

研 究 協 力 者

研 究 報 告

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

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  
共同研究者 辻 幸子 北海道大学病院神経内科  
新保和賢 溪仁会西円山病院神経内科  
田代 淳 北海道大学大学院医学研究科神経内科  
佐々木秀直 北海道大学大学院医学研究科神経内科

〈研究要旨〉

脊髄スライスカルチャーは器官の構造を保ったまま長期培養が可能であり、生体に比べ取り扱いやすい利点を有している。更に、位置情報が得られるため運動ニューロンの同定にも優れている。我々は ALS 患者の病理像に見いだされるユビキチン陽性封入体の存在からユビキチン・プロテアソーム系異常に着目し、脊髄スライスカルチャーを用いてプロテアソーム阻害剤の運動ニューロンに対する作用を検討した。運動ニューロンはプロテアソーム阻害剤 (lactacystin, 5 $\mu$ M) で有意に傷害されたが、同濃度では後角ニューロンは傷害されなかった。この運動ニューロン傷害は、細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇を伴い、細胞内 Ca<sup>2+</sup>キレーター (BAPTA-AM) やグルタミン酸受容体阻害剤 (MK-801, CNQX) で部分的に拮抗された。以上から脊髄運動ニューロンはプロテアソーム障害に特に脆弱であり、その細胞死にはイオン透過型グルタミン酸受容体を介した Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が部分的に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、多くの神経変性疾患でユビキチン陽性封入体が見いだされ、ユビキチン・プロテアソーム系 (ubiquitin proteasome system; UPS) 障害の関与が疑われている<sup>12</sup>。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) においても、Lewy body like inclusionはユビキチン陽性であり、UPS障害が関与している可能性がある。しかし、プロテアソーム活性低下が直接的に細胞死を引き起こすかについては細胞の種類や分化度などにより差があるものと考えられている<sup>3</sup>。

脊髄運動ニューロンがUPS障害により特に傷害されやすいことは、我々が以前にラット脊髄の分散培養系を用いて明らかにしたが<sup>4</sup>、今回、更に正確に運動ニューロンを同定できるスライスカルチャーを用いてこれを確認するとともに、その細胞死の機序に検討を加えた。

B. 研究方法

1. スライスカルチャーの作成

生後6日目ラット新生仔 (Sprague-Dawley rat) をケタミン麻酔後断頭、脊髄を採取し400 $\mu$ mにスライスし、6穴プレート内の培養膜上にのせ培養した。培養10日目から72時間、各濃度のLactacystinに暴露した。

2. 評価

運動ニューロンの指標としてSMI 32、後角ニューロンの指標としてcalretininで免疫染色し細

胞数を数えた。生存運動ニューロンは、前角に存在する30 $\mu$ m以上のSMI 32陽性大径細胞で突起の断片化がないものと定義した。

3. 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度測定

1時間のCalcium-green-AM (5 $\mu$ M)処置の後、共焦点顕微鏡で観察し、運動ニューロン、後角ニューロンそれぞれについて、ピクセルあたりの平均蛍光強度を計算した。

4. 保護効果の検討

lactacystin (5 $\mu$ M) と BAPTA-AM (2 $\mu$ M), nimodipin (20 $\mu$ M), CNQX (50 $\mu$ M), MK-801 (10 $\mu$ M), ifenprodil (10 $\mu$ M)を同時に処置し、72時間後に免疫染色で検討した。

5. 免疫蛍光染色

運動ニューロンと後角ニューロンでのCa<sup>2+</sup>結合蛋白の差違をみるためcalbindin D-28K, calretininについてSMI 32と二重蛍光染色を行った。

6. 統計処理

各実験は1回あたり3~4スライスずつ検討し、3回以上繰り返した。統計処理はANOVAで差が見られたものはpost-hoc test (Fisher's PLSD) にて検定した。

7. 倫理面の配慮

本研究は北海道大学医学部動物実験に関する指針に基づいて行った。

C. 研究結果

コントロール培養では一スライス平均約 20 個の運動ニューロンが存在した。後角にも SMI 32 陽性大径ニューロンが存在し、運動ニューロン同定における位置情報の重要性が示唆された。

運動ニューロンの生存数は lactacystin 暴露で濃度依存性に減少し、5 $\mu$ M では 3 $\pm$ 0.75 個/スライスであった ( $p < 0.01$ )、後角ニューロンは 5 $\mu$ M でも変化はなかった。

次に、calcium-green-AM で lactacystin 暴露後の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変化を観察した。運動ニューロンでは 8 時間後から明らかな上昇が見られた。後角ニューロンでは 24 時間後で暴露前に比べ有意な増加は見られたが、運動ニューロンに比べるとその変化は軽微であった。

細胞内 Ca<sup>2+</sup>キレーターの BAPTA-AM を lactacystin と同時処理すると運動ニューロン死は有意に抑制された (12.9 $\pm$ 2.4,  $p < 0.01$ ) ことから、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が重要なシグナルであると裏付けられた。Ca<sup>2+</sup>増加経路を調べるため、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体阻害剤である CNQX または MK801 を lactacystin と同時処理したところ、不完全ながらも運動ニューロン死は有意に抑制された (9.9 $\pm$ 1.3, 10.0 $\pm$ 1.3,  $p < 0.01$ )。NR2B サブユニット特異的 NMDA 受容体阻害剤 ifenprodil, L 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害剤 nimodipin では保護作用は明らかではなかった。

ALS で傷害されやすいニューロンは Ca<sup>2+</sup>結合蛋白の発現が弱く、Ca<sup>2+</sup>緩衝能が低いことが従来報告されている<sup>5</sup>。我々の系でも、二重蛍光染色で確認したが、calbindin D-28K, calretinin は後角では多数の陽性ニューロンが存在したが、運動ニューロンでは陰性であった。

#### D) 考察

ALS の発症・進行にはグルタミン酸興奮毒性や細胞内カルシウム緩衝能の低下、ミトコンドリア機能障害、活性酸素の増加、異常ニューロフィラメント蓄積などの複数の機序が複合して作用していると考えられている<sup>6</sup>。パーキンソン病などの変性疾患全般において UPS 障害の関与が注目されているが、プロテアソーム障害が直接ニューロンを細胞死に導くかについては異論がある<sup>7</sup>。今回の我々の結果は、プロテアソーム障害が比較的高い選択性をもって運動ニューロン死を引きおこし、その下流にカルシウム緩衝能低下やグルタミン酸興奮毒性仮説など、従来考えられてきた他のカスケードを巻き込んでいる可能性を示した。

カルシウム増加の経路として、MK 801, CNQX で保護作用が見られたことから、NMDA

型および AMPA 型受容体を介した細胞外からの流入亢進が考えられた。その機序は今後の検討課題であるが、最近、NMDA 型受容体の膜アンカー蛋白である PSD-95 のプロテアソーム分解が AMPA 型受容体のシナプスへの発現を制御しているとの報告がなされており<sup>8</sup>、プロテアソーム障害による受容体発現の増加やサブユニット構成の変化などが受容体の感受性を高めている可能性がある。

今回、Ca<sup>2+</sup>増加の要因として細胞外カルシウム流入のブロックを中心に検討したが、その効果は十分とは言えないことから、ミトコンドリアや小胞体を介した細胞内での Ca<sup>2+</sup>分布変化などについても今後検討が必要である。プロテアソーム障害は ER ストレスやミトコンドリア障害、JNK 経路の活性化など多くのカスケードとの関連が指摘されている<sup>9,10,11</sup>。我々の系の運動ニューロン傷害メカニズムを更に詳細に検討することは、ALS の分子生物学的理解に役立つものと考えられる。

また、スライスカルチャーは脊髄の構造を保ったまま、ニューロンの他、グリアや幹細胞も同時に培養が可能であり、幹細胞-組織間の相互作用を検討するのに有効なシステムである。このことを利用して、現在、骨髄間質細胞と脊髄スライスカルチャーの共培養を用いたニューロン再生について検討を進めている。

#### E) 結論

脊髄運動ニューロンはプロテアソーム障害に対し特に脆弱で、その機序には細胞内Ca<sup>2+</sup>増加が重要と考えられた。

#### F) 健康危険情報 なし

#### G) 研究発表

論文発表 未

学会発表

- 第 44 回日本神経学会総会 (平成 15 年, 横浜)
- 第 14 回 ALS/MND 国際シンポジウム (平成 15 年, イタリア・ミラノ)

#### H) 知的財産権の出願・登録状況 予定なし

#### References

- <sup>1</sup>Chung K. K., Dawson V. L. and Dawson T. M. (2001) The role of the ubiquitin-proteasomal pathway

---

in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* **24**, S7-14.

<sup>2</sup> McNaught K. S., Belizaire R., Isacson O., Jenner P. and Olanow C. W. (2003) Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol* **179**, 38-46.

<sup>3</sup> Sang C., Kobayashi Y., Du J., Katsumo M., Adachi H., Doyu M. and Sobue G. (2002) c-Jun N-terminal kinase pathway mediates Lactacystin-induced cell death in a neuronal differentiated Neuro2a cell line. *Brain Res Mol Brain Res* **108**, 7-17.

<sup>4</sup> Kikuchi S., Shinpo K., Takeuchi M., Tsuji S., Yabe I., Niino M. and Tashiro K. (2002) Effect of geranylgeranylacetone on cellular damage induced by proteasome inhibition in cultured spinal neurons. *J Neurosci Res* **69**, 373-381.

<sup>5</sup> Alexianu M. E., Ho B. K., Mohamed A. H., La Bella V., Smith R. G. and Appel S. H. (1994) The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **36**, 846-858.

<sup>6</sup> Julien J. P. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* **104**, 581-591.

<sup>7</sup> Sawada H., Kohno R., Kihara T., Izumi Y., Sakka N., Ibi M., Nakanishi M., Nakamizo T., Yamakawa K., Shibasaki H., Yamamoto N., Akaike A., Inden M., Kitamura Y., Taniguchi T. and Shimohama S. (2003) Proteasome mediates dopaminergic neuronal degeneration and its inhibition causes alpha-synuclein inclusions. *J Biol Chem*.

<sup>8</sup> Colledge M., Snyder E. M., Crozier R. A., Soderling J. A., Jin Y., Langeberg L. K., Lu H., Bear M. F. and Scott J. D. (2003) Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* **40**, 595-607.

<sup>9</sup> Masaki R., Saito T., Yamada K. and Ohtani-Kaneko R. (2000) Accumulation of phosphorylated neurofilaments and increase in apoptosis-specific protein and phosphorylated c-Jun induced by proteasome inhibitors. *J Neurosci Res* **62**, 75-83.

<sup>10</sup> Jana N. R., Dikshit P., Goswami A. and Nukina N. (2003) Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J Biol Chem*.

<sup>11</sup> Lee A. H., Iwakoshi N. N., Anderson K. C. and Glimcher L. H. (2003) Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9946-9951.

『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』

研究協力者 谷口直之 大阪大学大学院医学系研究科生化学・教授

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 1 つが Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1)である。FALS 患者や変異 SOD1 トランスジェニックマウスでは Cu/Zn-SOD 免疫陽性の封入体が観察されており、変異 Cu/Zn-SOD は aggregation を起こしやすいことが示唆されている。そこで凝集した変異 Cu/Zn-SOD タンパク質を精製し、その性質を検討した。Cu/Zn-SOD トランスジェニックラットの脳や脊髄をトリスバッファー、NP-40、そして SDS と段階的に溶解していった。その結果、ALS の病変部位である脊髄や脳幹のみ NP-40 不溶性 Cu/Zn-SOD を検出することができた。さらに NP-40 不溶性 Cu/Zn-SOD は可溶性の Cu/Zn-SOD と分子量やダイマー形成能は同じであったが、ポリクローナル抗体への反応性が亢進していた。以上のことは変異 Cu/Zn-SOD は ALS の病変部位である脊髄や脳幹でのみ構造変化を起こし、不溶性のタンパクに変化していると考えられる。

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・教授）

共同研究者

宮本泰豪（大阪府成人病センター・主任研究員）

藤原範子（兵庫医科大学生化学・講師）

高橋素子（大阪大学大学院医学系研究科生化学・助手）

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 100 以上の変異が報告されている。変異 Cu/Zn-SOD 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を障害するかは全く不明である。FALS 患者や変異 SOD1 トランスジェニックマウスでは Cu/Zn-SOD 免疫陽性の封入体が観察されており、変異 Cu/Zn-SOD は生体内で構造変化を起こし、aggregation を起こしやすいことが示唆されている。また我々は変異 Cu/Zn-SOD は野生型 Cu/Zn-SOD に比べ、糖化を受けやすいこと<sup>1)</sup>を見出してきた。これは変異 Cu/Zn-SOD と野生型 Cu/Zn-SOD では立体構造上なんらかの差異があることを示唆している。しかし、構造変化を起こし、aggregation を起こした不溶性の変異 Cu/Zn-SOD タンパク質の生化学的性質は不

明のままであった。そこで我々は実際に ALS 症状を引き起こしているトランスジェニックラットから不溶性の変異 Cu/Zn-SOD タンパク質を精製し、その性質を検討した。

## B. 研究方法

H46R および G93A トランスジェニックラットの脳および脊髄は東北大学大学院医学系研究科神経内科学講座の糸山先生より供与してもらった。この切片をトリスバッファー、NP-40、そして SDS と段階的に溶解して Cu/Zn-SOD タンパク質を精製し、その性質を検討した。尿素や塩酸グアニジンなども用いて可溶化の実験を行った。さらに精製 Cu/Zn-SOD の活性および ESI-MS による分子量の測定などの検討を行った。

## C. 研究結果

H46R および G93A トランスジェニックラットの脳や脊髄から Cu/Zn-SOD を分画したところ、ALS の病変部位である脊髄や脳幹でのみ、NP-40 不溶性 Cu/Zn-SOD を検出することができた。一方、前脳や小脳には NP-40 に溶解する Cu/Zn-SOD は脊髄や脳幹と同量存在していたにもかかわらず NP-40 不溶性 Cu/Zn-SOD は認められなかった。この NP-40 不溶性 Cu/Zn-SOD は 0.5%以上の SDS や 8M 以上の尿素および 3M 以上の塩酸グアニジンに溶解することができた。そこでいったん尿素や塩酸グアニジンで溶解して unfolding させたものを透析することでもう 1 度 folding させ、SOD 活性が残っているかどうかを検討した。その結果、尿素で unfolding させたものは低いながらも (30%) SOD 活性は存在

しており、NP-40 不溶性になっていても refolding によって活性を有する native な Cu/Zn-SOD に戻っていることが明らかになった。この refolding した Cu/Zn-SOD は分子量やイオン交換カラムへの結合などの性質はトリスバッファーで溶解できる Cu/Zn-SOD と同じ性質を有していたが、ポリクローナル抗体カラムに強い結合性があり、酸性バッファーやアルカリ性バッファーで溶出することができなかった。これは可溶性 Cu/Zn-SOD と不溶性の Cu/Zn-SOD では構造が異なっていることを示唆している。

## D. 考察

ALS の病変部位である脊髄や脳幹のみ、NP-40 不溶性 Cu/Zn-SOD を検出できたことは変異 Cu/Zn-SOD がどの部位でも aggregation を起こしてしまうことではないことを示している。つまり変異 Cu/Zn-SOD が自発的に不溶性になっているのではなく、その病変部位に限られた環境や他の物質が不溶性になるのを助けていることが示唆される。今後は ALS の病変部位に特異的な蛋白質のプロテオミクス的な解析が必要であると考えている。さらに不溶性の変異 Cu/Zn-SOD タンパク質を可溶化し、refolding させることで SOD 活性が回復したということも、他のタンパク質から分離することで元の構造に戻る可能性があることを示唆している。

## E. 結語

変異 Cu/Zn-SOD タンパク質は、病変部位に限られた環境やある物質の助けによって構造変化を起こし、不溶化し、封入体を形成す

ることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takamiya R., Takahashi M., Theingi M., Park Y- S, Miyazawa N., Endo T., Fujiwara N., Sakiyama H., Misonou Y., Miyamoto Y., Fujii J. and Taniguchi N. (2003) Glycation Proceeds Faster in Mutated Cu, Zn-Superoxide Dismutases Related to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. **FASEB J.**, 17, 938-940.

##### 2. 学会発表

Fujiwara N., Miyamoto Y., Takahashi M., Takamiya R., Honke K., Suzuki K. and Taniguchi N. (2003) DIFFERENCES IN STABILITY AND CONFORMATIONAL CHANGE BETWEEN WILD-TYPE AND MUTANT COPPER, ZINC-SUPEROXIDE DISMUTASE LINKED WITH FAMILIAL AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX Joint World Congress, October 8 -11, Montreal, Canada (Late Breaking Abstracts, 28, 2003.)

Takamiya R., Takahashi M., Park Y.S., Tawara Y., Fujiwara N., Miyamoto Y., Suzuki K. and Taniguchi N. (2003) OVEREXPRESSION OF MUTATED CU, ZN-SODS IN NEUROBLASTOMA CELLS RESULTS IN CYTOSKELETAL CHANGE. HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX Joint World Congress, October 8 -11, Montreal, Canada (Late

Breaking Abstracts, 23, 2003.)

Fujiwara N., Miyamoto Y., Takahashi M., Ookawara T., Eguchi H., Ogasahara K., Endo T., Takamiya R., Honke K., Tsukihara T., Suzuki K. and Taniguchi N. (2003) Differences in conformational change monitoring with monoclonal antibodies between wild-type and mutant Cu, Zn-SOD linked with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. :第76回日本生化学会大会.10.15-18, 横浜. (生化学, 75, 862, 2003.)

Takamiya R., Takahashi M., Park Y.S., Tawara Y., Fujiwara N., Miyamoto Y., Suzuki K. and Taniguchi N. (2003) Overexpression of Mutated Cu, Zn-SOD in Neuroblastoma Cells Results in Cytoskeletal Change. : 第76回日本生化学会大会.10.15-18, 横浜. (生化学, 75, 829, 2003.)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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、エダラボンをを用いた二重盲検試験

研究協力者 国立精神・神経センター国府台病院神経内科 神経内科医長 吉野 英

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病態にフリーラジカルによる酸化ストレスが関与していると推定されている。日本において急性期脳梗塞治療薬として承認されているフリーラジカル・スカベンジャー、エダラボンをを用い、ALS 患者における有効性と安全性を検討するための短期間のプラセボ対照二重盲検比較試験を実施した。

試験デザインは、4 週間の中、平日 20 日間エダラボン（n=20）ないしプラセボ（n=20）を点滴投与した。その後 2 週間の休薬期間をおいたのち、全例にエダラボンを 14 日間点滴投与した。試験期間としては 8 週間であるが、主要評価項目は二重盲検期（試験開始後 4 週間）の ALSFRS-R、%FVC 等の変化量、副次評価項目は二重盲検期の 3-nitrotyrosine (3NT) の変化量とした。

結果は、安全性については二重盲検期間内に実薬群とプラセボ群との間に自覚症状、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査に問題となる変化はみられなかった。

有効性について、ALSFRS-R、%FVC はプラセボ群とエダラボン群の間に有意差はみられなかった。3-NT は両群間に有意差はみられなかったものの、二重盲検期前後においてプラセボ群内では有意差はみられなかったが、エダラボン群内では有意に低下した。

探索的な解析として、層別解析を行ったところ、日本の厚生労働省による ALS 重症度分類における重症度が 1 および 2 度の患者群（日常生活に介助不要）において、%FVC はエダラボン群（n=13）では 3.22 増加したのに対し、プラセボ群（n=11）では 2.88 低下し両群間に有意な差があった（p=

0.023）。さらに試験開始時 ALSFRS-R が 41 点以上の患者群において、%FVC はエダラボン群（n=7）では 8.74 増加したのに対し、プラセボ群（n=8）では 3.39 低下し、両群間に有意な差があり（ $p<0.001$ ）、この効果は 8 週間後も認められた（ $p=0.031$ ）。また試験開始時 ALSFRS-R が 41 点以上の患者群における ALSFRS-R は、エダラボン群では 0.43 増加したのに対し、プラセボ群では 0.50 低下し、両群間に有意な差があり（ $p=0.037$ ）、この効果は 8 週間後も認められた（ $p=0.016$ ）。一方、重症度が 3 および 4 度の患者群（日常生活に介助必要）には本剤の効果は明らかでなかった。

エダラボンは、ALS 患者に投与して安全であった。本剤は発症早期あるいは重症度が軽度の患者群において、呼吸機能、運動機能障害を改善する可能性が示唆された。



研究報告書

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

研究協力者 高橋 良輔 理研脳センター・運動系神経変性研究チーム・チームリーダー

研究要旨：我々が開発した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を用いて、脊髄運動ニューロンにヒトアポトーシス阻害タンパク XIAP を過剰発現するトランスジェニックマウスおよびバキュロウイルスカスパーゼ阻害タンパク p35 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。これらのマウスと ALS モデルマウスとのダブルトランスジェニックマウスにおいては、発症後の罹病期間が XIAP では延長するが、p35 では延長しないことがわかった。従って、XIAP で抑制されるが p35 では抑制されないカスパーゼ 9 が罹病期間に重要な役割をはたしていることが示された。

A. 研究目的

運動ニューロン特異的な遺伝子過剰発現及びノックアウトシステムを開発し、筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS）モデルマウス、変異 SOD1 トランスジェニック(Tg)マウスにおける運動ニューロン変性のメカニズムを解明する。本年度は、変異 SOD1 マウスでは、ミトコンドリアアポトーシスの経路が活性化していることに注目し、その最上流であるカスパーゼ 9 を抑制するタンパク XIAP およびカスパーゼ-9 は抑制しないが、その他のカスパーゼを強力に抑制する p35 を導入することで、ALS モデルマウスの神経変性におけるカスパーゼ 9 の役割を検討した。

B. 研究方法

変異 SOD1 Tg マウスにおいて障害される脊髄運動ニューロンは、コリンアセチル転移酵素（ChAT）を特異的に発現する代表的なコリン作動性ニューロンである。我々は、ChAT プロモータ領域 6.4kb を用いることにより、外来遺伝子を脊髄運動ニューロンに発現させるシステムを開発した。そして XIAP あるいは p35 トランスジェニックマウスを作成し、G93A SOD1 Tg マウスとのダブルトランスジェニックマウスについて、生存期間、発症時期、罹病期間を解析した。なお、動物倫理面では動物の苦痛を軽減するよう、所の「動物実験実施要領」に基づき配慮した。

C. 研究結果：G93A SOD1 Tg マウスとのダブルトランスジェニックマウスでは、XIAP、p35 の両者により、およそ 10%弱、生存期間が延長し

た。しかしその内容は異なり、XIAP では発症時期は不変であったが、罹病期間は約 53%延長した。一方、p35 では発症時期は遅延したが、罹病期間は不変であった。XIAP で抑制されるが p35 では抑制されないカスパーゼ 9 は、発症後の変異 SOD1 マウス脊髄運動ニューロンで活性化していた。さらにヒト ALS の脊髄運動ニューロンでもカスパーゼ 9 の活性化を認めた。

E. 結論

カスパーゼ 9 が ALS 治療の標的分子になる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Inoue H, et al: The EMBO J. 22: 6665- 6674 (2003)

2. 学会発表

井上治久, 岩里琢治, 月田香代子, 糸原重美, 三浦正幸, 三澤日出巳, 高橋良輔：抗アポトーシス分子 p35 は ALS マウスの発症時期を遅延させ生存期間を延長する。第 44 回日本神経学会総会、(2003)、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

とくに予定はない。

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  
研究報告書

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

研究協力者 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

研究要旨：孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンの選択的神経細胞死には、イオンチャンネル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関わっていることがこれまで多数報告されている。我々は、AMPA 受容体の  $Ca^{2+}$  イオン透過性が亢進するような分子変化の有無を単一ニューロン組織で調べ、ALS 脊髄運動ニューロンで、疾患特異的・細胞選択的に AMPA 受容体 GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集率が有意に低下していることを明らかにした。一方、各サブユニット mRNA の発現量に変化を認めなかった。動物実験からは、RNA 編集異常が神経細胞死の直接原因となることが示されており、GluR2 の RNA 編集率低下は、ALS 脊髄運動ニューロンの神経細胞死の直接原因であることを裏付けている。

#### A. 研究目的

孤発性 ALS の病因仮説として最も有力な、AMPA 受容体を介する遅発性の神経細胞死のメカニズムを明らかにする目的で、AMPA 受容体の  $Ca^{2+}$  透過性を規定する要素である GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集率を定量した。

#### B. 研究方法

凍結保存ヒト剖検脳脊髄 (ALS、正常対照、疾患対照) よりレーザーマイクロディセクターで切り出した単一ニューロン組織より、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。疾患対照として、発症したヒト SOD1 トランスジェニックラットの脊髄運動ニューロンについても検討を加えた。

(倫理面への配慮)

研究倫理委員会の承認下で実験を行い、剖検組織は文書による承諾を得られた試料を用いた。

#### C. 研究結果

ALS 運動ニューロンの 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有意差がなかった。GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率は、ALS では 0-100% にばらついたのに対し、正常対照・疾患対照では全例でほぼ 100% であった。ヒト変異 SOD1 トランスジェニックラットの脊髄運動ニューロンでは、発症例でも変化はなかった。

#### D. 考察

ALS の脊髄運動ニューロンに見られた GluR2 mRNA 編集率の低下は、疾患特異的、部位選択的であり、細胞死に伴う非特異的変化ではないことを示している。動物実験からは、この分子変化は

神経細胞死の直接原因であることが示されており、ALS の神経細胞死の直接原因であることを裏付けている。この分子変化が孤発性 ALS に特異的であること、ヒト変異 SOD1 トランスジェニックラットには見られなかったことから、SOD1 遺伝子異常による家族性 ALS の神経細胞死のメカニズムは、孤発性 ALS とは異なると考えられる。

#### E. 結論

ALS 脊髄運動ニューロンでは、神経細胞死と深く関連している GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が疾患特異的、部位選択的に有意に低下していることを初めて明らかにした。この分子変化を正常化する方向での特異的治療法開発が期待される。

F. 健康危険情報：なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, Jeong S-Y, Kanazawa I: Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: An implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 85:680-689, 2003
2. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Kanazawa I, Kwak S: Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain. *Eur J Neurosci* 18:23-33, 2003.
3. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Ito M, Kanazawa I, Kwak S: Regulation of glutamate receptor RNA editing and ADAR mRNA expression in developing human normal and Down's syndrome brains. *Dev Brain Res* 148: 151-155, 2004.

4. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S: RNA editing and death of motor neurons in ALS. *Nature* in press 2004
  5. 鈴木岳之、都筑馨介、亀山仁彦、郭 伸: AMPA 受容体の生理機能-受容体機能発現から疾患まで-, *日薬理誌* 122: 515-526、2003
  6. 河原行郎、郭 伸: RNA 編集異常の医学的意味、*Clinical Neuroscience* 印刷中、2004
2. 学会発表
1. Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, Kanazawa I: Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain, the Gordon Research Conference on RNA EDITING, Ventura, California, 2003 年 1 月.
  2. 郭 伸、河原行郎、伊藤杏子、孫慧、橋田秀司、鄭善容、相澤仁志、金澤一郎: 筋萎縮性側索硬化症における AMPA 受容体分子異常の病因的意味、シンポジウム 47 「AMPA 受容体研究の最前線-受容体機能発現から疾患まで-」、第 76 回薬理学会・第 80 回生理学会、福岡、2003 年 3 月.
  3. 郭 伸: 運動ニューロン病の発症機序、シンポジウム「神経疾患の解明」、第 26 回日本医学会総会、福岡、2003 年 4 月.
  4. 河原行郎、郭 伸、孫慧、橋田秀司、伊藤杏子、相澤仁志、金澤一郎: AMPA 受容体発現パターンから見たヒト脊髄運動ニューロンの特異性、第 44 回日本神経学会総会、横浜、May、2003
  5. 孫慧、河原行郎、伊藤杏子、金澤一郎、郭 伸: AMPA 受容体サブユニット mRNA からみた脊髄運動ニューロンの特異性、第 44 回日本神経学会総会、横浜、2003 年 5 月.
  6. Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Kanazawa I: Deficient GluR2 editing but not expression causes neuronal death of spinal motoneurons in ALS. 15<sup>th</sup> International Congress of Neuropathology, Turin, 2003 年 9 月.
  7. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Kanazawa I, Kwak S: Low Editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain. 33rd Annual Meeting Society for Neuroscience, New Orleans, 2003 年 11 月. *Abstr Neurosci* 360.14, 2003.
  8. Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Kanazawa I: A low relative abundance of an RNA editing enzyme ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain: An implication for the mechanism of reduced RNA editing in ALS. The 14<sup>th</sup> International Symposium on MND/ALS, Milan, 2003 年 11 月. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders* 4 (suppl 1) 81-82, 2003.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得: なし
  2. 実用新案登録: なし
  3. その他: なし

研究協力者

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

吉良幸美 井上正康

**研究要旨** FALS 変異 SOD は活性酸素産生の主座であるミトコンドリア及びペルオキシソーム膜への親和性が低下し、これによりミトコンドリア局所での酸化障害が引き起こされこれが FALS の病態発症要因になることを検証してきた。また、ALS の病因にもミトコンドリア障害が関与する可能性を検討するため患者脊髄のミトコンドリア DNA 変異を解析した。ミトコンドリア膜保護作用を有するカルニチンが本病態マウスの神経・筋機能を保護し、筋細胞のアポトーシスを抑制し、寿命延長効果があることを見出したが、本薬剤が ALS 治療にも有用であるかを病態発症後のモデルマウスに投与し検討した。

研究協力者：井上正康 大阪市立大学大学院  
医学研究科分子病態学講座教授  
共同研究者：吉良幸美 大阪市立大学大学院  
医学部共同研究室

シスでは、長鎖脂肪酸が重要であることを解明し、FALS にも長鎖脂肪酸毒性が関与している可能性が示唆された。本年度はさらに ALS 病態発症におけるミトコンドリア障害の関与、及び治療法を検討した。

**A. 研究目的**

FALS の発症に Cu,Zn-SOD (SOD1)の点突然変異が関与することが判明したが、その病態発症の分子機構及びその治療法は確立されていない。我々はこれまで SOD1 の細胞内局在と酸化障害の関係に注目し正常 SOD1 がミトコンドリアやペルオキシソームなどに濃縮局在していること、および変異 SOD では両膜への結合性が低下していることを明らかにした。本疾患は他の臓器に比較してミトコンドリア依存性の高い神経や骨格筋が特異的なターゲットとなることから、FALS ではミトコンドリア局所での活性酸素病態が増強し、アポトーシスを誘起する可能性を示唆した。さらに、ミトコンドリア依存性アポトー

**B. 研究方法**

1. G93A-SOD1 トランスジェニックマウス (FALS Tg)の脊髄及び筋より DNA を抽出し、ミトコンドリア遺伝子を PCR により増幅後 Direct sequence を行いミトコンドリア DNA (mtDNA)の変異を解析した。
2. ALS 患者及び疾患 Control の脊髄サンプルに関しても同法により mtDNA の変異を解析した。
3. FALS Tg の病態発症後よりカルニチン(30 mg/kg) を 3 日おきに皮下投与し、運動能力の変化及び寿命に対する作用を検討した。動物の扱いに関しては、本学動物実験規定に従った。

## C. 研究結果

### (1) FALS Tg mtDNA の変異解析

Normal 及び FALS Tg (発症後末期) の脊髄および筋より DNA を抽出し、PCR-direct Sequence 法により mtDNA の変異を解析した結果、FALS Tg は Control に比較し多くの mtDNA 変異が加速しており特徴的な変異部位が見られた。

### (2) ALS 患者の mtDNA 変異解析

ALS 患者脊髄における mtDNA 変異は疾患コントロールに比較し増加傾向にあり、ALS 群に共通の変異も多く見られた。

### (3) 病態発症後のカルニチン治療効果

G93A FALS Tg 発症後にカルニチンを皮下投与し病態進行及び寿命に対するカルニチンの効果を検討した結果、投与群では全身状態もよく約 2 週間前後の延命効果が認められた。

## D, E. 考察及び結論

現在までに FALS 患者で見られた変異部位は SOD 分子の立体構造に影響する特性が強く、変異 SOD1 の多くは分子構造特性が変化していることが示唆される。SOD による  $O_2^-$  の細胞内消去反応は拡散律速で起こらなければならない。したがって、SOD1 が活性酸素産生の主座であるミトコンドリアやペルオキシゾーム膜表面に結合局在化していることは極めて重要である。これにより、両オルガネラから細胞質側にリークしてくる  $O_2^-$  をその膜表面で効率良く消去していると考えられる。FALS の変異 SOD1 のオルガネラへの結合能が低下していることより、変異 SOD1 の局在性変化が細胞内  $O_2^-$  の消去不全を誘起し、活性酸素傷害が蓄積しうる可能性が示唆された。実際、FALS モデルマウスのミトコンドリアからはコントロールに比較し多量の

$O_2^-$  が産生されており mtDNA の変異も加速していた。

さらに ALS 患者脊髄においても mtDNA 変異が加速していることが明らかとなり ALS においてもミトコンドリア障害が病態発症と密接な関わりを持つことが示唆された。これまで神経細胞のミトコンドリア依存性アポトーシスを抑制するカルニチンをモデルマウスに経口投与する予防治療実験でその臨床病態が著明に軽減することを明らかにしてきたが、この治療効果が病態発症後でも有効であるかを検討するため FALS Tg 病態発症後にカルニチンを皮下投与しその効果を検討した結果、病態発症後においても病態進行遅延及び寿命延長効果が認められた。本所見は、家族性および ALS の治療法としてカルニチンが有効であり、カルニチンのようなミトコンドリア保護剤を用いた治療法を試みる意義があることを示唆する。今後、この点に注目し、病態動物モデルおよび患者におけるさらなる病態治療法を開発したい。

## F. 健康危機情報：特記すべきことなし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kira Y, Sato E et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 399 : 96-102, 2002.
2. Chang B J, Nishikawa M et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 405 : 55-64, 2002.
3. Nishikawa M, Nshiguchi S et al., *Cancer Research.* 61: 1843-1845, 2001.
4. Inoue M, Sato E et al., *Free Rad. Res.* 33: 757-770, 2001.
5. Nishikimi A, Kira Y et al, *Biochem J.* 356: 621-626, 2001.

筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関する新規治療法の開発に関する研究班 研究報告  
「発現調節 AAV ベクターを使用した神経疾患の遺伝子治療」

研究協力者：中野今治 自治医科大学神経内科教授

研究要旨： ALS の遺伝子治療として骨格筋への GDNF 遺伝子導入を行った場合に GDNF の過剰産生を防ぐ安全機構として、誘導型 Cre/loxP system を応用した AAV ベクター(AAV-CreERT2)を開発した。このベクターによる発現調節は、培養細胞だけでなくマーカー遺伝子を発現するトランスジェニックラットを使用した実験でも有効であることを確認した。

共同研究者

自治医科大学神経内科：村松慎一、李小剛、

奈良優子、池口邦彦、

同 遺伝子治療：岡田尚巳、小澤敬也

同 臓器置換：袴田陽二、小林英司

同 生化学；遠藤仁司

東京工業大学生命理工学部：一瀬宏

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する遺伝子治療として、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを利用して骨格筋に神経栄養因子 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)の遺伝子を導入し、軸策を通して運ばれた GDNF により脊髄の運動神経細胞の脱落を抑制する方法を開発してきた。従来、ウイルスベクターによる遺伝子治療では、治療用遺伝子をいかに効率よく目的の細胞に導入し、長期間の発現を得るかということが大きな目標となっていたが、AAV を使用することにより、少なくとも神経細胞や筋肉に関する限り問題なくこの技術的な課題を克服できるようになってきている。そこで、臨床応用を視野に入れた次の目標としては、遺伝子発現を調整する機構の開発である。本研究では、これまで遺伝子改変マウスの作製用に使用されてきた誘導型 Cre/loxP system を応用した遺伝子発現を

調整可能な AAV を開発することを目的とする。

B. 研究方法

Cre recombinase とエストロゲン受容体の変異型リガンド結合部位との融合蛋白を発現する AAV ベクター (AAV-CreERT2、CreERT2 は IBGMC の Pierre Chambon 教授より供与された)、Cre recombinase を発現する AAV ベクター (AAV-Cre)、LacZ を発現する AAV ベクター (AAV-LacZ)を作製した。また、緑色蛍光蛋白質 EGFP の cDNA を loxP site の間に挟み、IRES 下流に赤色蛍光蛋白質 DsRed2 の cDNA を組み込んだ AAV ベクター(AAV-floxed EGFP-IRES-DsRed2)を作製した。これらの AAV ベクターを種々の組み合わせで 293 細胞に感染させ、蛍光蛋白質の発現を指標に tamoxifen により遺伝子発現が調整可能かどうか検討した。さらに、DsRed2 の cDNA を loxP site の間に挟み、IRES 下流に EGFP の cDNA を組み込んだトランスジェニックラットの下肢の骨格筋に AAV-CreERT2( $1 \times 10^8$  genome copies)を注入し、tamoxifen により EGFP の発現が得られるかどうか検討した。

C. 研究結果

293 細胞に、AAV-floxed EGFP-IRES-

DsRed2 と AAV-CreERT2 を感染させると、EGFP の緑色蛍光を発する細胞が多数観察されたが、培地に tamoxifen を加えることにより緑色蛍光の代わりに DsRed2 の赤色蛍光を発する細胞が大多数を占めるようになった。AAV-floxed EGFP-IRES-DsRed2 と AAV-Cre を感染させた場合には、当初から大部分の細胞は赤色蛍光を発していた。AAV-CreERT2 を注入したトランスジェニックラットの腓腹筋では、tamoxifen を投与した個体においてのみ DsRed2 から EGFP への発現蛋白質の変換が認められた。

#### D. 考察

遺伝子治療の臨床応用に際して、導入した遺伝子の発現調節が重要な課題となってきた。これまでに、Tet on/off system、Rapamycin system などが開発されている。これらの方法では、遺伝子発現の増強あるいは減弱を得るために tetracycline あるいは Rapamycin といった誘導物質を服用し続ける必要があり、実用的とは言い難い。ALS に対する骨格筋への GDNF 遺伝子導入では、これまでのマウスの実験においては GDNF の過剰産生による副作用は認められていないが、今後臨床試験を視野に入れた場合、万一過剰となった際に確実に遺伝子発現を抑制できる安全機構を組み入れる必要がある。GDNF 遺伝子の両端に loxP site を導入しておき、後から Cre recombinase を発現するベクターを再投与する方法も考えられるが、その際 AAV ベクターを使用した場合、今度は Cre recombinase 自体が持続的に発現することになる。その点、CreERT2 は、エストロゲンの誘導体である tamoxifen の存在下のみ Cre recombinase の活性を示すので、より安全性が高い。今回の実験結果から、AAV ベクターに CreERT2 を搭載することにより、過剰発

現を防ぐ遺伝子治療用ベクターとして利用できることが明らかとなった。

#### E. 結論

誘導型 Cre/loxP system を応用した AAV ベクター(AAV-CreERT2)による発現調節は、GDNF のみならず多くの治療用遺伝子の発現抑制機構として有用と考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Lu YY, Wang LJ, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, and Nakano I. Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci Res*, 45: 33-40, 2003
- 2) Nagata M, Takahashi M, Muramatsu S, Ueda Y, Hanazono Y, Takeuchi K, Okada K, Suzuki Y, Kondo Y, Suemori M, Ikeda U, Nakano I, Kobayashi E, Hasegawa M, Ozawa K, Nakatsuji N, and Shimada K. Efficient gene transfer of a simian immunodeficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. *J Gene Med*, 5: 921-928, 2003
- 3) Muramatsu S, Wang LJ, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Nakano I, and Ozawa K: Adeno-associated Viral Vectors for Parkinson's disease in Viral Vectors for Treating Diseases of The Nervous System. In *International Review of Neurobiology*, Latchman DS (Ed.), pp205-222, London,

Academic Press, 2003

浜, 2003年5月15-17日. (抄録 P.256)

- 4) 村松慎一: パーキンソン病に対する遺伝子治療. ゲノム医学. 3(4): 403-408, 2003.
- 5) 村松慎一: パーキンソン病と類縁疾患-遺伝子治療の現状と展望. 日本内科学会誌, 92: 1461-1466. 2003
- 6) 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療. ゲノム医学, 3: 403-408, 2003
- 7) 村松慎一, 王立軍, 池口邦彦, 藤本健一, 永田三保子, 中野今治, 小澤敬也: アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによるパーキンソン病モデル動物の遺伝子治療. 日本炎症・再生医学会雑誌, 23: 218-222, 2003
- 8) 村松慎一, 池口邦彦, 藤本健一, 中野今治, 小澤敬也: AAV-AADC によるパーキンソン病モデルサルへの遺伝子治療. Progress in Medicine, 23: 2784-2787, 2003

## 2.学会発表

- 1) 村松慎一, 永田三保子, 池口邦彦, 藤本健一, 中野今治, 中山孝, 井上順雄, 鈴木豊, 近藤靖, 小野文子, 寺尾恵治, 垣内岳春, 西山新吾, 原田典弘, 塚田秀夫: パーキンソン病モデルサルへのES細胞由来神経幹細胞の移植. 第44回日本神経学会総会, 横浜, 2003年5月15-17日. (抄録 P.223)
- 2) 奈良優子, 村松慎一, 永田三保子, 滝野直美, 嶋崎久仁子, 山門誠, 中野今治: ES細胞由来神経幹細胞のマウス新生仔脳への移植. 第44回日本神経学会総会, 横浜, 2003年5月15-17日. (抄録 P.242)
- 3) 江隅英作, 小島進, 池口邦彦, 森田光哉, 中野今治: 筋萎縮性側索硬化症(ALS)におけるアポトーシス関連蛋白Caspase-3の発現解析. 第44回日本神経学会総会, 横



厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

研究報告書

マウス脊髄の組織培養法とその応用

研究協力者 佐古田三郎

大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座（神経内科学）教授

研究要旨

生後マウス脊髄の組織培養法を確立した。さらにマウス脊髄の組織培養において、前角神経細胞死抑制効果を認めた Drug A が筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS)モデルマウスにおいても有効であったことから、マウス脊髄の組織培養の有用性が明らかになった。マウスにおいて確立されたことにより、今後、遺伝子改変動物への応用が期待される。特に ALS モデルマウスの脊髄を培養することにより、グルタミン酸毒性説に立脚しない、真の家族性 ALS モデルを作製できる可能性がある。また、神経細胞特異的に発現する GFP マウスの脊髄を使うことにより、ALS の薬剤スクリーニングを短期かつ有効におこなうことができると考えられる。

A. 研究目的

ALS の新規治療薬の開発は、一般に（１）薬剤スクリーニング（２）モデルマウスでの効果判定（３）臨床試験・治験の過程を経るが、数年以上の年月のかかる問題点がある。最近では、欧米においては、（２）の過程を省略し、（１）→（３）とすることで、早期に治療薬を開発しようとする試みがみられるが、Topiramate のように（１）で有効とされた薬剤が、（３）ヒトでは、効果が示されない例が報告されている。したがって、（１）薬剤スクリーニ

ングでは、いかにヒトに直結できるような、有効な手法を確立できるかが重要となる。現在の ALS の治療薬の開発の問題点の１つは、原因仮説の１つであるグルタミン酸毒性モデルに対し有効である薬剤が検討されていることである。我々は、ALS の病態を体現したモデルを作製し、薬剤を短期にスクリーニングするシステムを構築することを目的として、マウスの脊髄組織培養法を検討した。

B. 研究方法

ラットの脊髄の培養では、通常生後

8日の脊髄が使用される。マウスにおける培養条件を決めるために、生後2、4、8日のマウス脊髄の腰髄膨大部3mmを摘出し、tissue chopperにて厚さ350 $\mu$ mに切断した。6ウェルディッシュに培地(25%ウマ血清、25% Hanks' balanced salt solution、50% EMEM、グルコース6g/L、ペニシリン-ストレプトマイシン)を加え、Millicell-CM膜(Millipore)を装着し、インキュベータ内(37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub>5%)に準備しておき、膜1つあたり、5個の切片を培養した。週2回半量の培地交換を行った。培養脊髄を、抗脱リン酸型ニューロフィラメント抗体(SMI-32)にて染色し、前角領域にある大型の細胞で長径15あるいは25 $\mu$ m以上で長い突起を有する細胞をカウントした。

培養脊髄組織の前角神経細胞死の誘導実験では、培養開始後14日めにグルタミン酸取込み阻害剤である、L-transpyrrolidine 2,4-dicarboxylic acid (PDC)を100 $\mu$ M添加し、添加後6日および10日めにSMI-32で染色し評価した。またこの系を使い、市販薬であるDrug Aを培養開始後7日めに添加し、前角神経細胞死の抑制効果を検討した。

さらにDrug Aの雄性G93A ALSモデルマウス(TgN(SOD1-

G93A)1Gurdl)投与実験を行った。投与群9匹、非投与群8匹で、生後45日めから、Drug Aを純水に溶解投与した。後肢の麻痺が出現した時点 onset、重度の四肢麻痺にて摂食飲水が困難になった時点 endpointと定義し、non-parametric testの1つであるKolmogorov-Smirnov testにて統計学的に評価した。

#### (倫理面への配慮)

ネンプタール処置による深麻酔により、実験動物の苦痛は最小限におさえられた。動物実験に関しては、大阪大学医学部医学科動物実験委員会より計画を承認されている。

### C. 研究結果

生後2、4、8日のマウス脊髄培養の比較では、開始4週間後で染色した結果において、生後2日めで採取した脊髄培養が、最も脊髄前角後角の形態が保持され、再現よく前角運動神経細胞が観察された。以降、マウス脊髄培養では、生後2日の脊髄を使用した。

PDCによる前角神経細胞死の誘導実験では、添加後6日では変化がみられなかったが、10日めでは、後角神経細胞は維持されているのに対して、前角神経細胞は、統計学的に有意に細胞数の減少が観察された。

この系において、Drug A は、 $0.1\mu\text{M}$  では効果が見られなかったが、 $1.0\mu\text{M}$  および  $10\mu\text{M}$  においてグルタミン酸毒性による前角細胞死を有意に抑制した。

Drug A の ALS モデルマウス投与実験では、onset は変化せず、統計学的に有意な罹病期間の延長（非投与群 18.0 日、投与群 55.0 日）がみられた。

#### D. 考察

マウス脊髄の組織培養において、前角神経細胞死抑制効果を認めた Drug A が ALS モデルマウスにおいても有効であったことから、マウス脊髄の組織培養の有用性が明らかになった。マウスにおいて確立されたことにより、今後遺伝子改変動物への応用が期待される。とくに ALS モデルマウスの脊髄を使用することで、グルタミン酸毒性説に立脚しない、真の家族性 ALS モデルを作製できる可能性がある。また神経細胞特異的 GFP 発現マウスを使うことで、免疫染色することなく、個々の神経細胞の生死の経過を確実に追うことができると考えられる。またこの 2 種のマウスを交配することで、研究目的に挙げた (1) 薬剤スクリーニングの過程をより短期間にかつ有効に行うことが期待される。

このマウス脊髄の組織培養確立の過程で、*in vitro* と ALS モデルマウスを使った *in vivo* の系において有効性が示された Drug A は、罹病期間を延長したという点で、意義は大きい。ALS 患者は発症後来院されるので、onset が延長され罹病期間が変化のない薬剤より、onset に改善がみられなくとも罹病期間の延長がみられる薬剤の方が、効果が期待できると考えられる。この意味では、現在 ALS の唯一の薬剤であるリルゾールとともに、今後期待できる薬剤と考えられる。また ALS に限らず、他の神経変性疾患への応用も今後検討されるべき課題である。

#### E. 結論

マウス脊髄の組織培養法を確立した。今後、ALS モデルマウスおよび神経細胞特異的に発現する GFP マウスの脊髄を培養することにより、グルタミン酸毒性説に立脚せず、ALS の薬剤スクリーニングを短期かつ有効におこなうことができると考えられる。さらにマウス脊髄の組織培養および ALS モデルマウス投与において、効果を認めた Drug A は、マウスの罹病期間を延長したことから、ヒトへの応用が期待される。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

**1. 論文発表**

山本洋一 須貝文宣 佐古田三郎  
マウス脊髄のスライスカルチャー  
とその応用 脳 2 1 金芳堂  
6:196-199, 2003

**2. 学会発表**

須貝文宣 山本洋一 宮口勝行 佐  
古田三郎 生後マウス脊髄組織培養  
法を用いた神経保護効果を有する薬  
剤のスクリーニング 第44回日本  
神経学会総会、横浜、2003年5月

Fuminobu Sugai, Yoichi Yamamoto,  
Katsuyuki Miyaguchi, Saburo Sakoda In  
vitro model of ALS using mouse spinal  
cord. 14<sup>th</sup> International Symposium on  
ALS/MND, Milan, 2003年11月

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

**1. 特許取得**

準備中

**2. 実用新案登録**

なし