

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導の試み、第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002 年 5 月

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導の試み、第 25 回日本神経科学学会、東京、2002 年 7 月

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞を用いた神経系細胞の誘導、第 14 回日本神経学会総会、横浜、2003 年 5 月

Yohei Okada, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Generation of Motor Neurons from mouse Embryonic Stem Cells, The 2nd CREST Symposium on Development, Differentiation and Regeneration, Tokyo, May 2003

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞から運動ニューロン誘導の試み、神経組織の成長・再生・移植研究会 第 18 回学術集会、東京、2003 年 6 月

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞から運動ニューロン誘導の試み、第 26 回日本神経科学大会、名古屋、2003 年 7 月

Yohei Okada, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Generation of motor neuron progenitors from mouse embryonic stem cells, Keystone Symposia, Stem Cells (B2), Colorado, January 2004

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導：ES 細胞由来神経系前駆細胞の特性の解析、第 45 回日本神経学会総会、東京、2004 年 5 月

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導：ES 細胞由来神経系前駆細胞の特性の解析、第 37 回日本発生生物学会大会、名古屋、2004 年 6 月

岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導：ES 細胞由来神経系前駆細胞の特性の解析、第 27 回日本神経科学大会、第 47 回日本神経化学学会大会合同大会、大阪、2004 年 9 月

Yohei Okada, Takuya Shimazaki, Arifumi Matsumoto, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Generation of motor neurons from mouse embryonic stem cells: analysis of

ES cell-derived neural cells, Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, October 2004

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得（申請中）

(1)発明の名称：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

発明者：岡野栄之 島崎琢也

出願番号：特願 2001-099074,

申請日：2001.3.30

PCT 出願：PCT/JP01/08703

(2)発明の名称：記憶障害治療剤

発明者：岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人

出願番号：特願 2002-002433

申請日：2002.1.11

PCT 出願：無し

(3)発明の名称：記憶障害治療剤スクリーニング法

発明者：岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人

出願番号：特願 2003-6298

申請日：2003.1.14

PCT 出願：無し

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）

（筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新治療法の開発に関する研究班分担）研究報告書

発現ベクターとしてのポリオウイルス

分担研究者 野本 明男 東京大学大学院医学系研究科教授

小児マヒの病因であるポリオウイルスは、神経細胞、とくに運動神経細胞を標的とする RNA ウイルスである。これまでの研究から、血流中または骨格筋に接種すると、中枢神経系に侵入し、運動神経細胞で複製することが知られている。このポリオウイルスの性質は、運動神経細胞特異的な疾患である筋萎縮性側索硬化症の治療を目的としたウイルスベクターとなる可能性を秘めている。問題点は、ポリオウイルス自体が運動神経細胞に対する毒性を有していることである。本年度は、ポリオウイルスの特異的プロテアーゼであり、細胞変性効果発現に中心的役割を果す 2A プロテアーゼの遺伝子を除いたポリオウイルスが外来 mRNA を発現させることが出来るかを検討した。同時に筋肉内接種したポリオウイルスの逆行性軸索輸送メカニズムを明らかにする研究を展開した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動神経細胞の異常により発症する疾患である。一方、小児マヒの病因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、複製する能力を持っている。そこで、ポリオウイルスの性質を利用し、ALS の進行を阻止、または治療する物質を運動神経細胞で発現させることを目的とした。

現在、ALS の進行を止める可能性のある物質としては、HGF (hepatocyte growth factor) と XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) の存在が知られている。これらの mRNA のコーディング領域は、それぞれ 2184

塩基および 1491 塩基であり、ポリオウイルスのゲノム（約 7500 塩基）に挿入するには、ウイルスゲノムの一部を欠損させる必要がある。さらにウイルス毒性発現の中心的役割を持つ 2A プロテアーゼの活性をなくす必要があると考えられた。

昨年度までに、ウイルスのキャプシド蛋白質コーディング領域および 2A プロテアーゼコーディング領域を欠失させたポリオウイルス RNA もレプリコン活性を持ち、この RNA は、ワクチニアウイルスベクターで発現させたポリオウイルスキャプシド蛋白によりパッケージされ、粒子形成を起こすことを明らかにした。

本年度は、昨年度作製したポリオウイルス欠陥干渉 (DI) 粒子の遺伝子欠損部位に GFPmRNA および HGFmRNA を挿入し、効率良い発現が得られるかを検討した。同時に、ポリオウイルスが運ばれる逆行性軸索輸送システムにおけるポリオウイルス受容体とポリオウイルスの共局在を確かめた。

B. 研究方法

ポリオウイルス DI 粒子 RNA に GFPmRNA または HGFmRNA を挿入し、HeLa 細胞にトランスフェクションし、RNA レプリコン活性を測定した。活性測定には、ポリオウイルス IRES 部分に相当する cDNA をプローブとしたスロットプロット法を用いた。HeLa 細胞中で RNA レプリコンをパッケージするために、キャプシド蛋白質全域 (P1) を発現するように設計されたワクチニアウイルスベクターを重感染させた。

逆行性軸索輸送システム解析のため、ラット運動神経細胞の初代培養に GFP 融合ポリオウイルス受容体遺伝子をトランスフェクションし、蛍光標識したポリオウイルスを感染させた。

共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

(倫理面への配慮)

動物 (ラット) を使用した実験は、東京大学の動物実験ガイドラインに従って行った。その他は、*in vitro* の培養細胞系を使用した実験である。

C. 研究結果

GFPmRNA を外来 mRNA として持つポリオウイルス DI 粒子 RNA を HeLa 細胞にトランスフェクションしたところ、RNA レプリコン活性を持つことが示された。しかしながら、その活性は挿入 RNA を持たない DI RNA に比較すると低かった。RNA レプリコンのコピー数はトランスフェクション 12 間後に最多となった。この RNA をパッケージングし、粒子とした上で HeLa 細胞への感染を行ったところ、GFP 発現を観察することが出来た。

HGFmRNA を外来 mRNA として持つポリオウイルス DI 粒子 RNA を HeLa 細胞にトランスフェクションしたが、RNA レプリコン活性が検出できなかった。この理由は現在のところ不明である。プラスミド構築の際のミスである可能性もあるので、現在プラスミド構築をやり直している。

ラット神経細胞の初代培養系は機能しており、現在までにポリオウイルスとその受容体を合わせ持つ小胞体の逆行性輸送を観察できるようになった。

D. 考察

昨年度までに、ポリオウイルス 2A プロテアーゼ遺伝子領域を持たない RNA は、活性は低くなるものの RNA レプリコン活性を持つことが出来た。今年度、このレプリコンに外来 mRNA の挿入を行ったわけであるが、さらに活性は低下した。した

がって、HGFmRNA のような長い mRNA の効率の良い発現は困難である可能性がある。実際に HGFmRNA を挿入 mRNA として持つポリオウイルス DI 粒子 RNA の RNA レプリコン活性は、現在のところ検出できていない。

今年度は、別途、神経細胞にはポリオウイルスに対する抵抗性が存在することが判明し、ポリオウイルスの一回の感染では、細胞変性効果はほとんど出現しないことが明らかとなった。したがって、子ウイルス粒子産生に到ることのない DI 粒子は、たとえば 2A プロテアーゼ遺伝子を有していても安全なベクターとして使用できる可能性がある。もし、2A プロテアーゼ遺伝子欠損 DI 粒子がベクターとして不適であるなら、再考する価値がある。

E. 結論

ALS 治療に有効と思える 2A プロテアーゼ遺伝子欠損ポリオウイルスベクターにより、実際に HGF 発現を試みたが RNA レプリコン活性も測定できなかった。現在、原因を解明中であるが、2A プロテアーゼ遺伝子が存在していても安全である可能性が浮上した。ポリオウイルスと神経細胞の関連について、さらに詳しく調べる必要がある。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1.論文発表

Receptor(CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome.

J.Virol., 78(13):7186-7198,2004

Blockade of poliovirus-induced cytopathic effect in neural cells by monoclonal antibody against poliovirus or human poliovirus receptor.

J.Virol.,79(3):1523-1532,2005.

2.学会発表

ポリオウイルス体内伝播経路および伝播機構の解析

第 52 回日本ウイルス学会 2004 年 11 月 21-23 日 横浜

ポリオウイルス欠陥干渉粒子の解析

第 52 回日本ウイルス学会 2004 年 11 月 21-23 日

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

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プロファイル解析

分担研究者 祖父江元（名古屋大学神経内科・教授）

孤発性 ALS の運動ニューロンにおいて、包括的な遺伝子発現プロファイル解析を行い、運動ニューロン特異的な遺伝子発現を検出した。Bunina 小体を有する孤発性 ALS14 例、対照 13 例の剖検脊髄凍結組織よりレーザーマイクロダイセクションにて運動ニューロンを切り出し、RNA を抽出後増幅、マイクロアレイを用い遺伝子発現プロファイルを作成しクラスター解析を行った。さらに TaqMan RT-PCR、ISH、IHC により発現変化を確認した。運動ニューロンでは遺伝子の 1%が増加・3%が減少を示し、特徴的に変動する遺伝子群を抽出した。転写因子・細胞骨格の関連遺伝子群が減少し、神経栄養因子・細胞周期の関連遺伝子群が増加した。神経変性性と神経保護的、細胞死の促進と抑制という相反する発現変動が観察された。以上より、孤発性 ALS 運動ニューロン特異的に発現が変動する遺伝子群の病態発現機構への関与が示唆された。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）において単離した運動ニューロンの包括的な遺伝子発現プロファイル解析を行い、脊髄前角の遺伝子発現プロファイルと比較検討することによって、ALS 運動ニューロン特異的な遺伝子発現を検出しその分子病態を解析する。家族性 ALS では約 20%に SOD1 変異が認められる。SOD1 変異をげっ歯類や培養細胞に導入してその分子病態を解析することは可能であるが^{2) 6)}、孤発性 ALS ではこのアプローチによる研究は不可能である。今回用いた方法は孤発性 ALS に対する重要で有用な解析手段である³⁾。

B.研究方法

ALS14 例(平均年齢 62.1 歳)、対照 13 例(平均年齢 66.7 歳)の剖検脊髄凍結組織よりレーザーマイクロダイセクション法にて運動ニューロンを切り出し、RNA を抽出後 T7 RNA ポリメラーゼ法により増幅した。増幅によっても遺伝子発現比が変化しないことを確認した。

同様に脊髄前角より RNA を抽出し、各々を蛍光標識後、DNA マイクロアレイを用い遺伝子発現プロファイルを作成しクラスター解析を行った。さらに、TaqMan RT-PCR、in situ hybridization、immunohistochemistry により発現変化を確認した。組織採取に関して名大倫理委員会より承認を得た。

C.研究結果

運動ニューロンレベルでは遺伝子の 1%が増加と 3%が減少、脊髄前角レベルでは 0.7%が増加と 0.2%が減少を示した。階層（樹状図、主成分解析）および非階層（SOM）クラスタリングによって、ALS 運動ニューロンにおいて特徴的に変動する遺伝子群を抽出することができた (Fig.1)。運動ニューロンでは転写因子（CRABP1, EGR3 etc.）、細胞骨格（DCTN1, MAPs etc.）の関連遺伝子群の発現が減少し、神経栄養因子（GDNF, HGF etc.）、細胞周期（CCNC, CCNA etc.）の関連遺伝子群の発現が増加した。機能が既知または未知の遺伝子（KIAA0231, ACAT etc.）について、

Taqman RT-PCR、in situ hybridization、immunohistochemistryにより発現変化を確認した。一方、前角では運動ニューロンとは明らかに異なるクラスターを形成するものの、炎症関連遺伝子群を含め特徴的な変動を検出できなかった。

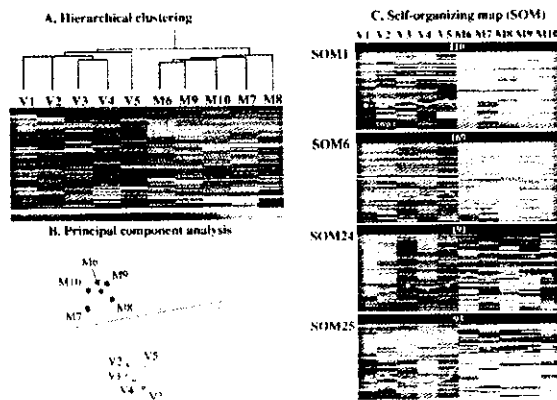


Fig. 1 Clustering of gene expression in spinal motor neurons and spinal ventral horns.

(A) Hierarchical clustering of gene expression in spinal motor neurons and ventral horns. The dendrogram was produced by hierarchical clustering of relative expression levels of 4,845 genes (rows) in 5 spinal homogenate and 5 motor neuron samples (columns) in making a total of 48,450 data points. Visual representation is shown with green representing down-regulated (<0.44), black representing intermediate, and red representing up-regulated (>2.28). The hierarchical clustering successfully detects two large clusters of ALS, discriminating between spinal homogenates of ventral horns (samples V1, V2, V3, V4 and V5) and motor neurons (samples M6, M7, M8, M9 and M10), with a correlation coefficient of 0.446 at the branching point. (B) Principal component analysis of spinal motor neurons and ventral horns. Principal component analysis by 6 components for the 4,845 genes reveals 2 main clusters consisting of spinal motor neurons (M6-10) and homogenates (V1-5). The number of patients corresponds to those in the dendrogram. (C) SOM (Self-organizing map)

analysis of spinal motor neurons and ventral horns. The 4,845 genes are grouped into 25 clusters, the optimal size of which is calculated from gap statistics analysis. In SOM1 and SOM6 majority of genes are down-regulated and in SOM24 and SOM25 majority of genes are up-regulated commonly in isolated motor neurons of 5 cases (M6-10). The numbers of genes are given at the top.

D. 考察

ALSでは包括的な遺伝子発現プロファイル解析は脊髄組織のホモジネートを用いて報告されている^{1) 4)}。しかし、この方法ではALSにおいて惹起されるグリア反応も検出され、運動ニューロン減少の影響もある。実際、運動ニューロンと脊髄前角の遺伝子発現プロファイルを比較してみると、脊髄前角において増加した遺伝子群には、運動ニューロン由来と考えられるものがある程度反映されるが、減少群には運動ニューロン由来の発現はほとんどみられない。したがって、切り出した運動ニューロンの発現解析はきわめて有効で世界において初めての試みである。ビタミンAを介する転写因子などの転写関連因子や逆行性軸索輸送に関わるDCTNの減少などがALS運動ニューロン特異的な発現変化である。一方、我々が以前に報告したように⁵⁾、GDNF、HGF、CNTFなどの神経栄養因子が増加した。しかし、それらの受容体を含め細胞膜の受容体や表面抗原はALS運動ニューロンにおいて減少傾向にあった。細胞死関連遺伝子では、細胞周期関連遺伝子が興味深い変化を示した。CCNC、CCNA、CCNEの変動はG1/S期停止を促進する働きをした。Caspase、TNFR、Bakなどの直接細胞死を惹起すると考えられる遺伝子発現もみられたが、変化率は比較的少なく、残存運動ニューロンの中で細胞死が進行している割合が少ないものと考えられた。症例ごと、あるいは運動ニューロンごとに、詳

細に病態関連遺伝子群の発現変化を検出することによって、我々が提唱した ALS における運動ニューロンの脱落過程が実証されるものと思われる⁷⁾。

E.結論

ALS 運動ニューロン特異的に発現変動する遺伝子群の病態発現機構への関与が示唆された。

F.文献

- 1) Dangond F et al. The molecular signature of late-stage human ALS revealed by expression profiling of post-mortem spinal cord gray matter. *Physiol Genomics* 16: 229-239, 2004
- 2) Ishigaki S et al. X-Linked inhibitor of apoptosis protein is involved in mutant SOD1-mediated neuronal degeneration. *J Neurochem* 82: 576-584, 2002
- 3) Jiang Y et al. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* in press
- 4) Malaspina A et al. Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays. *J Neurochem* 77: 132-145, 2001
- 5) Yamamoto M et al. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA in the spinal cord and muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 204: 117-120, 1996
- 6) Yoshihara T et al. Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 80: 158-167, 2002
- 7) Sobue G et al. Degenerating compartment and functioning compartment of motor neurons in ALS: possible process of motor neuron loss. *Neurology* 1983; 33: 654-657, 1983

G.研究発表

1.論文発表

Jiang Y et al. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57; 236-251, 2005

2.学会発表

なし

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

ALS 患者に対する IGF-1 髄腔内投与療法について

分担研究者 阿部康二 岡山大学大学院教授

永野 功¹⁾、塩手美冬¹⁾、村上哲郎¹⁾、永田哲也¹⁾、東海林幹夫¹⁾

¹⁾ 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

研究要旨

ALS に対する IGF-1 髄注療法の確立を目指して、ALS 患者 9 名に対し神経栄養因子 IGF-1 の腰部クモ膜下腔への投与を 9 ヶ月にわたって行い、その安全性と有効性を調べた。患者は、ランダムに高用量群と低用量群に割り振り、定期的に臨床的評価を施行した。その結果、高用量群においては低用量群と比較して、Norris scale の低下が遅延し、運動機能低下を遅延させる可能性が示唆された。副作用としては、3 名に皮疹を一過性に認めたのみであった。以上より、本療法は今後、ALS のひとつの治療法になる可能性が推測された。

A. 研究目的

Insulin-like growth factor-1(IGF-1)はインスリン類似の神経栄養因子で、運動ニューロン保護作用を持つことが報告されている。しかし、ALS 患者への皮下注による治験では北米において有効性が見られたが、全体的には有意ではなかった。我々は、脊髄組織への移行を改善させるために、IGF-1 を直接腰部脊髄腔内へ注入し、これにより G93A 変異型ヒト SOD1 トランスジェニックマウス(Tg マウス)の生存期間が延長することを観察している。この研究では、実際に ALS 患者への応用を図るために、IGF-1 の髄注法を開発し、その安全性と有効性を調べた。

B. 研究方法

IGF-1 としては、市販されておりその安全性が確認されているメカセルミン (商品名ソマゾン; 藤沢薬品)を使用した。脊髄腔内注入は以下の方法で行った。局所麻酔下に、側腹部皮下にリザーバー(Port-A-Cath II, Implantable Access Systems, SIMS Deltec Inc., St Paul, MN, USA)を埋め込み、このリザーバーに 16 ゲージの Portex カテーテルを接続し、これを L4/5 間から挿入して先端を腰部脊髄腔内においた。そして、皮膚を通してリザーバーへ所定濃度の IGF-1(メカセルミン)溶液を 2 週間毎、40

週間にわたって注入を行った。IGF-1 は、比較のために高用量(3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)と低用量(0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)の 2 種類の投与量にて投与した。

治験参加患者は、この試験に参加希望を表明して岡山大神経内科を受診した 48 名の ALS 患者から、Table 1 の基準に合致する者を選んだ。患者は、まず岡山大学病院神経内科に 2 週間入院して ALS の診断を確定し、患者および家族の参加意志の確認をしたうえで登録を行なった。その時点で患者を高用量群と低用量群に無作為、盲検的に割り振った。その後、外来で 3 ヶ月間経過観察をして、Norris scale が 2 点以上進行するのを確認した上で再入院させた。入院直後に局所麻酔下に皮下リザーバーを埋め込んで、ただちに第 1 回目の注入を実施。2 週間の観察期間において 2 回目の IGF-1 注入を実施して退院とした。この間、血糖値など生化学値のフォローおよび術創の観察を行った。退院後、対象患者へは 2 週間毎に約 6 時間にわたって IGF-1 の注入を行った。IGF-1 髄注は 40 週間にわたり 20 回施行した。

患者は 2 週間毎に、外来にて全身状態のチェックを受け、IGF-1 による副作用の可能性について問診が行われた。さらに、必要に応じて生化学、血液検査が実施された。また、3 ヶ月毎に IGF-1 の用量について知らされていない医師によって、Norris scale (limb および bulbar)

と肺活量の測定が行われた。Norris scale は、total スコアおよび limb スコア、bulbar スコアについて、肺活量は%VC について計算し、登録後から IGF-1 注入開始までの 3 ヶ月間の変化と、注入開始後終了までの 9 ヶ月間の変化を、統計学的に比較した。

高用量と低用量間の比較には、Norris scale (total, bulbar および limb スコア) および %VC について治療開始前と後でその低下の程度を、Norris scale については Mann-Whitney U test にて、%VC は Student's t test にて検討した。

(倫理面への配慮)

希望される患者には、文書で十分な説明を行い、患者の意志により治験をいつでも止められること、止めても不利益を被らないことを説明した。また患者のプライバシーについても充分配慮した。

Table 1 Inclusion criteria for the present study

1. Definite ALS according to El Escorial criteria.
2. Age between 20 and 70 years.
3. Duration of symptoms no longer than 36 months at inclusion.
4. Vital capacity higher than 70% of predicted.
5. Total Norris scale of higher than 65 at inclusion and decline of total Norris scales more than 2 between inclusion and start of the treatment

Exclusion criterion

Progressive bulbar palsy.

C. 研究結果

ALS 患者：

この治験に参加希望の 48 人の ALS 患者のうち、19 名が基準に合致した。しかし、病状進行による通院困難のために 10 人が途中で脱落した。最終的には 9 名の ALS 患者が最後まで参加した。この 9 名のうち、4 名が高用量群、5 名が低用量群に無作為に割り振られた。Table 2 に患者の内訳を高用量、低用量群で分けて示すが、男女比を除いて明らかな差はみられない。病状進行に対する効果：

観察期間内で、すべての患者で Norris scale と %VC は低下していった。治療開始前 3 ヶ月と治療開始後 9 ヶ月で、1 ヶ月あたりの低下度を示したものが Figure 1 であるが、治療開始前の低下度は高用量群と低用量群で差はない。しかし、治療開始後の低下度は高用量群で小さくなっており、治療開始前と後で低下度の比を

計算すると Norris total scale および Norris limb scale の 2 つのパラメーターにおいて、高用量群で有意に低下度が小さかった(Figure 2)。すなわち、ALS による筋力低下の進行を遅らせる効果が認められた。

副作用：

重大な副作用は認められなかったが、高用量群の 2 名、低用量群の 1 名で皮疹が観察された。しかし、抗アレルギー剤の投与ですみやかに改善し、IGF-1 投与は継続可能であった。

Table 2. Baseline Patient Characteristics

Characteristics	Low Dose	High Dose
No. of patients randomized	5	4
Age at onset (yr, mean \pm SEM)	46.0 \pm 5.6	49.5 \pm 8.2
Age at inclusion (yr, mean \pm SEM)	47.4 \pm 5.7	50.8 \pm 8.0
Time from onset to inclusion (mo, mean \pm SEM)	15.6 \pm 2.7	17.3 \pm 5.6
Men (%)	100	50
VC% predicted (mean \pm SEM)	104.2 \pm 12.2	104.4 \pm 8.0
Norris scale (mean \pm SEM)	87.4 \pm 3.4	92.3 \pm 3.7
Norris limb scale (mean \pm SEM)	51.0 \pm 3.1	54.5 \pm 4.0
Norris bulbar scale (mean \pm SEM)	36.4 \pm 2.6	37.8 \pm 0.9

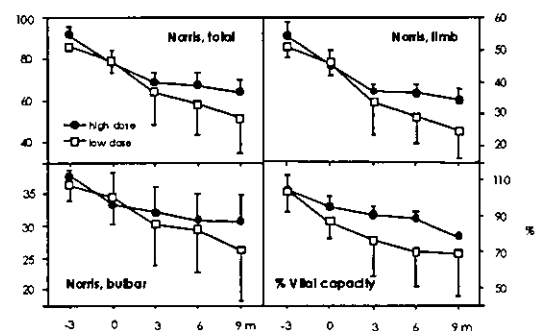


Fig. 1. Changes of Norris total, limb and bulbar scales, and vital capacity (percentage predicted) of ALS patients (mean \pm SEM) with measurements at -3 m and 0 m in the high-dose group (filled circles; n = 4) and in the low-dose group (open squares; n = 5), followed by an estimation of the slope from 0 m onward, as determined with repeated measurements analyses.

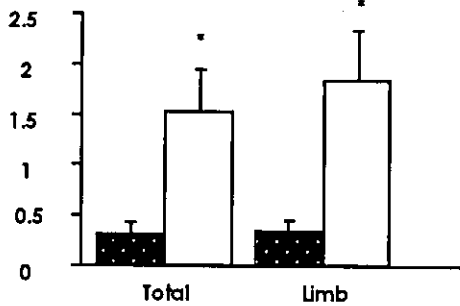


Fig. 2. Ratio of the slope of Norris total and limb scales after treatment to that before. A ratio of 1 indicates that there is no change of the slope before and after treatment. Note that the high-dose treatment (filled bars) delays motor deteriorations in ALS patients as compared to low-dose treatment (open bars). * $p < 0.05$.

D. 考察

今回、我々は IGF-1 脊髄腔内投与法を実際の ALS 患者において施行して、その安全性を確認した。IGF-1 の効果としては大きなものではなかったが、高用量群で低用量群に比べて有意な症状進行遅延効果が、Norris scale 特に limb スコアにおいて認められた。このことより、IGF-1 は四肢の脱力の進行を抑制すると推定される。球症状を反映する Norris bulbar スコアに有意な差がみられなかったことは、Table 2 から推定されるように、この治験に参加した ALS 患者が元々球症状の軽微な者が多かったためと思われる。さらに、%VC の低下に有意な効果がみられなかったことについても、ほとんどの患者で元々肺活量が保持されていたためと考えられる。

前述したように、皮下投与による IGF-1 の治験が欧米で行われたが、全体としては統計学的に有意な効果は認められなかった^{6,7)}。この治験では、IGF-1 は 50 または 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ もの量が投与されており、今回の我々の髄注投与量 (0.5 or 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/2$ weeks) に比べきわめて多い。皮下投与では、IGF-1 はおそらくほとんど中枢神経系に移行しなかったものと推定される。脊髄腔内投与において、今回のような少量投与でも効果を示したことは、投与経路として明らかに髄注が優れているということを示唆するものと思われる。

G93A 変異型 SOD1 マウスへの IGF-1 髄注実験においては、臨床的效果 (運動機能低下を遅延させ、生命予後を改善) に加えて、運動ニューロン脱落を抑制することが病理学的検索により明らかにされた。これは、生存シグナルである p-Akt と p-ERK の誘導を通して発揮され

るものと考えられている²⁾。従って、ALS 患者においても IGF-1 髄注の臨床的效果には、生存シグナル誘導による運動ニューロン死抑制が関わっている可能性があるものと推測される。

今回の治験結果から、IGF-1 脊髄腔内投与療法が安全で患者が充分耐えられ、かつ明確な有効性を有することは明らかになった。今後は、より多くの患者において長期間投与を行ってその有効性を検証する必要があるが、IGF-1 脊髄腔内投与療法が、ALS に対する一つの有効な治療法として確立されていくことが期待される。

E. 結論

IGF-1 髄注療法は、将来 ALS 治療の一つとして確立される可能性があるが、用量や投与頻度などをさらに多数の患者で最適化していく必要がある。

文献

- 1) Gluckman P, Klempf N, Guan J et al.: A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 593-599. 1992
- 2) Kermer P, Klocker N, Labes M et al.: Insulin-like growth factor-1 protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 in vivo. *J Neurosci* 20: 2-8. 2000
- 3) Wang JM, Hayashi T, Zhang WR et al.: Reduction of ischemic brain injury by topical application of insulin-like growth factor-1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 859: 381-386. 2000
- 4) Eustasche I, Seyfritz N, Gueritaud JP: Effects of insulin-like growth factors on organotypic cocultures of embryonic rat brainstem slices and skeletal muscle fibers. *Dev Brain Res* 81: 284-292. 1994
- 5) Bilak MM, Kuncz RW: Delayed application of IGF-1 and GDNF can rescue already injured postnatal motor neurons. *NeuroReport* 12: 2531-2535. 2001
- 6) Lai EC, Felice KJ, Festoff BW et al.: Effects of recombinant human insulin-like growth factor-1 on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-1 Study Group. *Neurology* 49: 1621-1630. 1997
- 7) Borasio MM, Robberecht W, Leigh PN et al.: A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-1 in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-1 Study Group. *Neurology* 51: 583-586. 1998

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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

—HGF ファミリーの ALS に対する機能解析—

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

神経特異的 HGF トランスジェニックマウス (Tg) と ALS モデル Tg マウスとのダブル Tg マウスの解析結果、HGF が脊髄運動ニューロンおよびその周囲の反応性アストロサイトに機能して病態を改善することを報告してきたが、ALS における脊髄以外の運動神経細胞死に対する HGF の効果は、明らかになっていなかった。本研究で、ダブル Tg マウスのアプローチで脊髄以外の運動ニューロンに焦点を当て解析進めた結果、HGF が顔面神経および舌下神経の運動ニューロンの神経細胞死も抑制することを明らかとなった。HGF は ALS で変性する運動ニューロン全般の治療に重要な機能をもつと考えられる。

- A. **研究目的:** 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経細胞の特異的神経細胞死を特徴とする致死性神経変性疾患で、現在治療法のない難病中の難病とされている。私達は肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: 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 (Tg) マウスの脊髄運動ニューロン死を抑制し、運動機能を改善、さらには寿命を大幅に延長することを見いだした。ALS の寿命延長には、脊髄運動ニューロンに加えて、他の領域の運動ニューロンの細胞死抑制も必須と考えられるが、ALS-Tg マウスの脊髄以外の運動ニューロンに対する HGF の効果は不明である。本研究では、ヒト ALS および ALS-Tg
- マウスで変性すること知られる舌下神経および顔面神経核の運動ニューロンに対する HGF の機能を解析することである。
- B. **研究方法:** ALS-Tg マウス (Tg-SODG93A) と神経特異的 HGF 発現 Tg マウス (HGF-Tg) を交配し、HGF 遺伝子を ALS-Tg マウスの神経系に特異的に供給した際の脊髄以外の運動ニューロン (顔面神経および舌下神経) の神経変性・脱落に対する HGF の効果を、組織学的に解析する。
- C. **研究結果:** (1) 顔面神経細胞 (運動ニューロン) の変性・脱落に対する HGF の効果: Cresyl violet 染色, MAP2 免疫染色および SMI32 免疫染色の結果、ALS-Tg マウスにおいて7ヶ月齢

のマウスの顔面神経核に局在する運動ニューロン数が減少し、残存神経細胞も atrophic change をおこしていた。一方、ALS/HGF においては顔面神経の運動ニューロン死が抑制されていた。同様に Cresyl violet 染色、MAP2 免疫染色、SMI32 免疫染色いずれの染色に於いても、舌下神経核においても7ヶ月齢でおこる運動ニューロンの変性脱落が ALS/HGF-Tg においては抑制されることが確認された。

D. 考察

ALS は、運動ニューロンが特異的に変性脱落していく難病で現在治療法がない。特に家族性 ALS (FALS) と孤発性 ALS (SALS) では、後者が90%以上を占める現状にあっては、FALS と SALS に共通する病態にアプローチする治療法開発が重要課題である。これまでの研究結果、HGF は ALS で特異的に変性する脊髄運動ニューロンに作用して、caspase の誘導を抑制、一方病態末期に於いては反応性アストロサイトに作用してグルタミン酸トランスポーターを誘導することでグルタミン酸のクリアランスを上昇させ、結果的に運動ニューロンへのグルタミン酸毒性を間接的にも緩和する2重のメカニズムで ALS の脊髄運動ニューロン死およびその軸索変性を抑制し、運動機能を改善、寿命を延長することを報告してきた。今回、HGF が脊髄運動ニューロンに加えて、顔面神

経核や舌下神経核の運動ニューロンの変性・細胞死の抑制効果を示せたことから、HGF は ALS の病態改善、治療に有用であること強く示唆される。一方鳥取大学加藤先生らとの共同研究の結果、ヒトにおいては FALS, SALS とともに HGF と c-Met が疾患末期まで FALS-Tg マウスと同様の発現制御を受け、逆に HGF と c-Met の破綻が疾患の顕著な進行(人工呼吸器の有無)と相関していたことは、HGF が FALS と SALS で共通して内因性 ALS 改善因子として機能している可能性を示唆している。今後は、HGF の ALS への適用に有効な供給法を確立していくことが大切と考えられた。

E. 結論

HGF が ALS の進行過程に於いて、従来示してきた脊髄運動ニューロンに加えて、顔面神経および舌下神経といった運動ニューロンについても神経変性・細胞死を抑制する効果があることを明らかとした。

F. 研究発表

1. Isogawa K, Akiyoshi J, Kodama K, Matsushita H, Takahashi, Tsutsumi T, Funakoshi H, Nakamura T, Anxiolytic effect of hepatocyte growth factor infused into rat brain. *Neuropsychobiology* 51(1):34-38, 2004.
2. Date I, Takagi N, Takagi K, Kago T, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S. Hepatocyte growth factor improved learning and memory dysfunction of microsphere-embolized rats. *J Neurosci Res*. 78(3):442-5, 2004.
3. Date I, Takagi N, Takagi K, Kago T,

- Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S. Hepatocyte growth factor attenuates cerebral ischemia-induced learning dysfunction. **Biochem Biophys Res Commun.** 319(4):1152-8, 2004.
4. 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):212-4, 2004.
 5. Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. **Clin Chim Acta.** 327:1-23 2003.
 6. 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 (Berl).** 106(2):112-20, 2003.
 7. 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.
 8. 船越 洋、中村 敏一、ALS と神経栄養因子-HGF による新しい治療法開発の可能性。 **脳神経** 55(10):841-845, 2003.

研究成果の刊行に関する一覧表

(分担研究者)

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻		出版年
			ページ		
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
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
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
Suzuki N, Aoki M, Himura Y, Takahashi T, Onodera Y, Ishigaki A, Kato M, Warita H, Tateyama M, Itoyama Y	Expression profiling with progression of dystrophic change in dysferlin-deficient mice (SIL).	Neurosci Res	in press		
Tamura T, Nakamura M, Ogawa Y, Toyama Y, Miura M, Okano H	Targeted expression of anti-apoptotic protein, p35, in oligodendrocytes reduces delayed demyelination and functional impairment after spinal cord injury.	Glia	in press		2005
Iwanami A, Kakneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K., Tanioka, Y., Tanaoki, N., Nomura, T, Toyama, Y, Okano H	Transplantation of human neural stem/progenitor cells promotes functional recovery after spinal cord injury in common marmoset.	J Neurosci Res	in press		2005
Iwanami A, Yamane J, Katoh H, Nakamura M, Momomoshima S, Ishii H, Tanioka Y, Tanaoki N, Nomura T, Toyama Y, Okano H	Establishment of Graded Spinal Cord Injury Model in a Non-human Primate: the Common Marmoset.	J Neurosci Res	in press		2005
Kanemura Y, Mori H, Nakagawa A, Islam MO, Kodama E, Yamamoto A, Shofuda T, Kobayashi S, Miyake J, Yamazaki T, Hirano S, Yamasaki M, Okano H	In vitro screening of epigenetic factors for human neural stem/progenitor cells proliferation using indirect measurement of total ATP content in viable cells.	Cell Transplantation	in press		2005
Watanabe K, Nakamura M, Iwanami A, Fujita Y, Kanemura Y, Toyama Y, Okano H	Comparison between fetal spinal cord-and forebrain-derived neural stem/progenitor cells as a source of transplantation for spinal cord	Dev Neurosci	26	275-287	2004

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻		出版年
			ページ		
Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H	Retinoic acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells.	Dev Biol	275 124-142		2004
Istibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Shimazaki T, Okano H, Mizusawa H	Human neuronal stem cells improve sensorimotor and cognitive impairment in Mongolian gerbils after ischemia.	J Neurosci Res	78 215-223		2004
Yoshizaki T, Inaji M, Kouike H, Shimazaki T, Sawamoto K, Ando K, Date I, Kobayashi K, Suhara T, Uchiyama Y, Okano H	Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells.	Neurosci Lett	363 33-37		2004
Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, Iwamoto Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y, Okano H	Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury.	J Neurosci Res	76 265-276		2004
Seiji Ohka, Norie Matsuda, Koujiro Tohyama, Takayuki Oda, Masato Morikawa, Shusuke Kuge, Akio Nomoto	Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome	J. Virol.	78 7186-7198		2004
Akiko Yanagiya, Qingmei Jia, Seiji Ohka, Hitoshi Horie, Akio Nomoto	Blockade of poliovirus-induced cytopathic effect in neural cells by monoclonal antibody against poliovirus or human poliovirus receptor	J. Virol.	79 1523-1532		2005
Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G	Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients.	Brain	in press		2005
Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G	Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	Ann Neurol			2005
Ishigaki S, Hishikawa N, Niwa J, Jemura S, Natsume T, Hori S, Kakizuka A, Tanaka K, Sobue G	Physical and functional interaction between dorfins and valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitinated inclusions in neurodegenerative disorders.	J Biol Chem	279 51376-51385		2004

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻		出版年
			ページ	ページ	
Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H	Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells.	Dev Biol	275	124-142	2004
Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G	Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): Ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspective.	J Mol Med	82	298-307	2004
Katsuno M, Adachi H, Sobue G	Sweet relief for Huntington disease.	Nature Med	10	123-124	2004
Katsuno M, Sobue G	Polyglutamine diminishes VEGF: Passage to motor neuron death?	Neuron	41	677-679	2004
Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, 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	89	64-72	2004
Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Sobue G	Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy.	Hum Mol Genet	13	1183-1192	2004
Kurata T, Matsubara E, Yokoyama M, Nagano I, Shoji M, Abe K	Improvement of SSPE by intrathecal infusion of α -IFN.	Neurology	63	398-399	2004
Morimoto N, Nagano I, Deguchi K, Murakami T, Fushimi S, Shoji M, Abe K.	Leber's hereditary optic neuropathy with chorea and dementia resembling Huntington disease.	Neurology	63	2451-2452	2004
Shiote M, Nagano I, Ilieva H, Murakami T, Narai H, Ohta Y, Nagata T, Shoji M, Abe K.	Reduction of a VEGF receptor, Flk-1, by antisense oligonucleotides induces motor Neuron death in rat spinal cord exposed to hypoxia	Neuroscience		in press	2005
Nagano I, Shiote M, Murakami T, Kamada H, Hamakawa Y, Matsubara E, Yokoyama M, Morita K, Shoji M, Abe K.	Beneficial effects of intrathecal IGF-1 administration in patients with amyotrophic lateral sclerosis.	Neurological Research		in press	2005
Isogawa K, Akiyoshi J, Kodama K, Matsushita H, Takahashi, Tsutsumi T, Funakoshi H, Nakamura T,	Anxiolytic effect of hepatocyte growth factor infused into rat brain.	Neuropsychobiology	51(1)	34-38	2004

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻		出版年
			ページ		
Date I, Takagi N, Takagi K, Kago T, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S.	Hepatocyte growth factor attenuates cerebral ischemia-induced learning dysfunction.	Biochem Biophys Res Commun.	319(4)	1152-8	2004
Date I, Takagi N, Takagi K, Kago T, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S.	Hepatocyte growth factor improved learning and memory dysfunction of microsphere-embolized rats.	J Neurosci Res.	78(3)	442-5	2004
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)	212-4	2004

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者	論文タイトル	書籍全体の編集者	書籍名	出版社	巻		出版年
					ページ		
青木正志、永井真貴子、石垣あや、糸山泰人	神経栄養因子HGFの髄腔内投与によるALS治療法の開発		最新医学		59 87-93		2004
Iwanami A, Ogawa Y, Nakamura M, Kaneko S, Sawamoto K, Okano HJ, Toyama Y, Okano H	Neural stem/progenitor cell transplantation for spinal cord repair; optimal timing of transplantation.	eds. Freese A, Simone FA, Leone P, Janson C	Prog. Neurol. Surg.	Kanger	18 104-123		2005
砂田典子、出口健太郎、永野功、幡中邦彦、山脇均、藤木茂篤、東海林幹夫、阿部康二	片側顔面神経麻痺と舌下神経麻痺のみを呈した皮質梗塞の1例		脳と神経		56 801-804		2004
村上哲郎、瓦林毅、松原悦朗、永野功、東海林幹夫、阿部康二、今居謙、井上治久、高橋良輔	パーキンソン病患者のレビー小体におけるPeal-R, ParkinnおよびGlupの関与		Progress in Medicine		24 3049-3053		2004
伏見聡一郎、永野功、出口健太郎、名古屋草子、村上哲郎、東海林幹夫、阿部康二	MRI所見のない亜急性脊髄炎にて発症し体性感覚誘発電位(SEP)が診断に有用であった原発性Sjogren症候群の1例		脳と神経		56 1029-1034		2004
山脇美由紀、名古屋草子、永野功、大森信彦、阿部康二	舌根部萎縮および交代性斜偏視を合併した小脳失調症の1例		神経内科		62 75-79		2005
山本久美子、永野功、太田康之、東海林幹夫、阿部康二	亜急性に四肢脱力が進行し運動神経軸索障害を中心としたサルコイドニューロパチーの1例		神経内科		62 70-74		2005

研 究 協 力 者

研 究 報 告