

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：
運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

平成 16 年度 総括研究年度終了報告書

主任研究者 小柳 清光

平成 17 年 (2005 年) 3 月

目次

I. 総括研究年度終了報告

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：
運動ニューロンにおける蛋白合成系の異常と
治療法開発の試み

小柳清光 -----5

II. 分担研究年度終了報告

1. 筋萎縮性側索硬化症(ALS)前角細胞リボソーム RNA 遺伝子
転写活性と細胞変性/ヌクレオリン

小柳清光 -----9

2. 異常蛋白から追求する家族性 ALS の
発症メカニズム

三澤日出巳 -----13

3. 剖検とリソース、臨床病理学的検索および
ALS における痴呆の責任病巣

水谷俊雄 -----17

4. 新規治療法の開発

渡部和彦 -----21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----27

IV. 研究成果の刊行物・別刷り -----31



厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

I. 総括研究年度終了報告書

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

主任研究者 小柳清光 東京都神経科学総合研究所神経病理学部門長・参事

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の脊髄・脳幹の運動ニューロンの蛋白合成系に焦点を合わせ、病的メカニズムの解明と新規治療法を開発する目的で研究を進め、16年度下記の成果を得た。

脊髄前角細胞におけるリボソーム(r)RNA 遺伝子転写活性に関し、早発老化モデルと言われる klotho マウスにおいて、脊髄前角細胞における Klotho 蛋白形成不全と、リボソーム RNA 遺伝子の転写活性の減少、胞体内 RNA および粗面小胞体の減少を見出した。ALS 前角細胞の所見との類似性を指摘し、ALS における klotho 遺伝子の検索の必要性と、ALS 研究モデルとしての klotho マウスの有用性を報告した。

家族性 ALS のうち常染色体劣性遺伝で若年発症を特徴とする ALS2/ALSIN において、ALS2 蛋白と結合する蛋白の同定を試み、それが微小管結合活性を持つ既知の蛋白であることを突き止めた。この蛋白の機能障害による軸索輸送障害が ALS2 の発症と関連している可能性を指摘した。

ラットを用いた前角細胞の軸索障害モデルにおいて、障害部位への酸化型ガレクチン-1 の投与で、軸索障害が形態学的にも機能的にも有意に回復が進むことを見出し、脊髄運動ニューロン障害時の機能回復に対する神経栄養因子酸化型ガレクチン-1 の有用性を報告した。

分担研究者

三澤日出巳 東京都神経科学総合研究所主任研究員
水谷俊雄 東京都立神経病院部長
渡部和彦 東京都神経科学総合研究所副参事研究員

A. 研究目的

ALS 脊髄・脳幹運動ニューロンの蛋白合成系に焦点を合わせ、新たな視点から弧発性および家族性 ALS の病態究明と治療法の開発を目指す。

I. ALS 前角細胞における蛋白合成系の

異常と細胞脱落との関連の解明。

II. 家族性 ALS の新規原因遺伝子

ALS2/ALSIN 欠失による運動ニューロン脱落メカニズムの解析。

III. 新規の神経栄養因子および組み換えウイルス、移植による細胞治療法の開発。

IV. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) で観察される痴呆症状の形態学的責任病巣の検討。

B. 研究方法

I. ALS の発症メカニズムの追求：

(1) ALS の前角細胞における、蛋白合成系「最上流」と考えられるリボソーム (r)RNA 遺伝子の転写活性減少メカニズムを解明する。これと、蛋白合成系「下流」の rRNA の量、粗面小胞体の変化、Golgi 小体の断片化、ユビキチン化封入体などが「一連の」変性であるか検討する。

(2) 家族性 ALS の ALS2/ALSIN 蛋白と結合して運動ニューロン変性と係わると考えられる蛋白を同定する。

II. モデル動物を用いた治療法の開発：

成体ラット顔面神経引き抜き損傷モデルと前角細胞軸索損傷モデルを用いて、脱落を阻止する有効な新規組み換えウイルス、栄養因子を見出す。

III. ALS-痴呆：

大脳側頭葉を免疫組織学的に解析

し、痴呆の発症機構を追求する。

C. 研究結果と考察

脊髄前角細胞におけるリボソーム (r)RNA 遺伝子転写活性に関し、早発老化 klotho マウス前角細胞における Klotho 蛋白形成不全と rRNA 遺伝子の転写活性の減少、胞体内 RNA および粗面小胞体の減少を見出した。ALS との関連性を指摘した。

家族性 ALS2/ALSIN において、ALS2 蛋白と結合する蛋白が微小管結合活性を持つ蛋白であり、軸索障害の可能性を指摘した。

ラット前角細胞軸索障害モデルは、酸化型ガレクチン-1 投与で障害が形態学的にも機能的にも有意に回復した。

痴呆の無い ALS7 症例中 1 例に海馬支脚 prosubiculum の変性所見を認めた。

D. 結論

ALS における klotho 遺伝子検索の必要性和 ALS 研究モデルとしての klotho マウスの有用性を報告した。ALS2 蛋白は微小管結合活性を持つ既知の蛋白と結合することを突き止めた。酸化型ガレクチン-1 は前角細胞障害に有効である。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表 原著論文 計 18 編。

そのうちの主なもの

- 1) Anamizu Y, Kawaguchi H, Seichi A, Yamaguchi S, Kawakami E, Kanda N, Matsubara S, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nakamura K, Oyanagi K. Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn. Acta Neuropathol. 印刷中
- 2) Tateno, M., Sadakata, H., Tanaka, M., Itoharu, S., Shin, R.M., Miura, M., Masuda, M., Aosaki, T., Urushitani, M., Misawa, H. and Takahashi, R. Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of

amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. Hum. Mol. Genet. 2004, 13, 2183-2196

- 3) Kadoya T, Oyanagi K, Kawakami E, Hasegawa M, Inagaki Y, Sohma Y, Horie H. Oxidized Galectin-1 advances the functional recovery after peripheral nerve injury. Neurosci. Lett. 印刷中

2. 学会発表 国内 計 30 編、国外 計 3 編。

G. 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（こころの健康科学研究事業）

II. 分担研究年度終了報告書

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

1. ALS 前角細胞リボソーム RNA 遺伝子転写活性と 細胞変性/ヌクレオリン

分担研究者 小柳清光 東京都神経科学総合研究所部門長・参事

研究要旨

ALS 前角細胞の変性脱落機序を解明するため、蛋白合成系の「最上流」にあると考えられるリボソーム(r)RNA 遺伝子の転写活性減少のメカニズムと、「下流域」の変性所見との関連性を解明する。16 年度の研究で、早発老化モデルと言われる klotho マウスの脊髄前角細胞における Klotho 蛋白形成不全と、リボソーム RNA 遺伝子の転写活性の減少、胞体内 RNA および粗面小胞体の減少を見出した。本研究では、これらの所見が ALS 前角細胞の所見と類似する事を指摘し、ALS における klotho 遺伝子の検索の必要性和、klotho マウスが ALS の研究モデルとして有用であることを報告した。またラットを用いた脊髄前角細胞の軸索障害モデルにおいて、酸化型ガレクチン-1 を軸索障害部位に投与すると、軸索障害の形態学および機能的回復が有意に進むことを見出し報告した。

A. 研究目的

ALS 前角細胞の変性脱落機序を解明するため、蛋白合成系の「最上流」にあると考えられるリボソーム(r)RNA 遺伝子の転写活性減少のメカニズムを明らかにする。この所見を、蛋白合成系のより「下流」にある、リボソーム RNA の量、粗面小胞体の変化、Golgi 小体の断片化などと対比し、ALS 前角細胞におけるこれらの変化が蛋白合成

系の「一連の」変性であるか否かを明らかにする。また成体ラット前角細胞の軸索損傷モデルに対する、新たな神経栄養因子酸化型ガレクチン-1 の保護・回復効果を検討する。

B. 研究方法

早発老化モデルと言われる klotho マウスにおいて、脊髄前角細胞における Klotho 蛋白形成不全と、リボソーム RNA 遺伝子の転写活性の減少、胞体内

RNA および粗面小胞体の検討を行う。すなわち、klotho 変異マウスは8週から10週で死亡する。本研究では7週齢の klotho 変異マウス (KL-/-) と、野生型 (WT) マウスを使用した。KL-/-マウス7匹、WT 5匹は4%パラホルムアルデヒドで経心的に灌流固定し第5頸髄を切り出しパラフィン包埋した。6ミクロン厚の切片を作製し光学顕微鏡および免疫組織化学的、レクチン化学的に観察した。電顕観察用にはKL-/-mouse と wild type mouse 各2匹ずつ2.5%グルタルで経心的に灌流固定し第5頸髄を取り出し標本化した。

脊髄における klotho gene の発現を、RT-PCR法を用い、検討した。

Hematoxylin-eosin, Kluyver-Barrera 染色による光学顕微鏡観察、電子顕微鏡観察に加え免疫組織化学的観察、レクチン化学的観察を行った。また第5頸髄前角の核小体をもつ神経細胞の面積を計測した。計測は各症例とも第5頸髄部を4分割してその間の3枚につき行った。

またラットを用いた脊髄前角細胞の軸索障害モデルに対する酸化型ガレクチン-1投与による、軸索障害の形態学および機能的回復を検討した。すなわち、成熟ラットを用い、座骨神経を切断-縫合後凍結し、その部位に種々の濃度の酸化型ガレクチン-1を浸透圧ポンプで投与して100日後まで観察し

た。臨床症状は、下肢指の開大の程度で評価し、形態学的評価は、21mm遠位部における有髄線維を定量的に検討した。

C. 研究結果と考察・結論

早発老化モデルと言われる klotho マウスにおいて、脊髄前角細胞における Klotho 蛋白形成不全と、リボソーム RNA 遺伝子の転写活性の減少、胞体内 RNA および粗面小胞体の減少を見出した。ALS 前角細胞の所見との類似を指摘し、ALS における klotho 遺伝子の検索の必要性と、klotho マウスが ALS の研究モデルとして有用であることを報告した。

ラットを用いた脊髄前角細胞の軸索障害モデルにおいて、酸化型ガレクチン-1を軸索障害部位に投与すると、軸索障害の形態学および機能的回復が有意に進むことを見出した。

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kikuchi-Horie K, Kawakami E, Kamata M, Wada M, Hu J-G, Nakagawa H, Ohara K, Watabe K, Oyanagi K. Distinctive expression of midkine in the repair period of rat brain during neurogenesis: immunohistochemical and immunoelectron microscopic observations. J Neurosci Res

- 2004;75:678-87.
- 2) Ito, U., Kuroiwa, T., Hanyu, S., Hakamata, Y., Kawakami, E., Nakano, I., Oyanagi, K., Ultrastructural temporal profile of the dying neuron and surrounding astrocytes in the ischemic penumbra: apoptosis or necrosis?, *Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia V*, Buchan, A.M., 2004; 189-196
- 3) Anamizu Y, Kawaguchi H, Seichi A, Yamaguchi S, Kawakami E, Kanda N, Matsubara S, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nakamura K, Oyanagi K. Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn. *Acta Neuropathol.* 印刷中
- 4) Oyanagi K., Yamazaki M, Kawakami E, Morita T, Makifuchi T, Takahashi H. Amyotrophic lateral sclerosis: On the origin on the degenerated fibers in the white matter of the spinal cord. *Amyotrophic lateral sclerosis: New Research*, Nova Science Publishers, 印刷中
- 5) Oyanagi K. The nature of the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam and magnesium deficiency. *Parkinsonism Rel. Dis.* 印刷中
- 6) Kadoya T, Oyanagi K., Kawakami E, Hasegawa M, Inagaki Y, Sohma Y, Horie H. Oxidized Galectin-1 advances the functional recovery after peripheral nerve injury. *Neurosci. Lett.* 印刷中
- ## 2. 学会発表
- 1) 小柳清光、山崎峰雄、渡部和彦、河上江美子、和田学、森田俊、高橋均、加藤修一、水谷俊雄、林秀明、筋萎縮性側索硬化症: 折り畳みに関与する蛋白からみた前角細胞小胞体の変化, 第45回日本神経学会(2004, 5. 12)
- 2) 山崎峰雄、長谷川成人、森修、片山泰朗、小柳清光、グアム島パーキンソン病痴呆症では大脳皮質と白質でタウアイソフォームが異なる, 第45回日本神経学会(2004, 5. 14)
- 3) 小柳清光、山崎峰雄、渡部和彦、河上江美子、和田学、森田俊、高橋均、加藤修一、水谷俊雄、林秀明、筋萎縮性側索硬化症: 小胞体で蛋白の折り畳みに関与すると言われるシャペロンからみた前角細胞の変化, 第45回日本神経病理学会(2004, 5. 27)
- 4) 山崎峰雄、長谷川成人、森修、片山泰朗、小柳清光、大脳皮質と白質で異なるタウアイソフォーム: グアム島パーキンソン病痴呆症における

観察, 第45回日本神経病理学会
(2004, 5.26)

5) 伊藤梅男、黒岩俊彦、袴田陽二、河上江美子、中野今治、小柳清光, 虚血性ペナンプラにおける播種性神経細胞死後の neuronal remodeling process: 死亡した神経細胞を囲む神経細胞突起, 第45回日本神経病理学会(2004, 5.26)

6) 小柳清光、河上江美子、穴水依人、星地亜都司、渡部和彦, ヒト脊髄損傷の病態に近似し、病変の強さをコントロールでき、病変の再現性が確保できる新しい脊損モデルの開発, 第45回日本神経病理学会(2004, 5.26)

7) Horie, H., Oyanagi, K., Nakajima, S., Kawakami, E., Sato, M., Kadoya, T., Yoshioka, T., Tetzlaff, W., Axonal plasticity in neurite extension, 第47回日本神経化学会大会・第27回日本神経科学大会・合同大会, (2004, 9.22)

8) Horie, H., Oyanagi, K., Nakajima, S., Kawakami, E., Sato, M., Kadoya, T., Yoshioka, T., Tetzlaff, W., Pre-axotomy enhances neurite regeneration from axons removed from their cell bodies, 4th Asia Pacific Symposium on Neural Regeneration, (2004, 12.5)

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。

F. 知的財産権の出願・

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

II. 分担研究年度終了報告書

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

2. 異常蛋白から追求する家族性 ALS の発症メカニズム

分担研究者 三澤日出巳 東京都神経科学総合研究所主任研究員

研究要旨

家族性 ALS の原因遺伝子（欠失）として新規同定された ALS2/ALSIN の病的役割を解明する目的で研究を進めた。このため、ALS2/ALSIN 蛋白と結合し運動ニューロン変性と係わると考えられる ALS2BP 蛋白の同定を試み、分子量約 120 kDa の特異的バンドを検出した。質量分析 (MS/MS) による解析から、この 120 kDa のタンパク質は微小管 (microtubule) 結合活性を持つ既知のタンパク質であることが判明した。これらの解析から「ALS2 発症において、神経軸索の安定性の低下、およびそれに起因する軸索を介する物質輸送系の障害」が ALS 病態の形成へ関与する可能性を指摘した。

A. 研究目的

家族性 ALS の原因遺伝子（欠失）として新規同定された ALS2/ALSIN の病的役割を解明する。このための ALS2/ALSIN 蛋白特異抗体はすでに開発した。本研究によって ALS2/ALSIN 蛋白と結合し運動ニューロン変性と係わると考えられる ALS2BP 蛋白を同定し家族性 ALS の新規原因遺伝子 ALS2/ALSIN 欠失がどんな機序で運動ニューロン脱落を惹起するか解析する。

B. 研究方法

ヒト ALS2/ALSIN と特異的に反応す

るポリクローナル抗体をカラムに固定したアフィニティーカラムを作製して、ALS2/ALSIN と結合するタンパク質の同定を試みる。その後質量分析 (MS/MS) による解析を行って、GST 融合タンパク質を用いた pull-down 法および特異抗体を用いた免疫沈降法にて、このタンパク質がどんなタンパク質と結合するか検討する。

C. 研究結果と考察・結論

本カラムを用いて ALS2/ALSIN と共精製される分子量約 120 kDa の特異的バンドを検出した。質量分析 (MS/MS)

による解析から、この 120 kDa のタンパク質は微小管 (microtubule) 結合活性を持つ既知のタンパク質であることが判明した。そこで、ALS2 が神経細胞内の細胞骨格系タンパク質、特に微小管構成タンパク質と結合する可能性を、GST 融合タンパク質を用いた pull-down 法および特異抗体を用いた免疫沈降法にて検討した。どちらの方法でも微弱な結合は観察されるものの、はっきりとした結論は得られなかった。このため、両者の結合は定常状態では極めて弱く、セカンドメッセンジャーなどにより誘導される可能性を想定して実験を行っている。これらの解析から「ALS2 発症において、神経軸索の安定性の低下、およびそれに起因する軸索を介する物質輸送系の障害」が ALS 病態の形成へ関与する可能性が考えられた。

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Buccafusco, J.J., Beach, J.W., Terry, A.V., Doad, G.S., Sood, A., Arias, E., Misawa, H., Masai, M., Fujii, T. and Kawashima, K. Novel analogs of choline as potential neuroprotective agents. *J. Alzheimers Dis.* 6, 2004, S85-S92
2. Tateno, M., Sadakata, H., Tanaka, M., Itohara, S., Shin, R.M., Miura, M., Masuda, M., Aosaki, T., Urushitani, M., Misawa, H. and Takahashi, R. Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 2004, 13, 2183-2196
3. Oda, Y., Muroishi, Y., Misawa, H. and Suzuki, S. Comparative study of gene expression of cholinergic system-related molecules in the human spinal cord and term placenta. *Neuroscience*, 2004, 128, 39-49 (2004)
4. Burau, K., Stenull, I., Huber, K., Misawa, H., Berse, B., Unsicker, K. and Ernsberger, U. c-ret regulates cholinergic properties in mouse sympathetic neurons: evidence from mutant mice. *Eur. J. Neurosci.*, 2004, 20, 353-362
5. Mori, T., Yuxing, Z., Takai, H., Takeuchi, M., Iseki, K., Hagino, S., Kitanaka, J-i., Takemura, M., Misawa, H., Ikawa, M., Okabe, M. and Wanaka, A. The LIM homeobox gene, L3/Lhx8, is necessary for proper development of basal forebrain cholinergic neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 2004, 19, 3129-3141
6. Nakata, K., Okuda, T. and Misawa, H. Ultrastructural localization of

high-affinity choline transporter in the
rat neuromuscular junction:

Enrichment on synaptic vesicles.

Synapse, 2004, 53, 53-56. onference
(INRC), Albi, France (1988)

2. 学会発表

1. 中田和子、奥田隆志、三澤日出巳.
高親和性コリントランスポーター
のシナプス小胞への局在:免疫電顕
による検討. 第27回日本神経科学

大会、第47回日本神経化学大会(合
同大会)、大阪市

F. 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（こころの健康科学研究事業）

II. 分担研究年度終了報告書

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

3. 剖検とリソース、臨床病理学的検索、
ALS における痴呆の責任病巣

分担研究者 水谷俊雄 東京都立神経病院部長

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）で観察される痴呆症状の形態学的責任病巣を明らかにする目的で研究を進めた。16年度、痴呆を伴わない本症例7例について、海馬支脚を含む左側頭葉（吻側および尾側）を免疫組織学的に検討した。海馬支脚のうち、アンモン角に接する部分をとくに Prosubiculum といい、ここは内嗅領皮質から歯状回に入力する貫通線維が通り、Alzheimer 型痴呆ではこの部分が選択的に萎縮し、アストログリアの増殖がみられ、その変化は内嗅領皮質の層状変性とほぼ比例関係にあることが明らかになっている。ALS における記憶・記銘力障害の形態学的背景として注目されてきたが、本研究結果では、痴呆の無い ALS 7 例中 1 例にのみ Prosubiculum の変化が確認された。しかし、内嗅領皮質、歯状回、stratum lacunosum には明らかな変化は認められなかった。内嗅領皮質変性がないにも関わらず Prosubiculum に病変がある点は、Alzheimer 型痴呆におけるメカニズムとは違う可能性もあり、さらなる検討が必要と考える。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）で観察される痴呆症状の形態学的責任病巣を検討する。

B. 研究方法

痴呆を伴わない本症例7例について、ホルマリン固定後、大脳を前額

断し、海馬支脚を含む左側頭葉（吻側および尾側）をパラフィン包埋し、薄切後、Hematoxylin-Eosin 染色、Kluver-Barrera 染色、Methenamine-Bodian 染色、抗リン酸化 tau 抗体、抗 ubiquitin 抗体による免疫染色を施した。

C. 研究結果と考察・結論

海馬支脚のうち、アンモン角に接する部分をとくに Prosubiculum ということがある。ここは内嗅領皮質から歯状回に入力する貫通線維が通る場所で、Alzheimer 型痴呆ではこの部分が選択的に萎縮し、アストログリアの増殖がみられる。我々はその変化は内嗅領皮質の層状変性とほぼ比例関係にあることが明らかになっており、本症における記憶・記銘力障害の形態学的背景として注目されている。

そこで ALS における Prosubiculum の変化を調べた結果、7 例中 1 例にのみ上記の変化が確認された。しかし、内嗅領皮質には明らかな病変を見いだすことは出来なかった。また、この 1 例には臨床的に痴呆は認められなかった。

次に、Prosubiculum を通過した貫通線維は直接歯状回に入力するとされてきたが、その他にもアンモン角の stratum lacunosum を通る線維系があることも知られており、我々は剖検例でそれを証明している。Alzheimer 型痴呆ではこの stratum lacunosum の萎縮、神経線維の減少、アストログリアの増殖が観察される。しかし、今回検討した ALS 例には同様の変化は認められなかった

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 宮本和人、阿部達哉、松原四郎、林 秀明、水谷俊雄. 免疫染色による交感神経節の検討. 第 45 回日本神経病理学会(2004 年 5 月)
- 2) 高橋竜哉、新井信隆、小森隆司、水谷俊雄、黒岩義之. 進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症とパーキンソン病における縫線核. 第 45 回日本神経病理学会(2004 年 5 月)
- 3) 阿部達哉、宮本和人、松原四郎、水谷俊雄、林 秀明. 皮膚汗腺組織における synaptophysin 免疫染色の検討. 第 45 回日本神経病理学会(2004 年 5 月)
- 4) 小柳清光、山崎峰雄、渡部和彦、河上江美子、和田 学、森田 俊、高橋 均、加藤修一、水谷俊雄、林 秀明. 筋萎縮性側索硬化症：小胞体で蛋白の折り畳みに関与すると言われるシャペロンからみた前角細胞の変化. 第 45 回日本神経病理学会(2004 年 5 月)
- 5) 新井信隆、小森隆司、海津怜子、江口弘美、水谷俊雄、海馬硬化のない側頭葉てんかんの海馬歯状回の病理学的解析. 第 45 回日本神経病理学会.(2004 年 5 月)
- 6) 小柳清光、山崎峰雄、渡部和彦、河上江美子、和田 学、森田俊、

高橋均、加藤修一、水谷俊雄、林秀明、筋萎縮性側索硬化症：折り畳みに関与する蛋白からみた前角細胞小胞体の変化，第45回日本神経学会(2004, 5.12)

F. 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（こころの健康科学研究事業）

II. 分担研究年度終了報告書

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

4. 新規治療法の開発

分担研究者 渡部和彦 東京都神経科学総合研究所副参事研究員

研究要旨

ALS 運動ニューロンの変性メカニズムの解明と、ALS の新規治療法を開発する目的で研究を続けた。家族性 ALS モデルである変異ヒト SOD1 (G93A, H46R) トランスジェニック・ラットに顔面神経引き抜き損傷を加えた際、正常ラットに比べて傷害運動ニューロンの変性脱落が有意に促進されるが、傷害運動ニューロンのみに変異 SOD1 を発現させても変性脱落が促進されないことを見出した。今年度新たに作製した肝細胞増殖因子 (HGF) 組換えウイルスが損傷運動ニューロンの変性脱落を有意に抑制することを確認した。ラジカルスカベンジャー MCI-186 の経口投与が、引き抜き損傷後の運動ニューロン死に対する有意な抑制効果を有することを認めた。移植治療に用いる細胞として、LacZ 標識ラット・シュワン細胞不死化培養株を樹立し、脳および末梢神経に移植後生着することを確認した。少数ながらミエリンを再生しうることを確認した。

A. 研究目的

ALS モデルとして成体ラット顔面神経の引き抜き損傷モデルを使用して、損傷神経細胞の病態解析を行い、それに対する神経栄養因子の遺伝子導入治療、低分子薬物投与の効果を分析して、更に有効な新規組み換えウイルスを開発し幹細胞・シュワン細胞の移植治療を試みる。

B. 研究方法

1. 成体運動ニューロン変性のメカニ

ズムに関する検討：家族性 ALS のモデルである変異ヒト SOD1 (G93A, H46R) トランスジェニック・ラットに顔面神経引き抜き損傷を加え、傷害運動ニューロンの変性脱落の性状と程度を正常ラットと比較した。

2. 神経栄養因子組換えアデノウイルス

の保護効果：成体ラット顔面神経引き抜き損傷に対して、我々の作製した

各種の神経栄養因子組換えアデノウイルス・ベクターを損傷部に局所接種しその保護効果を検討した。

3. 低分子薬剤投与による保護効果：引き抜き損傷後の運動ニューロン死に対し、ラジカルスカベンジャーMCI-18の経口投与を行ってその効果を検討した。

4. シュワン細胞の移植による細胞治療の試み：引き抜き損傷部位にシュワン細胞を移植し、神経栄養因子産生による傷害運動ニューロンの保護効果を検討した。

C. 研究結果と考察・結論

1. 成体運動ニューロン変性のメカニズムに関する検討：家族性 ALS モデルラットの解析：家族性 ALS のモデルである変異ヒト SOD1 (G93A, H46R) トランスジェニック・ラットに顔面神経引き抜き損傷を加えると、正常ラットに比べて傷害運動ニューロンの変性脱落が有意に促進される。一方、変異 SOD1 組換えアデノウイルスを正常ラット引き抜き損傷に局所接種し傷害運動ニューロンのみに変異 SOD1 を発現させても変性脱落が促進されないことがわかり、病変の増悪にはニューロン以外の細胞の関与が必要と考えられた。今後、病変部のグリア細胞の関与についての詳細な検討を重ねたい。

2. 神経栄養因子組換えアデノウイルスの保護効果：神経栄養因子組換えアデノウイルスの保護効果：成体ラット

顔面神経引き抜き損傷に対して、我々の作製した各種の神経栄養因子組換えアデノウイルス・ベクターを損傷部に局所接種しその保護効果を検討している。これまで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、神経成長抑制因子 (GIF、metallothionein-III) 組換えウイルスの保護効果を明らかにしてきたが、新たに作製した肝細胞増殖因子 (HGF) 組換えウイルスも損傷運動ニューロンの変性脱落を有意に抑制することを見出した。今後、ヘルペスウイルスなど他の組換えウイルスによって導入された神経栄養因子の作用増強効果などについて検討を重ねていく予定である。

3. 低分子薬剤投与による保護効果：ラジカルスカベンジャーMCI-186 の経口投与により、引き抜き損傷後の運動ニューロン死に対する有意な抑制効果を認めた。一方、現在のところ同化合物の静脈内反復投与では満足すべき効果が得られておらず、投与量や投与方法の更なる検討が今後必要と思われる。

4. シュワン細胞の移植による細胞治療の試み：引き抜き損傷により、運動ニューロン死とともに傷害部近位の軸索・ミエリンの崩壊が観察されるが、シュワン細胞を移植することによって、神経栄養因子産生による傷害運動ニューロンの保護およびミエリンの再生を期待しうる。移植に用いる細胞として、