

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, β 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 3. 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ルを挿入、ポンプは皮下に留置して術創を閉鎖した。3 群 (各群 n=8) の Tg ラットにそれぞれ vehicle (PBS) および 40 μ g, 200 μ 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し、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. どちらの変異を導入した Tg マウスも Cu/Zn SOD 活性の上昇はなく、病理像として空胞変性の少ないヒトの ALS に近いモデルと考えられた。脊髄前角の神経細胞脱落、グリオシスは両変異ともに認められた。しかし神経細胞、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るのに対して、L84V 変異マウスではその頻度は低かった。Tg マウスの脊髄において Western-blotting により GRP78 蛋白の上昇を認めた。また免疫染色において Caspase-12 および 3 陽性の残存神経細胞が認められた。変異 Cu/Zn SOD Tg マウスにおいて何らかの小胞体ストレスが神経細胞死に関与している可能性が示唆された。

研究 2. 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衣細胞に 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 1)。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 1)。

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、中心管上衣細胞だけでなく、前角も含めた灰白質と広汎にわたって認められた (図 2)。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 3. 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 3)。また、高用量 (200 μ g) 投与群では発症が約 10 日間延長した。

D. 考察

研究 1. 変異の異なる 2 種類のトランスジェニックマウスを比較すると、Cu/Zn SOD 遺伝子変異を伴う家族性 ALS における臨床像と相似した結果であった。神経細胞およびグリア細胞に見られる inclusion body は神経細胞死に直接関与するものではない可能性がある。神経細胞死には小胞体ストレスが関与している可能性が示唆された。

研究 2. 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た。その多くはグリア系細胞へ分化している可能

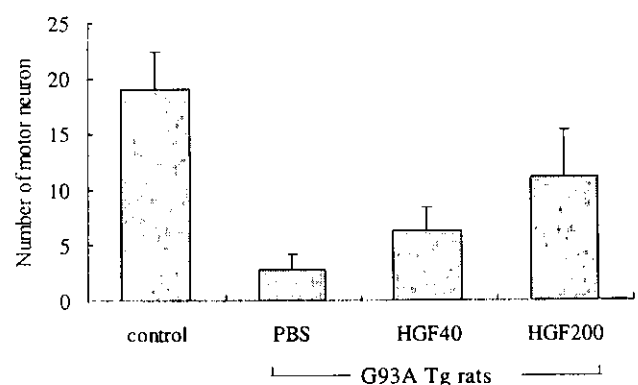


図 3. 腰髄運動ニューロン数

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 μ g 投与群, HGF200: 200 μ g 投与群)。

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3. 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

異なる2種類の変異を導入した Tg マウスの解析により、神経細胞およびグリア細胞に認められた inclusion body は神経細胞死に直接関与するものではない可能性およびその神経細胞死には小胞体ストレスが関与している可能性が示唆された。

Tg ラットによる新しい ALS モデルは従来のマウスモデルに比較して個体が大きいことから、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。

さらにはこの ALS モデルを用いて HGF リコンビナント蛋白を髄腔内に持続投与を行うことでその有効性が確認されたことは、現在治療法のない ALS にとって希望のある発見である。

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)

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Takamiya R, Takahashi M, Myint T, Park Y S, Endo T, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Miyamoto Y, Fujii J, Tamiguchi N	Glycation proceeds faster in mutated Cu,Zn-superoxide dismutases related to familial amyotrophic lateral sclerosis	FASEB Journal	in press	2003
Funakoshi H, 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, Matumoto K Nakamura T	Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons	J Neurosci Res	68 150-60	2002
Kishi YA, 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

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
Takamiya R, Takahashi M, Myint T, Park Y S, 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 Journal	in press	2003
Funakoshi H, 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, Matumoto K, Nakamura T	Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons	J Neurosci Res	68 150-60	2002
Kishi YA, 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

研究成果の刊行に関する一覽

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	ALS治療研究の最前線		難病と在宅ケア	日本プランニングセンター	7 8-10	2002
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
青木正志	トランスジェネティックラットによる新しいALSモデル		Clinical Neuroscience	中外医学社	20 858-9	2002
青木正志	筋萎縮性側索硬化症に対する治療法の開発、 グルタミン酸仮説からトランスジェネティックラットモデルを 用いた新規治療法の開発		Molecular Medicine	中山書店	39 1074-78	2002
永井真貴子、青木正志 糸山泰人、三好一郎 笠井藏雪	筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新しいモデルとしての トランスジェネティックラットの作製		アニテックス	研成社	14 189-192	2002
Y. Miyamoto, Y. H. Ko, W. Che, Y. S. Park, N. Fujiwara, T. Ookawara, K. Suzuki, N. Taniguchi	Dysfunction of antioxidative enzymes and redox regulation under nitrosative stress and glycoxidative stress	Seikoh Hornuchi	The Maillard Reaction in Food and Chemistry and Medical Science	Elsevier	23-30	2002

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
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 No.1 245-253	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		(増刊号： 神経の再生) 108-115	2003

20020907

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.17-P.20の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。