

200400749A

厚生労働科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症に対する
肝細胞増殖因子（HGF）を用いた
挑戦的治療法の開発とその基盤研究

平成16年度 総括研究報告書

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

平成17年3月 印刷

目 次

I. 研究者一覧

II. 総括研究報告 1

東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学 糸山 泰人

III. 研究報告（分担研究者）

1. 変異Cu,Zn-SOD 高発現細胞に認められた細胞骨格異常に関する研究 7

大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学生化学 谷口 直之

2. SOD1 変異体をターゲットとする新規ヒトユビキチンリガーゼNEDL1および NEDL2の神経細胞死における役割に関する研究 11

千葉県がんセンター生化学研究部 中川原 章

3. ALS に対する HGF 遺伝子治療法の開発・適用の基盤研究 14

大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻
組織再生医学講座分子組織再生分野 船越 洋

4. ALS ラットに対する肝細胞増殖因子（HGF）髄腔内投与による病態進行の抑制 および内在性神経前駆細胞の賦活の試み 18

東北大学病院神経内科 青木 正志

IV. 研究成果一覧

V. 研究成果に関する刊行物

研究者一覽

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた
挑戦的治療法の開発とその基盤研究

研 究 者 一 覧

| | | | |
|-------|-------|---|-----|
| 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 | 教 授 |
| 分担研究者 | 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 |
| | 中川原 章 | 千葉県がんセンター生化学研究所 | 所 長 |
| | 船越 洋 | 大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻 組織再生医学講座分子組織再生分野 | 助教授 |
| | 青木 正志 | 東北大学病院神経内科 | 助 手 |

総括研究報告

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた挑戦的治療法の開発と
その基盤研究

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

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）

中川原 章（千葉県がんセンター生化学
研究部）

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）

青木正志（東北大学病院神経内科）

に ALS トランスジェニック（Tg）マウスに有用であることが示され、ALS の新規の治療薬として注目されている。今までの HGF を用いた治療実験では、本研究グループで開発された ALS Tg ラットに対して髄腔内投与にて明らかな延命効果を認めてきている。運動ニューロンの選択的細胞死のメカニズムと HGF の有効性の機序を解明しつつ HGF を用いた ALS の新規治療法を確立していきたい。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は病因不明の進行性の難治性神経筋疾患である。運動ニューロンの選択的な細胞死が惹起されて、全身の筋萎縮と脱力が進行し、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り、未だ筋萎縮の進行を止める有効な治療法が確立していない。世界的にも ALS に対する新たな治療法が切望されているが、国内外での臨床治験の結果は絶望的なものと云わざるをえない。本研究の目的はこの神経難病 ALS に対して挑戦的な治療法の開発と確立をめざすことである。

日本で発見された新規の神経栄養因子である肝細胞増殖因子（HGF）は遺伝子工学的

B. 研究方法

ALS の病因と病態は不明であるが、家族性 ALS の病因遺伝子 Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）の関与が最も重要なものと考えられる。本研究グループは変異 SOD1 導入 ALS モデルのなかでも従来のマウスに較べてより大型の ALS ラットを用いて HGF の髄腔内投与治療実験を完成させ、早期に臨床応用にもってゆくことを目的としている。

その為に、①新規治療法開発の基盤となる ALS Tg ラットにおける神経細胞死の機序の解明、②ALS ラットに対する HGF の髄腔内投与実験の完成と HGF の運動ニューロン死抑制機序の解明の研究、③HGF を用いた将来的

な ALS 治療として再生医療や遺伝子治療の可能性の研究を行う。

1) 新規治療法開発の基盤となる ALS Tg ラットにおける神経細胞死の機序解明

①変異 SOD1 は生体内で構造変化を起こし神経細胞傷害を示すことが考えられている。この細胞傷害の機序を解析する為に神経芽細胞 Neuro 2a (N2a) に野生株 (WT) および変異型 SOD1 (G37R、G93A) を高発現させて細胞周期の検討と細胞骨格の変化の検討を行なった。

今まで、神経芽種の cDNA ライブラリーより神経組織特異的に発現する新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 を同定してきている。この NEDL1 は正常な SOD1 とは結合せず変異 SOD1 と結合し、ユビキチン化による分解を引き起こす一方、強固な結合体を形成し、細胞内封入体に沈着することを確かめてきている。また NEDL1 は Wnt 細胞内情報伝達系の重要な制限因子である Dishevelled-1 (Dvl-1) をユビキチン化の基質とし細胞傷害を引き起こす可能性も考えられている。細胞死における NEDL1 の関与を検討する目的で培養細胞に NEDL1 の発現ベクターを遺伝子導入して colony formation assay を行った。又、培養細胞に SOD1 変異体 (A4V) を導入し免疫沈降法などで結合物質を検討した。

2) ALS ラットに対する HGF の髄腔内投与実験の完成と HGF の運動ニューロン死の抑制機序の解明

次世代の ALS 治療薬として注目されている HGF の臨床応用を目指して ALS ラットに対する HGF の髄腔内投与実験を行なった。G93A Tg ラットの髄腔内にヒトリコンビナント HGF (hr HGF) を浸透圧ポンプ (Alzet Model 2004) を用いて発症前の 100 日齢から持続投

与して、発症の遅延と運動ニューロン死の抑制を認めてきた。今回は ALS 患者に対する臨床応用を目指して、hr HGF を発症期にあたる 115 日齢から ALS ラットの髄腔内に投与し、病態の進行抑制の有無とその作用機序を検討した。

3) HGF を用いた将来的な ALS 治療としての再生医療や遺伝子治療の可能性

HGF を用いた再生医療の開発を目的に ALS ラットにおける内在性神経前駆細胞の HGF に対する反応性の解析を開始した。ALS Tg ラット脊髄では運動ニューロン脱落前からグリア細胞新生 (gliogenesis) が認められるとともに、発症後期から末期に至って未分化な神経前駆細胞が増殖していることを確認している。今回、Tg ラット髄腔内に HGF を投与することで、内在性神経前駆細胞の賦活を試みた。

HGF の ALS モデルラットへの臨床的な有効性は示されているが、将来的に ALS 治療として確立する為には髄腔内投与に勝る方法で HGF を安定した量で脊髄の広範囲にわたって発現する必要がある。この目的で HGF 発現遺伝子治療ベクターをアデノ随伴ウイルスベクター (AAV2、AAV4、AAV5) および複製能欠失型単純ヘルペス I 型ウイルスベクター (HSV1) で脊髄での HGF 発現蛋白量を検討した。

C. 及び D. 研究結果及び考察

1) 新規治療法開発の基盤となる ALS Tg ラットにおける神経細胞死の機序解明

①変異 SOD1 高発現の N2a 細胞を作製した結果、変異 SOD1 高発現細胞では、cell growth の遅れがあり、その原因として G2/M 期の遅延が認められた。G2/M 期の遅延には細胞骨

格の異常が考えられるため、細胞骨格系タンパクの免疫染色を行ったところ、ファロイジンによるアクチンの染色が低下しており、アクチン骨格に異常が生じていることが確認された。また、抗 SOD1 抗体による免疫沈降後に二次元電気泳動を行ったところ、変異型 SOD1 細胞抽出液には野生型には認められない、いくつかのスポットが認められ、そのスポットの一つはアクチンであることが確認された。以上の結果より、変異 SOD1 はアクチンとの結合により細胞骨格に異常をもたらしている可能性があり、それに伴い G2/M 期の遅延が起きている可能性が考えられた。

②NEDL1 が細胞増殖あるいはアポトーシスにどのようなファンクションを担うかを調べるため、培養細胞に NEDL1 を過剰発現させて colony formation assay を行った。その結果、NEDL1 の過剰発現により colony 形成の数はコントロールと比べ有意に減少した。さらに、*in situ* TUNEL assay により、NEDL1 を過剰に発現した細胞では、TUNEL 陽性細胞の比率がコントロールに比し有意に高くなることが判明した。また、新たにクローニングした NEDL2 は、Dvl-1 をユビキチン化による分解のターゲットにしていたが、変異型 SOD1 をユビキチン化する機能はほとんどなかった。これらから NEDL1 を含む HECT 型ユビキチンリガーゼは、ターゲットとしての変異型 SOD1 および Dvl-1 に対し redundancy と specificity を有しているものと考えられた。

2) ALS ラットに対する HGF の髄腔内投与実験の完成と HGF の運動ニューロン死の抑制機序の解明

これまで ALS ラットに対する hr HGF の発症前のタイミングで髄腔内持続投与を行い、発症遅延の効果を得てきた。今回は発症期か

らの HGF を髄腔内に投与することによって、発症から死亡までの平均罹病期間が延長するか否かを調べた。その結果、HGF 投与群が 27.5 ± 11.1 日間、対照群が 16.9 ± 8.17 日間と HGF 投与群が 62.7% の罹病期間の増大を示し ALS ラットの死亡遅延が確認され、今後の臨床への応用が期待される。

HGF 投与による病態進行抑制の機序として、caspase cascade の主な実行因子とされている caspase-3、9 の抑制効果を認めたことから caspase cascade、またはその上流の細胞死機序を抑制することが示唆された。また、EAAT2 が発現増加し XIAP が保持されたことから、細胞保護機能の維持・増強が示され、またアストロサイトなどの神経細胞以外の神経組織構成細胞にも HGF が作用することが示された。

3) HGF を用いた将来的な ALS 治療としての再生医療や遺伝子治療の可能性

ALS ラット脊髄における未分化な神経前駆細胞の増殖は、ALS が進行した発症後期から末期になり認められはじめる。これらの細胞群を早期から賦活し組織修復に役立てることを目的として、HGF の髄腔内投与を試みたところ、本モデルラット脊髄の新生細胞増殖の促進が確認された。現在、HGF により賦活された細胞群の形質と局在について検討中であるが、将来的に HGF をはじめとした外来性再生誘導因子の投与が新しい治療法開発につながる可能性がある。

ALS の遺伝子治療のベクターとして検討しているアデノ随伴ウイルスベクター (AAV2 と AAV4) と HSV1 は、直接脊髄中にベクターを投与すると注入近傍の大型運動ニューロンに発現がみられた。また、髄腔内への投与においては広範囲の脊髄レベルにおいても

発現細胞が認められた。これらの投与系にて HGF 発現ウイルスベクター投与による HGF 蛋白レベルを測定すると、内因性 HGF レベルの 3~5 倍に上昇することが脊髄注入実験で認められた。さらに期待されることは、髄腔内投与実験においては広範囲の脊髄においても HGF 蛋白が発現することが確かめられ将来的に ALS の治療に適切な方法と考えられた。

E. 結論

本研究の目的は苛酷な神経難病である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する次世代の新規治療薬として期待される肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた挑戦的治療法の開発とそれに関わる基盤研究を進めることにある。ALS の病因として最も重要視されている変異 SOD1 による選択的運動ニューロン死のメカニズムはまだ十分明らかにされていないが、変異 SOD1 タンパクは細胞骨格タンパクであるアクチンや新規ユビキチンリガーゼの NEDL1 と結合しながら細胞の機能を変化させ最終的には細胞死にいたらせるものと考えられる。いずれにしろ現状では ALS の新規治療薬の開発には HGF が極めて重要であり、今回の治療実験において ALS 発症後からの HGF の髄腔内投与にても明らかな延命効果が認められた。この事実は今後の ALS の HGF 治療の臨床応用について大きなステップと考えられる。また、その有効性の機序としては caspase 3、9 の抑制やアストロサイトでの EAAT2 の保持が関与することも明らかとなった。将来的な ALS の HGF 治療の新たな投与方法の研究においては、HGF 遺伝子を組み込んだアデノウイルス随伴ベクターや HSV1 ベクターを髄腔内に 1 回投与することにより脊

髄内の運動ニューロンに HGF を発現することが動物実験で示され、将来的な ALS に対する HGF の治療に希望を与える結果である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J Biol Chem* 279: 11327-11335, 2004
- 2) Takamiya R, Takahashi M, Park Y.S, Tawara Y, Fujiwara N, Miyamoto Y, Gu J, Suzuki K, Taniguchi N. Overexpression of mutated Cu, Zn-SOD in neuroblastoma cells results in cytoskeletal change. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:253-259, 2005
- 3) Fujiwara N, Miyamoto Y, Ogasahara K, Takahashi M, Ikegami T, Takamiya R, Suzuki K, Taniguchi N. Different immunoreactivity against monoclonal antibodies between wild-type and mutant Copper/Zinc superoxide dismutase linked to amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 280:5061-5070, 2005
- 4) 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 107: 149-158, 2004

5) Oshima K, Shimamura M, Mizuno S, Tamai K, Doi K, Morishita R, Nakamura T, Kubo T, Kaneda Y. Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats. FASEB J 18(1):212-214, 2004.

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 Vol.20 No.5: 533-540, 2003

2. 学会発表

藤原範子、宮本泰豪、高橋素子、大河原知水、江口裕伸、谷口直之、鈴木敬一郎 (2004) 家族性筋萎縮側索硬化症 (FALS) の原因となる変異 Cu/Zn-スーパーオキシドディスムターゼの構造変化と不安定性。過酸化脂質・フリーラジカル学会第 28 回大会。10. 28-29, 名古屋。(過酸化脂質研究, 28, 42, 2004.)

H. 知的財産の出願・登録状況

ラットを用いた ALS モデル (出願済)

分 担 研 究 報 告

厚生省研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

「筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた挑戦的治療法の開発とその基盤研究」

『変異 Cu, Zn-SOD 高発現細胞に認められた細胞骨格異常に関する研究』

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

研究要旨 家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）のうち、20%は Cu, Zn-スーパーオキシドディスムターゼ（Cu, Zn-SOD）遺伝子（SOD1）の変異が原因であることが証明されているが、ALS の発症に直接結びつくメカニズムは解明されていない。そこで、変異 Cu, Zn-SOD が神経芽細胞にどのような影響を与えるかを検討するため、野生型および変異 Cu, Zn-SOD を高発現する Neuro 2a 細胞（N2a）を作製した。その結果、変異 Cu, Zn-SOD 高発現細胞では、cell growth の遅れがあり、その原因として G2/M 期の遅延が認められた。また、G2/M 期の遅延には細胞骨格の異常が考えられるため、細胞骨格系タンパクの免疫染色を行った。その結果、変異 Cu, Zn-SOD 高発現細胞ではファロイジンによるアクチンの染色が低下しており、アクチン骨格に異常が生じている事が確認された。また、抗 Cu, Zn-SOD 抗体による免疫沈降後に二次元電気泳動を行ったところ、変異型 Cu, Zn-SOD 細胞抽出液には 40 kDa 付近に野生型のものには認められない、いくつかのスポットが認められた。抗アクチン抗体を用いたウェスタンブロットの結果、そのスポットの一つはアクチンである事が確認された。以上の結果より、変異 Cu, Zn-SOD 高発現細胞は、アクチンとの結合により細胞骨格に異常をもたらしている可能性があり、それに伴い G2/M 期の遅延が起きている可能性が考えられた。

共同研究者

藤原範子（兵庫医科大学生化学）、宮本泰豪（大阪府成人病センター）、高橋素子（佐賀大学医学部分子生命科学講座 細胞生物学分野）、高宮里奈（大阪大学大学院医学系研究科生化学）

のうち 20%に Cu, Zn-スーパーオキシドディスムターゼ（Cu, Zn-SOD）遺伝子（SOD1）変異が認められ、今まで 153 アミノ酸残基中 100 種類以上の変異が報告されている。しかし、その発症メカニズムはほとんど解明されていない。これまでの ALS 研究の結果、Cu, Zn-SOD 本来の機能を喪失するのではなく、変異タンパク質が細胞に対する毒性を獲得する、“gain of toxic function”により引き起こされる事が考えられており、これまでに、酸化ストレス、グルタ

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、進行性、且つ運動神経特異的な神経疾患である。ALSのうち、約 10%は家族性 ALS（FLAS）であるが、そ

ミン酸代謝異常、変異 Cu, Zn-SOD の凝集等が報告されている。また、最近では、異常リン酸化、異常タンパク質の蓄積、軸索輸送障害や、細胞内小器官輸送異常等が報告されてきている。弧発性及び家族性 ALS においても、運動神経細胞でニューロフィラメント、チューブリン、アクチン等の細胞骨格系タンパクの異常が報告されてきている。また、細胞周期に關与するタンパクの異常等が報告され、細胞周期の異常が神経細胞死に關与していると示唆されている。しかし、異常が起きているタンパクが、どのように変異 Cu, Zn-SOD に關与しているかは、いまだ不明のままである。今回の実験で我々は変異 Cu, Zn-SOD 高発現細胞を用い変異 Cu, Zn-SOD がどのように細胞周期に影響を与えるかを検討した。

B. 研究方法

神経芽細胞 Neuro 2a (N2a) に野生型 (WT) および変異型 Cu, Zn-SOD (G37R, G93A) を高発現させた細胞 (以下、WT 細胞、G37R 細胞、G93A 細胞とする) を作製し、cell growth、cell cycle の検討を行った。細胞骨格系タンパクはファロイジン及び抗チューブリン抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。さらに変異 Cu, Zn-SOD に結合しているタンパクを検索するため、SOD 発現細胞を 1% Nonidet p-40, 1% Triton の入った溶液で可溶化した画分を抗 Cu, Zn-SOD 抗体で免疫沈降を行い、この免疫沈降物の二次元電気泳動を行った。

C. 研究結果

ALS で見いだされている遺伝子の点変異のうち、G37R, G93A の変異 Cu, Zn-SOD 高発現 N2a 細胞

を作製した。G37R 細胞と G93A 細胞は両者とも野生型 SOD 高発現細胞に比べて cell growth の遅れが認められた。また、cell cycle の検討を行った所、G37R 細胞と G93A 細胞では G2/M 期の遅延が認められた。FCS (牛胎児血清) を細胞培養液中から取り除くと、WT 細胞ではほとんどの細胞が G0 期に戻るのに対し、変異 SOD 細胞では約 50% の細胞が G2/M 期に残っていた (図 1)。

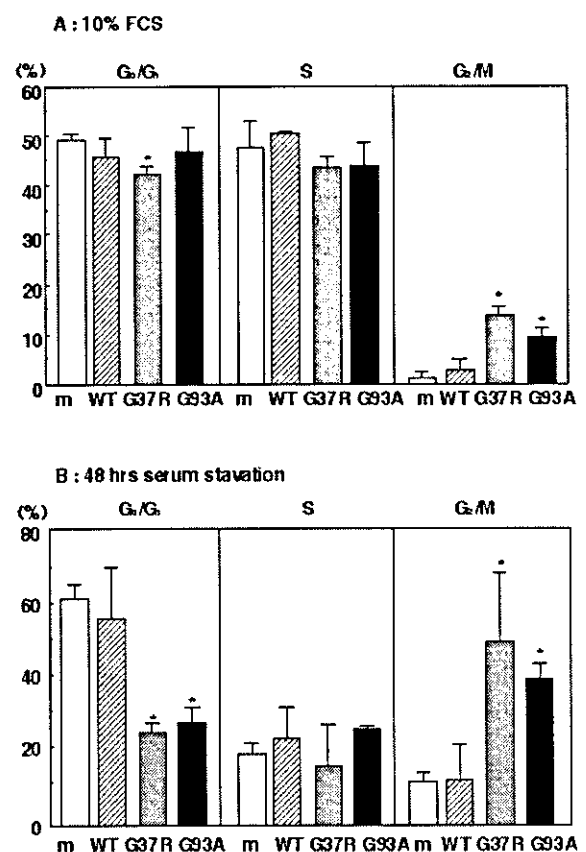


図 1 mock、WT、G93A 及び G37R 高発現細胞の細胞周期

G2/M 期の遅延として、細胞骨格系の異常が考えられるため、細胞骨格系タンパクの形態を検討した。その結果、すべての細胞においてチューブリンには変化が認められなかったが、ファロイジン染色を行った所、G37R、G93A 細胞に F-アクチンの異常が認められた。また、核染色

を行った所、G37R、G93A 細胞では核を二つ持つものが多く認められたことから、M 期に異常がある可能性が示唆された。次に、細胞で起きている変化をタンパクレベルで調べるために、二次元電気泳動を行った。細胞の可溶化画分の二次元電気泳動では、WT 細胞と G37R、G93A 細胞の間に大きな違いは認められなかったが、細胞の可溶化画分を抗 Cu, Zn-SOD 抗体で免疫沈降した後に二次元電気泳動をしたところ、40 kDa 付近に G37R 細胞、G93A 細胞ともに WT 細胞では認められないいくつかのスポットが認められた。アクチンの分子量が 43kDa であることから、このスポットのうち一つはアクチンであると考え、抗 Cu, Zn-SOD 抗体で免疫沈降後、二次元電気泳動を行い、抗アクチン抗体を用いウェスタンブロットを行った。その結果、WT 細胞の可溶化画分ではアクチン陽性のスポットは認められなかったが、G37R、G93A 細胞の可溶化画分にはアクチン陽性のスポットが認められた。また、逆に抗アクチン抗体で免疫沈降を行い、抗 Cu, Zn-SOD 抗体でウェスタンブロットを行った結果、同様の結果が得られた。以上の結果より変異 Cu, Zn-SOD はアクチンと結合している可能性が示唆された。

次に、変異 Cu, Zn-SOD がアクチンの重合に直接影響しているかを検討するため、*in vitro* のアクチン重合の系に精製した変異 Cu, Zn-SOD タンパクを直接加え実験を行った。その結果、変異 Cu, Zn-SOD は、アクチンの重合には影響しなかった。しかしながら、WT 及び G93A を加えた、アクチン重合時のサンプルを抗 Cu, Zn-SOD で免疫沈降を行い、さらに抗アクチン抗体でウェスタンブロットを行った結果、G93A を加えたアクチンサンプルの方が、WT を加えたサンプルより

も強い陽性を示した。この結果より、アクチンは直接変異 Cu, Zn-SOD と結合する可能性が示唆された。

D. 考察

FALS 変異 Cu, Zn-SOD 高発現 N2a 細胞では、cell growth の遅れが見られ、その原因として G2/M 期の遅延が考えられた。また、ファロイジンの染色により G37R、G93A 細胞では、F-アクチン異常が認められた。細胞可溶化画分を抗 Cu, Zn-SOD 抗体で免疫沈降をした後、二次元電気泳動を行った結果、G37R、G93A 細胞では 40 kDa 付近に WT 細胞では認められないいくつかのスポットが確認された。抗アクチン抗体によるウェスタンブロットの結果より、このスポットの一つはアクチンである事が確認された。

変異 Cu, Zn-SOD タンパクはなんらかの異常を有しており、細胞内小器官に異常をもたらす事が報告されている。我々はこれまでに変異 Cu, Zn-SOD は銅の結合力が落ちている事や非酵素化学的反応である糖化が更新している事を報告してきた。変異 Cu, Zn-SOD は糖化を起こす事により銅が外れやすくなり、活性酸素を生じやすくなる事を報告してきている。最近、F-, G-アクチンの酸化により、F-アクチンの異常が起きるという報告もある。従って、変異 Cu, Zn-SOD とアクチンの結合は、アクチン骨格の異常を引き起こす可能性があると考えられる。

また、FALS 患者さんの神経細胞死に細胞骨格の異常が深く関わっているという報告や、細胞骨格タンパクの異常があるという報告がなされてきている。例えば、ニューロフィラメントの凝集が ALS 発症の早い段階で認められる事、また変異 Cu, Zn-SOD トランスジェニックマウス

を用いた実験では、 β -アクチンの減少が起こっている事が報告がされている。現在、Cu, Zn-SOD がアクチンと結合する事により、どのようにアクチンに異常をもたらすか検討中である。

変異 Cu, Zn-SOD とアクチンとの結合は、変異 Cu, Zn-SOD の凝集とも関わっている可能性がある。ALS における病理学的検討より、変異 Cu, Zn-SOD の凝集は ALS 発症の早い段階で認められる。また、最近 ALS における Cu, Zn-SOD の凝集体中に Bcl-2 が含まれている事が運動神経細胞のミトコンドリアで報告されている。この変異 Cu, Zn-SOD の凝集が ALS において運動神経細胞内の物質移送系の破綻を引き起こし、運動神経細胞死につながるのではないかと示唆されてきている。我々は、この Cu, Zn-SOD の凝集は変異 Cu, Zn-SOD の立体構造変化により引き起こされ、アクチンを含めた他のタンパクとの異常な結合が ALS の原因の一つとなると考えている。現在この変異 Cu, Zn-SOD と他のタンパクとの異常なインタラクションがどのようにして起こるかを検討中である。

Hepatocyte Growth Factor (HGF) は、アクチンを含めた細胞骨格系のタンパクの再構築に有効である事が知られている。今回の実験より、変異 Cu, Zn-SOD 高発現細胞では、F-アクチンに異常が認められた。今後は、HGF を遺伝子導入する事でこのアクチンの異常が解消されるかを検討し、HGF を ALS の治療に用いる有効性について検討したいと考えている。

E. 結語

変異 Cu, Zn-SOD を高発現させた細胞において、cell growth の遅れが見られ、G2/M 期の遅延が

認められた。また、変異 Cu, Zn-SOD 高発現細胞では F-アクチンの異常が認められ、抗 Cu, Zn-SOD 抗体を用いた二次元電気泳動より、変異 Cu, Zn-SOD とアクチンとの結合が示された。変異 Cu, Zn-SOD の細胞骨格異常を引き起こす原因を解明する事は、ALS 発症のメカニズムの解明や ALS 治療につながるものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Takamiya R., Takahashi M., Park Y.S. Tawara Y., Fujiwara N., Miyamoto Y., Gu J., Suzuki K. and Taniguchi N.: Overexpression of Mutated Cu,Zn-SOD in Neuroblastoma Cells Results in Cytoskeletal Change. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* (2005) **288**, C253-259

(2) Fujiwara N., Miyamoto Y., Ogasahara K., Takahashi M., Ikegami T., Takamiya R., Suzuki K. and Taniguchi N.: Different Immunoreactivity against Monoclonal Antibodies between Wild-type and Mutant Copper/Zinc Superoxide Dismutase Linked to Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Biol. Chem.* (2005) **280**, 5061-5070

2. 学会発表

藤原範子、宮本泰豪、高橋素子、大河原知水、江口裕伸、谷口直之、鈴木敬一郎 (2004) 家族性筋萎縮側索硬化症 (FALS) の原因となる変異 Cu/Zn-スーパーオキシドディスムターゼの構造変化と不安定性. 過酸化脂質・フリーラジカル学会第 28 回大会. 10. 28-29, 名古屋. (過酸化脂質研究, 28, 42, 2004.)

H. 知的財産権の出願・登録状況なし。

SOD1 変異体をターゲットとする新規ヒトユビキチンリガーゼ NEDL1 および NEDL2 の
神経細胞死における役割に関する研究

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所 所長

研究要旨

家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）の約20%はSOD1遺伝子の生殖系統における変異から生じるが、その詳細な分子機構はまだ不明である。我々は前回の報告で、小児神経芽腫 cDNA ライブラリーより、神経組織特異的に発現する新規ヒトユビキチンリガーゼ NEDL1 を同定した。NEDL1 は正常な SOD1 とは結合せず SOD1 変異体と特異的に結合し、ユビキチン化による分解を引き起こす一方、強固な結合体を形成し、細胞内封入体中に沈着した。また、NEDL1 が Wnt 細胞内情報伝達系の重要な制御因子である Dishevelled-1 (Dvl-1) をユビキチン化の基質とするも明らかにし、NEDL1 と SOD1 変異体との相互作用が SOD1 変異体由来 FALS 発症の一因となる可能性が示唆された。本年度は、これらの結果を踏まえて、以下のことを明らかにした。1) NEDL1 を細胞に遺伝子導入したところ、colony formation assay および *in situ* TUNEL assay により、NEDL1 の過剰発現はアポトーシスを誘導した。2) NEDL1 のファミリーである NEDL2 を新たにクローニングした。また、他の HECT 型ヒトユビキチンリガーゼを含めて検討したところ、3種の酵素が NEDL1 よりも弱いながら変異型 SOD1 をユビキチン化による分解のターゲットにすることが明らかになった。3) NEDL2 も、NEDL1 と同様、Dvl-1 をユビキチン化による分解のターゲットとした。4) NEDL2 は、神経細胞死の制御に重要な p73 分子と直接結合し、ユビキチン化するにもかかわらず p73 を安定化しアポトーシスを誘導した。これらの結果より、NEDL1 を含む HECT 型ユビキチンリガーゼは、ターゲットとしての変異型 SOD1 および Dvl-1 に対し redundancy と specificity を有し、神経組織特異的に発現する NEDL1 の ALS 発症における重要性がさらに明らかになった。

A. 研究目的

前年度までの研究により、神経組織特異的に発現する新規ヒトユビキチンリガーゼ NEDL1 は Wnt 細胞内情報伝達系で重要な制御因子である Dishevelled-1 (Dvl-1) をユビキチン化の基質とし、また小胞体トランスロコンの構成タンパクで SOD1 変異体と結合する TRAP- δ と結合した。さらに、NEDL1 は、正常な SOD1 とは結合せず SOD1 変異体と特異的に結合し、ユビキチン化による分解を引き起こした。また、興味深いことに、その結合、ユビキチン化、分解の程度は、その SOD1 変異体が原因となる FALS の臨床的重症度と強く相関した。免疫組織化学染色でも、NEDL1 はヒト FALS 並びに SOD1 変異体トランスジェニックマウスの脊髄運動ニューロン lewy body-like hyaline inclusions に陽性であった。これらの結果から、NEDL1 と SOD1 変異体との相互

作用は SOD1 変異体に由来する FALS 発症の一因となる可能性が示唆された。そこで、神経特異的な品質管理ユビキチンリガーゼとしての NEDL1 の生理的な機能の解明、および SOD1 変異体と相互作用し FALS 発症に関わる他の因子の同定を目的とした。

B. 研究方法

(1) Colony formation assay と *In Situ* TUNEL assay
培養細胞に NEDL1 の発現ベクターを遺伝子導入し、G418 抗生物質で選び、2週間に渡って形成された colony を染色した。また、培養細胞に NEDL1 と EGFP を共同導入し、48時間後 *In Situ* TUNEL 染色キットで染め、共焦点顕微鏡を用い、NEDL1 がアポトーシスを誘導するかどうかを検討した。

(2) 免疫沈降および Western Blotting
培養細胞に SOD1 変異体 (A4V) その他の発現ベク

ターを導入し、免疫沈降法および Western Blotting により結合の確認を行った。

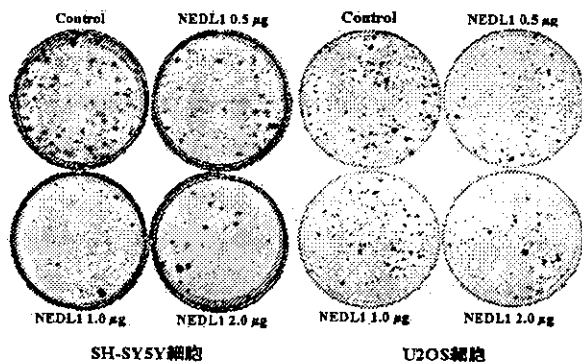
(3) 蛋白質間相互作用、基質同定、チェイス実験
一過性の遺伝子発現による免疫沈降法並びにウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* 転写/翻訳法により蛋白質間結合の確認を行った。また、培養細胞内でのユビキチン化の検討も行った。さらに蛋白質合成阻害剤サイクロヘキシミドを用いたチェイス実験により SOD1 変異体蛋白の半減期の検討も行った。

C. 研究結果

(1) NEDL1 による細胞のアポトーシス誘導

NEDL1 が細胞増殖或いはアポトーシスにどのような機能を担うかを調べるため、colony formation assay を行った。その結果、NEDL1 の過剰発現により、形成した colony の数はコントロールと比べ有意に減少した。さらに、*in situ* TUNEL assay により、NEDL1 を過剰に発現した細胞では TUNEL 染色陽性である細胞の比率がコントロールに比し有意に高くなることが判明した (図 1)。

図 1. NEDL1 過剰発現による Colony forming activity



(2) NEDL2 のクローニングとその組織発現

NEDL1 に相同性をもつ新規ユビキチンリガーゼを見出すために database を探索したところ、1572 アミノ酸から成る 193 kDa の NEDL2 を見出し、その全長をクローニングした。NEDL1 と同様に、C2 ドメイン、2つの WW ドメイン、COOH-端に HECT ドメインを持ち、ユビキチンリガーゼ活性を有した。NEDL1 とは異なって、ほとんどのヒト組織で発現を認めた。

(3) HECT 型ヒトユビキチンリガーゼによる変異型 SOD1 のユビキチン化

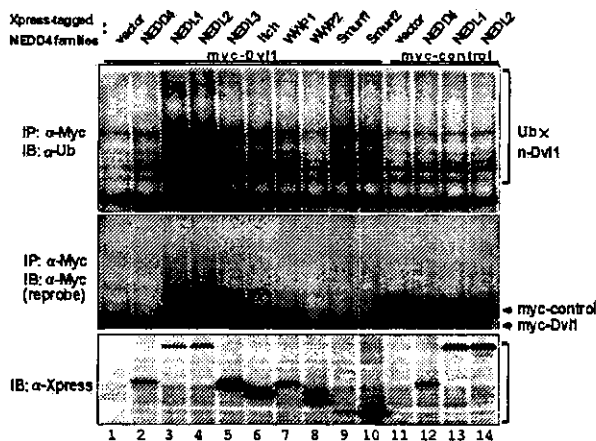
NEDL1, NEDL2 を含む 9 種の HECT 型ヒトユビキチンリガーゼについて、変異型 SOD1 をユビキチン

化のターゲットにするかどうか調べたところ、NEDL1 より活性は低いものの、3 種の酵素が同様に変異型 SOD1 を基質にすることが明らかになった。

(4) NEDL2 による Dvl-1 のユビキチン化分解

NEDL2 は NEDL1 と極めて高い相同性を有するため、前者が NEDL1 と同様、Dvl-1 を基質とすることについて検討した。その結果、他の HECT 型ヒトユビキチンリガーゼとは異なり、その両者が特異的に Dvl-1 をユビキチン化による分解の基質に

図 2. NEDL1, NEDL2 は特異的に Dvl-1 を Ub 化する



することが明らかになった (図 2)。

(5) NEDL2 による p73 の安定化とアポトーシス誘導

我々は以前、p73 が、その splicing variant である deltaNp73 とともに、神経細胞死の制御において重要な働きをしていることを報告した。今回、NEDL2 が p73 と直接結合することを見出した。しかし、NEDL2 は p73 をユビキチン化するにもかかわらず逆に安定化し、アポトーシスの誘導を促進した。

D. 考察

SOD1 変異体は 1993 年 FALS の原因遺伝子として発見されたが、FALS 発症の詳細な分子機構はまだ不明であり、有効な治療法も確立されていない。従って、SOD1 変異体と相互作用し、SOD1 変異体の存在により制御される因子の同定は、SOD1 変異体由来の FALS 発症機構の解明に重要と思われる。

我々は最近、新規神経特異的品質管理ユビキチンリガーゼ NEDL1 を同定した。これまでの研究により、NEDL1 は Wnt 細胞内情報伝達系の重要な制御因子である Dvl-1 および SOD1 変異体と結合し、ユビキチン化による分解を引き起こすことが明らかになっている。今回の研究結果から、NEDL1 自体の過剰発現により、細胞のアポトーシス誘導が促進されることがさらに明らかになった。NEDL1 は神

経組織特異的に発現していることから、前回までの研究結果と合わせると、SOD1 変異体との相互作用により NEDL1 の機能の異常が誘起され、そのことが FALS における運動神経変性の分子的背景になっている可能性が考えられる。

我々が新たにクローニングした NEDL2 は、機能的には NEDL1 と類似しており、共に Dvl-1 をユビキチン化による分解のターゲットにしていた。しかしながら、変異型 SOD1 をユビキチン化する機能はほとんどなく、むしろ他の HECT 型ヒトユビキチンリガーゼ 3 種にその活性が見られたことから、NEDL1 を含む HECT 型ユビキチンリガーゼは、ターゲットとしての変異型 SOD1 および Dvl-1 に対し redundancy と specificity を有しているものと思われた。

一方、NEDL2 が神経細胞の生存と死を制御する重要な分子である p73 と結合し、それをユビキチン化するという事実は、NEDL2 以外の HECT 型ユビキチンリガーゼファミリーも p73 の制御に関わっている可能性を示唆しており、ALS における運動神経細胞死の誘導機構を理解するうえで重要な示唆を与える知見であった。現在 NEDL1 と p73 の関係についても検討中である。

今回の結果により、神経組織特異的に発現する NEDL1 の ALS 発症における重要性がさらに裏付けられた。

E. 結論

(1) NEDL1 の過剰発現はアポトーシスを誘導した。
(2) NEDL1 のファミリーである NEDL2 を新たにクローニングした。NEDL1 と同様、NEDL2 も Dvl-1 をターゲットとし、ユビキチン化による分解を促進した。
(3) NEDL1 を含む HECT 型ヒトユビキチンリガーゼファミリーについて検討したところ、3 種の酵素が NEDL1 よりも弱いながら変異型 SOD1 をユビキチン化による分解のターゲットにすることが明らかになった。
(4) NEDL2 は、神経細胞死の制御に重要な p73 分子と直接結合し、ユビキチン化するにもかかわらず p73 を安定化しアポトーシスを誘導した。
(5) NEDL1 を含む HECT 型ユビキチンリガーゼは、ターゲットとしての変異型 SOD1 および Dvl-1 に対し redundancy と specificity を有し、神経組織特異的に発現する NEDL1 の ALS 発症における重要性がさらに明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 ubiquitin-protein isopeptide ligase for dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J Biol Chem.* 279:11327-35, 2004.

2) Nakagawara A. Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link. In *NGF and Related Molecules in Health and Disease*, Ed. By Luigi Aloe and Laura Calza, Progress in Brain Research Vol. 146, 2004, Elsevier Science Publisher, pp233-242.

3) Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279:25549-25561. 2004.

4) Miyazaki K, Ozaki T, Kato C, Hanamoto T, Fujita T, Irino S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 308:106-113, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願中 1 件

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

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた挑戦的治療法の開発と

その基盤研究

ALS に対する HGF 遺伝子治療法の開発・適用の基盤研究

分担研究者 船越 洋、角山 圭一、宮澤 大介、中村 敏一

大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学講座分子組織再生分野助教授

研究要旨

HGF が新規神経栄養因子として ALS モデルトランスジェニックマウスの運動ニューロンに対して直接栄養作用（活性型 caspase-1 や活性型 caspase-9 の誘導抑制）を示すことに加え、グリア細胞に働きその機能改善作用（グリア細胞特異的グルタミン酸トランスポーター:EAAT2/GLT1 の発現誘導を介した運動ニューロンへのグルタミン酸毒性の緩和作用）により、ALS の病態を 2 重に改善、運動機能を維持し、寿命を延長することを示してきた。しかし、この結果はトランスジェニックマウスを用いた結果であり、ヒトへこのままの形で適用することは難しい。そこで我々は、HGF の供給方法として、遺伝子治療に適したベクターの選択とその投与方法について検討した。アデノ随伴ウイルスベクター（AAV2, AAV4, AAV5）および複製能欠失型単純ヘルペス I 型ウイルスベクター（HSV1）について脊髄へ供給できる HGF 蛋白質量（ELISA）およびその発現範囲（広さ）について解析した結果、検討した範囲では AAV2-HGF および HSV1-HGF が HGF 遺伝子治療に適用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

HGF が ALS モデル Tg マウスの進行抑制・改善に有用であることは、HGF 遺伝子を ALS-Tg マウスの神経系にトランスジェニックマウスのアプローチで明らかとなったが、この方法の臨床適用は容易ではない。本研究では、ALS 治療に最適な HGF 発現遺伝子治療ベクターの検討とどの有効な供給方法を検討することにある。

B. 研究方法

(1) AAV2-LacZ, AAV4-LacZ, AAV5-LacZ, AAV2-HGF, AAV4-HGF の準備：自

治医科大学分子遺伝子治療学教室との共同研究の形で rat HGF 遺伝子発現ウイルス発現ベクターを準備した。

- (2) HSV1-LacZ, HSV1-HGF の準備、大阪医科大学脳神経外科との共同研究の形で rat HGF 遺伝子を発現する複製能欠失型 HSV1 ウイルスベクター（London 大学 Coffin らがオリジナルに開発したベクターをもとに作成）を大量に準備した。
- (3) 野生型動物は Wistar ラットを、ALS モデル Tg 動物（Tg-SODH46R rat）

は東北大学神経内科から供与を受けたもの、およびそれを繁殖したものを使用した。

(4) 各種ウイルスベクターの ALS-Tg 動物への投与：

① 脊髄中への直接投与：脳定位固定装置を用いて定速 injection 装置を用いて腰髄レベルで脊髄に直接ウイルスベクターを投与した。

② 脳脊髄液中への投与：臨床適用を mimic する意味で腰部より intrathecal injection 法を用いてウイルスベクターを脳脊髄液 (CSF) 中に single injection した。

(5) HGF 蛋白質定量：ELISA 法で測定した。LacZ 発現に対する beta-Gal 染色：常法によった。

(6) ALS モデル Tg 動物への HGF 発現ウイルスベクター投与の効果の解析：ALS-Tg rat (SODH46R) に発症時期に HGF 発現ウイルスベクターを投与し、個体死までの期間延長 (寿命延長) 効果等につき解析した。

C. 研究結果

(1) 各種 LacZ 発現ウイルスベクター (AAV2-LacZ, AAV4-LacZ, AAV5-LacZ および HSV1-LacZ) の野生型ラット脊髄への直接投与群の組織解析：Beta-gal 染色による解析結果、AAV2, AAV4, HSV1 については injection 近傍に大型の運動ニューロンを含む大量の染色細胞を認めた。

染色強度は AAV2 で最も強かった。一方染色される細胞群の範囲はいずれも injection 部位から離れるにつれ減少した。

(2) 各種 HGF 発現ウイルスベクター (AAV2-HGF, AAV4-HGF および HSV1-HGF) の野生型ラット脊髄への直接投与群の HGF 蛋白質発現量の解析：LacZ 発現ウイルスベクターの結果から、HGF 発現ウイルスベクターとしては AAV2-HGF, AAV4-HGF, HSV1-HGF に絞る脊髄中の HGF 蛋白質発現量の解析を行った結果、AAV2-HGF および HSV1-HGF 投与群においては、injection 部位近傍 (脊髄の下 1/3) における HGF 蛋白質レベルが、内因性 HGF レベルの 3~5 倍に上昇した。一方で、injection 部位から離れた領域 (脊髄上部 1/3 および中部 1/3) においては HGF の発現レベルが顕著に低下し、特に AAV2 においてその傾向が顕著であった。

(3) 各種 LacZ 発現ウイルスベクター (AAV2-LacZ, AAV4-LacZ, AAV5-LacZ および HSV1-LacZ) の野生型ラット脊髄腔への intrathecal injection 群の組織解析：AAV2, AAV4, HSV1 については、広範囲の脊髄レベルについて beta-gal 陽性の細胞群を認めた。一方 AAV5-HGF についても陽性細胞を認めたが background とのレベルの差が少なかった。