

ことが明らかになったことは、作用機序上 ALS に有利と考えられた。というのは、ヒト ALS の原因遺伝子である変異 SOD1 を運動ニューロンにだけ特異的に発現させても、グリア細胞に特異的に発現させても ALS の病態が発症しないことから、ALS 発症には運動ニューロンに加えグリア細胞が重要な部分を担うと証明されたからである。HGF は ALS の神経細胞とグリア細胞の両方に作用できていた。一方で、寿命延長の内訳を見てみると、寿命延長効果は ALS 発症遅延効果によっており、逆に発症後死亡までの期間 (duration) は延長しないことが明らかとなった (これはこれまでの HGF 供給アプローチでは ALS 末期 HGF の発現量が十分でないことを反映していると考えられた)。

そこで、HGF が ALS の duration を延長し、治療効果をさらに延長する可能性を検討するため、本研究では以下の2つを目的と解析を進めた。

- (1) ALS 末期の ALS 進行メカニズム、中でも duration に関与する機序に対する HGF の機能を解析すること。
- (2) ALS に対する新しい HGF 供給法の開発

2. 研究方法

- (1) 神経特異的に HGF を発現するトランスジェニックマウス (HGF-Tg) と ALS-Tg との比較解析：

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神経特異的に発現するマウス (HGF-Tg) と ALS-Tg を交配し、特に発症前後における ALS 病態進行機構に対する HGF の機能を解析した。

[解析項目]

- ① 各種活性型カスパーゼ, ② 各種 Bcl ファミリー分子

[解析方法]

免疫染色法、活性解析およびウエスタンブロット法で発現調節および細胞内分布に関する解析を行った。

- (2) 各種 HGF 発現ウイルスベクターの構築と解析および投与法の検討：

- ① HSV, 各種 AAV の LacZ 発現ウイルスベクターを用いた投与法の検討、② HSV, 各種 AAV の発現ウイルスベクターの構築、sequence と HGF の機能チェック

* 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 神経特異的に HGF を発現するトランスジェニックマウス (HGF-Tg) と ALS-Tg との比較解析：

ALS-HGF-Tg と ALS-Tg につき HGF による発症前後での各種 ALS 病態進行分子機構に対する修飾について解析した。特に ALS-HGF-Tg で HGF レベルが発症後も比較的高かった物について焦点を当て検討した。ALS-Tg において活性型カスパーゼ9は ALS 発症中期の運動ニューロンに誘導され、ALS 末期には一部反応性アストロサイトにも誘導された。HGF のレベルが高く維持された ALS-HGF-Tg マウスは8か月齢でも生存し、そのマウスにおいては、運動ニューロンとグリア細胞のいずれにおいても対応する週齢の ALS-Tg に認める活性型カスパーゼ9の誘導が抑制された。活性型カスパーゼ9の誘導が抑制されているマウスでは、運動ニューロンの変性がよく抑制されていた。すなわち、HGF のレベルが疾患末期にも高いレベルに保たれていた例の詳細な解析により、ALS の duration の進行主要分子機構である活性型

カスパーゼ9の誘導を、HGFが抑制する効果をもつことをはじめて明らかとした。このことからALS末期の脊髄に十分量HGF蛋白質を供給するアプローチを開発出来たら、ALSのdurationをも延長し、さらなるALSの寿命延長効果を期待できるものと示唆された。

(2) 各種 HGF 発現ウイルスベクターの構築と解析および投与法の検討（新しい HGF 供給法の検討—HGFの最大効果の解析に向けて）:

（大阪医科大学宮武助教授および自治医科大学小澤教授らとの共同研究）

① HSV-LacZ および各種 AAV-LacZ の投与法の検討

Wildtype ラットおよびマウスを用い HSV および AAV の投与法を決定した。LacZ 発現するウイルスベクターの解析結果から発現期間はどちらも解析に十分であることも確認された。

② HSV-HGF, 各種 AAV-HGF の構築、sequence と作成、作成したウイルスベクターの in vitro 解析

HGF 発現ウイルスベクターの構築を全て終了し、共同研究により作成した HGF 発現ウイルスベクター-HGF の発現を、ELISA 法、ウエスタンブロット法、生物アッセイ法で解析し、いずれも正しい発現ベクターの作成に成功していることを確認した。

4. 結語

HGFによりALSのdurationに重要な活性型カスパーゼ9の発現誘導を抑制出来ることが明らかとなった。この結果は、HGFがALSの発症を遅らせるだけでなく、durationも延長し、これまで以上にALSの寿命を延長できるポテンシャルを持っていることを示唆するものである。今後HGFの

よりよい供給法の開発が進めばALSの福音となると期待される。

5. 共同研究者

大阪大学大学院医学系研究科 宮澤 大介、
中村 敏一、大阪医科大学 宮武 伸一、自治
医科大学 水上 浩明、小澤敬也

6. 研究発表

1. Funakoshi H. and Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. **Clin Chim Acta** 327:1-23, 2003.

2. Kato S, Funakoshi H., Nakamura T, Kato M, Nakano I, Hirano A, Ohama E. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. **Acta Neuropathol (Berl)**. 106(2):112-20, 2003.

3. Takahashi H, Funakoshi H. and Nakamura T. LIM-kinase as a regulator of actin dynamics in spermatogenesis. **Cytogenic and Genome Research** 2004, in press.

4. 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）. 108-115, 脳の科学（増刊号：神経の再生）, 2003.

5. 船越 洋、中村 敏一、ALSと神経栄養因子:HGFによる新しい神経栄養因子 HGFによる新しい治療法開発の可能性. 脳と神経, 55巻10号, 841-845, 2003.

6. 船越 洋、中村 敏一、肝細胞増殖因子（HGF）は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の進行を遅らせる. 神経治療学 20巻5号, 533-540.

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

ALS ラットモデルに対する髄腔内投与による新規治療法の開発に関する研究

分担研究者 青木 正志 東北大学病院神経内科

研究要旨 ALSに対する新規薬剤の投与は変性しつつある脊髄の運動ニューロンに対して効率良くしかも副作用を回避できるルートとして髄腔内投与が注目されている。われわれは動物モデルに対して薬剤の髄腔内投与を可能とするために、世界に先駆けてトランスジェニックラットによるALSモデルの開発に成功した。さらにHGFの臨床応用のために、このALSラットモデルに対してリコンビナント肝細胞増殖因子（HGF）蛋白の髄腔内持続投与を行い、その治療効果を臨床的にかつ病理学的にも確認した。さらにはこのHGF髄腔内の持続投与をALS発症期からおこなっても、トランスジェニックラットの罹病期間の延長が可能であることを確認した。

分担研究者： 青木 正志

東北大学病院神経内科

研究協力者：石垣 あや*、永井真貴子*、割田 仁*
、加藤 昌昭、神位りえ子*、糸山 泰人*、
船越 洋†、中村 敏一‡

*東北大学大学院医学系研究科神経内科

†国立療養所米沢病院神経内科

‡大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学

告された特異な臨床的特徴を持つH46Rと2)すでにトランスジェニック（以下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 Tgラットの開発に成功した(Nagai M et al., J Neurosci 2001)。ALSの治療法として脊髄の運動ニューロンに対して効率良くしかも副作用を回避できる薬物の投与ルートとして髄腔内投与が注目されており、実際に米国ではALS患者へのポンプを用いた神経栄養因子の持続髄腔内投与が試みられている。われわれが開発したTgラットではこの髄腔内投与が容易であり、将来的な遺伝子治療を含めた新しい治療法開発のために非常に有用なモデルとして期待されている。

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(Sun W et al., J Neurosci 2002)。本研究で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。また変異Cu/Zn SODによる運動ニューロンの細胞死にはカスパーゼの関与が報告されている。このカスパーゼを抑制による治療法に関する検討も行う

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。

ALSに対する新規治療法の開発のために我々はALSの新しい動物モデルとして、1) わが国で報

た。

B. 研究方法

研究 1

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 蛋白を持続投与した。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 μg , 200 μg の HGF 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。

研究 2

さらには G93A Tg ラットに対する ALS 発症後の病態進展に対する効果を検討した。リコンビナント HGF 蛋白 200 μg /個体と Vehicle をそれぞれ 8 匹の G93A Tg ラットの髄腔内に臨床的に発症時期の直前である 115 日齢から 4 週間持続投与し、その体重と発症日と寿命の観察を行った。さらに病理的検索も行った。

研究 3

今まで複数の報告により、ALS における神経細胞死へのアポトーシスの関与が示唆されてきた。G93A SOD1 Tg マウスへの pan caspase inhibitor である zVAD-fmk 脳室内投与実験では、発症と死亡の遅延が報告された (Li et al., Science 2000)。zVAD-fmk は髄液移行率が低いため、脊柱管内髄腔内投与が理想的だが、マウスは小さく、その方法が困難であるため、Li らの実験では脳室内投与が施行された。

本研究では、caspase を阻害することで神経細胞のアポトーシスを抑制し、神経細胞に対して保護作用を持つと予想される zVAD-fmk を、より効率よく脊髄へ作用させるため、G93A SOD1 Tg ラットの腰部より髄腔内投与し、zVAD-fmk の髄腔内投与が脊髄前角細胞へ与える影響を検討した。

C. 研究結果

研究 1

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 投与量に依存したものであった (図 1)。

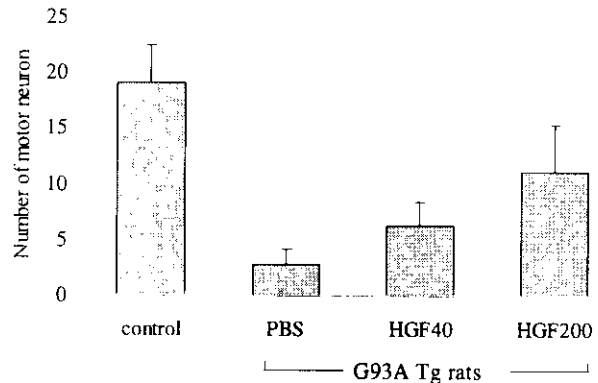


図 1. 腰髄運動ニューロン数

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性に運動ニューロン脱落の抑制効果が認められた (HGF40: 40 μg 投与群, HGF200: 200 μg 投与群)。

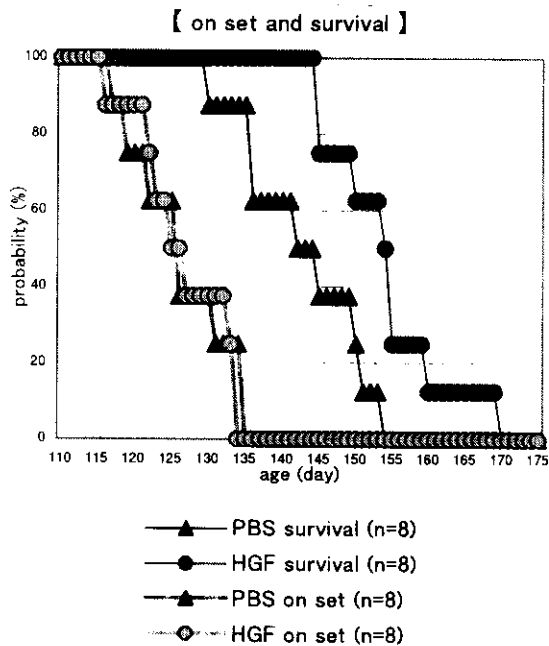


図 2. 115 日令投与による発症および生存曲線

Vehicle を投与した G93A Tg ラット (PBS) と、HGF 200 μg を投与した G93A Tg ラット間では発症に差はないが、発症から死亡までの罹病期間が有意に延長した。

また、高用量（200 μg ）投与群では発症が約 10 日間延長した。

研究 2

対照（Vehicle）群と比較してリコンビナント HGF 蛋白 200 μg /個体 群では発症日には差が認められなかったが、発症から死亡までの平均罹病期間は対照群の 16.9 日に対して HGF 投与群では 27.5 日であり、有意に延長が認められた ($p = 0.023$) (図 2)。

研究 3

zVAD-fmk を投与した群の発症、死亡時期が、対照群より有意に早く認められた (図 3)。

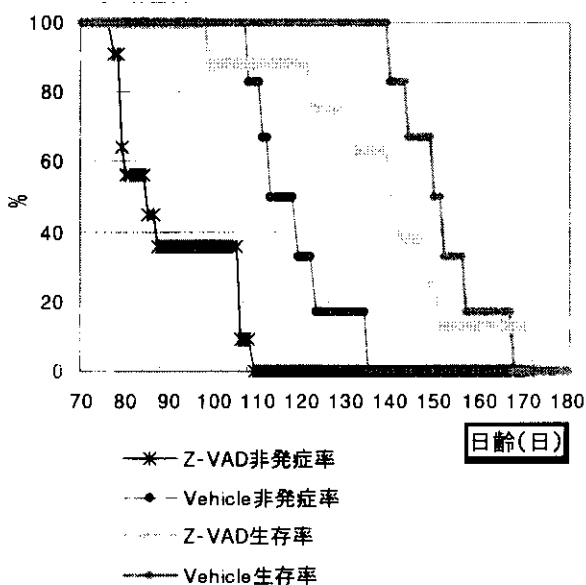


図3 Z-VAD-fmk 髄腔内投与による発症および生存曲線

また前角細胞の減少も、zVAD-fmk 投与群が対照群より早期に認められた。ライトサイクラーによる脊髄中 caspase1 と caspase3 の mRNA の定量は、各時期において、Z-VAD-fmk 投与群が対照群よりも小さかった。Z-VAD-fmk 投与群と、対照群の 90 日齢、110 日齢の第 5 腰髄を、casase-1、active caspase-3、caspase-9、caspase-12、active p38、active JNK により免疫染色を行い、陽性細胞の割合を計算し、比較した。概ね Z-VAD-fmk 投与群が対照群

よりも陽性率が小さかったが、110 日齢の caspase-9、active JNK は Z-VAD-fmk 投与群の方が大きかった。

D. 考察

研究 1 および 2

リコンビナント HGF 蛋白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。115 日齢は臨床的には発症直前だが、病理学的には既に脊髄前角の運動神経の脱落が認められる時期である。この時期での投与で約 63% の罹病期間の延長効果が確認されたことにより、HGF の髄腔内持続投与の臨床応用が期待される。今後は 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。

研究 3

本研究では、zVAD-fmk 投与群の発症・運動ニューロン脱落が予想に反して対照群より早かった。zVAD-fmk 投与群では概ね caspases が阻害されていたが、caspase-9、active JNK はむしろ対照群よりも強く発現していた。zVAD-fmk は caspase cascade を阻害したが、caspase を介さない細胞死への経路が賦活され、神経細胞の細胞死が促進されたと推測した。

E. 結論

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。

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、さらに発症期の投与により罹病期間の延長効果を確認したことは、現在治療法のない ALS にとって希望のある発見であり、早期の臨床治験の開始が期待される。

一方、カスパーゼ抑制による抗アポトーシス療法は投与の時期、程度によっては他の細胞死の経路を賦活する可能性が明らかになり、さらなる慎重な検討を要する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tobisawa S, Hozumi Y, Arawaka S, Koyama S, Wada M, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Goto K and Kato T. Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice, *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 303:496-503

2. Kato S, Saeki Y, Aoki M, Nagai M, Ishigaki A, Itoyama Y, Kato M, Asayama K, Awaya A, Hirano A and Ohama E. Histological evidence of redox system breakdown caused by superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation is common to mutant SOD-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis patients and transgenic rats expressing human mutant SOD1, *Acta Neuropathol (Berl)* (2004) 107:149-58

3. Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M and Nakagawara A. NEDL1, a novel E3 Ubiquitin ligase for dishevelled1, targets mutant superoxide dismutase 1, *J Biol Chem*, in press

4. 青木正志、糸山泰人、治療戦略に有用な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の動物モデルの開発、*神経治療学* 20 (2003) 527-532

2. 学会発表

青木正志、永井真貴子、加藤昌昭、石垣あや、松本有史、割田 仁、船越 洋、中村敏一、糸山泰人、 HGF 髄腔内持続投与による ALS 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抑制

第 44 回日本神経学会総会 2003. 5 横浜

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
Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A	NEDL1, a novel E3 Ubiquitin ligase for dishevelled1, targets mutant superoxide dismutase 1	J Biol Chem		in press
Kato S, Saeki Y, Aoki M, Nagai M, Ishigaki A, Itoyama Y, Kato M, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E	Histological evidence of redox system breakdown caused by superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation is common to SOD1-mutated motor neurons in humans and animal models	Acta Neuropathol (Berl)	107 149-58	2004
Tobisawa S, Hozumi Y, Arawaka S, Koyama S, Wada M, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Goto K, Kato T	Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice	Biochem Biophys Res Commun	303 496-503	2003
Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Taniguchi N	Oxidative Stress Caused by Inactivation of Glutathione Peroxidase and Adaptive Responses	J Biol Chem	384 567-574	2003
Takamiya R, Takahashi M, Myint T, Park YS, Miyazawa N, Endo T, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Miyamoto Y, Fujii J, Taniguchi N	Glycation proceeds faster in mutated Cu, Zn-superoxide dismutases related to familial amyotrophic lateral sclerosis	FASEB J	17 938-940	2003
Ohira M, Morohashi A, Inuzuka H, Shishikura T, Kawamoto T, Kageyama H, Nakamura Y, Isogai E, Takayasu H, Sakiyama S, Suzuki Y, Sugano S, Goto T, Sato S, Nakagawara A	Expression profiling and characterization of 4200 genes cloned from primary neuroblastomas: identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets	Oncogene	22 5525-36	2003

<p>H. Funakoshi, T. Nakamura</p> <p>S. Kato, H. Funakoshi, T. Nakamura, M. Kato, I. Nakano, A. Hirano, and E. Ohama</p> <p>H. Takahashi, H. Funakoshi, and T. Nakamura</p>	<p>Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications</p> <p>Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation</p> <p>LIM-kinase as a regulator of actin dynamics in spermatogenesis</p>	<p>Clinica Chimica Acta</p> <p>Acta Neuropathol (Berl)</p> <p>Cytogenic and Genome Research</p>	<p>327(1-2) 1-23</p> <p>106(2) 112-120</p>	<p>2003</p> <p>2003</p> <p>in press</p>
--	---	---	--	---

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、糸山泰人	治療戦略に有用な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の動物モデルの開発		神経治療学	日本神経治療学会	20 527-532	2003
船越 洋、中村敏一	ALSと神経栄養因子：HGFによる新しい治療法開発の可能性		脳と神経		55 841-845	2003
船越 洋、中村敏一	肝細胞増殖因子 (HGF) は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の進行を遅らせる		神経治療学	日本神経治療学会	20 533-540	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		25 増刊号 (神経の再生) 108-115	2003

20030716

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

事務局

青木正志 金森洋子

東北大学医学部神経内科

〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1

電話 022-717-7189 / FAX 022-717-7192