTF, cardiotrophin-1 or IGF1, protects injured adult motoneurons after facial nerve avulsion. *J Neurosci Res* 2003 (in press).
6. Hakuba N, Watabe K, Hyodo J, Ohashi T, Eto Y, Taniguchi M, Yang L, Tanaka J, Hata R, Gyo K. Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Gene Ther* 2003 (in press).
7. Shirakura M, Fukumura M, Inoue M, Fujikawa S, Maeda M, Watabe K, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Hasegawa M. Sendai virus vector-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents delayed neuronal death after transient global ischemia in gerbils. *Exp Anim* 2003 (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

変異 SOD1 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

研究協力者 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

研究要旨 臨床経過が異なる FALS モデルである H46R および G93A 変異 SOD1 を導入した成体ラットに顔面神経核運動ニューロン損傷を加え、運動ニューロンの傷害性を検討した。12-13 週齢の発症前各変異 SOD1 導入ラットと対照ラットの顔面神経を引き抜き除去した。損傷 2 週間後、顔面神経核の運動ニューロン数を算定したところ、変異 SOD1 導入ラットで運動ニューロン死が 30~40%促進され、G93A 変異ラットでより顕著であった。免疫染色により、変異 SOD1 導入ラットの引き抜き損傷運動ニューロンの胞体および軸索に SOD1 の蓄積が認められた。以上から、運動徴候発症前の 2 種類の変異 SOD1 導入ラットで、神経損傷による運動ニューロンの易傷害性が示された。

A. 研究目的

現在、運動ニューロン疾患の実験動物モデルとして、1) 変異 SOD1 導入による家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS) モデル、2) 顔面神経、舌下神経、脊髄神経などの神経切除(axotomy) や引き抜き損傷(avulsion) による運動神経損傷モデルが主に用いられている。これまで我々は、成体ラット顔面神経引き抜き損傷による顔面神経核運動ニューロン死に対する各種神経栄養因子組換えアデノウイルスベクターの保護効果について検討してきた。一方、FALS、神経損傷の両モデル動物における運動ニューロン死が、部分的にせよ共通のカスケードを経て起こっている可能性が考えられる。本研究では、運動徴候発症前の H46R および G93A 変異 SOD1 導入ラット (Nagai et al., J Neurosci 2001;21:9246-9254)の顔面神経を引き抜き除去し、運動ニューロンの傷害性を検討した。

B. 研究方法

運動徴候が出現する前の生後 80-90 日齢雌 H46R 変異 SOD1 導入ラット(n=8)と同腹の正常対照ラッ

ト(n=11)、G93A 変異 SOD1 導入ラット(n=7)と対照ラット(n=6)の右顔面神経をそれぞれ引き抜き除去した。損傷 2 週後に 4% paraformaldehyde で灌流固定し脳幹部のパラフィン連続切片を作製、5 枚毎の切片計 25 枚の Nissl 染色標本につき、顔面神経核において明瞭な核小体と Nissl 物質を有する運動ニューロンの数を算定した。また、同パラフィン切片を用いて SOD1 (Calbiochem), phosphorylated neurofilament (SMI-31), ubiquitin(DAKO) 抗体による免疫染色を施行した。

C. 研究結果

損傷 2 週後の運動ニューロン生存率 (mean \pm SD %) は、H46R 導入ラット(47.7 \pm 7.9 %)と同対照ラット(72.9 \pm 3.2 %)に比べ 30%前後低下した。G93A 導入ラットの運動ニューロン生存率(35.4 \pm 10.8 %)も同対照ラット(76.7 \pm 7.3 %)に比べ 40%程度低下し、運動ニューロンの易傷害性は G93A 導入ラットでより顕著であった。非損傷側の運動ニューロン数は、いずれの実験群においても有意差はなかった (図 1)。

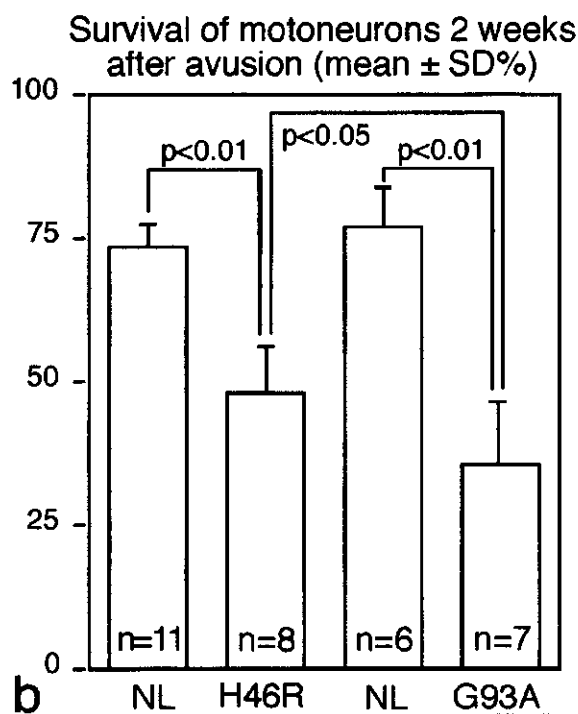
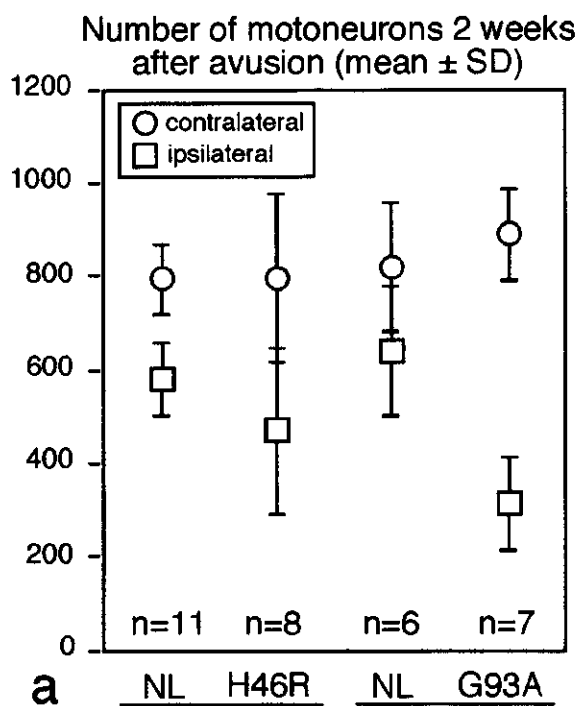


図1. 顔面神経引き抜き損傷2週後の H46R, G93A 変異 SOD1 導入ラットおよび同腹対照ラット(normal littermate; NL)における顔面神経核運動ニューロン数を算定. a: 運動ニューロン数. b: %損傷側/非損傷側 (p: Student's t-test).

顔面神経核を含む脳幹部の SOD1 免疫染色では, H46R 変異ラットの非損傷側では陽性染色を認めなかったが, 引き抜き側では運動ニューロンの胞体および軸索がびまん性に染色された. 一方, G93A

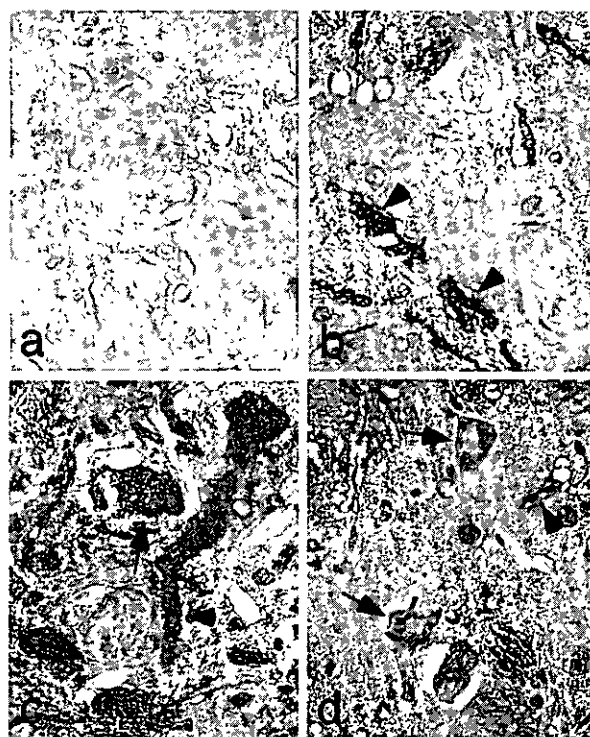


図2. 顔面神経引き抜き損傷2週間後の顔面神経核運動ニューロンの SOD1 免疫染色. H46R 変異ラット非損傷側(a), 損傷側(b), G93A 変異ラット非損傷側(c), 損傷側(d). 運動ニューロンの胞体(矢印)および軸索(矢頭)が陽性.

変異ラットでは, 非損傷側ですでに軸索が SOD1 免疫染色陽性で neuropil の空胞化を伴い, 引き抜き側では軸索に加えて運動ニューロンの胞体に顆粒状に染色された. 一方, 各群の顔面神経核運動ニューロンには明らかな細胞内封入体を認めず, ubiquitin 免疫染色も全て陰性であった. また, 全ての実験群で引き抜き側の顔面神経核運動ニューロンの胞体内にリン酸化ニューロフィラメントがびまん性に染色された. なお, 茎乳突孔出部での顔面神経の切断(axotomy)では, 両変異 SOD1 導入ラット・対照ラットともに運動ニューロンの有意な変性脱落を認めなかった.

D. 考察

本研究により, 運動徴候発現前の生後 80~90 日齢の H46R および G93A 導入ラットでは, 顔面神経引き抜き損傷により誘発される運動ニューロン死が各対照ラットに比べて約 30~40%程度促進し,

G93A 導入ラットでより顕著であることが示された。こうした運動ニューロンの易傷害度は、各々の変異 SOD1 導入ラットにおける運動徴候の発症時期 (G93A 変異ラットで平均 120 日齢, H46R 変異ラットで平均 150 日齢), 疾患の進行速度, 生存期間などの臨床経過と相関しており, 変異 SOD1 に起因する運動ニューロン死と神経損傷によるニューロン死の間には部分的にせよ共通のカスケードがあることが示唆される。一方, 引き抜き損傷によって損傷運動ニューロンに SOD1 の発現上昇がみられ, これも細胞死に深く関与しているものと考えられるが, 細胞内封入体を認めず, 同ラットの自然経過での運動ニューロン死とは趣を異にしている。今後, より詳細な病理組織学的検討を行うとともに, 同変異ラットでの異なる日齢における脳幹・脊髄運動ニューロンの易傷害性の違いについても検討を重ねてゆきたい。

E. 結論

運動徴候発症前の 2 種類の変異 SOD1 導入ラットで, 外傷負荷による運動ニューロンの易傷害性が確認された。これらの運動ニューロン死の程度は, H46R 導入ラットと G93A 導入ラットにおける臨床経過の差違と相関していた。

本研究は, 池田 憲 (東京都神経科学総合研究所分子神経病理, PL 東京健康管理センター神経内科), 坂本 剛, 川添陽子 (東京都神経科学総合研究所分子神経病理), 青木正志, 永井真貴子, 石垣あや, 神位りえ子, 糸山泰人 (東北大学医学部神経内科), 岩崎泰雄, 木下真男 (東邦大学医学部第 4 内科) との共同研究で行われた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sango K, Yamanaka S, Ajiki K, Tokashiki A, Watabe K. Lysosomal storage results in impaired survival but normal neurite outgrowth in dorsal root ganglion neurons from a mouse model of Sandhoff disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002; 28: 23-34.
2. Shen J-S, Watabe K, Meng XL, Ida H, Ohashi T, Eto Y. Establishment and characterization of spontaneously immortalized Schwann cells from murine model of globoid cell leuko-dystrophy (Twitchee). *J Neurosci Res* 2002; 68: 588-594.
3. Watabe K, Sakamoto T, Kawazoe Y, Michikawa M, Miyamoto K, Yamamura T, Saya H, Araki N. Tissue culture methods to study neurological disorders: Establishment of immortalized Schwann cells from murine disease models. *Neuropathology* 2003;23: 64-74.
4. Saito K, Shiotani A, Watabe K, Moro K, Fukuda H, Ogawa K. Adenoviral GDNF gene transfer prevents motoneuron loss in the nucleus ambiguus. *Brain Res* 2003;962:61-67.
5. Sakamoto T, Kawazoe Y, Shen J-S, Takeda Y, Arakawa Y, Ogawa J, Oyanagi K, Ohashi T, Watanabe K, Inoue K, Eto Y, Watabe K. Adenoviral gene transfer of GDNF, BDNF and TGF β 2, but not CNTF, cardiotrophin-1 or IGF1, protects injured adult motoneurons after facial nerve avulsion. *J Neurosci Res* 2003 (in press).
6. Hakuba N, Watabe K, Hyodo J, Ohashi T, Eto Y, Taniguchi M, Yang L, Tanaka J, Hata R, Gyo K. Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Gene Ther* 2003 (in press).

7. Shirakura M, Fukumura M, Inoue M, Fujikawa S, Maeda M, Watabe K, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Hasegawa M. Sendai virus vector-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents delayed neuronal death after transient global ischemia in gerbils. *Exp Anim* 2003 (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

平成14年度 班会議

プ ロ グ ラ ム