

20020907

厚生労働科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業

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

平成14年度 研究報告書

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

平成15年3月 印刷

# 目 次

## I. 研究者一覧

## II. 総括研究報告 ..... 1

東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学 糸山 泰人

## III. 研究報告 (分担研究者)

### 1. 変異 SOD 1 の toxic gain of function の解析 ..... 5

大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学生化学 谷口 直之

### 2. 新しい HGF 発現トランスジェニックマウスの作成とヒト筋萎縮性側索硬化症に おける HGF の発現解析 ..... 9

大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻  
組織再生医学講座分子組織再生分野 船越 洋

### 3. トランスジェニックラットを用いた新しい ALS モデルに関する研究 ..... 13

東北大学医学部附属病院神経内科 青木 正志

## IV. 研究成果一覧

# 研 究 者 一 覽

## 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

### 研究者一覧

主任研究者	糸山 泰人	東北大学大学院医学系研究科神経科学講座 神経内科学	教授
分担研究者	谷口 直之	大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学生化学	教授
	船越 洋	大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻 組織再生医学講座分子組織再生分野	助教授
	青木 正志	東北大学医学部附属病院神経内科	助手

# 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

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

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

## 分担研究者

谷口直之（大阪大学大学院医学系研究科  
生化学）

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）

青木正志（東北大学医学部附属病院神経内科）

## A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は病因不明の進行性の難治性神経筋疾患である。運動ニューロンの選択的な細胞死が惹起されて、全身の筋萎縮と脱力が進行し、最終的には呼吸筋の麻痺をきたすという極めて予後が不良な疾患であり、未だ筋萎縮の進行を止める有効な治療法が確立していない。本研究は神経難病のなかでも最も苛酷な疾患と考えられる ALS の病因と病態の解明を行うことが主要な目的であり、かつその研究成果をふまえて ALS の有効な治療法の確立をめざす。前年度までの研究では、変異 SOD 遺伝子導入ラットを世界に先駆けて作製したことに加えて、トランスジェニック（Tg）マウスを用いた遺伝子工学的手法で肝細胞増殖因子（HGF）が強力な運動ニューロン死の抑制効果があることを示した。

## B. 研究方法

ALS の病因と病態は不明であるが、グルタミン酸毒性、重金属毒性およびウイルス感染説など多くの病因論が研究されてきた。これらのなかでも、家族性 ALS の病因遺伝子として発見された細胞内のフリーラジカルスカベンジャーである Cu/Zn superoxide dismutase（SOD）が最も重要なものと考えられる。本研究グループは ALS 病因解明の研究を変異 SOD に基づく運動ニューロン死の機序の解明に置き、それに関連した病態解明と治療法の確立を目指す。即ち、①変異 SOD 蛋白の物理・生化学的および立体構造的異常の検討、②変異 SOD 遺伝子を導入した ALS Tg マウスモデルとラットモデルでの病態研究、③ALS Tg ラットを用いて新たな治療法につながる HGF の運動ニューロン死の抑制の研究を行う。

### 1) 変異 SOD 蛋白の物理化学的異常の検討

正常 SOD と変異 SOD（G93A、G37R、I113T）の DNA を昆虫細胞発現ベクターに組み込み、それぞれの SOD 蛋白を精製し、SOD に対して 1mM、10mM のグルコースあるいはフルクトースと反応させ、その糖化反応の程度を抗ヘキソールリジン抗体あるいは抗フルクトースリジン抗体で検討した。またその反応中に発生す

るヒドロキシラジカルや過酸化水素を測定した。

## 2) 変異 SOD 遺伝子導入 Tg 動物モデル

① 臨床病像の異なる L84V および H46R の 2 種類の変異 SOD 遺伝子を導入したマウスの臨床症状や経過ならびに SOD 活性と脊髄の病理像を比較検討した。また、神経細胞変性への小胞体ストレスの関与を検討するために GRP78、caspase-12 および caspase-3 の免疫染色ならびに Western-blotting を行った。

② 当研究グループで作成した Tg ラットに対し bromodeoxyuridine (BrdU、50mg/kg) を 7 日間連日腹腔内投与してその 2 日後に灌流固定を行い凍結切片を作成した。抗 BrdU 抗体による免疫染色をおこない BrdU 陽性細胞を定量検討した。さらに各種の細胞マーカーと二重染色をして細胞の同定をおこなった。

③ G93A Tg ラットの髄腔内にリコンビナントヒト HGF (rh HGF) を浸透圧ポンプを用いて持続投与した。rh HGF の 40  $\mu$ g と 200  $\mu$ g を ALS 発症前の 100 日齢から一ヶ月間にわたって投与してその臨床病像と脊髄内における運動ニューロン数を定量化して比較した。対照としては PBS を用いた。

## 3) HGF の筋肉内特異的発現 Tg マウスの作成

導入する HGF 遺伝子としてラット HGF に KT3 タグを付加し、これに筋肉内特異的プロモーター (MCK プロモーター) を用いた常法で筋肉特異的発現 Tg マウスを作成した。得られた Tg ラインのうち筋肉特異的に HGF を発現するマウスを選び、それらにおいてラット HGF mRNA の発現、HGF 蛋白の定量、筋肉抽出液中の HGF 活性を MDCK 細胞に対する運動能を scattering アッセイで解析をおこなった。

## C. 及び D. 研究結果及び考察

### 1) 変異 SOD の物理化学的検討

G37R、G93A、I113T のいずれの変異 SOD 蛋白も正常 SOD と比較すると糖化反応が明らかに亢進していた。同様の実験をフルクトースで行ったがグルコースと同じように糖化の亢進が認められた。糖化反応の過程においてスーパーオキシドの活性酸素が発生することが知られている。本研究においてヒドロキシラジカルと過酸化水素を測定したところ、G93A SOD はグルコースおよびフルクトースの反応において正常 SOD の約 2 倍の過酸化水素が発生することが明らかになった。しかし、ヒドロキシラジカルの発生は確認できなかった。

### 2) 変異 SOD 遺伝子導入 Tg モデル

① 2 種類の異なる変異 SOD 遺伝子導入 Tg マウスが発症し、家族性 ALS 家系と類似した臨床病像を示した。病理像として空胞変性の少ないヒトの ALS に近いモデルが作成された。神経細胞およびグリア細胞内に認められる Lewy-body like inclusion が H46R 変異マウスにおいて著明に認められた。また、Tg マウスの脊髄において GRP78 蛋白の上昇を認め、また免疫染色において caspase-12 および 3 陽性の神経細胞が認められ、神経細胞死において小胞体ストレスが関与している可能性が示唆された。

② ALS Tg ラットの腰髄においては運動ニューロン脱落前 (15 週齢) から非 Tg ラットに比べて有意に BrdU 陽性細胞が増加しており、これは病態の進行に伴って顕著となっていた。Tg ラットにおける BrdU 陽性細胞は脊髄の後角、白質、中心管上衣細胞のみならず前角も含めた灰白質と広範にわたって認められた。二重染色の結果、これらの細胞の多くは

アストログリア、マイクログリアなどのグリア系細胞と考えられた。

③ALS Tg ラットへの髄腔内への rh HGF 投与群においては PBS 投与群に比べて有意に腰髄での運動ニューロン数は保たれていることが明らかになった。この運動ニューロン死への HGF の神経細胞保護効果は容量依存的であった。また、200  $\mu$ g の高容量 HGF 投与群では ALS の発症が対照群に比べて約 10~30 日間の延長効果を示した。

### 3) 筋肉内 HGF 発現 Tg マウス

作成した HGF-Tg マウスにおいて、mRNA と蛋白質が発現している Tg ラインを 3 つ確認した。これらの筋肉抽出液には外来性 HGF 蛋白質が高レベルで発現していた。

ヒト家族性 ALS と孤発性 ALS の脊髄では HGF とその受容体である c-Met がともに ALS-Tg マウスと同様の発現抑制を受けることが明らかになった。c-Met は運動ニューロンにおける発現レベルが疾患進行とともに上昇すること、疾患末期では反応性アストロサイトに c-Met の発現が誘導されていた。これらの結果は ALS Tg マウスの結果と極めて類似していた。

## E. 結論

ALS の病因研究における最大の疑問点は「何故ある一定年齢に達して運動ニューロンに選択的な神経細胞傷害が生じるのか？」である。近年の ALS 研究において最も重要な病因につながる発見は家族性 ALS における病因遺伝子 SOD が同定されたこととその変異遺伝子を導入することにより ALS Tg マウスが作成されたことである。本研究グループではこの変異 SOD がいかんして運動ニューロン死を引き起こすのかの機序解明を研究目的にしている。

神経細胞内での変異 SOD は正常の SOD に比べてグルコースないしフルクトースによる糖化反応を受けやすく、かつ糖化反応の過程で発生する活性酸素も増加し、この酸化ストレスの誘導が神経細胞死を惹起する可能性が示された。変異 SOD 遺伝子を導入した動物モデルにより病態解明の研究は重要である。本年度は臨床病像の異なる 2 種類の変異 SOD 遺伝子を導入したマウスを作成し、その臨床病像と病理学的所見の差異を明らかにし、変異 SOD の病因における重要な関与が明らかになった。

また、大型の ALS モデルとして作成された ALS Tg ラットにおいて、症状の進行とともに神経系前駆細胞が脊髄の全般に増殖しており、その多くはグリア系細胞に分化していることが明らかになった。今後、これらの細胞を神経細胞特に運動ニューロンへの分化に導き治療への方向性をもつ研究を進める。また、ALS Tg ラットの髄腔内へ HGF を持続注入させることにより臨床経過においては約 10~30 日間の発症を遅らせ、かつ脊髄における運動ニューロンの定量的検討においても明らかな改善が認められた。このことは治療の少ない ALS の次の新規治療法として重要な発見と考えられる。

また、遺伝子操作において HGF を筋肉特異的に発現させる Tg マウスが完成された。これも HGF の髄腔内投与と同様に将来的に ALS に対して遺伝子治療による HGF 療法に大きな期待を持たせるものと考えられる。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 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 and Taniguchi N. Facilitated glycation in mutated Cu, Zn superoxide dismutases related to familial amyotrophic lateral; sclerosis. FASEB J (2003) in press

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

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 SOD 1 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 札幌他

## H. 知的財産の出願・登録状況

ラットを用いた ALS モデル（出願済）  
他は別掲。

# 分 担 研 究 報 告

厚生省研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

筋萎縮性側索硬化症の病態解明と治療法の開発に関する研究

変異 SOD1 の toxic gain of function の解析

分担研究者 谷口直之

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。

分担研究者 谷口直之

所属施設 大阪大学大学院医学系研究科  
生化学

職名 教授

共同研究者 宮本泰豪、高橋素子、高宮  
理奈、大阪大学生化学

藤原範子 長寿科学振興財団

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た。そこで生理的加齢変化、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。

#### 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

#### B. 研究方法

正常と変異 SOD1(G93A, G37R, H113T)の cDNA を昆虫細胞発現ベクター(PVL1392)に組み込み、Sf21 昆虫細胞に強制発現させ、正常と変異 SOD1 をイオン交換カラム、ゲル濾過カラムにて精製した。精製タンパク質を 1mM、10mM のグルコ

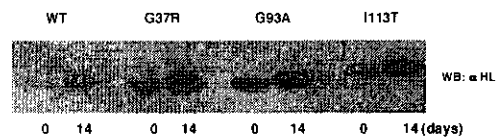
ースあるいはフルクトースと1週間反応させ、SDS-PAGE後western blottingを行い、抗ヘキシトールリジン抗体あるいは抗フルクトースリジン抗体にて糖化の程度を検討した。また Sf21 昆虫細胞に発現中に SOD1 が糖化反応を受けたため、精製後に糖化された SOD1 をボロン酸カラムで除去した。さらにグルコースあるいはフルクトースとの反応中に発生するヒドロキシラジカル、過酸化水素をそれぞれ DMPO スピントラップ法および過酸化水素測定キットにて測定した。

### C. 研究結果

変異 SOD1 タンパク質 (G37R, G93A, I113T) および正常 SOD1 タンパク質を高純度で精製した。それぞれのタンパク質を 100mM のグルコースと2週間反応させ糖化の程度を抗ヘキシトールリジン抗体で検討した。いずれの変異 SOD1 (G37R, G93A, I113T) も正常 SOD1 と比較すると糖化反応が亢進していた (図1)。図1からわかるようにグルコースと反応する以前から正常、変異 SOD1 とともに糖化をうけていたことより、昆虫細胞系で高発現させている間の約 4mM のグルコースによって SOD1 が糖化をうけていることが明らかとなった。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。その結果、1mM の低濃度のグルコースにより変異 SOD1 は糖化を受

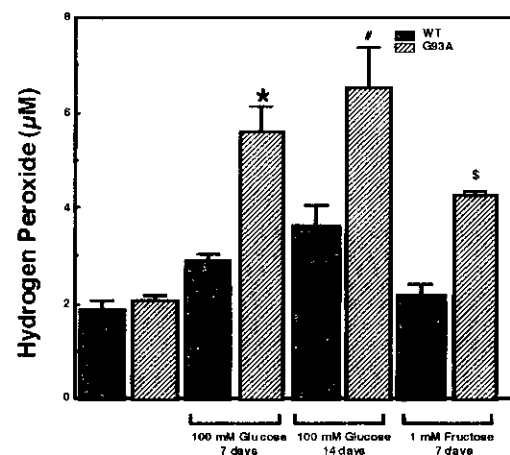
けていたが、正常 SOD1 はほとんど糖化を受けていなかった。10mM のグルコース濃度では正常 SOD1 はわずかに糖化を受けていたのに対して、変異 SOD1 は高度に糖化をうけていた。同様の実験を 1mM、10mM のフルクトースで行ったが、グルコースで得られた結果とほぼ同じ結果が得られた。

図1 正常、変異 SOD1 の糖化反応性



糖化反応の過程においてスーパーオキシドなどの活性酸素が発生することがよく知られている。そこで 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 とともにグルコース、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 (図2)。

図2、糖化反応による過酸化水素の発生



#### D. 考察

今回の結果から、変異 SOD1 が正常 SOD1 に比較して非酵素的糖化反応性が亢進することが明らかとなった。糖化反応性の亢進は、正常 SOD1 は非常にコンパクトで安定な構造をとるのに比べ、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、グルコースの生理的濃度は 5.5mM であることを考えあわせると、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。糖化反応の過程でフリーラジカルであるスーパーオキシドが発生することが知られている。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。細胞内には過酸化水素を消去する酵素（グルタチオンパーオキシダーゼ、カタラーゼ）が存在しており、この過酸化水素の発生上昇のみで細胞に酸化ストレスを惹起するとは考えにくい。しかし今回の実験では確認できなかったが、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する可能性が高い。このヒドロキシラジカルは非常に酸化力、細胞障害性が強く、消去する酵素も存在

しないため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。ALS の特徴の一つに脊髄運動神経が特異的に障害されることが上げられる。脊髄運動神経は神経系の中で最も長い軸索を持つため、細胞体で合成されたタンパク質の寿命は非常に長いことが知られている。そのためグルコースなどの還元糖と反応する時間が長くなり、糖化反応が進み、脊髄運動神経が特に障害されやすくなる可能性も考えられる。

#### 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。今後は FALS の病態解明、さらには治療法の開発には、生体内においても変異 SOD1 の糖化が亢進しているか、脊髄運動神経に見られる不溶性の封入体に糖化反応をうけた変異 SOD1 が蓄積しているか、さらには酸化ストレスがどのようなメカニズムで運動神経細胞障害を引き起こすかを検討することが必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

年 10月

G. 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

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

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

# 新しい HGF 発現トランスジェニックマウスの作成と ヒト筋萎縮性側索硬化症における HGF の発現解析

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

HGF は筋衛星細胞を標的とできることが明らかにされており、HGF は筋肉に直接的に機能して ALS 進行に際しておこる筋萎縮を抑制すると共に、筋肉からの HGF の逆行性輸送を介して運動神経細胞死抑制に間接的に寄与している可能性があるが、その詳細は不明である。筋肉に発現する HGF の ALS 進行過程における機能を解析する目的で、本研究において、筋肉に特異的に HGF を発現するトランスジェニックマウスを作成した。作成したマウスはラット HGF mRNA と蛋白質を筋肉特異的に高レベルで発現し、その筋肉抽出液には HGF の典型的機能である細胞遊走促進活性を認めた。現在このマウスと ALS モデル Tg マウスを交配することでダブルトランスジェニックマウスを作成し、HGF の筋肉における発現の機能的意義を解析中である。一方、ヒト ALS における HGF と c-Met の発現制御はこれまで明らかにされていなかった。家族性 ALS (FALS) と特発性 ALS (SALS) の患者さんの免疫染色およびウエスタンブロット解析の結果、FALS のみならず SALS 患者さんにおいて、HGF とその受容体 (c-Met) が家族性 ALS モデル Tg マウスと同様の発現制御を受けていることが明らかとなった。このことは、HGF と c-Met が協調して FALS と SALS の共通病態に内因性に応答し ALS 病態進行抑制に働いていること示唆する。また、この結果はヒト FALS のみならずヒト SALS についても HGF の ALS 病態進行抑制効果を期待させるものである。今後、モデル動物で HGF の理想的投与法を確立できれば、HGF によるヒト ALS の新しい治療法開発が具体化できると期待される。

## 1. 目的

私達は、HGF を神経系に発現させると ALS の病態進行にしたがい重篤化する運動神経細胞死と神経軸索変性を抑制し、ALS モデル Tg マウスの寿命を大幅に延長することを、神経特異的に HGF を発現するトランスジェニックマウスを作成し明らかにしてきた。一方、HGF は筋衛星細胞を標的とできることが明らかにされており、HGF は筋肉に直接的に機能して ALS 進行過程でおこる筋萎縮を抑制し、筋肉からの HGF の逆行性輸送を介して運動神経細胞死抑制に間接的に寄与して

いる可能性があるが、HGF の ALS に対する神経系以外に対する機能の詳細は不明である。また、ヒト ALS 患者さんにおける HGF とその受容体 (c-Met) の内因性発現制御に関しても不明である。本研究において、(1) 筋肉に発現する HGF の ALS 病態進行過程における機能を解析すること、(2) ALS 患者さん脊髄組織における HGF と c-Met の発現制御を解析することの2点を目的とした。

## 2. 研究方法

(1) 筋肉特異的にラット HGF を発現するトランスジェニックマウス (HGF-Tg) の作成と解析:

導入する HGF 遺伝子としてラット HGF に KT3 という短いタグを付加した構築を作成した。この遺伝子が内因性のラット HGF と同等の機能をもつことを、HGF の代表的 2 つの活性 ① 初代培養神経細胞に対する神経生存促進作用、② MDCK 細胞の scattering アッセイ (運動能) で定量的に解析し、両者に相違がないことを確認した。次いで筋肉特異的プロモーター (MCK プロモーター) を用い常法で筋肉特異的 HGF 発現トランスジェニックマウスを作成した。得られた Tg ラインのうち筋肉特異的に HGF を発現するマウスを選び、それらのラインの ① マウスおよびラット HGF mRNA の発現を RNase プロテクションアッセイ (RPA) で、② HGF 蛋白質量を ELISA 法で、③ 筋肉抽出液中の HGF 蛋白質をウエスタンブロット法 (rodent HGF に対する抗体と KT3 に対する抗体を用いて) で、④ 筋肉抽出液中の HGF 活性を MDCK 細胞に対する細胞遊走アッセイ (Scatter アッセイ) で解析した。⑤ 末梢神経 (座骨神経) 切断後の筋萎縮を、Wildtype マウスと HGF-Tg マウスで比較した。

(2) ヒト ALS 脊髄 (FALS と SALS) における HGF と c-Met の発現解析:

死亡した ALS 患者さんの脊髄組織を、FALS と SALS に分類し、両者をさらに発病後の罹患期間と人工呼吸器の装着の有無で分類することで便宜的に発症後の病態 stage を分類した。これらの脊髄組織に対し、

① H-E 染色、② 免疫染色 (HGF, c-Met)、③ ウエスタンブロット (HGF, c-Met) 法により解析した。

\* 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。倫理面に関しても十分配慮して行った。

3. 研究結果および考察

① MCK プロモーターを用いて常法で rat HGF を筋肉特異的に発現する Tg-マウスを作成:

作成した HGF-Tg マウスに関し、HGF の mRNA と蛋白質レベルを、RPA 法と ELISA 法で解析した。その結果、ラット HGF が筋肉特異的に発現する Tg ラインを 3 つ確認した。これらは、いずれも wildtype littermate と比較して HGF レベルが非常に高いことが明らかとなった。次いで筋肉抽出液に対し HGF 蛋白質をウエスタンブロット法により解析した。筋抽出液には、外因性 HGF 蛋白質が高レベルで発現していることが、抗 HGF 抗体と KT3 tag に対する抗体を用いて確認した。組織学的には生後 2 ヶ月までは筋肉に野生型と差を認めなかった。以上から、非常に高いレベルで筋肉に特異的に HGF を発現する HGF-Tg マウスを 3 line 得られたことが確認された。これらのマウスの座骨神経を切断し、切断後の筋肉湿重量を測定すると、1 つの Tg-line において、wildtype littermate に比較し筋湿重量の低下が少ない傾向を示す line を認めた。このことは、において外因性 HGF が in vivo で機能できている可能性を示唆している。現在 HGF-Tg マウスと ALS-Tg マウスの交配実験を開始している。

(2) ヒト FALS と SALS における HGF と c-Met の発現制御とその意義:

(鳥取大脳研病理加藤信介らとの共同研究)  
免疫染色及びウエスタンブロット解析の結果、



ヒト FALS、SALS の脊髄では、HGF と c-Met が共に FALS-Tg と同様の発現制御を受けることが明らかとなった。c-Met は、運動ニューロンにおける発現レベルが疾患進行と共に上昇すること、疾患末期（罹患期間が長いが人工呼吸器をつけていない症例）では、反応性アストロサイトで c-Met の発現が誘導されていた。すなわちヒトにおける結果は、まさに ALS-Tg マウスの結果と一致していた。一方人工呼吸器をつけた症例（マウスでは既に死亡している時期と推定される）においては、HGF の発現が低下していた。以上の結果は免疫染色法とウエスタンブロット法で確認された。このことは HGF と c-Met は FALS と SALS で惹起される共通の事象によって発現制御を受けること、すなわち HGF が FALS に加えて SALS にも寄与できることを強く示唆する。また、マウスでは既に死亡している時期に相当する時期のヒト症例において HGF の発現レベルが低下していた。このことは、HGF が疾患進行につれその進行を阻止するべく誘導されるが、そのレベルが維持できなくなる（逆に低下する）例では、運動ニューロン生存維持機構が破綻をきたすと考えられた。逆に外因性 HGF を投与することで FALS、SALS 共に病態進行を抑制できる可能性を示唆する結果である。東北大学青木、糸山らとの研究により、人に投与可能な方法の 1 つである intrathecal injection により HGF 蛋白質を投与することで、ALS モデル Tg ラットの神経細胞死が抑制されることが明らかとなりつつあり、できるだけ近い将来 HGF による ALS 治療が現実となる日がくることが期待される。

#### 4. 結語

筋肉特異的 HGF 発現 Tg マウスを作成しその characterization を行った。家族性 ALS に加え特発性 ALS においても HGF およびその受容体 (c-Met) が ALS モデル Tg と同様の発現制御を受けたことから、HGF の理想的投与法を確立出来たら、家族性のみならず特発性 ALS の患者さんの福音になると期待される。

#### 5. 共同研究者

大阪大学大学院医学系研究科 別所 一彦、  
中村 敏一、鳥取大学脳研病理 加藤 信介

#### 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).

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

トランスジェニック動物を用いた新しい ALS モデルに関する研究  
分担研究者 青木 正志 東北大学附属病院神経内科

**研究要旨** ALS 病態の解明のため、変異 Cu/Zn SOD を導入したトランスジェニックマウスおよびラットを作製し、その解析を行った。変異 Cu/Zn 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。さらにはこのラットによる新しい ALS モデルに対して運動ニューロンに対する保護作用の明らかになった肝細胞増殖因子（HGF）の髄腔内持続投与を行い、ALS ラットの寿命の延長効果を明らかにした。

分担研究者： 青木 正志

東北大学医学部附属病院神経内科

研究協力者：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>、  
糸山 泰人<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

## A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis 以下 ALS）は、進行性の神経変性疾患であり、きわめて予後不良である。このためその病因病態の解明と有効な治療法確立が強く求められている。1993年に Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn 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 Cu/Zn 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。

Cu/Zn SOD 変異による ALS の病態を明らかにするために、Cu/Zn SOD 遺伝子変異を伴う家族性 ALS として、臨床経過が著しく早く上肢から発症を認める L84V 変異と、経過が数十年と長く下肢より発症する H46R 変異それぞれを導入したトランスジェニックマウス (Tg マウス) を作製してその病態を解析した。

トランスジェニックマウス (Tg マウス) を作製してその病態を解析した。

昨年度までに我々は 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 H46R と 2) すでに Tg マウスが普及している G93A の 2 種類の変異を導入した変異 Cu/Zn 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 Tg マウス作製により、G93A 変異 Cu/Zn SOD Tg 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。

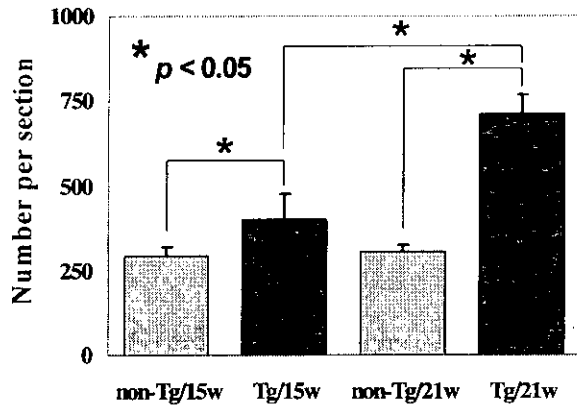


図1. BrdU 陽性細胞数

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, \*:  $p < 0.05$

## B. 研究方法

### 研究 1.

L84V および H46R 2 種類の変異を導入した Tg マウスの臨床症状、経過、Cu/Zn SOD 活性と、終末期腰髄膨大部の病理像を比較検討した。また神経変性への小胞体ストレスの関与を検討するために GRP78, Caspase-12 および Caspase-3 の免疫染色、Western-blotting を行った。

### 研究 2.

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

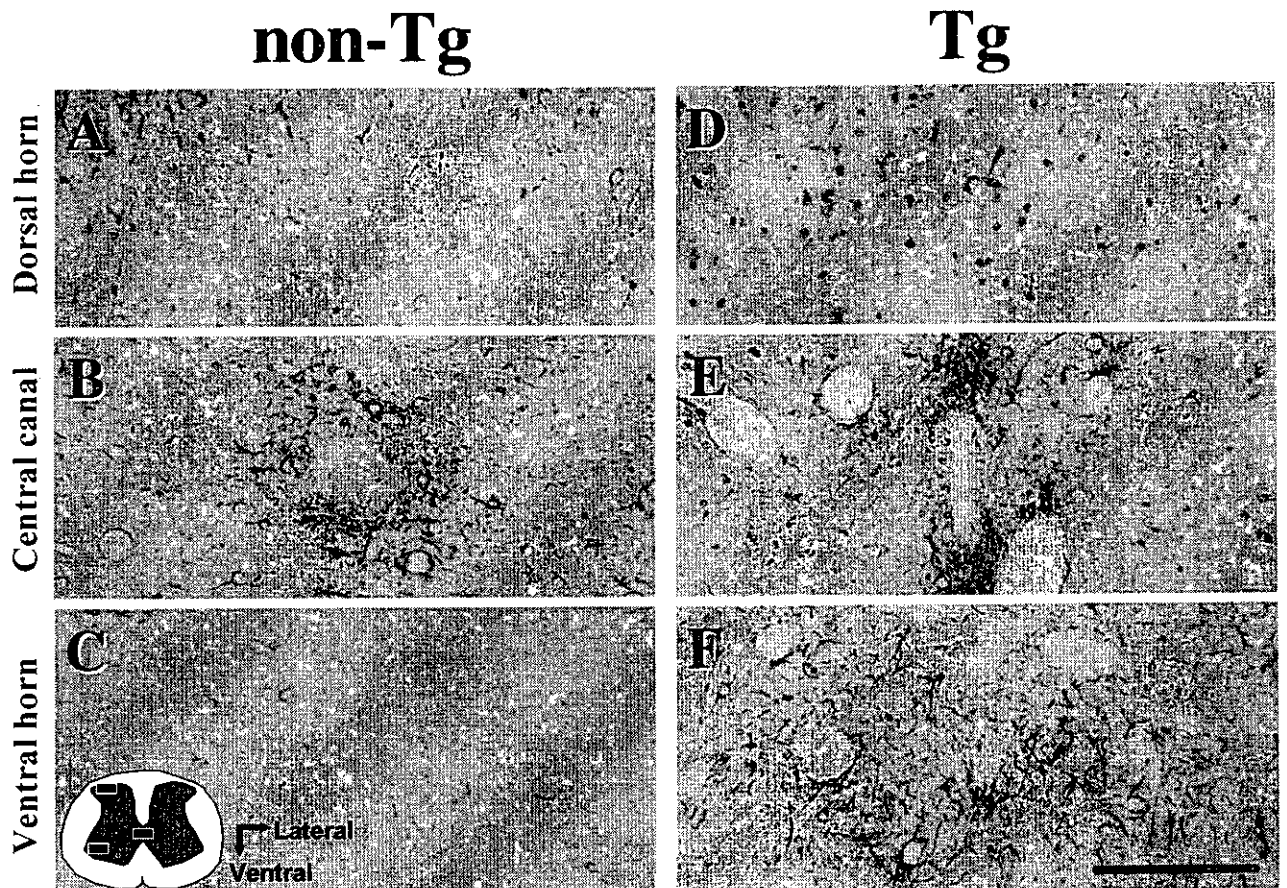


図2. 腰髄における BrdU・GFAP 免疫組織化学

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  $\mu\text{m}$