

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に
関わる新規治療法の開発に関する研究班

平成16年度 研究報告書

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

— 2 0 0 4 —

主任研究者 糸山 泰人

Chairman : Yasuto Itoyama, M.D.
Department of Neurology, Tohoku University School of Medicine
Sendai, Japan

2005年3月 印刷

序 文

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

次ページに掲げた分担研究者ならびに研究協力者による平成15年度の「筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新規治療法の開発に関する研究班」の研究報告を公表する。

2005年3月

「筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新規治療法の開発に関する研究」班

主任研究者 糸山 泰人

（東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野）

研 究 者 一 覽

筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新規治療法の開発に関する研究班
研究者一覧

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

目 次

I. 研究者一覧

II. 総括研究報告

糸山 泰人

III. 研究報告（分担研究者）

- 1.-1 ALSラットに対する発症期からの肝細胞増殖因子（HGF）髄腔内投与による病態進行抑制とその機序
- 1.-2 外来性再生誘導因子の髄腔内投与によるALSトランスジェニックラット
内在性神経前駆細胞の賦活の試み
東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野 糸山 泰人
2. ES細胞を用いた運動ニューロン再生の試み
慶應義塾大学医学部生理学教室 岡野 栄之
3. 発現ベクターとしてのポリオウィルス
東京大学大学院医学系研究科微生物学教室 野本 明男
4. 孤発性筋萎縮性側索硬化症における運動ニューロンの遺伝子発現のプロファイル解析
名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学講座 祖父江 元
5. ALS患者に対するIGF-1髄腔内投与療法について
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学 阿部 康二
6. HGFファミリーのALSに対する機能解析
大阪大学大学院医学系研究科組織再生分野 船越 洋

IV. 研究成果一覧（分担研究者）

V. 研究報告（研究協力者）

1. プロテアソーム障害による運動ニューロン変性
北海道大学大学院医学研究科神経内科 菊地 誠志
2. ALSを引き起こす変異 Cu/Zn-SOD 蛋白質の構造変化と不安定性に関する研究
大阪大学医学系研究科生化学 谷口 直之
3. 不飽和脂肪酸による変異 superoxide dismutase 1 の凝集機構に関する研究
理化学研究所脳科学総合研究センター運動系神経変性研究チーム 高橋 良輔
4. ALS におけるAMPA 受容体 RNA editing 異常の研究
東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学 郭 伸

5. 食品成分カルニチンによるミトコンドリアの保護と筋萎縮性側索硬化症の治療
大阪市立大学大学院医学系研究科分子病態学部門 井上 正康
6. In vivo 発現ベクターを応用した神経変性疾患の遺伝子治療
自治医科大学神経内科 中野 今治
7. 筋萎縮性側索硬化症の病態における免疫補助分子CD40の解析
大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学神経機能医学講座神経内科学 佐古田三郎
8. H46R Tgマウス と細胞モデルにおける変異型 SOD1 の可溶性変化についての検討
山形大学医学部第三内科 加藤 丈夫
9. 新たに同定された変異 SOD1 結合蛋白・HSP105 の病態的意義
京都大学大学院医学研究科臨床神経学 下濱 俊
10. 「脊髄神経細胞への遺伝子導入用ベクターの新規開発」ならびに「ラット一過性虚血モデルに
対する髄液由来細胞と複製不能型1型ヘルペスウイルスベクターを用いた複合治療」に関する研究
大阪医科大学脳神経外科 宮武 伸一
11. 筋萎縮性側索硬化症（ALS）における神経成長因子ミッドカインの発現に関する研究：
ALSの新規治療戦略としてのミッドカイン応用の可能性の証明
鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理 加藤 信介
12. 筋萎縮性側索硬化症（ALS）発症機構に対する小胞体ストレスの影響に関する研究
大阪大学大学院医学系研究科プロセッシング機能形態 森 泰丈
13. 末梢神経損傷による運動ニューロン死のメカニズムと治療に関する検討
東京都神経科学総合研究所分子神経病理研究部門 渡部 和彦

VI. 平成16年度班会議プログラム

総括研究報告

筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新規治療法の開発に関する研究

主任研究者 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野教授

研究要旨

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

分担研究者

岡野栄之（慶應義塾大学医学部生理学）

野本明男（東京大学大学院医学系研究科微生物学）

祖父江 元（名古屋大学大学院医学系研究科神経内科）

阿部康二（岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学）

船越 洋（大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野）

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

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

1. AMPA 受容体サブユニット GluR2 異常による運動ニューロン死

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

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

2. ALS 治療への HGF の応用

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

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

3. 遺伝子治療に向けてのベクターの開発

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

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

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

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

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

5. その他の即応性のある ALS 治療の可能性

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

(倫理面の配慮)

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

C. 及び D. 研究結果と考察

1. AMPA 受容体 GluR2 の RNA 編集異常

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

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

2. HGF など神経栄養因子の ALS への治療応用

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

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

3. ポリオウイルスベクターの開発

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

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

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

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

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

5. その他の即応性のある ALS 治療薬の可能性

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

E. 結論

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

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

Kato S, Funakoshi H, Nakamura T, Kato M, Nakano I, Hirano A and Ohama E. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the

anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis(ALS):immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. Acta Neuropathol, 106(2): 112-120,2003

RNA、cDNA およびプラスミド (特許取得)

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

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

2. 学会発表

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1)ラットを用いた ALS モデル (特許取得)

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

(3)記憶障害治療剤 (申請中)

(4)記憶障害治療剤スクリーニング法 (申請中)

(5)欠陥干渉粒子、ポリオウイルス欠損変異

分 担 研 究 者

研 究 報 告

ALS ラットに対する発症期からの肝細胞増殖因子（HGF）髄腔内投与による病態進行抑制とその機序

主任研究者 糸山 泰人 東北大学大学院医学系研究科神経内科教授

研究要旨 私たちはこれまでに ALS の動物モデルの SOD1 トランスジェニック（Tg）ラットに対するヒトリコンピナント（hr）肝細胞増殖因子（HGF）の発症前髄腔内持続投与による発症遅延を報告してきた。今回は発症期からの投与により死亡の遅延と、HGF の脊髄前角運動神経細胞死抑制の機序として神経細胞の caspase 活性の抑制、内因性の XIAP 保持、EAAT2 の発現増加を認めた。

主任研究者： 糸山泰人

東北大学大学院医学系研究科神経内科教授

研究協力者： 青木正志、石垣あや、永井真貴子、
割田 仁*、加藤昌昭**、船越 洋***、加藤信介****、加藤雅子*****

東北大学大学院医学系研究科神経内科

*国立病院機構米沢病院神経内科

**国立病院機構宮城病院神経内科

***大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野

****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、病院病理部

モデル動物の飼育・管理は当学動物実験ガイドラインを遵守した。

C. 研究結果

平均発症は HGF 投与群が 126.8 ± 13.1 日、対照群が 126.3 ± 13.8 日 ($p=0.87455$) と有意差は認められなかった。平均死亡は HGF 投与群が 154.3 ± 16.4 日、対照群が 143.25 ± 17.0 日 ($p=0.02323$) と HGF 投与群が対照群より有意に遅延した。発症から死亡までの平均罹病期間が、HGF 投与群が 27.5 ± 11.1 日間、対照群が 16.9 ± 8.17 日間と、HGF 投与群では対照群の 62.7%の増大を示し、発症期の投与によっても HGF が Tg ラットの罹病期間を大幅に延長させることが示された。foot print と体重は、HGF 投与群が対照群よりも保たれ、両者とも 118 日齢で統計学的な有意差を認めた (foot print : 118 日齢 $p=0.0424$ 、体重 : 118 日齢 $p=0.0047$)。

A. 研究目的

私たちはこれまでに、ALS の動物モデルの G93A SOD1 Tg ラットに対する発症前の 100 日齢からの hr HGF の髄腔内持続投与による腰髄運動神経細胞の脱落抑制と発症の遅延を報告してきた (平成 14 年度 研究報告書)。今回は hrHGF を発症期にあたる 115 日齢から G93A SOD1 Tg ラットの髄腔内に投与し、病態進行抑制効果の有無とその作用機序を検討した。

B. 研究方法

平均発症時期頃の 115 日齢から hrHGF200 μ g/匹と、対照群として PBS をそれぞれメス G93A Tg ラット 8 匹ずつに 4 週間髄腔内持続投与し、死亡するまで経過を観察した。これとは別に検体採取用に 115 日齢からメス G93A SOD1 Tg ラットに hrHGF100 μ g/匹と、対照群として PBS をそれぞれ 2 週間髄腔内持続投与後腰髄を採取し、第 5 腰髄の免疫染色と前角運動神経細胞数の計測、ウェスタンブロットを行い、採取するまでの期間 foot print と体重の計測を行った。

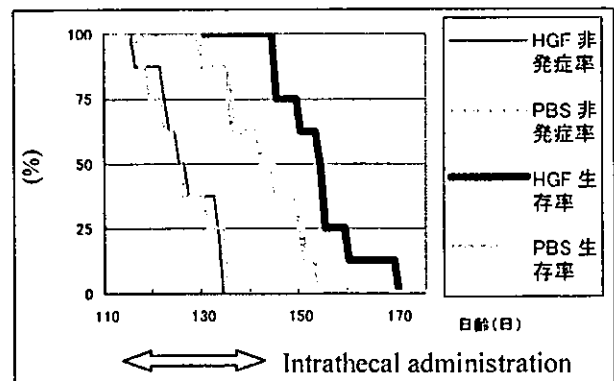


図1. 115日齢からのHGF投与による病態進行抑制効果

第 5 腰髄の前角運動神経細胞数は、HGF 投与群は平均 14.5 個、対照群は平均 8.33 個 ($p=0.02846$) と HGF 投与群の運動神経細胞数が対

照群よりも有意に保持されていた。免疫染色の結果は、活性型の HGF 受容体であるリン酸化 C-met は HGF 投与群のほうが強く染色された。active caspase-3 および active caspase-9 は対照群のほうが強く染色され HGF 投与群では抑制されていた。

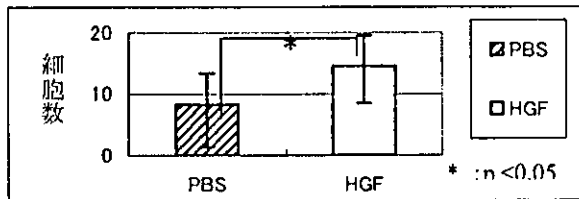


図2. 運動神経細胞数 (第5腰髄前角)

ウェスタンブロットでは各バンドの density を定量解析し、内部標準との比の平均値を算出した。HGF 投与群が対照群よりも caspase-3、9 のバンドが減弱し、caspase-3 では有意差を認めた (pro-caspase-9 : $p=0.694$ 、active caspase-9 : $p=0.2364$ 、pro-caspase-3 : $p=0.0031$ 、active caspase-3 : $p=0.0154$)。GFAP のバンドは HGF 投与群と対照群とほぼ同様だった。一方、XIAP、EAAT2 のバンドは HGF 投与群の方が対照群よりも増強しており (XIAP : $p=0.0099$ 、EAAT2 : $p=0.0417$)、特に EAAT2 では HGF 投与群が正常ラットよりもバンドが増強していた。

D. 考察

発症時期からの投与により罹病期間延長効果が得られたことから、臨床において発症後 ALS と診断されてから ALS 患者に HGF を投与開始しても、

病態進行抑制効果が期待できる可能性が示された。このことは、臨床への応用という点に関して、注目すべき結果と考える。

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。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。

E. 結論

発症時期からの投与により罹病期間延長効果を示した HGF は、臨床でも治療効果をもつことが期待できる。その作用機序として細胞死抑制、細胞保護機能の維持・増強が示された。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表
別ページ参照

2. 学会発表

第45回日本神経学会総会 2004.5 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

ラットを用いた ALS モデル (特許出願済)

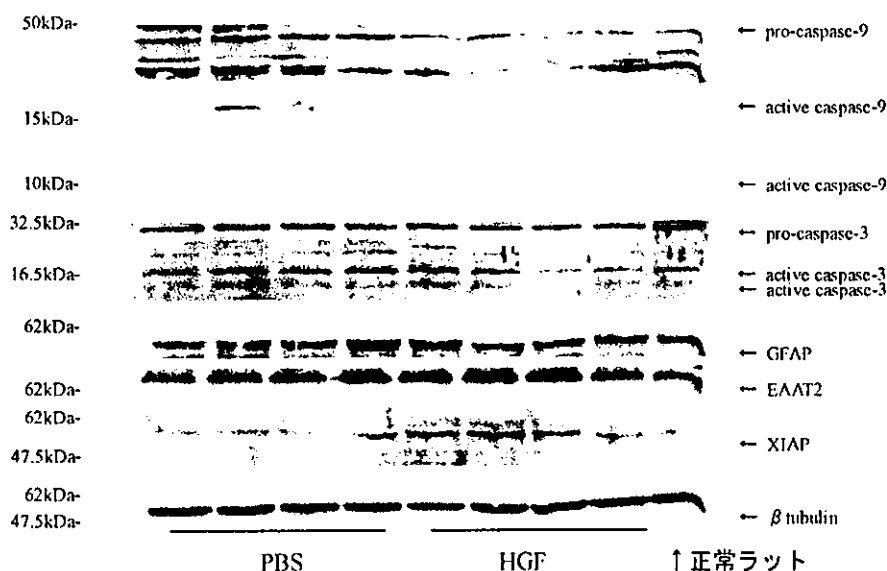


図3. ウェスタンブロット (腰髄)

外来性再生誘導因子の髄腔内投与による ALS トランスジェニックラット 内在性神経前駆細胞の賦活の試み

主任研究者 糸山 泰人 東北大学大学院医学系研究科神経内科 教授

研究要旨 ヒト変異 *Cu/Zn SOD* トランスジェニックラット脊髄における未分化な神経前駆細胞の増殖は、運動ニューロン脱落が進行した発症後期から末期と遅い。このような細胞群を早期から賦活し組織修復に役立てるために、再生誘導因子の1つ肝細胞増殖因子(HGF)の髄腔内投与を試みた。その結果、本モデルラット脊髄の新生細胞増殖を促進された。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。将来的に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。

主任研究者: 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経内科 教授

研究協力者: 青木 正志^{*}, 割田 仁[†], 石垣 あや^{*},
永井真貴子^{*}, 松本 有史[§], 岡野栄之[§], 船越 洋[‡]

^{*}東北大学大学院医学系研究科神経内科

[†]国立病院機構米沢病院神経内科

[§]慶應義塾大学医学部生理学

[‡]大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生医学

A. 研究目的

系統的な運動ニューロン死を特徴とする神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, 以下 ALS) は致死的にもかわらず有効な治療法が未だなく、これほど新規治療法開発が強く希求されている疾患はない。しかし、優性遺伝性 ALS の一部における *Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD)* 遺伝子変異の発見から現在まで依然として病態には不明な点が多い。これまでに我々は ALS の新しい動物モデルとしてヒト変異 *Cu/Zn SOD* トランスジェニックラット (Tg ラット) を確立した。従来のマウスモデルではなく、このラットモデルを用いることで髄腔内投与や細胞移植などの実験的治療を行うことがきわめて容易となった。

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

内在性神経前駆細胞を利用した再生医療が脊髄の変性疾患である ALS の新規治療戦略として注目されている。また、近年までに神経前駆細胞の増殖、分化、遊走、突起伸展を調節するさまざまな因子が報告されており、とくに *in vitro* ではこれらの“再生誘導”因子に関する研究が益々活発になされている。

我々は再生医療の開発を目的に内在性神経前駆細胞の解析を開始し、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ようやく未分化な神経前駆細胞が増殖していることを昨年までに示した。本年度は Tg ラット脊髄に外来性再生誘導因子の一候補である肝細胞増殖因子 (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。

B. 研究方法

発症直前かつ脊髄運動ニューロン脱落開始直後の 18 週齢 (pre-symptomatic, Pre 期)、および発症後期にあたる 22 週齢 (symptomatic, Sym 期) のヒト His46Arg 変異 *Cu/Zn SOD*-Tg ラットに対して、ヒトリコンビナント HGF (総量 100 µg/匹) を 2 週間にわたり浸透圧ポンプ (Alzet model 2002, 流量 0.5 µL/時) によって髄腔内に持続投与した。vehicle としては人工髄液 (artificial cerebrospinal fluid, aCSF) を用いた。HGF 投与群と vehicle 投与群 (各群 n=4~5) いずれ

に対しても HGF 投与期間の後半 1 週間にチミジン類似体 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を 1 日 1 回腹腔内投与 (50 mg/kg 体重) して新生細胞を標識した。

2 週間の投与期間終了翌日に脊髄腰膨大部の灌流固定後凍結切片を作成して蛍光免疫組織化学的に解析した。一個体につき少なくとも 5 切片以上の多重切片を得て、一横断切片あたりの BrdU 陽性細胞数を計測、統計学的検討を加えた。

なお、モデル動物の飼育・管理は本学動物実験ガイドラインを遵守し、可能な限り使用動物数の削減を図った。

C. 研究結果

Pre 期と Sym 期の vehicle 投与群だけを比較すると、病期の進行に伴い BrdU 陽性細胞数が増加していた。これに対して、Pre 期の HGF 投与群では vehicle 群に比較して BrdU 陽性細胞数がさらに増加する傾向が認められた (有意差なし)。一方、Sym 期の HGF 投与群では vehicle 群に比較して優位に BrdU 陽性細胞数が増加していた (図 1)。

現在、これらの BrdU 陽性細胞の形質と局在を他の選択的細胞マーカーとの多重免疫組織化学を用いて解析中である。

D. 考察

HGF 髄腔内投与によって病態下脊髄で増加しつつある新生細胞をさらに増加させることが示された。近年、*in vitro* で HGF が neurosphere 形成細胞の増殖、ニューロンへの分化促進といった再生誘導能を示すことが報告されている (Kokuzawa J, et al. 2003)。本研究により *in vivo* でも、HGF が神経前駆細胞を賦活させる可能性が示された。しかし、HGF は多様な機能をもつサイトカインであることから、神経前駆細胞への直接賦活効果だけでなく、運動ニューロン死抑制効果、astrocyte 機能改善効果を介した間接効果もまた想定される (Sun W, Funakoshi H, et al. 2002)。したがって、HGF が増殖促進した細胞群についての解析に加え、HGF 受容体 c-Met の発現や前駆細胞以外の細胞種、細胞外環境への効果についても検討を要する。

また、運動ニューロン脱落開始直後 (Pre 期) よりは、よ

り進行期 (Sym 期) に HGF を投与する方が新生細胞増加促進の度合いが大きいことが示された。このことは、運動ニューロン脱落が一定レベル以上に生じた環境の方がより新生細胞の増加を許容しやすいという可能性を示唆し、細胞外環境 (液性因子等) の関与が想定される。

最後に、髄腔内投与法は主病変部位が脊髄に系統的に存在し、かつ血液脳関門が障害となる HGF のようなペプチド因子投与の場合、病変部位に効率よく到達させる優れた投与方法であることがあらためて確認された。

E. 結論

HGF 髄腔内投与が脊髄において新生細胞を増加させることが示された。今後、HGF の至適用量や投与時期の検討、他の再生誘導因子と組み合わせ投与、細胞移植、治療的遺伝子導入などの組み合わせを検討することで、内在性神経前駆細胞を賦活するような新規治療法につながる可能性がある。

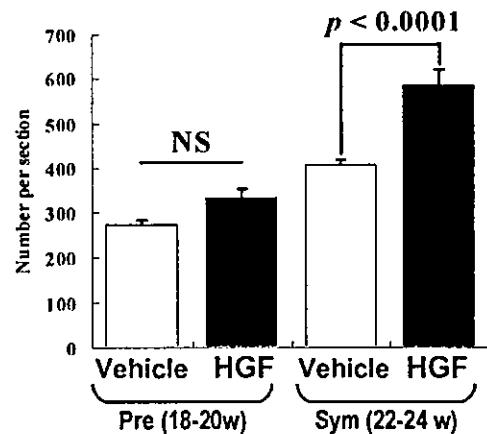


図 1. 腰髄 BrdU 陽性細胞数の変化 (本文参照)

F. 健康危険情報

特になし

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) 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
- 3) Yasuda H, Ebihara S, Yamaya M, Asada M, Sasaki H, Aoki M: Increased arterial carboxyhaemoglobin concentrations in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 1076-1077, 2004
- 4) Suzuki N, Aoki M, Takahashi T, Takano D, Asano M, Shiga Y, Onodera Y, Tateyama M, Itoyama Y: Novel dysferlin mutations and characteristic muscle atrophy in late-onset Miyoshi myopathy. *Muscle Nerve* 29: 721-723, 2004

2. 学会発表

割田 仁 ほか, ALSトランスジェニックラットにおける未分化な内在性神経前駆細胞の増殖, 第45回日本神経学会総会 2004.5 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

ラットを用いた ALS モデル (出願済)

分担研究報告書

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

分担研究者 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室 教授

研究要旨 マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を用い、筋萎縮性側索硬化症(ALS)で選択的に障害される運動ニューロンとその前駆細胞を誘導する培養法を確立した。さらに、この神経系前駆細胞を ALS モデルラットの脊髄に移植し、その *in vivo* における性質を解析した。

A. 研究目的

マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) から運動ニューロンとその前駆細胞を誘導する培養法を確立し、誘導した運動ニューロンを ALS の病態解析や薬剤スクリーニングに利用する。さらに、ALS モデルラットである変異型 SOD1 (G93A) トランスジェニックラットの脊髄に移植し、運動ニューロンの再生を試みる。ALS モデルラットの治療効果判定のための運動機能評価法の開発も行う。

B. 研究方法

我々はマウス ES 細胞から胚様体(Embryoid Body: EB)を経て、多能性神経幹細胞を含む未分化神経系前駆細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法を確立してきた。本研究では、EB 形成時に後方化因子であるレチノイン酸(RA)を作用させることにより、ES 細胞由来の神経系前駆細胞に後方の領域特異性を付与し、神経管後方より発生する運動ニューロンとその前駆細胞を高率に生み出すニューロスフェアの誘導法を確立する。まず、RA を用いて EB から高率にニューロスフェアを誘導する培養系を確立する。これらの解析は、RT-PCR 法やウェスタンブロット法などの分子生物学的手法、免疫染色法を用いて行う。さらに誘導した細胞の *in vitro* での性質を、細胞培養や電気生理学的手法を用いて明らかにする。さらに、*in vivo* での細胞の生着とその動態を確かめる。特に ALS モデル動物である変異型 SOD1 (G93A) トランスジェニックラット (mSOD1 ラット) の腰髄へ ES 細胞由来神

経系前駆細胞を移植し、免疫染色法により移植細胞の性質を、さらに運動機能の改善についても解析する。ALS モデルラットに関しては、治療効果判定法がいまだ十分に確立されていないため、我々の研究室独自の運動機能解析法 (治療効果判定法) を開発する。さらに、マウス ES 細胞で確立した手法をヒト ES 細胞へ応用する。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

まず、様々な濃度の RA を用いて EB を形成させ、RT-PCR 法、western blot 法、免疫染色法により種々の遺伝子の発現パターンの解析を行った。RA は濃度依存的に神経分化と後方化を促し、低濃度の RA を用いた時に形成される EB 中に、Nestin 陽性、Sox1 陽性の、未分化神経系前駆細胞が多く含まれ、これらの細胞が中脳、後脳の領域特異性を持つことが明らかとなった。そこで低濃度の RA を用いて形成させた EB を分散し、線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 存在下で浮遊培養させたところ、高率にニューロスフェアを形成させることに成

功した。この一次ニューロスフェアは接着培養で分化させるとニューロンを多く生み出し、一方で一度継代した二次ニューロスフェアからはニューロンおよびグリアを生み出すことが明らかとなった。この結果は *in vivo* の中枢神経の発生をよく模倣していることから、中枢神経発生モデルとしても有用であると考えられた。さらに、低濃度の RA を用いて誘導したニューロスフェアからは、運動ニューロンやその前駆細胞のマーカーである HB9 陽性の細胞が高率に誘導された。このようにして誘導したニューロンは、電気生理学的手法（パッチクランプ法）を用いて解析すると活動電位が記録され、さらに、筋芽細胞株由来の myotube と共培養すると *in vitro* で α -BTX により標識される neuromuscular junction を形成した。また EGFP で標識した ES 細胞由来の神経系前駆細胞を、発症前の mSOD1 トランスジェニックラットの腰髄に移植したところ、生着し NeuN 陽性のニューロンに分化した。また、その一部は Choline acetyl transferase (ChAT) 陽性のコリン作動性ニューロンに分化していた。これらの結果から、ES 細胞由来の前駆細胞が *in vivo* で機能的な運動ニューロンに分化できる可能性が示唆された。

また、細胞治療による治療効果判定のために、ALS ラットの運動機能解析法を開発した。ALS ラットは多様な表現型を示すが、体重測定、Inclined plane test、3次元自動運動機能解析装置、独自に開発した motor score などにより、再現性のよい統一かつ客観的な評価法を確立することができた。

D. 考察

ES 細胞から低濃度レチノイン酸を用いて高率にニューロスフェアを誘導することができた。誘導したニューロスフェアからは、運動ニューロンとその前駆細胞のマーカーである HB9 を高率に発現し、電気生理学的に活動電位を発するニューロンが誘導された。さらにこれらのニューロンと myotube とのコンタクトも認められたことから、機能的な運動ニューロンとその前駆細胞を、*in vitro* でマウス ES 細胞から高率に誘導できる培養法を確立でき

たと考えられた。さらに、これらの細胞を ALS ラットの腰髄に移植したところ、生着しコリン作動性ニューロンを含むニューロンに分化したことから、生体内でも機能的な運動ニューロンに分化し得ると考えられた。今後、さらに移植方法を改良するとともに、細胞を移植した ALS モデルラットの運動機能の改善についても解析していく予定である。また、ヒト ES 細胞を用いて同様の実験を行い、ヒト ES 細胞を用いた ALS における運動ニューロンの再生および、細胞治療法を開発していく予定である。

E. 結論

マウス ES 細胞から運動ニューロンとその前駆細胞を高率に誘導する方法を確立した。また、これらの細胞は *in vivo* でもコリン作動性ニューロンを含むニューロンに効率に分化できることが示された。運動ニューロンの機能解析、ALS の病態解析、および薬剤スクリーニングなどを *in vitro* で行うためのモデルとして、またヒト ES 細胞へ同様の手法を応用することにより、ALS における再生医学への応用が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okada Y, Shimazaki T, Sobuc G, Okano H. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 275(1):124-142, 2004

Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S.-i, Shimazaki T, Chino N, Okano H, and Okamoto H. Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isll* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Developmental Biology* 278(2): 587-606. 2005

2. 学会発表