

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

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

研究協力者 山形大学医学部第三内科 任 長虹 和田 学 加藤 丈夫

研究要旨 Galectin-1 は ALS の脊髄前角に認められる腫大軸索に蓄積し、その形成に関与していると考えられる。酸化型 galectin-1 は末梢神経において再生促進作用を有することが明らかにされているが、ALS 脊髄前角における神経保護作用を有するか未だ不明である。今回、変異 SOD1 トランスジェニックマウス(H46R SOD1 Tg mice)に対し、galectin-1 を筋肉内投与し、その発症時期、生存・罹病期間、運動機能及び脊髄前角の残存神経細胞数を galectin-1 未投与群と比較検討した。その結果、酸化型 galectin-1 投与群では、発症時期の遅延、生存・罹病期間の延長、運動機能の改善が認められ、また、病理学的に脊髄前角の大型神経細胞がより多く残存していた。酸化型 galectin-1 は、H46R SOD1 Tg mice の脊髄前角大型神経細胞に対し神経保護作用を有することが示唆された。

A 研究目的

変異 SOD1 トランスジェニックマウス(H46R SOD1 Tg mice) に対し、酸化型 galectin-1 投与し、その治療効果を検討する。

B 研究方法

変異 SOD1 トランスジェニックマウス(H46R SOD1 Tg mice、東北大学神経内科系山泰人教授より提供)に対して、酸化型 recombinant human galectin-1 (rhGAL-1/ox)(0.25 µg/body weight(g))及び生理食塩水を投与し、この2群間において、運動障害の発症時期、生存期間及び罹病期間を比較検討した(各群 n=14)。また、マウスの運動機能は Rotarod (室町工業)を用い、7日ごとに評価し、2群間で比較検討した。投与は左側腓腹筋に生後10週から開始し、7日おきに投与を継続した。また、これとは別に、脊髄前角大型神経細胞の病理学的検討を目的とし、生後21週(発症期)のマウスを

還流固定し、その腓腹筋支配髄節の腰髄(L₄₋₅)パラフィン連続切片を作成した。Nissl染色を施行後、脊髄前角において長径20µm以上の残存大型神経細胞数をカウントし、2群間で比較検討した。

(倫理面への配慮)

本実験は、山形大学医学部動物実験施設の指針に従って行った。

C. 研究結果

酸化型 galectin-1 投与群は、生理食塩水投与群と比較し、その発症時期が延長していた(Log-rank; $p=0.0156$) (Fig. 1A)。また、生存期間および罹病期間の生存解析において、galectin-1 投与群は生理食塩水投与群に比し、有意に延長を示した(Log-rank; $p<0.0001$) (Fig1B&C)。運動機能については galectin-1 投与群が生理食塩水投与群に比し、20 rpm において運動機能の低下は抑制されていた(ANOVA; $p=0.038$) (Fig. 2)。また、腰髄前

角の大型神経細胞数は生理食塩水投与群に比し、galactin-1投与群においてより多く残存していたが(Student's *t*; $p=0.044$) (Fig. 3A)、残存神経細胞数の左右差は認められなかった (Fig. 3B)。

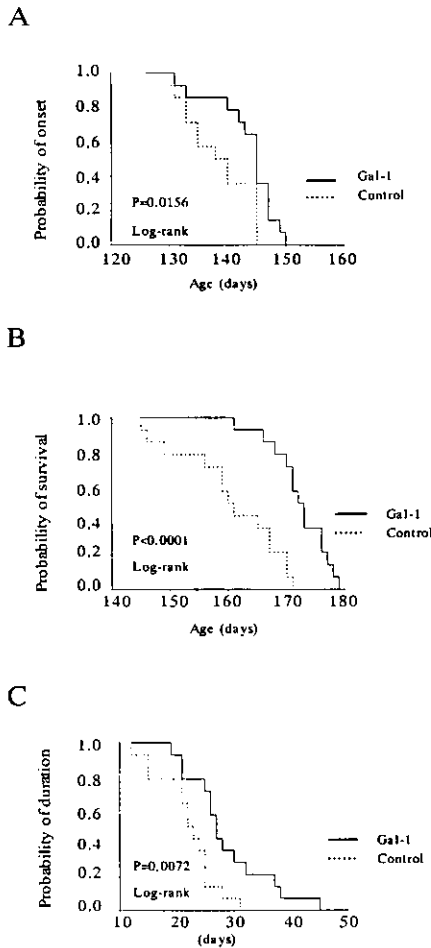


Fig. 1. *rhGAL-1/ox* delayed the disease onset and prolonged the survival of Tg mice (mutant H46R SOD1)

The Kaplan-Meier curves demonstrate the probability of onset of Rotarod deficit (A), length of survival (B), and duration of illness (C) in Tg mice (mutant H46R SOD1). The onset of the Rotarod deficit was more delayed in the gal-1-treated group than it was in the control group ($P=0.0156$) (A). The life span was significantly more prolonged in the gal-1-treated group than in the control group ($P<0.0001$) (B). The duration of illness was significantly more prolonged in the gal-1 treated group than in the control groups

($P=0.0072$) (C). Control group, $n=14$; gal-1- treated group, $n=14$.

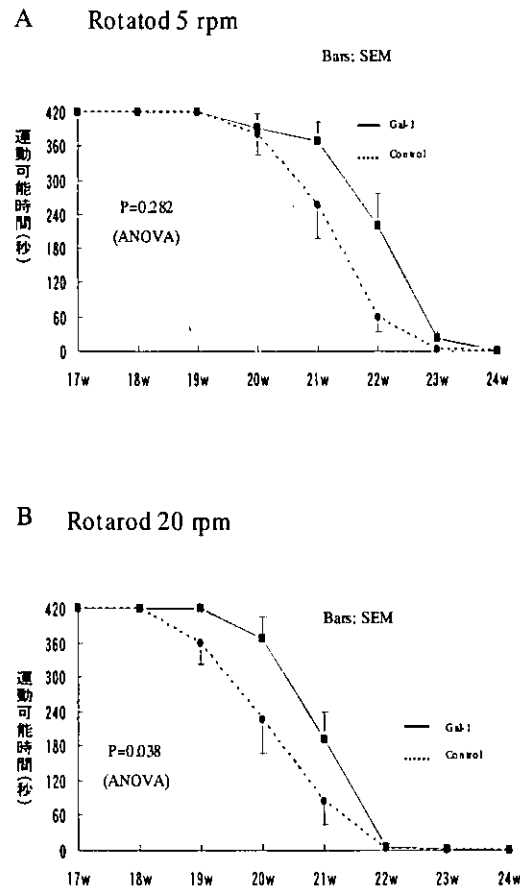
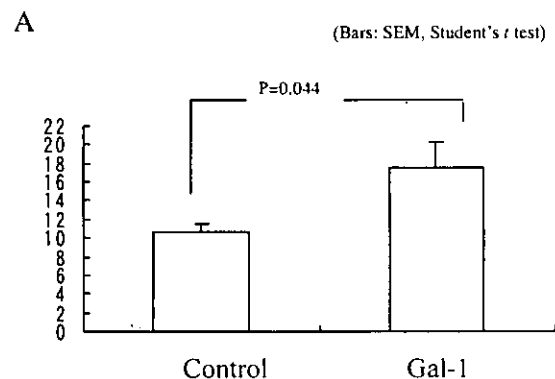


Fig. 2. Motor function of Tg mice (mutant H46R SOD1) tested with the Rotarod

For the 5 rpm task (A), there was no significant difference between the two groups. However, the assessment with the Rotarod task at 20 rpm was much more improved in the gal-1-treated group than in the control group ($P=0.038$) (B). Control group, $n=9$; gal-1-treated group, $n=10$.



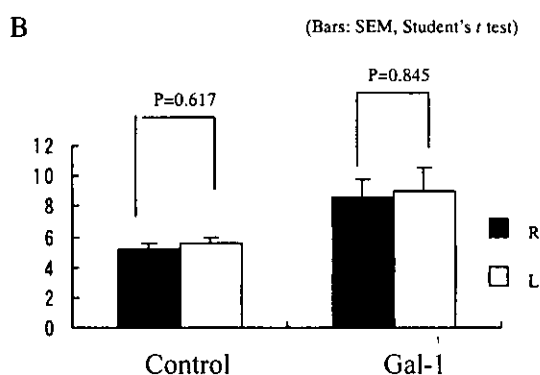


Fig. 3. Quantification of the remaining anterior horn neurons in the anterior horns of the lumbar cord (L_{4,5})

The total number of anterior horn neurons in the anterior horns was significantly more preserved in the mice of the gal-1 treated group than in those of the control group ($P=0.044$) (A). There was no significant difference ($P=0.845$) in the number of anterior horn neurons between the left and right sides of the spinal cord (B).

D. 考察

酸化型 galectin-1 による神経細胞保護作用のメカニズム (仮説)

酸化型 galectin-1 が脊髄運動ニューロンに作用する機序は二つの可能性がある。一つは galectin-1 が直接運動ニューロンに作用する可能性 (直接作用)、もう一つは他の神経栄養因子を介して作用する可能性である (間接作用)。直接作用としては、軸索輸送 (逆行性) により、胞体に運ばれ神経栄養因子として作用する可能性が考えられるが galectin-1 が神経細胞に直接作用し、神経再生を促進させたとする報告はない。一方、galectin-1 は末梢神経のシュワン細胞に作用し、神経再生を促すことが報告されている。また、マクロファージの存在下に galectin-1 を投与することで末梢神経再生が促進されることなどから、シュワン細胞やマクロファージを介し他の神経栄養因子が分泌され、神経再生が促進されるものと考えられている。しかし、galectin-1 の存在下にこれらシュワン細胞あるいはマクロファージを介し分泌される液

性因子は現在まで同定されておらず、今後の研究課題とされている。

H46R SOD1 Tg mice に対し rhGAL-1/ox を投与した今回の研究において、脊髄前角残存神経細胞数の左右差が認められないことから、galectin-1 の作用は軸索輸送を介した直接作用ではなく、筋注した galectin-1 が循環系を介して脊髄全体に作用した可能性が考えられた。

ヒト ALS の神経変性に対する酸化型 galectin-1 による治療効果の可能性

SOD1 トランスジェニックマウスにより、種々の薬剤による運動神経保護作用の検討が可能となった。今回検討した galectin-1 と同様に「発症の遅延」と「生存の延長」の両者を兼ね備えた薬剤は、現在まで carboxyfullerenes、d-penicillamine、zVAD-fmk、minocycline が報告されている。近年はアデノウイルスベクターを用いた GDNF や IGF 1 による治療効果も報告され、これらの臨床応用が検討されている。これらの薬剤および神経栄養因子と同様に、galectin-1 は H46R SOD1 Tg mice の発症遅延、生存期間の延長、運動機能の改善作用を有し、病理学的に脊髄前角における神経細胞変性を抑制する作用が示唆され、ヒト ALS に対して有効である可能性が考えられた。

E. 結論

酸化型 galectin-1 は H46R 変異 SOD1 トランスジェニックマウスに対して神経保護作用を有し、ヒト ALS に対して治療効果の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Wada M, Ono S, Kadoya T, Kawanami T, Kurita K, Kato T. Decreased galectin-1 immunoreactivity of the skin in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci.

2003 15; 208: 67-70

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.* 2003; 303: 496-503.

H 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：「ガレクチン-1 を有効成分として含有する筋萎縮性側索硬化症治療剤」

出願番号：特願 2003-433967

出願日：2003 年 12 月 26 日（申請中）

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究報告書

ALS モデルマウスを用いたプロテオーム解析による薬剤の作用評価の試み

研究協力者 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

研究要旨：筋萎縮性側索硬化症(ALS)をはじめとする神経変性疾患の発症機序の一つとして、異常タンパク質の蓄積などが明らかにされており、神経組織における網羅的なタンパク質解析が重要と考えられる。我々は ALS 研究の標準的な動物モデルである SOD1(G93A)Tg マウスを用い、その神経組織の可溶性分画・難溶性分画での二次元電気泳動によるプロテオーム解析およびタンパク質のリン酸化のプロファイル解析を行った。これらは、各種神経保護作用を持つ薬剤の疾患モデルマウスを用いたスクリーニングのための、有用なデータとなりうると考える。

共同研究者：川又純¹，山下博史²，藤澤 仁³
1 京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構，2 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，3 滋賀県立成人病センター研究所

A. 研究目的

ALS 研究の標準的な動物モデルである SOD1(G93A)Tg マウスでの神経組織におけるプロテオームの経時的な変動の検討を行い、運動神経変性に伴い変化するタンパク質群を同定する。これらの情報と、すでに延命効果など神経保護作用が認められている薬剤投与によるプロテオームの変動を比較検討し、運動神経保護作用に関連するタンパク質群の同定を試み、薬剤の作用機序の解明を目指す。

B. 研究方法

The Jackson Laboratory より購入した B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur (high copy) を用いた。Tg マウスおよびその野生型マウス

の1ヶ月齢、2ヶ月齢、および4ヶ月齢の神経組織を用い、可溶性分画および不溶性ペレットをギ酸処理により可溶化した難溶性分画の2分画について2次元電気泳動を行い、各スポットの発現量を各群で比較した。主要なスポットおよび変化を認めたスポットについてMALDI-TOF型質量分析にてタンパク質の同定を行った。抗リン酸化アミノ酸特異抗体（抗リン酸化アミノ酸セリン抗体、抗リン酸化スレオニン抗体）を用い、2次元電気泳動上の細胞骨格タンパクを中心としたリン酸化の検討を行った。さらに Tg マウスを対象にすでに延命効果が報告されている Minocycline (MINO) を投与し、プロテオームの変動を検討した。

（倫理面への配慮）

動物は NIH の動物実験の使用に関するガイドラインを遵守して扱われた。

C. 研究結果

Tg とコントロールマウスの比較で、大脳皮

質、小脳に比較して特に脊髄において多くのスポットのタンパク量の変動を認めた。これらの変化は1ヶ月齢に比し4ヶ月齢でより顕著であった。それらの一部についてはMALDI-TOF型質量分析を行いタンパク質の同定を行った。

4ヶ月齢Tgマウスにて上昇していた発現量の多いタンパクにはGFAP, Vimentin, α internexin, α enolase, Peroxiredoxin 5, HSP25kDa, HSP27kDaなどがあり、逆に減少していたものにはNF-L, Malate dehydrogenaseなどがあつた。

また、あわせて主に各細胞骨格タンパクについての特徴的なリン酸化パターンを検討した。抗リン酸化スレオニン抗体で認識されるパターンの変化では、Tgマウスにおいて、 γ actinが上昇、 β tubulin, NF-Lなどが減少していた。NF-Lの減少については、タンパク量の減少を反映したものと考えられた。

一ヶ月齢での大脳での難溶性分画ではTgマウスで相対的に14-3-3タンパクの一群、HSP70kDa, malate dehydrogenaseが上昇、その一方HSP60kDaの減少を認めた。Tgマウスを対象にしたMINO投与群では4ヶ月齢の脊髄可溶性分画でHSP27kDaがSham群に比して減少しており、難溶性分画ではmalate dehydrogenaseおよび未同定のスポットの上昇が認められた

D. 考察

報告されているDNAチップを用いた遺伝子発現パターンのプロファイリングの報告

(Olsen et al. 2001, Yoshihara et al. 2002)同様、グリア細胞で特異的に発現が認められるGFAPなど比較的大きなスポッ

トの変動は、脊髄でのグリオシスを反映したものだと考えられる。一方、神経細胞を反映するNF-Mでは変化が無くNF-Lでは減少、 α internexinでは逆に増加を示している。これはすでに報告(McGraw et al. 2002)されているように、運動神経への障害の際に、NF-Lでは発現が減少、 α internexinでは増加するという所見を反映している可能性が考えられる。

また、 α -enolaseの一部のスポットが上昇している一方、主要な α -enolaseのスポットは変動しておらず、それぞれがどのような修飾を受けたスポットであるかの検討が必要である。

その他にもPeroxiredoxin 5, HSP25kDa, HSP27kDaなども上昇傾向があり、まだ同定されていないスポットを含めて更なる解析が必要であると考えられた。

今回、抗リン酸化アミノ酸特異抗体を用いた解析を併用することでより詳細なプロテオーム解析が可能になることを示した。

延命効果が確認されているMINOの投与群では、可溶性分画で相対的なHSP27kDaの低下を認めた。変異SOD1と親和性の高いとされるHsp群(HSP25kDa, HSP27kDa, HSP70kDa)が発症に関与している仮説(Okado-Matsumoto, 2002)との関連からも興味深い。

E. 結論

ALSモデルマウスにおけるプロテオームの変動の解析を行った。ヒトの病理組織に比して、実験動物系では高い再現性で網羅的なタンパク質の検討が可能であった。可溶性分画、難溶性分画など易溶解度による各分画での検討を行った。ALS治療候補薬

物投与によるプロテオームの変動を解析することで、神経保護作用機序の解明への有効なアプローチとなりうる可能性を示した。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特に予定はない

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tsuji T, Shiozaki A, Kohno R, Yoshizato K, Shimohama S. Proteomic profiling and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2002 Oct;27(10):1245-53.

(2) Nakamizo T, Kawamata J, Yoshida K, Kawai Y, Kanki R, Sawada H, Kihara T, Yamashita H, Shibasaki H, Akaike A, Shimohama S. Phosphodiesterase inhibitors are neuroprotective to cultured spinal motor neurons. *J Neurosci Res.* 2003 Feb 15;71(4):485-95.

(3) Aiko Shiozaki, Teruyuki Tsuji, Ryuichi Kohno, Jun Kawamata, Kengo Uemura, Hiroshi Teraoka, Shun Shimohama
Proteome analysis of brain proteins in Alzheimer's disease: Subproteomics following sequentially extracted protein preparation. *J. Alzheimer's Disease* Vol.6, No.3, IN PRESS

2. 学会発表

(1) 川又 純, 中溝知樹, 河野隆一, 塩崎愛子, 辻 輝之, 下濱 俊, 柴崎 浩. SOD1 (G93A) トランスジェニックマウスの神経系プロテオーム解析 第44回日本神経学会総会 横浜 2003年5月

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

研究報告書

「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

研究協力者 宮武伸一 大阪医科大学、脳神経外科、助教授

研究要旨：塩基性繊維芽細胞増殖因子(FGF-2)発現アデノウイルスベクターを構築し、ベクター投与により、神経保護、神経再生について実験的治療を行った。砂ネズミ両側頸動脈遮断モデル作成3時間後に右側脳室より同ウイルスを感染させることにより、海馬における神経細胞死の抑制、海馬、脳室壁、皮質における神経再生を認めた。またラット中大脳動脈一時遮断モデル作成後、同ウイルスを側脳室内に投与することにより、梗塞巣の縮小、神経症状の改善を認めた。これらの研究結果を踏まえ、ALSの治療用ベクターとしてアデノウイルスベクターよりも神経親和性が高く細胞毒性の低い複製不能型遺伝子組み換え型単純ヘルペスウイルスベクターの構築を University College London との共同研究により開始した。この新しい複製不能型単純ヘルペスウイルスベクター（HSV-1）がラット座骨神経に直接投与すると脊髄神経細胞に安定して遺伝子を発現することを確認した上で、このベクターに FGF-2、HGF（肝細胞成長因子）および VEGF（血管内皮細胞成長因子）を載せた組み換えウイルスベクターの作成に着手し、既に HGF と VEGF のベクターは完成し FGF-2 のベクターについて検証中である。

骨髄間質系細胞が豊富な cytokine secretion により神経保護効果を示すことや、multipotent な progenitor cell を含み将来的には移植用 neural cell の source となり得る可能性があることに着目し、新規に開発した複製不能型 HSV-1 ベクターの骨髄由来細胞への遺伝子導入効率について検討を行った。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症をはじめとする神経変性疾患の主病態は神経細胞死であり、この病態を改善するため様々なアプローチが用いられている。われわれは神経栄養因子を脊髄前角細胞に選択的に発現させることにより、この病態を改善させることを目的として、研究を行っているが、まず、神経栄養因子の一つとして、FGF-2 に着目し、この分子の神経保護効果については昨年度に報告した。我々は新規の複製不能型単純 HSV-1 の作成を行な

い、FGF-2 以外に HGF および VEGF を導入した HSV-1 ベクターをそれぞれ作成した。これら新規ベクターは昨年度までの実験で使用したアデノウイルスベクターに比べ、目的遺伝子を強力かつより長期に発現させることが可能である。ALS に対して神経栄養因子の遺伝子治療が有効であることを、この新規開発ベクターを用いて明かにしたい。

B. 研究方法

まずヒト FGF-2 発現アデノウイルスベクターを構築し、以下の検討を齧歯類にて行った。

尚、使用した FGF-2 遺伝子は FGF-2 の cDNA の上流に IL-2(interleukin-2)の signal sequence を遺伝子組み換えにより付加したもので、これにより FGF-2 が分泌型蛋白として振る舞い細胞外分泌量が増えることを確認し、以下の研究では全てこの組み換え FGF-2 遺伝子を使用している。

1) 齧歯類脳虚血モデルにおける神経保護、神経再生効果、神経症状改善効果：砂ネズミ両側頸動脈を5分間結紮し、3時間後に右側脳室より同ウイルスベクターを投与し、海馬における神経保護効果、脳内各部位での神経再生を調べた。またラット右中大脳動脈閉塞し2時間後に再灌流させることにより一過性脳虚血モデルを作成し、再灌流時に右側脳室より同ベクターを投与。その後の神経症状の改善、脳梗塞巣の広がりを検討した。

2) 脊髄、脳室系への遺伝子の導入：immediate early gene である ICP34.5, ICP4, VP16 欠失させ、LAT promoter 制御下に LacZ gene 及び GFP gene を発現することにより長期に渡り強力な遺伝子発現を維持できる複製不能型単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクターを構築した。このベクターを座骨神経に直接投与することによる脊髄前角神経細胞での遺伝子の発現、脳室内投与による脳室壁での遺伝子の発現を調べた。

3) 骨髄間質系細胞への遺伝子の導入：骨髄間質系細胞は豊富な cytokines secretion により神経保護効果を示すことや、multipotent な progenitor cell を含み将来的には移植用 neural cell の source となり得る可能性があることがこれまでの研究から示唆されている。骨髄間質系細胞は ALS に対する細胞移植治療の targer になる可能性を考え、我々が開発した複製不能型 HSV-1 ベクターの骨髄由来

細胞への遺伝子導入効率について flow cytometer を用いて検討した。また骨髄細胞内において、この新規 HSV-1 ベクターが construct 通りに複製不能であるかどうかについても検証を行った。

C. 研究結果

1) ラット脳梗塞モデルにおける FGF-2 の治療効果の検討：砂ネズミ両側頸動脈結紮モデルにおいて、虚血作成3時間後に FGF-2 発現ウイルスベクターを脳室内投与することにより、海馬での遅発性神経細胞死は 50%程度に抑制され、water maze test の成績も改善した。また、海馬、脳室周囲のみならず、大脳皮質でも BrdU 陽性かつ NeuN 陽性の神経細胞の再生を認めた。この結果を踏まえ、ラット中大脳動脈一過性閉塞モデルを作成し、脳虚血における FGF-2 の神経症状の改善効果について NCSS を用いて評価した。前述の処置により、ウイルス治療群では運動機能、感覚障害、反射等の神経症状は改善し、また治療24時間後の脳梗塞巣の広がりも未治療群の半分にまで縮小できた。

2) 脊髄、脳室系への遺伝子の導入：前述の組み換え HSV-1 ベクターの座骨神経内投与により、腰部脊髄前角、後角の神経細胞に効率よく、マーカー遺伝子の発現を認めた。また脳室内投与を行ったところ脳室壁、脈絡叢にマーカー遺伝子の発現が認められた。

3) 骨髄間質系細胞への遺伝子の導入：骨髄由来細胞は遺伝子導入が難しいことで知られるが、HSV-1 ベクターは MOI 依存性に遺伝子導入効率が上昇し、MOI20 以上では 90%を超える遺伝子導入が可能であることを GFP を marker gene として flow cytometer で確認した。また感染させたウイルスベクターは感染

後、急激に減少してゆき、感染8時間後以降には一切検出されることはなく、骨髄由来細胞内では完全に複製不能型ウイルスとして振舞うことが示された。

D. 考察

以上の結果より、FGF-2 発現ウイルスベクターの投与により、生体の各部位で神経保護効果、神経再生効果が有ることが確認できた。砂ネズミ両側頸動脈結紮モデルにおける神経再生効果に関しては、大脳皮質においても神経再生を認めた。これが今までに定説となっている、海馬および脳室壁での神経幹細胞を活性化し、大脳皮質にまで遊走したものか、はたまた、大脳皮質自体に神経幹細胞が存在するのかまでは判明していない。また、ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける神経保護効果に関しては、梗塞巣の縮小のみで神経症状の改善がおこるのか、あるいはいわゆる penumbra の神経細胞死を抑制する神経保護効果のみによる改善か、それとも神経再生による症状の改善か今後の検討を要する。

また、組み換え HSV-1 により、末梢神経からの逆行性感染法により脊髄前角へ安定した遺伝子導入が可能なることも判明した。さらにこの HSV-1 は CD34+細胞にも高率に遺伝子導入が可能であり、特に骨髄間葉系細胞には high MOI で感染させると 95%以上の導入効率を示した。以上の結果より、FGF-2, HGF, VEGF を candidate gene とし、これら遺伝子を発現する組み換え HSV-1 ベクターの作成を行った。HGF および VEGF を導入したベクターは完成し、現在 FGF-2 のベクターを検証中である。今後これらの神経栄養因子遺伝子を載せた新規ベクターを用いて、ALS の治

療研究を行う予定である。

E. 結論

以上の結果より、FGF-2 発現ウイルスベクターの投与により、虚血脳組織での神経保護効果、神経再生効果が得られることを確認した。また新規複製不能型 HSV-1 ベクターで脊髄神経組織、脳室系組織および骨髄由来細胞に安定した遺伝子導入が可能であることを確かめ、FGF-2 と同様に神経栄養因子としての機能を有する HGF と VEGF の遺伝子を導入したベクターを作成した。今後、これらの3つの神経栄養因子による ALS の遺伝子治療について新規 HSV-1 ベクターを用いて実験を行う。

F. 健康危険情報

以上の研究は in vitro および実験動物を用いた研究であり、患者を用いた臨床研究ではない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Norihiro Matsuoka, Kazuhiko Nozaki, Yasushi Takagi, Masaki Nishimura, Shin-Ichi Miyatake, Nobuo Hashimoto. Adenovirus-mediated Gene Transfer of FGF-2 Promotes Neurogenesis after Forebrain Ischemia in Gerbils. Stroke 34(6):1519-25,2003.

Hiroyasu Yamashiro, Takashi Inamoto, Hironori Kato, Michio Yagi, Megumi Takeuchi, Shin-Ichi Miyatake, Yasuhiko Tabata, and Yoshio Yamaoka. Spontaneous Proliferation and Adipogenesis of Human Adipose Tissue-derived Vascular-stromal Cells Infected with Basic Fibroblast Growth Factor Gene. Tissue

厚生科学研究費補助金（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
研究報告書

筋萎縮性側索硬化症およびその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

研究協力者： 加藤信介 鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門 助教授

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症(ALS)では脊髄前角細胞死が生ずるが、残存細胞も存在する。ペルオキシレドキシシン(Prx)とグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)は、細胞内レドックスシステムを構築する基幹酵素であり、細胞の生存・維持には不可欠である。この Prx/GPx (レドックスシステム)に着目し、ALS 残存脊髄前角細胞の生存メカニズムを解析した。ほとんど全ての正常脊髄前角細胞が Prx/GPx (レドックスシステム)を発現していた。ALS ストレス下の残存脊髄前角細胞の一部に Prx/GPx の同時強発現が認められ、レドックスシステムの up-regulation を認めた。ALS の経過と共に両者を強発現する細胞数は激減し、大部分の残存神経細胞では、レドックスシステムの破綻を示した。ALS モデル動物における肝臓では、ALS 発症期間中に、肝細胞も変異 SOD1 細胞毒性に反応して、レドックスシステムの up-regulation を示したが、細胞死は生じなかった。即ち、細胞ストレスに対して、細胞の一部はレドックスシステムを up-regulate することで、自らを守って生存していた。一方レドックスシステムが破綻した細胞は、細胞死を迎えると考えられた。従って、レドックスシステムを維持あるいは過剰発現することで、運動ニューロン死が十分に抑制できる高い可能性が提示できた。

共同研究者：青木正志¹、糸山泰人¹、阿部靖子²、西野武士²、加藤雅子³、堀江 靖³、平野朝雄⁴、大浜栄作^{3,5}

¹東北大学大学院医学系研究科神経内科、²日本医科大学生化学第一教室、³鳥取大学医学部附属病院病理部、⁴Montefiore Medical Center 神経病理部門、⁵米国立鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門

封入体を形成しない変異 SOD1 を伴う前角細胞・肝細胞に加えて、変異 SOD1 を病因としない孤発性筋萎縮性側索硬化症(SALS)の前角細胞と肝細胞とを解析することによって、細胞死を起こす前角細胞と細胞死を起こさない肝細胞のレドックスシステムの動態を解明し、ALS の治療開発の手がかりとして、レドックスシステムの up-regulation が細胞死を防ぐ高い可能性があることについて報告する。

A. 研究目的

SOD1 遺伝子異常を伴った生体系においては、レドックスシステムを構築する基幹酵素であるペルオキシレドキシシン (Prx) とグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)が、aggregation toxicity を有する変異 SOD1 と co-aggregate し、変異 SOD1 細胞毒性に基づく細胞死を増強すると共に、細胞内 Prx/GPx (レドックスシステム)の減少をも惹起し、細胞内レドックスシステムが破綻することを昨年報告した。

SOD1 遺伝子異常を有する生体系、つまり変異 SOD1 を有する家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS)及び変異 SOD1 ALS モデル動物において、細胞内凝集物(封入体)を形成する前角細胞のみならず、封入体を形成せずに細胞死に至る前角細胞が存在することも事実である。レドックスシステムという視点に立ち、封入体を形成する変異 SOD1 を伴う前角細胞のみならず、

B. 研究方法

ヒト剖検症例として、発症後6ヶ月から11年5ヶ月のSALS 40 症例(男性19例、女性21例、年齢43歳から86歳)、SOD1 遺伝子異常を伴うFALSとしてJapanese Oki Family(コドン126の2塩基欠失)2症例(1年6ヶ月、11年)とAmerican C家系(A4V)3症例(7ヶ月、8ヶ月、1年)、対照として正常20症例(男性11例、女性9例、年齢33歳から75歳)を検索した。

ALS モデル動物として、ラットではH46R 及びG93A トランスジェニックラット(TgR)、マウスではG93A トランスジェニックマウス(TgM)の high copy 群と low copy 群を検索した。対照にはそれぞれの同胞を使用した。H46R TgR では、生後110日から終末期(200日)までの5時点(110日、135日、160日、170日、200日)、G93A TgR では生後70日から終末期(200

日)までの6時点(70日、90日、110日、130日、150日、200日)、G93A TgM low copy 群では、生後90日から終末期(215日)までの7時点(90日、100日、120日、135日、170日、185日、215日)、high copy 群では生後90日から終末期(125日)までの4時点(90日、100日、110日、125日)で検体採取を行い、実験に供した。

各組織材料からパラフィンブロックを作製し、ルーチン染色と免疫組織化学染色に供した。ルーチン染色はHE、Klüver-Barrera、Holzer、Gallyas-Braakの各染色法を施行した。免疫組織化学染色は一次抗体として、抗Prx1抗体、抗Prx2抗体、抗GPx1抗体、抗SOD1抗体を用い、ABC法との組み合わせで、DAB発色にて行った。

Western blot解析は、2症例のSALS(2年6ヶ月、11年5ヶ月)と正常脊髄の新鮮凍結組織を用いた。

C. 研究結果

1. SALSおよびFALSの脊髄病理組織学的解析・免疫組織化学的解析結果

ヒトSALSの脊髄前角の病理組織学的所見は、前角神経細胞数の減少とそれに伴うgliosisである。残存神経細胞は、変性、萎縮し、リポフスチン含有神経細胞が目立った。臨床経過の短い症例では、残存神経細胞の数は比較的保たれているが、経過が長くなるにつれて、その数は減少していた。但し、11年5ヶ月の極長期生存例においても、少数ながら残存神経細胞が認められた。SOD1遺伝子異常を伴うFALSの脊髄前角では、SALSの病理所見に加えて、封入体としてのレビー小体様硝子様封入体(Lewy body-like hyaline inclusion, LBHI)が一部の残存前角神経細胞に認められた。11年の極長期生存FALS例においても、残存神経細胞は極めて少数であるが、この少数の残存神経細胞の中にも、LBHIを有する細胞とLBHIを有しない細胞とが存在していた。

ヒト正常脊髄の免疫組織化学的解析では、ほとんど全ての前角細胞の胞体および樹状突起がびまん性にPrx2を発現し、核も一部で陽性所見を示した。GPx1染色でも、ほとんどの前角細胞の胞体および樹状突起がびまん性に染色され、核は染色性を示さなかった。

SALSの残存前角細胞の一部は、Prx2とGPx1との両者強陽性を示すものがあり、胞体から樹状突起にかけて染色された。多くの残存前角細胞は、Prx2とGPx1との両者を発現しなかった。

病恹期間が4年までのSALSの残存前角細胞の一部には、Prx2/GPx1の両者強陽性、即ち、レドックスシステムをup-regulationさせている残存前角細胞が認められた。特に、発症後2、3年のSALSにおいて、残存神経細胞の一部にレドックスのup-regulationを示す神経細胞が目立った。それ以後は、ALS経過と共に、レドックスシステムをup-regulationさせている残存前角細胞は激減した。一方、Prx2/GPx1を発現しない、レドックスシステムの破綻した残存神経細胞はALSの経過と共に増加した。

ヒトFALSでは、神経細胞内LBHIを認め、SOD1、Prx2、GPx1の三者に強陽性を示した。LBHIを有する神経細胞の胞体はPrx2/GPx1はほとんど染色されず、神経細胞自体のレドックスシステムは破綻していた。LBHIを持たない残存神経細胞のPrx2/GPx1の染色動態は、SALSの残存神経細胞と同じであった。

2. ALSモデル動物の脊髄病理組織学的解析・免疫組織化学的解析結果

ALSモデル動物であるTgR及びTgMの病理組織学的所見は、基本的には、ヒトFALSの脊髄所見と同様であり、発症後の脊髄では、前角細胞の変性萎縮と消失を示した。経過の長いもののほど、前角細胞の変性萎縮の程度は強く、細胞消失も高度であった。また、封入体としてLBHI形成も認められた。

正常コントロールの免疫組織化学的解析では、ヒトと同様に、ほとんど全ての神経細胞は、胞体から樹状突起にかけてびまん性にPrx2とGPx1を発現していた。一部の核もPrx2陽性所見を示した。

TgRおよびTgMにおけるALSモデル動物においても、神経細胞内LBHIを認め、SOD1、Prx2、GPx1の三者に強陽性を示した。LBHIを胞体内に形成している神経細胞の胞体は、Prx2/GPx1はほとんど発現していなかった。ALSモデル動物では、多くのLBHIは樹状突起内封入体として形成されるため、光顕的にはニューロピルにみられ、LBHIを胞体内に有している神経細胞は少なく、胞体内にLBHIを持たない神経細胞が多数認められた。発症時期のLBHIを持たない神経細胞の一部には、Prx2/GPx1の両者を同時強発現して、レドックスシステムをup-regulationしている神経細胞が認められた。しかし、多くの神経細胞は、Prx2/GPx1を発現せず、レドックスシステムに破綻を来していた。終末期では、SOD1/Prx2/GPx1三者強陽性を示す封入体を認めるものの、大部分の残存神経

細胞は、Prx2/GPx1 を発現せずレドックスシステムの破綻を認めた。

3. Western blot 解析結果

ヒト SALS の 2 症例の新鮮脊髄組織を用いた Western blot 解析では、2 年 6 ヶ月症例では、Prx2/GPx1 の両タンパクの発現量は正常対照例の脊髄と比較して、全体量には変化はみられなかった。この所見は、2 年 6 ヶ月 SALS では前角細胞が変性萎縮し、消失していることを考慮すれば、一部の残存前角細胞における Prx2/GPx1 (レドックスシステム) の up-regulation を証明している。しかし、11 年 5 ヶ月症例では正常対照例と比較して発現量の低下が認められた。

4. ALS および ALS モデル動物における肝臓病理組織学的解析・免疫組織化学的解析結果

TgR および TgM における ALS モデル動物での肝の病理組織学的解析では、ALS 全経過にわたって前角細胞でみられたような肝細胞死は認められなかった。

免疫組織化学的解析では、ラットとマウスのほとんど全ての肝細胞の細胞質は Prx1、Prx2、GPx1 陽性を示した。G93A TgR においては、生後 130 日の発症期間において、Prx1/Prx2/GPx1 の染色性の増強が最も目立ち、レドックスシステムの up-regulation を示した。G93A TgM においても、発症期間の肝細胞の細胞質の Prx1/Prx2/GPx1 の増強所見が認められ、レドックスシステムの up-regulation 機構の存在を認めた。High copy 群では生後 110 日目に、low copy 群では生後 185 日目において、このレドックスシステムの up-regulation が最も目立った。

ヒト正常肝と ALS 肝の病理組織学的解析では、ALS の肝には著変なく、正常肝と同一組織像であった。免疫組織化学的解析では、正常肝と ALS 肝において、Prx1/Prx2/GPx1 は肝細胞の細胞質に発現しており、染色性は同一であった。

D. 考察

SOD1 はスーパーオキシドラジカルを過酸化水素に変換する経路を介して、レドックスシステムと連携している。この SOD1 遺伝子に異常が生じた生体系の病理形態学的変化は SOD1 遺伝子異常を伴う FALS や ALS モデル動物における神経細胞内 LBHI に特徴づけられる。この終末期の LBHI 形成に伴う神経細胞内のレドックスシステムの破綻機序に関しては既に昨年明らかにした。しかし、このような SOD1 遺伝子異常

を伴う生体系において、LBHI (細胞内凝集物) を形成しない神経細胞が存在することも事実であり、やがては、LBHI を形成しない神経細胞も細胞死に至る。

今回の SOD1 遺伝子異常を伴う ALS モデルラットおよびマウスを用いた動物実験で、発症前からの全経時的変化を、レドックスシステムの観点から解析を行ったところ、発症期間の一部の残存前角細胞において、Prx/GPx の両者が同時増発を、レドックスシステムの up-regulation を認めた。即ち、封入体形成しない SOD1 遺伝子異常を伴う神経細胞においては変異 SOD1 細胞毒性に対して、自らを守って生存する機構の一つにレドックスシステムの up-regulation 機構が存在することが判明した。また、SOD1 遺伝子異常を伴う ALS モデルラットおよびマウスの肝細胞においても、発症期間の経過中に、変異 SOD1 に反応してレドックスシステムの up-regulation が認められた。

さらに、SOD1 遺伝子異常を病因としない SALS の発症後 6 ヶ月症例から発症後 11 年 5 ヶ月症例の 40 症例中、特に経過が、2、3 年の SALS において、レドックスシステムが up-regulate していた残存神経細胞が目立った。発症後 4 年経過以後の症例では、SALS の経過とともにレドックスシステムが up-regulate していた残存神経細胞は激減した。

SOD1 遺伝子異常を伴う生体系においては、ヒトでもモデル動物でも、変異 SOD1 細胞毒性の影響は、脊髄だけでなく肝臓にも及ぶが、その ALS 発症経過中には、脊髄のみならず、肝臓においても、レドックスシステムの up-regulation 機構の存在が証明された。一方、SALS においては、原因不明の ALS stress によって、脊髄前角細胞は障害され、細胞死を生じる。しかし、肝細胞には、この ALS ストレスに対する組織学的影響はなく、また、レドックスシステムの観点からも正常状態を呈し、ALS ストレスに反応も示さなかった。即ち、原因不明の ALS ストレスあるいは変異 SOD1 ストレスに対して、脊髄前角細胞は防御システムとして内因性のレドックスシステムの up-regulation 機構をもって、自らを守って生存するシステムの一つにしていることが判明した。しかし、脊髄前角細胞は最終的には、レドックスシステムの破綻をきたし、細胞死に至る。一方、肝細胞は、変異 SOD1 ストレスに対して、レドックスシステムの up-regulate をもってこれに対し反応するが、細胞死は生じない。従って、運動ニューロン死を生じさせる ALS ストレスの防御システムの一つで

あるレドックスシステムを常に維持あるいは過剰発現状態にすることで、運動ニューロン死が十分に抑制できる高い可能性を呈示できたものと考えられる。

E. 結論

ヒト SALS・FALS と ALS モデル動物の脊髄と肝臓における細胞内レドックスシステムを構築する基幹酵素である Prx と GPx を解析した。変異 SOD1 が病因であるヒト FALS と ALS モデル動物のみならず、原因不明の SALS においても発病期間の一部の脊髄前角細胞は、Prx/GPx の同時過発現し、レドックスシステムの up-regulation を示した。しかし、多くの残存前角細胞はレドックスシステムは破綻し、やがては細胞死を迎えるものと考えられた。肝臓では、変異 SOD1 病である ALS モデル動物において、ALS 発病期間中に、肝細胞も変異 SOD1 細胞毒性に反応して、レドックスシステムの up-regulation を示したが、細胞死は生じなかった。即ち、ALS ストレスに対して、脊髄前角細胞の一部はレドックスシステムの up-regulation 機構を持って、自ら守って生存するシステムの一つにしていることが判明した。従って、レドックスシステムを常に維持あるいは過剰発現状態にすることで、運動ニューロン死が十分に抑制できる高い可能性が呈示できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 著書

Kato S., Shaw P., Wood-Allum C., Leigh P.N., Show C. Amyotrophic lateral sclerosis. Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders. Edited by D. Dickson. Basel, ISN Neuropath Press, 2003; pp 350-368

2. 論文発表

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 2003, 106(2): 112-120.

Kato S., Esumi H., Hirano A., Kato M., Asayama K., Ohama E. Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human brain tumors: relationships of

iNOS to superoxide dismutase (SOD) proteins (SOD1 and SOD2), Ki-67 antigen (MIB-1) and p53 protein. Acta Neuropathol. 2003, 105(4): 333-340.

Nakamura K., Nakada C., Takeuchi K., Osaki M., Shomori K., Kato S., Ohama E., Sato K., Fukayama M., Mori S., Ito H., Moriyama M. Altered expression of cardiac ankyrin repeat protein and its homologue, ankyrin repeat protein with PEST and prolin-rich region, in atrophic muscles in amyotrophic lateral sclerosis. Pathobiology 2002-03, 70 (4): 197-203.

Kato M., Shinozawa T., Kato S., Terada T. Immunohistochemical localization of truncated midkine in developing human bile ducts. Histol and Histopathol 2003, 18 (1): 129-134.

Awaya A., Watanabe K., Kato S. Individuals exhibiting conspicuous nevi (lentiginosimplex) are resistant to allergic rhinitis/conjunctivitis (pollinosis), but those who do not show increased susceptibility to pollinosis. Microbiol Immunol 2003, 49 (1): 101-103.

3. 学会発表

加藤信介、佐伯有祐、青木正志、永井真貴子、糸山泰人、加藤雅子、朝山光太郎、栗屋 昭、平野朝雄、大浜栄作 SOD1 遺伝子異常を伴う FALS とトランスジェニックラット(H46R・G93A)とにおける SOD1 凝集とレドックス制御システムとの関連について。第44回日本神経病理学会総会学術研究会(2003, 名古屋)

隅 寿恵、藤村晴俊、加藤信介、高安 聡、佐古田三郎 G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスの Vacuolation 形成における CCS の関与。第44回日本神経学会総会(2003, 横浜)

山下 賢、箕田修治、加藤信介、大浜栄作、内野 誠

外来性ヒト Bcl-2 による変異 SOD1 マウスの運動ニューロン変性抑制機序。第44回日本神経学会総会(2003, 横浜)

Kato S., Saeki Y., Aoki M., Nagai M., Itoyama Y., Kato M., Asayama K., Awaya A., Hirano A., Ohama E. Relationship between mutant SOD1 aggregation and the redox system in SOD1-mutated FALS patients and transgenic rats (TgR) expressing human mutant SOD1. XVth Congress of the International Society of Neuropathology (2003, Turin, Italy)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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」分担〕
「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」

研究協力者 山岸覚、山口淳、人見淳一、片山泰一、遠山正彌

（大阪大学 大学院医学系研究科・プロセッシング機能形態学）

加藤昌昭、青木正志、糸山泰人（東北大学・医学部・神経内科）

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症（ALS）は遅発性、進行性、一部が家族性、大部分が孤発性、特定の細胞（運動神経）が変性を受けるなどの点は、アルツハイマー病（AD）やパーキンソン病（PD）など他の神経変性疾患と類似性を有する。近年、AD や PD に見られる神経細胞死は小胞体（ER）を起源とする細胞死であることが報告されている。我々はこの点に着目し、ALS 発症と ER ストレスとの関わりについて研究を開始した。ALS のモデル系として、家族性 ALS(FALS)のなかでも早期発症原因として知られている L84V SOD1 を恒常的に発現する SK-N-SH 細胞を作製し、この細胞に ER ストレスを負荷すると、1) SOD1 が凝集体を作る、2) 凝集した SOD1 がユビキチン化している、3) HE 染色でエオジン陽性に染まる、4) ゴルジ装置が崩壊する、という FALS 患者及びモデルマウスの運動神経における神経病理学的知見と共通した点が観察された。この凝集体形成は小胞体ストレス以外に、プロテアソーム-ユビキチン経路を阻害した際にも観察された。また、野生型 SOD1 を恒常的に発現させた細胞においては観察されなかった。これらのことから、ALS 解析のモデルとして有用であることが示唆された。このモデル細胞において小胞体ストレスを負荷した際に観察された SOD1 が細胞内のどこで凝集しているかの検討を行った。その結果、凝集した SOD1 はミトコンドリア、ゴルジ装置、リソソームにおいて共局在は観察されなかったが、小胞体に共局在していることが明らかになった。また、小胞体ストレスを与えることにより、小胞体の局在が変化し、細胞周辺部に集まるようになることを見出した。さらに、この細胞において Lewy body-like hyaline inclusion(LBHI)様の封入体が観察された。以上の結果から、L84V SOD1 細胞は ALS モデルとして有用である可能性が示され、また、変異 SOD1 の封入体や凝集体形成に小胞体ストレスが関与していることが示唆され、これは、他の FALS や孤発性 ALS の発症機構にも小胞体ストレスが関与する可能性を示唆する。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は中高年期に発症し、大脳、脳幹、脊髄の運動ニューロンが選択的、かつ系統的に侵され 2~5 年で呼吸不全に至り、死にいたる神経変性疾患である。現在考えられている ALS の発症

原因としては、1) 酸化ストレス 2) Glutamate excitotoxicity 3) Peroxynitrite toxicity 4) axonal transport 障害 5) Mitochondria 障害 6) 細胞骨格障害などが唱えられているが、なぜ中高年になり発症するのか、運動ニューロンのみが選

挾的に脱落するののかという、根源的な原因究明には至っていない。また、ALS 患者全体の約 10%を占める家族性 ALS(FALS)のうち、約 20%は SOD1 の変異によると報告されている。これまでの研究から、SOD1 変異による FALS 発症の原因は SOD1 変異による“Toxic gain of function”である可能性が高いが、変異 SOD1 の凝集体自体が毒性であるのか、逆に、凝集体形成は神経細胞保護のためなのかは不明であり、また、凝集体形成のメカニズムも依然として不明であり、これらの解明は、家族性のみならず、孤発性 ALS の発症機構解明にも大きく貢献するものと期待される。

ALS は、遅発性、進行性かつ特定の細胞（運動神経）が変性を受ける点、一部が家族性であるが大部分が孤発性である点は、アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病 (PD) など他の神経変性疾患と類似性を有する。近年、AD や PD に見られる神経細胞死は小胞体 (ER) を起源とする細胞死であることが報告されている。我々はこの点に着目し、ALS 発症と ER ストレスとの関わりについて、FALS の原因の一つである SOD1 変異を利用して研究を開始した。ALS の研究では、運動神経細胞の初代培養が容易にはできない点が大きなネックである事から、まず、*in vitro* のモデル系の確立を試みた。また、近年、SOD1 がミトコンドリアへ移動し、ラジカルの発生に関わっているという説も報告されており、この点についても検討を行った。

B. 研究方法

ALS のモデル系としては、FALS の中でも早期発症の原因として知られている L84V SOD1 を恒常的に発現するヒト由来神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞を作製し、一方、コントロールとして野生型 SOD1 を発現する細胞を用いた。本細胞腫は α -MEM+10%FCS で飼育し、セルラインの選択にはジェネティシンを用いた。この細

胞に ER ストレスとして 1 μ g/ml のツニカマイシン、プロテアソーム-ユビキチン経路阻害剤である 4 μ g/ml の ALLN を 24 時間負荷し、次の項目について検討を行った。

1) 本細胞腫に ER ストレスを負荷した際、ALS 患者の運動神経における神経病理学的知見と共通した点が観察されるか？

使用した抗体は抗ユビキチン抗体 (ストレスジェン)、SOD1 抗体 (カルビオケム)、KDEL 抗体 (ストレスジェン)、GM130 (ファーミンジェン) を用いた。ヘマトキシリン、エオジン (HE) 染色も行った。また、ユビキチンを強制発現し、免疫沈降することによってユビキチン化アッセイも行った。

2) 小胞体ストレスを与えた際、SOD1 はどこに局在しているか？

ミトコンドリア、リソソーム及びゴルジ装置の染色には Mitotracker (モレキュラープローブ)、Lysotracker (モレキュラープローブ)、抗 GM130 抗体 (ファーミンジェン) を用いた。

C 研究結果

1) 細胞腫に ER ストレスとしてツニカマイシン、或いは ALLN を処置し、24 時間後細胞を固定し、SOD1 抗体及びユビキチン抗体で免疫染色を行った。その結果、全細胞数の 20%以上の細胞内において SOD1 が凝集体を作った。なお、この凝集体は野生型 SOD1 を発現する細胞では観察されなかった。また、ユビキチンを強制発現させ、抗 SOD1 抗体で免疫沈降し、ユビキチン抗体でプロットすることにより、ユビキチンアッセイを試みた。その結果、L84VSOD1 を発現する細胞のみでポリユビキチンによるラダーを検出した。このことは、凝集した SOD1 がユビキチン化されていることを示唆している。凝集した SOD1 が HE 染色でエオジン陽性に染まるかどうかを検討した結果、エオジン陽性を示すことが明らかとなった。更に、ER ストレスを与えることにより Lewy body-like hyaline inclusions

(LBHI) 様の封入体を *in vitro* で形成することを見出した。また、ゴルジ装置のマーカーとして GM130 抗体を用いて同様に免疫組織化学的検討を行ったところ、小胞体ストレス負荷前に比べてゴルジ装置の崩壊を認めた。一方、野生型 SOD1 を発現する細胞においては、小胞体ストレスを負荷した際もゴルジ装置は通常形態を保っていることから、これは L84V SOD1 を強制発現の結果であると考えられる。これら上記の一連の結果から、今回作製した L84V SOD1 発現 Cell line は ALS 解析のモデルとして有用であることが示唆された。

2) 次にこのモデル細胞において、小胞体ストレスを負荷した際に観察された SOD1 が細胞内のどこで凝集しているかについて検討を行った。その結果、ER ストレスにより SOD1 の凝集は、ミトコンドリアやゴルジ装置、リソソームには強く認めなかった。このことは、近年しばしば報告されているミトコンドリア内腔における SOD1 の局在化とは異なっており、興味深い。さらに詳細に調べた結果、SOD1 は小胞体に局在化しており、また、小胞体の分布も小胞体ストレスの前後では異なっていた。小胞体は通常、核周辺に存在しているが、SOD1 と共局在を示す小胞体は細胞膜近傍へと移動していた。すなわち、小胞体ストレスが負荷されると、蛋白質の合成をストップし、小胞体の局在が変化し、SOD1 が小胞体内にリクルートされるということを示唆している。このことは、形態電顕、及び免疫電顕によっても確認された。

D 考察

SOD1 の野生型及び変異体 L84V を定常的に発現するヒト由来神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞を構築した。L84V SOD1 発現細胞は継代するだけでは特に目立った変化を見せないが、小胞体ストレス状態に置かれると、24 時間後には細胞質に多数の構造物を生み出した。しかしながら、SOD1

はもともと細胞質に存在する蛋白質であって小胞体を経由しないことを考えると、小胞体ストレスが加わった時に見られるこの凝集体は、小胞体関連分解(ERAD)に異常を来たすことによる、間接的な現象である可能性も考えられる。最近、L84V SOD1 のトランスジェニックマウスの運動神経で GRP78 の発現がコントロールに比べてより誘導されている事が報告されており (Biochem Biophys Res Commun. 303(2): 496-503(2003))、小胞体ストレスと L84V SOD1 の凝集化の間に synergy がある可能性も示唆される。

本研究において認めた、小胞体ストレスにより SOD1 が小胞体に局在するという事実は、まだ、mutant SOD transgenic mouse や、FALS の患者の組織では報告がなく、今後、SOD1 L84V のトランスジェニックマウスの組織で確認する予定である。また、この系において、変異 SOD1 が小胞体へと移行するメカニズムについては、現時点では不明である。

E 結論

以上の結果から、L84V SOD1 発現 SK-N-SH 細胞は小胞体ストレス、プロテアソーム阻害剤によって SOD1 を凝集させるということが明らかとなり、変異 SOD1 を原因とする FALS の発症機構に小胞体ストレスが関与する可能性が示され、これは、他の FALS や弧発性 ALS の発症機構に、小胞体ストレスが関与する可能性がある事を示唆している。今後はこのモデル系を用いることにより、生化学的アッセイを行い、SOD1 の共凝集物を同定する予定である。また、*in vivo* を用いた実験も同時に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

本研究に関する論文はまだありません。

2.学会発表

Yamagishi et al., Analysis of L84V
SOD1 mutant in SK-N-SH cells. The
Society for Neuroscience's 33rd Annual
meeting (ニューオーリンズ) 2003 年
11月

H 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

研究協力者 渡部 和彦

財団法人 東京都医学研究機構 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

研究要旨 成体ラット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し、以下の3点について検討した。1. 正常ラット、変異 SOD1 トランスジェニックラットともに、引き抜き損傷後、ほぼ全ての傷害運動ニューロンに ATF3, phospho-c-Jun, phospho-Hsp27 が発現したが、変性脱落は変異 SOD1 ラットの方が早く進行した。一方、正常ラット引き抜き損傷部に GDNF 組換えアデノウイルスを接種すると、ATF3, phospho-c-Jun, phospho-Hsp27 の発現が減弱し、運動ニューロン死が抑制された。2. 正常ラット引き抜き損傷後の MCI-186 (edaravone) 経口投与により、運動ニューロン死が抑制された。3. 正常ラットから LacZ 標識シュワン細胞株を樹立し、引き抜き損傷部への細胞移植治療実験の可能性を示した。

共同研究者：坂本剛¹、川添陽子¹、池田憲²、
青木正志³、永井真貴子³、石垣あや³、
神位りえ子³、糸山泰人³

¹ 東京都神経科学総合研究所分子神経病理研究部門

² PL 東京健康管理センター神経内科

³ 東北大学大学院医学系研究科神経内科

A. 研究目的

成体齧歯類では顔面神経、脊髄根神経、坐骨神経などの末梢神経の引き抜き損傷によって運動ニューロンが著明に変性脱落することが知られており、運動ニューロン死モデルのひとつとして重視されている（論文 1,4,6,7）。しかし、本モデルにおける運動ニューロン死のメカニズムの詳細は不明であり、筋萎縮性側索硬化症（ALS）における運動ニューロン死との異同を明らかにすることは、ALS 治療法開発の一助になると考えられる。一方、我々はこれまで、成体ラット顔面神経引き抜き損傷部に各種の神経栄養因子組換えアデノウイルスベクターを接種し、グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF） β 2、メタロチオネイン-III（MT-III; growth inhibitory factor, GIF）組換えウイル

スが損傷運動ニューロン死を抑制することを報告してきた（論文 1,4,7）。また、同動物モデルに対して低分子化合物 T-588 を経口投与すると、傷害運動ニューロンの脱落が抑制されることがわかった（論文 6）。さらに我々は、正常および疾患モデルからのシュワン細胞株の樹立について報告してきた（論文 3）。そこで今回は、成体ラット顔面神経引き抜き損傷による運動ニューロン死モデルに関して、以下の3点につき検討を試みた。

1. 損傷運動ニューロンにおける転写因子 activating transcription factor-3 (ATF3), c-Jun および heat shock protein-27 (Hsp27) の発現。
2. 損傷運動ニューロンに対する MCI-186 (edaravone) 経口投与の保護効果。
3. LacZ 標識ラット・シュワン細胞株の樹立と移植の試み。

B. 研究方法

1. ラット顔面神経引き抜き損傷：正常 12 週齢 Fischer 344 雄ラット、運動徴候が出現する前の生後 80-90 日齢雌 H46R 変異 SOD1 ラットと同腹の正常対照ラット、G93A 変異 SOD1 導入ラットと対照ラットの右顔面神経をそれぞれ引き抜き除去した。

正常ラットの一部分には、引き抜き損傷部に GDNF 組換えアデノウイルス (AxCAhGDNF) を接種した。一方、別の正常ラットを引き抜き損傷後、直後より MCI-186 (1mg/g 粉末混餌で約 0.1g/kg/day) を 4 週間、自由経口投与した。

2. 免疫組織化学：4% paraformaldehyde 灌流固定パラフィン切片につき、1 次抗体として ATF3, c-Jun, phospho-c-Jun, Hsp27, phospho-Hsp27 に対する抗体を用いた免疫染色 (ABC 法) を施行した。

3. 運動ニューロン数計測：パラフィン連続切片を作製し、5 枚毎の切片計 25 枚の Nissl 染色標本につき、顔面神経核において明瞭な核小体と Nissl 物質を有する運動ニューロンの数を算定した。

4. LacZ 標識ラット・シュワン細胞株の樹立：正常 12 週齢 Fischer 344 雄ラット後根神経節初代培養を heregulin- β , forskolin を含む無血清培地で 4 ヶ月間培養後コロニーを分離し、シュワン細胞株 IRS1 を樹立、同細胞に pcDNA3.1/lacZ をトランスフェクトし、安定株 IRS1L11 を得た。樹立したシュワン細胞株の形質を蛍光抗体法、RT-PCR で確認し、脳神経組織に移植した。

C. 研究結果

1. 損傷運動ニューロンにおける転写因子 ATF3, c-Jun, Hsp27 の発現：①正常ラット顔面神経引き抜き損傷では、ほぼ全ての傷害運動ニューロンに ATF3, phospho-c-Jun, phospho-Hsp27 が発現するが、変性脱落は徐々に進行した。②H46R, G93A ラットの脊髄前角、顔面神経核の一部運動ニューロンに ATF3, phospho-c-Jun, 反応性アストロサイトに phospho-Hsp27 が発現していた。③正常ラットと同様、発症前 H46R, G93A ラットに顔面神経引き抜き損傷を加えても、傷害運動ニューロンに ATF3, phospho-c-Jun, phospho-Hsp27 が発現した。運動ニューロンの変性脱落は正常ラットよりも早く進行した。④正常ラット顔面神経引き抜き損傷直後に AxCAhGDNF を局所注入すると、傷害運動ニューロンにおける ATF3, phospho-c-Jun, phospho-Hsp27 の発現が抑制された。

2. 損傷運動ニューロンに対する MCI-186

(edaravone) 経口投与の保護効果：対照非投与群 (n=9) では傷害側顔面神経核運動ニューロンの脱落を認めた (健常側の $30.3 \pm 6.4\%$) が、MCI-186 投与群 (n=9) では脱落が有意に抑制された ($50.6 \pm 9.4\%$)。

3. LacZ 標識ラット・シュワン細胞株の樹立と移植の試み：樹立シュワン細胞株は、いずれも明確なシュワン細胞の形質を示し、検索した限りでは LacZ 導入による形質の変化は認められなかった。IRS1L11 細胞は成体ラット側脳室、線条体に移植後、X-Gal 陽性細胞として生着し、腫瘍形成はみられなかった。同様に、IRS1L11 細胞は成体ラット顔面神経引き抜き損傷部に移植後生着した。

D. 考察

これまで、成体ラットでは神経切断により傷害運動ニューロンにおける ATF3, phospho-c-Jun, phospho-Hsp27 の発現が上昇し、運動ニューロン死に対して抑制的に働くとする報告がある。しかし、引き抜き損傷でも傷害運動ニューロンにおける ATF3, phospho-c-Jun, phospho-Hsp27 の発現が強く誘導される一方、運動ニューロン死が進行することから、これら因子の細胞死抑制効果を他の細胞死誘導因子が凌駕している可能性、あるいは ATF3, phospho-c-Jun, phospho-Hsp27 が本来細胞死を抑制する経路ではない可能性がある。引き抜き損傷後の GDNF 組換えアデノウイルスの接種により、ATF3, phospho-c-Jun, phospho-Hsp27 の発現が減弱し、細胞死が抑制されるという今回の実験結果は後者を支持するように受け取れるが、今後のより詳細な解析が必要と考えられる。さらに、変異 SOD1 ラットに引き抜き損傷を加えると、正常ラットに比べて損傷運動ニューロン死が早く進行するが、ATF3, phospho-c-Jun, phospho-Hsp27 の発現に大きな違いはなかった。Hsp27 が変異 SOD1 に結合し、その結果細胞死が起こるとする報告 (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2002) もあり、引き抜き損傷後の傷害運動ニューロンにおける Hsp27 と変異 SOD1 発現の関連性について更なる検討が必要である。

他方、MCI-186 の経口投与により有意な運動ニューロン保護効果がみられ、本薬剤が運動ニュー