

厚生労働科学研究費補助金 - 難治性疾患克服研究事業

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

平成15年度 研究報告書

Annual Report of the Group Research
on the Pathogenesis of and New Treatment
for Amyotrophic Lateral Sclerosis

— 2 0 0 3 —

主任研究者 糸山 泰人

Chairman : Yasuto Itoyama, M.D.

Department of Neurology, Tohoku University School of Medicine
Sendai, Japan

2004年3月 印刷

序 文

本研究班は神経難病の中でも最も苛酷な疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病因・病態の解明と新たな治療法の開発を目的とする。

次ページに掲げた分担研究者ならびに研究協力者による平成15年度の「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」の研究報告を公表する。

2004年3月

「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

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)

目 次

I. 研究者一覧

II. 総括研究報告

糸山 泰人

III. 研究報告 (分担研究者)

- 1.-1 ALSトランスジェニックラットに対する pan caspase inhibitor の髄腔内投与
- 1.-2 ALSトランスジェニックラット脊髄における未分化神経前駆細胞の局在と分化
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 糸山 泰人
2. ES細胞の運動ニューロンへの分化
慶應義塾大学医学部生理学教室 岡野 栄之
3. 発現ベクターとしてのポリオウィルスの解析
東京大学大学院医学系研究科微生物学教室 野本 明男
4. Dorsin による SOD1 トランスジェニックマウスの治療の試み
名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学講座 祖父江 元
5. IGF-1 髄腔内投与による SOD1 変異マウスにおける治療効果の検討
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学 阿部 康二
6. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新規治療法開発への挑戦
—— HGF ファミリー分子 (HGF & HLP) の機能解析 ——
大阪大学大学院医学系研究科組織再生分野 船越 洋

IV. 研究成果一覧 (分担研究者)

V. 研究報告 (研究協力者)

1. ラット脊髄器官培養 (スライスカルチャー) を用いた運動ニューロン傷害モデルの検討
北海道大学大学院医学研究科神経内科 菊地 誠志
2. 変異 SOD1 トランスジェニックラットから精製した NP-40 不溶性 Cu/Zn-SODの解析
大阪大学医学系研究科生化学 谷口 直之
3. 筋萎縮性側索硬化症に対するフリーラジカル・スカベンジャー、エダラボンを用いた
二重盲検試験
国立精神・神経センター国府台病院神経内科 吉野 英
4. 運動ニューロン特異的遺伝子発現・ノックアウトシステムの確立に関する研究
理化学研究所脳科学総合研究センター運動系神経変性研究チーム 高橋 良輔
5. 筋萎縮性側索硬化症脊髄運動ニューロンにおけるAMPA受容体サブユニット GluR2 の
RNA 編集異常の病因的意味
東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学 郭 伸

6. ミトコンドリア膜保護剤による筋萎縮性側索硬化症の発症後治療効果の検討に関する研究
大阪市立大学大学院医学系研究科分子病態学部門 井上 正康
7. 発現調節AAV ベクターを使用した神経疾患の遺伝子治療
自治医科大学神経内科 中野 今治
8. マウス脊髄の組織培養とその応用
大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学神経機能医学講座神経内科学 佐古田三郎
9. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療薬として galectin - 1の可能性に関する研究
山形大学医学部第三内科 加藤 丈夫
10. ALS モデルマウスを用いたプロテオソーム解析による薬剤の作用評価の試み
京都大学大学院医学研究科臨床神経学 下濱 俊
11. 「各種神経栄養因子 (FGF-2、HGF、VEGF) 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
大阪医科大学脳神経外科 宮武 伸一
12. 筋萎縮性側索硬化症およびモデル動物の脊髄と肝におけるレドックスシステムの解析：
治療戦略としての up-regulation 機構の存在の証明
鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理 加藤 信介
13. 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
大阪大学大学院医学系研究科プロセッシング機能形態 山口 淳
14. 顔面神経引き抜き損傷による運動ニューロン死のメカニズムと治療に関する検討
東京都神経科学総合研究所分子神経病理研究部門 渡部 和彦

VI. 平成15年度班会議プログラム

研究者一覽

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

研究者一覧

	氏名	所属	職名	Tel/FAX
主任研究者	糸山 泰人	東北大学大学院医学系研究科神経学講座神経内科学	教授	T 022-717-7187
				F 022-717-7192
分担研究者	岡野 栄之	慶應義塾大学医学部生理学	教授	T 03-5363-3747 F 03-3357-5445
	野本 明男	東京大学大学院医学系研究科微生物学	教授	T 03-5841-3407 F 03-5841-3374
	祖父江 元	名古屋大学大学院医学系研究科神経内科	教授	T 052-744-2391 F 052-744-2394
	阿部 康二	岡山大学医歯学総合研究科神経病態内科学	教授	T 086-235-7365 F 086-235-7368
	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	助教授	T 06-6879-3783 F 06-6879-3789
研究協力者	菊地 誠志	北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野	助手	T 011-700-5375 F 011-700-5356
	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	T 06-6879-3421 F 06-6879-3429
	吉野 英	国立精神・神経センター国府台病院神経内科	医長	T 047-372-3501 F 047-372-1858
	高橋 良輔	理化学研究所脳科学総合研究センター 運動系神経変性研究チーム	チーム リーダー	T 048-467-6072 F 048-462-4796
	郭 伸	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻 神経内科学	助教授	T 03-5800-8672 F 03-5800-6548
	井上 正康	大阪市立大学大学院医学系研究科分子病態学部門	教授	T 06-6645-3722 F 06-6645-3721
	中野 今治	自治医科大学神経内科	教授	T 0285-58-7352 F 0285-44-5118
	佐古田三郎	大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学 神経機能医学講座神経内科学	教授	T 06-6879-3571 F 06-6879-3579
	加藤 丈夫	山形大学医学部第三内科	教授	T 023-628-5316 F 023-628-5318
	下濱 俊	京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座 臨床神経学	助教授	T 075-751-3771 F 075-751-3265
	宮武 伸一	大阪医科大学脳神経外科	助教授	T 0726-83-1221 F 0726-83-4064
	加藤 信介	鳥取大学医学部脳研神経病理	助教授	T 0859-34-8034 F 0859-34-8289
	山口 淳	大阪大学大学院医学系研究科 プロセッシング機能形態分野	助手	T 06-6879-3221 F 06-6879-3229
	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	T 042-325-3881 F 042-321-8678

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

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

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

研究要旨

神経難病のなかでも最も過酷な疾患とされる筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、その病因・病態の解明と新規治療法の開発が切望されている。現在 ALS の病因・病態研究としては家族性 ALS の原因である変異 SOD1 遺伝子による運動ニューロン死の機序の解明が最も重要と考えられている。本研究班の目的は ALS の病因・病態解明を行うとともにその知見に基づいた ALS の治療法を新たに開発することである。本年度の成果としては①ALSにおける運動ニューロン死の機序として AMPA 受容体 GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集率の低下が重要であることが患者脊髄から得られた単一運動ニューロンの解析で明らかにされた。②次世代の ALS の治療薬として注目されている肝細胞増殖因子（HGF）を ALS トランスジェニック（Tg）ラットに持続髄腔内投与療法を行い、臨床的に ALS を発症した後に投与しても有意に症状の進行を遅延させることが示された。③将来的に ALS 治療には各種の遺伝子導入療法は重要であり、ポリオウイルスは運動ニューロンに特異的に感染し複製する機能を持つために ALS 遺伝子導入治療のベクターとして有力視されている。ベクターのゲノム（7500 塩基）改変に際して細胞毒性を欠落させて感染・複製の特性を有するには約 3000 塩基程度の外来 mRNA が挿入が限度であることが示された。④将来的な ALS の治療法として神経幹細胞移植療法は重要である。今回、培養マウス ES 細胞から運動ニューロンないし運動ニューロンの前駆細胞への誘導が可能になり、ALS ラットの髄腔内または脊髄内への投与実験が行われるようになった。⑤変異 SOD1 のみを認識するユビキチンリガーゼである Dorfin を発現する Tg マウスが作製され、ALS マウスとの交配で Dorfin を高発現させることにより ALS マウスの生存期間を延長することが示され、新たな ALS 治療戦略の可能性が示された。⑥その他現在 ALS で悩む患者に即応出来る可能性の薬剤としてエダラボンやカルニチンなどが運動ニューロン細胞死の抑制ないしは ALS 治療での有用性が報告された。

分担研究者

岡野栄之（慶應義塾大学医学部生理学）

野本明男（東京大学大学院医学系研究科微生物学）

祖父江 元（名古屋大学大学院医学系研究科神経内科）

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）

船越 洋（大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野）

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は病因・病態が不明の進行性の難治性神経疾患である。主として運動ニューロンの選択的細胞死が惹起されて全身の筋萎縮をきたし、最終的には呼吸筋の麻痺をきたす極めて予後不良な疾患である。本研究班はこの神経難病の中でも最も過酷な疾患である ALS の病因と病態の解明を行いつつ、その知見に基づいた新規の治療薬や治療法を確立することが研究目的である。今までの本班

の研究成果では、変異 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子導入 ALS ラットを世界に先駆けて開発し、このラットを用いての病因・病態解明ならびに治療法の開発が進められている。また本邦発の新規の ALS 治療薬として期待されている肝細胞増殖因子 (HGF) が ALS 動物モデルにおいて遺伝子工学的及び髄腔内投与にて有効性が示されている。これらの研究成果の流れをくみ、本研究班では、ALS の病因・病態を解明しつつ、かつそれらの知見に基づいた新規治療法を開発することを主要な目的として、以下の点を主に研究する。①ALS の新規治療薬の開発につながる運動ニューロンの選択的神経細胞死の機序の解明を行なう。②現在 ALS の新規治療薬の候補として最も有力視されている HGF の有用性の確立と臨床への応用を検討する。③ALS 患者の脊髄前角細胞に薬剤を有効に導入する遺伝子治療のためのベクター開発の研究を行う。④将来的な ALS 治療薬として神経幹細胞移植や他の新機軸の治療法を検討する。⑤現在 ALS で悩んでいる患者に即応出来る治療薬の開発と応用を目指す。

B. 研究方法

ALS の病因・病態は不明であるが、いくつかの有力な病因仮説が存在する。なかでも本研究班が最も重要視している SOD1 の遺伝子変異によるものの他に、グルタミン毒性によるものや重金属毒性などが考えられている。

1. AMPA 受容体サブユニット GluR2 異常による運動ニューロン死

ALS の病態研究で最も重要な点は運動ニューロンの選択的細胞死の機序解明である。その機序には従来からイオン型グルタミン酸受容体サブタイプの AMPA 受容体を介した細胞内の Ca^{2+} イオン濃度上昇が深くかかわっていると考えられている。ALS の患者脊髄からレーザーマイクロディセクターで切り出した単一運動

ニューロンより AMPA 受容体各サブユニットに対する定量的 RT-PCR により mRNA の発現量を定量し、GluR2 の RT-PCR 産物を特異的制限酵素 Bbv1 消化断片の定量により Q/R 部位 RNA 編集率を算定した。

2. ALS 治療への HGF の応用

HGF は神経栄養因子の中でも運動ニューロンに対し強い保護作用を持ち、かつ遺伝子操作により ALS に対する効果が認められているので、次世代の新規の治療薬として最も期待されている。ALS の臨床応用を見据えてこの HGF を ALS Tg ラットに対して、ALS の症状発症後に HGF 髄腔内投与を行い、その治療効果を臨床的および組織学的に確かめた。

一方、インシュリン様成長因子 (IGF- I) は経皮的投与では ALS 患者には有効性を示さなかったため、ALS Tg マウスに対し髄腔内投与を行い、その結果を検討した。

3. 遺伝子治療に向けてのベクターの開発

ALS の遺伝子治療の開発には候補治療薬が変性運動ニューロンに有効に到達することが重要である。ポリオウイルスは運動神経細胞に特異的に感染し複製する能力を有している。この特性を利用して ALS 遺伝子治療のベクターとして用いるべく研究開発を行う。ポリオウイルスはゲノムサイズが全長約 7500 塩基と短いためベクターとして用いるには導入する外来候補薬剤遺伝子のサイズとの関係でどの程度ポリオウイルスゲノムを改変できるのかの点とポリオウイルス自体の持つ神経毒性をどの程度減らせるかが問題になる。この点を明らかにするためにベクターとして用いるポリオウイルスゲノムの改変を検討した。

4. 将来的な ALS 治療としての神経幹細胞移植および他の新機軸による治療法

ALS の将来的な治療として胚性幹細胞 (ES 細胞) から運動ニューロンやその前駆細胞を誘導し、それらを細胞移植によって ALS を治療する方法が考えられる。これらの新規治療法を

目指してマウスの ES 細胞から胚様体を経て多能性神経幹細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法を確立し、この過程で後分化因子であるレチノイン酸を作用させ運動ニューロンの誘導が効率良く起こるかどうかを検討した。また、誘導された細胞を ALS Tg ラットへの細胞移植法を検討した。

一方、変異 SOD1 のみを認識するユビキチンリガーゼの Dorfin は培養系で変異 SOD1 による神経細胞障害を抑制することが知られている。今回この効果を *in vivo* で確認する為に pCAGGS ベクターを用いて chicken β -actin プロモーター調節下に全身で Dorfin を発現する Dorfin Tg マウスを作製し、それを ALS Tg マウスと交配して mSOD1/Dorfin ダブル Tg マウスを作り臨床症状の解析を行なった。

5. その他の即応性のある ALS 治療の可能性

ALS の新規治療法の開発と並行して現在 ALS 治療として適応のない薬剤が ALS に有効性を示すか否かを検討することは ALS の即応性の治療薬開発に重要である。ALS ではミトコンドリア DNA の変異が加速している所見からミトコンドリアの膜保護作用のあるカルニチンの効果を検討した。また、フリーラジカルスカベンジャーであり虚血性脳梗塞の治療薬であるエダラボンの変性運動ニューロンへの細胞保護効果を検索し、臨床応用の可能性を検討した。

(倫理面の配慮)

各研究施設における倫理委員会規定に従い十分なインフォームド・コンセントを施行し、動物実験に関しては倫理的動物実験指針に従い実験を行った。

C. 及び D. 研究結果と考察

1. AMPA 受容体 GluR2 の RNA 編集異常

ALS 患者脊髄からの単一運動ニューロンでの AMPA 受容体サブユニット mRNA の発現量、

GluR2 の割合とも対照群と差がなかった。しかし、GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率は対照群では 100%であったが、ALS では 0~100%の割合で低下していた。この編集率の低下は患者のプルキンエ細胞では認められず運動ニューロンの細胞特異性が認められた。

2. HGF など神経栄養因子の ALS への治療応用

ALS Tg ラットに対して ALS の症状が発症してから HGF を持続髄腔内投与し、臨床経過が非投与 ALS Tg ラットに比較して約 1.6 倍の延長が認められた。また、腰髄レベルにおける運動ニューロン数を測定するとコントロール群に対して HGF では運動ニューロンの数が保存されていた。

一方、SOD1 Tg マウスに対しての IGF-1 髄腔内投与では対照群に較べて発症の遅延と生存期間の延長をもたらした。また病理学的にも運動ニューロン死の抑制が認められた。

3. ポリオウイルスベクターの開発

ポリオウイルスを ALS の遺伝子治療のベクターとして用いるためにポリオウイルスゲノムはどこまで改変可能であるかを検討した。現在のところ約 3000 塩基程度の外来 mRNA の挿入が可能であり、したがって ALS の治療薬として注目されている HGF の mRNA の挿入が可能であると考えられる。また、ポリオウイルスの細胞毒性発現に中心的役割を担う 2A プロテアーゼの発現はウイルス複製にとって必須でないことが明らかになった。したがってゲノムから 2A プロテアーゼ領域を除き得るのでより実用に向けて安全なベクターとして期待がもてる。

4. 将来的な ALS 治療法としての神経幹細胞移植および他の新機軸の治療法

マウス胚性幹細胞からニューロスフェア形成過程において低濃度のレチノイン酸を作用させることにより、マウス ES 細胞から運動ニューロンやその前駆細胞を高率に誘導することができた。これらの細胞を *in vitro* で筋芽細

胞由来の myotube と共培養すると myotube との接触が観察されるとともにパッチクランプ法にて活動電位も記録された。現在 in vivo における解析としてニューロスフェアをマウス胎児や ALS Tg ラットの脊髄への移植の方法を検討しており、ES 細胞由来の細胞が生体に生着することが確認されている。

Dorfin と ALS のダブル Tg マウスにおいては ALS の発症時期は ALS Tg マウスと差はなかったものの、生存期間においては ALS マウスに較べて有意に延長が認められた。また、組織化学的にダブル Tg マウスの前角細胞では SOD1 およびユビキチンの蓄積減少が観察され、Dorfin の高発現が in vivo においても治療的有効性を発揮することが示された。

5. その他の即応性のある ALS 治療薬の可能性

ALS 患者脊髄における mt DNA 変異はコントロールに較べて増加傾向にあり、ミトコンドリア障害が進行している可能性が考えられた。したがってミトコンドリア膜保護作用を持つカルニチンを ALS Tg マウスに発症後 30mg/kg を皮下投与したところ、約 2 週間の延命効果が認められた。ALS 発症後からの投与でも有効性を示したことから ALS 患者への治療応用への期待がある。エダラボン治療を ALS 患者に続けてきているが、今回プラセボを対象とした治療結果では重症度の ALS-FRS-R スケールでは差はないものの、層別解析を行なうと、軽症の患者群においては %FVC に対するエダラボンの効果が認められ、長期のトライアルの結果が今後期待される。

E. 結論

本研究班の目的は ALS の病因ならびに病態の解明を行いつつその知見に基づいた新規治療法を開発することにある。運動ニューロン死の機序に関しては、新たに AMPA 受容体の GluR2 サブユニットの RNA 編集率が ALS 患者の運動ニューロンのみで低下していること

が単一ニューロンの解析で明らかにされた。HGF に関しては ALS Tg ラットを用いて髄腔内投与での有用性の条件設定が行なわれている。将来的に ALS の治療法として有望な遺伝子導入治療には、効率的なベクターの開発が重要と考えられる。ポリオウイルスベクターは HGF の遺伝子導入に対しても十分その運動ニューロン向精神性を発揮し、かつポリオウイルスの毒性を削除することが可能であることが明らかにされた。今後はポリオウイルスベクターを用いての遺伝子導入実験の展開が期待される。さらにもう一つの ALS の将来的治療としては神経幹細胞移植が有力視されている。マウスの ES 細胞から運動ニューロンないしその前駆細胞の誘導が可能になり、かつそれらの細胞が myotube に接触することが明らかになった。これらの細胞を ALS Tg ラットの脊髄への移植実験を行っており、現状での ES 細胞由来の移植細胞が生体に生着していることが確認されている。このことは動物モデルにおける神経細胞移植による ALS の治療実験の展開を期待させる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyazaki K et al. NEDL1, a novel E3 ubiquitin ligase for dishevelled1, targets mutant superoxide dismutase 1. J Biol Chem, in press.

Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M and Sobue G. Dorfin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem. in press.

Kato S, Funakoshi H, Nakamura T, Kato M, Nakano I, Hirano A and 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*, 106(2): 112-120,2003

Saito K, Shiotani A, Watabe K, Moro K, Fukuda H and Ogawa K. Adenoviral GDNF gene transfer prevents motoneuron loss in the nucleus ambiguus. *Brain Res*, 962:61-67, 2003

Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I and Kwak S. RNA editing and death of motor neurons in ALS. *Nature*, in press.

2. 学会発表

Okada Y, Shimazaki T, Sobue G and Okano H. Generation of motor neurons from mouse embryonic stem cells, The 2nd CREST Symposium on Development, Differentiation and Regeneration, Tokyo, May 2003.

Shiote M, Nagano I, Murakami T, Ilieva H, Nagata T, Yokoyama M, Shoji M and Abe K. Therapeutic benefit of intrathecal infusion of insulin-like growth factor-1 in transgenic mice that express a mutant human SOD1 gene. 15th Int. Meeting on ALS/MND, Milan, Italy, November 17-19,2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1)ラットを用いた ALS モデル (特許取得)

(2)胚性幹細胞からの神経幹細胞、運動ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンの製造法

(申請中)

(3)記憶障害治療剤 (申請中)

(4)記憶障害治療剤スクリーニング法 (申請中)

(5)欠陥干渉粒子、ポリオウイルス欠損変異 RNA、cDNA およびプラスミド (特許取得)

分 担 研 究 者

研 究 報 告

ALS トランスジェニックラットに対する pan caspase inhibitor の髄腔内投与

主任研究者 糸山 泰人 東北大学大学院医学系研究科神経内科教授

研究要旨 家族性 ALS の動物モデルの G93A SOD1 トランスジェニックラットに、pan caspase inhibitor である Z-VAD-fmk の髄腔内持続投与を行った。同剤の G93A SOD1 Tg マウスへの脳室内投与では、発症、死亡の遅延が報告されていたが、本研究では、対照群と比較して Z-VAD-fmk 投与群の発症と、脊髄前角運動神経細胞の減少が有意に早かった。Z-VAD-fmk の髄腔内投与は、caspase を抑制したが、脊髄前角運動神経の細胞死を caspase 経路以外の機序で促進したと考えた。

主任研究者： 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経内科教授

研究協力者： 青木正志、石垣あや、永井真貴子、割田 仁*、加藤昌昭、神位りえ子

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

A. 研究目的

今まで複数の報告により、ALS における神経細胞死への Apoptosis の関与が示唆されてきた。G93A SOD1 トランスジェニック（以下 Tg と略）マウスへの pan caspase inhibitor である Z-VAD-fmk 脳室内投与実験では、発症と死亡の遅延が報告された（2000, Li et al）。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、こ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 apoptosis 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 Z-VAD-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、Z-VAD-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。

B. 研究方法

70 日齢から皮下埋め込み型浸透圧ポンプを用いて、Z-VAD-fmk をグラム体重あたり 15 μ g と、

Vehicle を、Tg ラットの腰部より、髄腔内に 8 週間持続投与した。これらのラットと、non-Tg ラットにおける発症時期と寿命の観察、70 日齢、90 日齢、110 日齢、terminal 期における第 5 腰髄の病理像の検討、ライトサイクラーによる脊髄中 caspase1 と caspase3 の mRNA の定量を行い、比較検討した。

（倫理面への配慮）

モデル動物の飼育・管理は当学動物実験ガイドラインを遵守した。

C. 研究結果

Z-VAD-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。

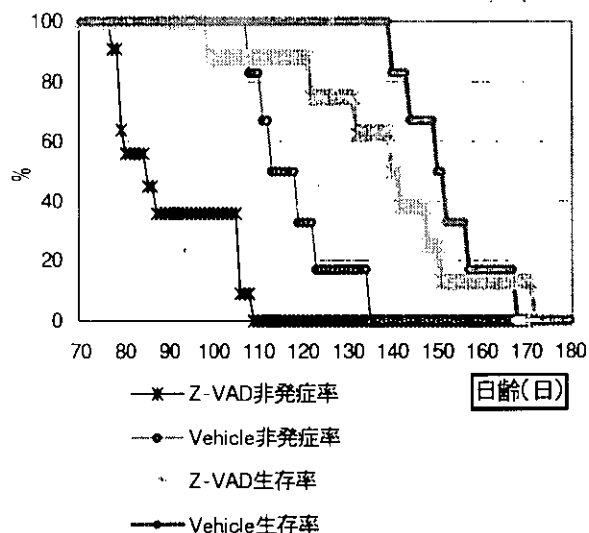


図 1. 非発症率と生存率

前角細胞の減少も、Z-VAD-fmk 投与群が対照群より早期に認められた。

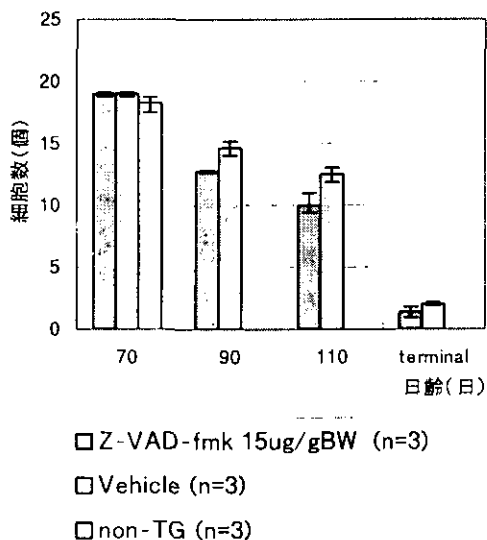


図2. 第5腰髄前角の運動神経細胞数

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。

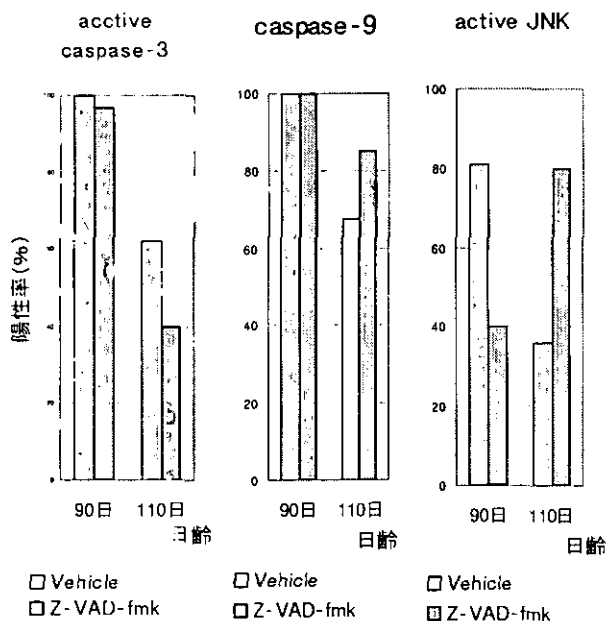


図3. 第5腰髄前角 免疫染色 陽性率

Z-VAD-fmk 投与群と、対照群の90日齢、110日齢の第5腰髄を、caspase-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

本研究では、Z-VAD-fmk 投与群の発症・神経脱落が対照群より早かった。Z-VAD-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。Z-VAD-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

Z-VAD-fmk の髄腔内投与が caspase cascade を強く阻害したため、ストレスキナーゼやミトコンドリアを経由する経路など、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。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyazaki K et al. NEDL1, a novel E3 Ubiquitin ligase for dishevelled1, targets mutant superoxide dismutase 1. J Biol Chem, in press

2. 学会発表

石垣あや他、ALSトランスジェニックラットに対するZ-VAD-fmk 髄腔内投与、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(特許取得済)

ALS トランスジェニックラット脊髄における未分化神経前駆細胞の局在と分化

主任研究者 糸山 泰人 東北大学大学院医学系研究科神経内科 教授

研究要旨 ヒト変異 *CuZn 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から内在性神経前駆細胞が増殖しおもにグリア系細胞に分化している。一方、より未分化な神経前駆細胞 (nestin 陽性 / GFAP 陰性細胞) は運動ニューロン脱落后、発症後期から末期に至ってようやく増殖し、主として脊髄中心管上衣層に局在することが示された。このような細胞を早期から賦活し組織修復に役立てることで新規治療法開発につながる可能性がある。

主任研究者：糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経内科 教授

研究協力者：青木 正志^{*}、割田 仁[†]、石垣 あや^{*}、
加藤 昌昭^{*}、松本 有史[§]、永井真貴子^{*}、神位りえ子^{*}、
船越 洋[‡]、岡野栄之[§]

^{*}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

[§]慶應義塾大学医学部生理学教室

在性神経前駆細胞を利用した再生医療が脊髄の変性疾患である ALS の新規治療戦略として注目されている。我々は再生医療の開発を目的に内在性神経前駆細胞 (neural progenitor cells、以下 NPCs) の解析を開始し、Tg ラット脊髄では運動ニューロン脱落后より有意に NPCs が増殖し、その多くはグリア系細胞に分化していることを昨年度までに示した。本年度は神経幹細胞に近い、より幼若で未分化なマーカーを発現する神経前駆細胞の検索を行い、その局在と分化を明らかにすることを試みた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis 以下 ALS) は系統的な運動ニューロン死を主病態とする神経変性疾患で、病態解明と有効な治療法開発が強く求められている。しかし、優性遺伝性 ALS の一部における *CuZn superoxide dismutase* (*CuZn SOD*) 遺伝子変異の発見から現在まで依然として病態は不明である。これまでに我々は ALS の新しい動物モデル、ヒト変異 *CuZn SOD* トランスジェニックラット (Tg ラット) を作製した。その個体が従来のマウスモデルと比べ極めて大きいことから、1) 生化学的、生理的な解析、2) 脊髄や運動ニューロンに効率よく投与できる髄腔内投与や細胞移植などの実験的治療が、優れて容易となった。

正常成体脊髄にも潜在的再生能があることが示されてきた近年、a) 外来性の細胞移植あるいは b) 内

B. 研究方法

発症前かつ脊髄運動ニューロン脱落后 (15 週齢) および発症後早期 (21 週齢)、後期 (23 週齢)、末期 (25 週齢) の H46R Tg ラットと非 Tg ラット (コントロール) に対して bromodeoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg) を腹腔内投与して新生細胞を標識、脊髄腰膨大部の灌流固定後凍結切片を作成して免疫組織化学的に解析した。未分化神経前駆細胞の選択的マーカーとして nestin を用い、BrdU あるいは GFAP との二重染色を行った。

C. 研究結果

1) コントロールの BrdU 陽性細胞はおもに後角と中心管上衣層および白質に散在する程度であったのに対し、Tg ラットでは発症前から前角を含めた灰白質、白質に

広汎に BrdU 陽性細胞が認められ、病期とともに有意に増殖した。

2) コントロールおよび発症前 Tg ラットでは nestin 陽性像は血管内皮の一部にしか認められなかった(図 1A)。これに対し、発症後早期の Tg ラットでは、nestin 陽性像が血管内皮の一部と脊髓前角の反応性アストログリアの一部にも認められたが、中心管上衣層の陽性像は稀であった(図 1B)。しかし発症後後期～末期の Tg ラットでは、中心管上衣層(図 1C 矢頭)、中心管周囲灰白質(図 1C 矢印)、脊髓前角、そして白質とより一層多くの nestin 陽性細胞が認められ、BrdU/nestin 二重陽性細胞も確認された。脊髓前角、中心管周囲灰白質、白質に認められる nestin 陽性細胞の多くは GFAP とも共陽性を示したが、中心管上衣層に存在する nestin 陽性細胞は GFAP 陰性であった。

D. 考察

運動ニューロン脱落開始後早期ではなく、かなり病期が進行した後期～末期に至ってようやく nestin 陽性かつ GFAP 陰性の未分化な NPCs の存在が示された。BrdU/nestin 二重陽性細胞は nestin の発現が既存の細胞ではなく新生細胞に生じていることを示している。こうした細胞の局在は主として中心管上衣層であり、成体齧歯類の脊髓における神経幹細胞の局在が示唆されてきた部位と一致している。

一方、nestin/GFAP 二重陽性細胞も単なる反応性アストログリアといえるのか、通常の反応性アストログリアにはみられない潜在的分化能をもつのか現時点では不明である。

E. 結論

このような未分化 NPCs をより早期から分化誘導し組織修復に役立てる方法を探っていくことが、新しい治療法の開発につながる可能性がある。また、本モデル病態下でなぜ運動ニューロン脱落后早期から組織修復メカニズムがはたらかず再生の場(niche)が形成されないのか、そのメカニズム解明する必要がある。これは将来的な細胞移植による再生療法確立に必須と考えられる。現在、外来性再生誘導因子の髄腔内投与を試み検討中である。

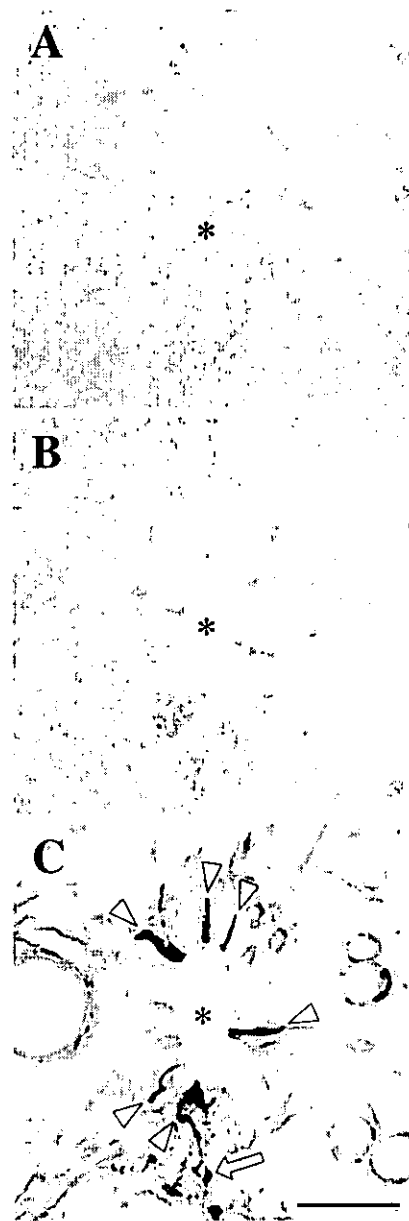


図 1. 腰髄中心管周囲の nestin 免疫組織化学
A: コントロール(21 週齢)では陰性, B: Tg(21 週齢)では稀に陽性像を認めるのみに対し, C: Tg(23 週齢)では中心管上衣層(矢頭)、周囲灰白質(矢印)、血管内皮に明らかな陽性像を認める。
*: 中心管, Bar: 25 μ m

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyazaki K et al. NEDLI, a novel E3 Ubiquitin ligase

for dishevelled1, targets mutant superoxide dismutase 1.
J Biol Chem, in press

2. 学会発表

割田 仁 ほか、ALS トランスジェニックラット脊髄前駆
細胞のグリア系細胞への分化、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)

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

分担研究者 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室 教授

研究要旨 マウス胚性幹細胞を用い、筋萎縮性側索硬化症(ALS)で選択的に障害される運動ニューロンとその駆細胞を誘導する培養法を確立した。この細胞の *in vitro*、*in vivo* における性質を明らかにし、ALS の病態解析や細胞移植による治療法の研究に利用する。

A. 研究目的

マウス胚性幹細胞(ES 細胞)から運動ニューロンとその前駆細胞を誘導する培養法を確立し、誘導した運動ニューロンを ALS の病態解析や薬剤スクリーニングに利用する。さらに再生医療の見地から細胞移植などの新規治療法の開発を試みる。

B. 研究方法

我々はマウス ES 細胞から胚様体(Embryoid Body: EB)を経て、多能性神経幹細胞を含む未分化神経系前駆細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法を確立してきた。本研究では、EB 形成時に後方化因子であるレチノイン酸(RA)を作用させることにより、ES 細胞由来の神経系前駆細胞に後方の領域特異性を付与し、神経管後方より発生する運動ニューロンとその前駆細胞を高率に生み出すニューロスフェアを誘導することを試みる。まず、RA の濃度が ES 細胞の分化に与える影響を検討する。さらに、その結果を用いて EB から高率にニューロスフェアを誘導する培養系を確立する。これらの解析は、RT-PCR 法やウェスタンブロット法などの分子生物学的手法、免疫染色法を用いて行う。さらに誘導した細胞の *in vitro* での性質を、細胞培養や電気生理学的手法を用いて明らかにする。さらに、これらの *in vitro* での結果をもとに、*in vivo* での細胞の生着とその動態を確かめる。その手法として、超音波ガイド下でのマウス胎児への細胞移植、さらには、ALS モデル動物(変異型 SOD1 トランスジェニックラット:mSOD1 ラット)への細胞移植治療を試みる。ALS モデルラットに関しては、治療効果判定法がいまだ十分に確立されておらず、我々の研究室独自の運動機能

解析法(治療効果判定法)の開発も試みる。さらに、ヒト ES 細胞への応用を計画している。

(倫理面への配慮)

モデル動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。当研究室におけるヒト ES 細胞の使用については、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成 14 年 11 月 7 日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認されており、研究計画はそれに準拠したものとなっている。

C. 研究結果

まず、様々な濃度の RA を用いて EB を形成させ、RT-PCR 法、western blot 法、免疫染色法により種々の遺伝子の発現パターンの解析を行った。RA は濃度依存的に神経分化と後方化を促し、低濃度の RA を用いたときに形成される EB 中には、Nestin 陽性、sox1 陽性の、未分化神経系前駆細胞が多く含まれかつ、これらの細胞は中脳、後脳の領域特異性を持つことが明らかとなった。そこで低濃度の RA を用いて形成させた EB を分散し、bFGF 存在下で浮遊培養させたところ、高率にニューロスフェアを形成させることに成功した。この一次ニューロスフェアは接着培養で分化させるとニューロンを多く生み出し、一方で一度継代した二次ニューロスフェアからはグリアを多く生み出すことが明らかとなった。この結果は *in vivo* の中枢神経の発生をよく模倣していることから、中枢神経発生のモデルとしても有用であると考えられた。さらに、低濃度の RA を用いて誘導したニューロスフェアからは、運動ニューロンやその前駆細胞のマーカー

である HB9 陽性の細胞が高率に誘導された。このようにして誘導したニューロンは、電気生理学的手法(パッチクランプ法)を用いて解析すると活動電位が記録され、さらに、*in vitro* で筋芽細胞株由来の myotube と共培養すると α -BTX により標識される myotube とのコンタクトが観察された。*In vivo* における解析では、ES 細胞由来のニューロスフェアの、マウス胎児への移植(超音波ガイド下)や mSOD1 ラット脊髄への移植を行っており、ES 細胞由来の細胞が生体内に生着することは確認された。生着した細胞の性質については現在解析中である。また、mSOD1 ラットの運動機能解析法は、傾斜台、3 次元自動運動機能解析装置、独自に開発したスコアリングなどにより、再現性のよい評価法を確立することができた。

D. 考察

ES 細胞から低濃度レチノイン酸を用いて高率にニューロスフェアを誘導することができた。領域特異性を決定するマーカー遺伝子群の発現解析により、これらのニューロスフェアは後脳タイプの領域特異性を獲得していると考えられた。誘導したニューロスフェアからは、運動ニューロンとその前駆細胞のマーカーである HB9 を高率に発現し、電気生理学的に活動電位を発するニューロンが誘導された。さらにこれらのニューロンと myotube とのコンタクトも認められたことから、機能的な運動ニューロンとその前駆細胞を、マウス ES 細胞から高率に誘導できる培養法を確立できたと考えられた。これらの細胞は、生体内に生着し、ニューロンに分化して機能し得ると考えられるが、生着した細胞の性質については今後さらに詳細に解析していく必要があると考えられる。

E. 結論

マウス ES 細胞から運動ニューロンとその前駆細胞を高率に誘導する方法を確立した。誘導した細胞を用いた *in vitro* での運動ニューロンの機能や ALS の病態解析、薬剤スクリーニングに加え、*in vivo* での機能解析、ALS モデル動物への移植等による新規治療法の開発が期待される。今後は、ヒト ES 細胞への応用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

Tonchev, A. B., Yamashima, T., Zhao, L., Okano, HJ. and Okano, H, Proliferation of neural and neural progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys *Mol. Cell. Neurosci* 23: 292-301. 2003

Yuasa, Y., Yamamoto, M., Oda, E., Yamamoto, A., Kanemura, Y., Hara, M., Suzuki, A., Yamasaki, M. Okano, H, Drosophila homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development* 130: 2419-2428. 2003

Hu QD., Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Natesan S, Ng YK, Ling EA, Israel A, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai, H, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC, F3/Contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. Blockade of interleukin-6 receptor ameliorates functional recovery in spinal cord injury. *Cell* 115: 163-175. 2003

Matsuzaki, Y., Kinjo, K., Mulligan, RC. and Okano, H. Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cell. *Immunity* 20: 87-93. 2004

2. 学会発表

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導の試み、第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002 年 5 月

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導の試み、第 25 回日本神経科学会、東京、2002 年 7 月

岡田洋平、吉崎崇仁、島崎琢也、岡野栄之、神経幹細胞、胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学、第 2 回 Stroke フロンティア、東京、2003 年 3 月

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞を用いた神経系細胞の誘導、第 14 回日本神経学会総会、横浜、2003 年 5 月

Yohei Okada, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Generation of Motor Neurons from mouse Embryonic Stem Cells, The 2nd CREST