

91(2):404-412, 2004

45回日本神経学会総会 2004年

Sugai F, Yamamoto Y, Miyaguchi K, Zhou Z, Sumi H, Hamasaki T, Goto M, Sakoda S. Benefit of valproic acid in suppressing disease progression of ALS model mice. Eur. J. Neurosci. 2004 Dec;20(11):3179-83

中辻裕司、奥野龍禎、熊ノ郷淳、菊谷仁、森谷真之、佐古田三郎. 免疫補助刺激分子 CD40 の筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルマウス脊髄における発現と機能の検討. 第16回日本神経免疫学会 2004年

2. 学会発表

小口健、中辻裕司、澤田誠、奥野龍禎、佐古田三郎. 反応性グリオシス抑制への試みー4. 第43回日本神経学会総会 2002年

奥野龍禎、森谷真之、中辻裕司、熊ノ郷淳、菊谷仁、藤村晴俊、佐古田三郎. 家族性筋萎縮性側索硬化症モデルマウス脊髄における CD40 の発現と機能の検討. 第45回日本神経学会総会 2004年

奥野龍禎、中辻裕司、熊ノ郷淳、菊谷仁、森谷真之、佐古田三郎. 免疫補助刺激分子 CD40 の筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルマウス脊髄における発現. 第44回日本神経学会総会 2003年

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得	該当なし
実用新案登録	該当なし
その他	該当なし

小口健、中辻裕司、澤田誠、奥野龍禎、佐古田三郎. 反応性グリオシス抑制への試みと炎症性サイトカイン産生能の検討. 第15回日本神経免疫学会 2003年

山本洋一、周志衛、須貝文宣、中村秀次、佐古田三郎. 神経栄養因子 HDGF(hepatoma-derived growth factor) の作用機序に関する研究. 第45回日本神経学会総会 2004年

隅寿恵、長野清一、藤村晴俊、佐古田三郎. 加藤信介変異 SOD1 (G93A) トランスジェニックマウスにおける空胞形成過程とその意義. 第

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班

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

研究者 山形大学医学部第三内科 小山信吾 荒若繁樹 加藤丈夫

研究要旨

変異 SOD1 による ALS 発症メカニズムは未だ不明であるが、変異型 SOD1 タンパク凝集体が細胞毒性を発揮するという「重合化仮説」が提唱されている。本研究は「変異型 SOD1 の可溶性変化」に焦点をあて、加齢による変異型 SOD1 の可溶性変化と、さらに変異型 SOD1 の可溶性変化と分子シャペロン群のヒートショックプロテイン（Hsp）70、Hsp40、ユビキチン・プロテアソーム分解系との関係を検討した。Triton X-100 不溶性-SDS 可溶性の変異型 SOD1 分子種は ALS モデルマウスの加齢とともに増加した。また、Triton X-100 不溶性-SDS 可溶性の変異型 SOD1 分子種は、プロテアソーム阻害剤の濃度依存性に増加し、Hsp の共発現によってその発現量は減少した。変異型 SOD1 は SDS 可溶性分子種を経て凝集体を形成することが示唆された。

A. 研究目的

SOD1 重合化仮説を検討するための基礎的情報となる変異型 SOD1 の可溶性変化に焦点をあて、1. 本来可溶性タンパク質である SOD1 が、どのような不溶性分子種に分けられるか検討する。2. 変異型 SOD1 の可溶性変化と加齢との関係を検討する。3. ユビキチン・プロテアソーム分解系と変異型 SOD1 の可溶性変化との関係を検討する。4. Hsp が変異型 SOD1 の可溶性変化に及ぼす影響を検討する。

B. 研究方法

家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）のモデルとして、H46R 変異型 SOD1 トランスジェニックマウス（東北大学神経内科

糸山先生、青木先生より供与）を用いた。マウスの運動機能をロタロッドで測定し、発症前早期、発症前後期、発症期、末期と病期分類し、各病期で脊髄のサンプリングを行なった。マウス脊髄を PBS バッファー、1% Triton X-100/ PBS バッファー、5% SDS/ PBS バッファー、8M 尿素/ PBS バッファー、88% ギ酸/ PBS バッファーで分画し、ウエスタンブロットを行い、変異型 SOD1 の可溶性変化を検討した。SOD1 を過剰発現させた培養細胞（COS7 細胞、SH-SY5Y 細胞）を用い、プロテアソーム阻害剤である MG132 あるいは lactacystin を添加することでプロテアソーム分解系と SOD1 の可溶性変化との関係を検討した。また、SOD1 と Hsp を共発

現させることでHspが及ぼすSOD1の可溶性変化を検討した。

(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た。

C. 研究結果

変異型SOD1トランスジェニックマウスは平均142.7日より運動機能の低下をきたし、平均163.5日で死亡した。マウスの内因性SOD1、過剰発現された野生型SOD1はTriton X-100可溶性画分までで回収されるのに対し、変異型SOD1はSDS可溶性画分以降の画分でも検出され、SOD1の2量体、高分子量種として検出された。PBS可溶性画分、Triton X-100可溶性画分の変異型SOD1は病期の進行によっても大きな変動を示さなかった。SDS可溶性画分における変異型SOD1単量体、2量体は発症前に有意な増加を示したのに対して、SDS可溶性画分の高分子量種やより可溶性の低下したギ酸可溶性画分の変異型SOD1は発症後に有意な増加をきたした。

COS7細胞にSOD1を過剰発現させ

(pcDNA3.1ベクター)、プロテアソーム阻害剤であるMG132を添加すると、変異型SOD1はSDS可溶性画分、SDS不溶性画分においてMG132濃度依存性の増加を示し、2量体、高分子量種の形成を認めた。

SH-SY5Y細胞を用いた場合や異なるプロテアソーム阻害剤であるlactacystinを用いても同様の結果を示した。COS7細胞にpEF-BOSベクターを用いてSOD1を過剰発現させると、プロテアソーム阻害剤を添加しない状態でもSDS可溶性画分、SDS不溶性画分に変異型SOD1が観察された。

変異型SOD1分子種はHsp70の共発現によりSDS可溶性画分、SDS不溶性画分で減少した。Hsp40単独の共発現によるSOD1の減少効果はわずかであったが、Hsp40はHsp70の作用を増強させた。

D. 考察

変異型SOD1は、いくつかの可溶性の異なる分子種から形成され、マウスにおいて変異型SOD1の可溶性変化は、Triton X-100不溶性SDS可溶性SOD1分子種の出現によって、内因性ならびに野生型SOD1と区別できた。この可溶性が低下したSOD1分子種が凝集体形成の過程における中間体である可能性が考えられた。SDS可溶性の変異型SOD1(特に、単量体と2量体)は、運動機能障害の出現より先行して増加していたことから、ALS発症において重要な役割を果たしている可能性があるものと考えられた。

変異型SOD1はプロテアソーム阻害剤の濃度依存性にTriton X-100不溶性-SDS可溶性SOD1分子種が増加し、この変化はマウスの加齢に伴う可溶性変化に類似していたことから、SOD1の可溶性変化におけるプロテアソーム活性の関与が示された。Hsp70/40の過剰発現は、SDS可溶性の変異型SOD1の発現量を抑制したが、PBS可溶性画分やTriton X-100可溶性画分のSOD1発現量の変化は乏しかった。これよりHspが可溶性の低下した変異型SOD1分子種を認識し、リホールディングよりも分解の方向へ向かわせている可能性が考えられた。

E. 結論

変異型 SOD1 は、分子シャペロンやユビキチン・プロテアソーム分解系の処理能力を超えた場合、SDS 可溶性分子種を経て凝集体を形成することが示唆された。

G. 研究発表

第 45 回日本神経学会で発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

新たに同定された変異 SOD1 結合蛋白・HSP105 の病態的意義

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:免疫沈降法によるスクリーニングによって、変異 SOD1 の結合蛋白として HSP105 を同定した。変異 SOD1 毒性が強いものほど HSP105 の結合量が多く、またマウス脊髄での結合を確認した。変異 SOD1 transgenic マウスの運動麻痺の進行期に脊髄での HSP105 が減少することを確認し、そのことは変異 SOD1 毒性の一部に HSP105 の消費がある可能性を示唆した。HSP105 は保護的に作用していると考えられ、変異 SOD1 毒性に対して治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

共同研究者:山下博史¹、川又純²、畑山巧³

1 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 2 京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構 3 京都薬科大学生化学教室

A.研究目的

運動ニューロンに選択的な障害をもたらす変異 SOD1 の結合蛋白を同定することは、未解明の部分の多い変異 SOD1 毒性の性質を明らかにし、治療方法を開発する上で重要である。そこで変異 SOD1 結合蛋白を可能な範囲で網羅的に検索し質量分析にて同定、新たな結合蛋白を検出し、その蛋白について病態との関連を検討した。

B.研究方法

サンプルとして培養細胞とマウス組織を使用した。変異 SOD1 としては、優性遺伝型の G93A、G85R、劣性遺伝型の D90A、非病原性の変異としての報告がある D96N、それと wild type をそれぞれ培養細胞において一過性発現で使用した。サンプルの溶解液に抗 SOD1 抗体または抗 FLAG 抗体を加えて免疫沈降し、SOD1・結

合蛋白複合体を SDS-PAGE で分離、銀染色で変異 SOD1 のレーンにのみ認めるバンドについて質量分析を行った。また新たに同定した変異 SOD1 結合蛋白が G93A SOD1 transgenic マウスの脊髄で経時的にどのように変化するかを WB で検討した。

(倫理面への配慮)

マウスは京都大学動物実験に関する指針を遵守して扱われた。

C.研究結果

マウスの neuroblastoma cell line である Neuro2A に対して C 末端に FLAG 配列を付加した SOD1 を一過性過剰発現し抗 FLAG 抗体で免疫沈降すると、wild type SOD1 を過剰発現したサンプルを用いた免疫沈降ではみられず変異 SOD1(G85R,G93A)を過剰発現したサンプルのみに特異的にみられるバンドが 75kD 付近と 100kD 付近に 1 本ずつ認められた。銀染色にて認める有意な 2 本のバンドをゲルより切り出し質量分析にて解析すると、それぞれ heat shock cognate protein70(HSC70)、heat shock protein 105(HSP105)と判明した。

HEK293T をサンプルとして同様の実験を行うと HSC70 と HSP105 に加えて、HSP70、さらに HSP110 family に属する APG-2 を変異 SOD1 に特異的なバンドとして認めた。HSP105 と変異 SOD1 の結合は抗体を用いたプロットでも確認した。また一定量の沈降抗体により共沈する HSP105 の量は、wild、D96N では認めず、D90A<<G85R≒G93A の順に多くなり変異 SOD1 の病原性の強さと相関していることが分かった。次に in vivo における SOD1 と HSP105 の結合をマウス脊髄(littermate control、wild SOD1 transgenic、G93A SOD1 transgenic)をサンプルとして免疫沈降で検討したところ、in vitro での結果と同様に G93A 変異 SOD1 に最も多く HSP105 が結合していた。G93A transgenic マウス脊髄の主要なシャペロンの蛋白量の経時的な変化を検討したところ、運動麻痺の進行期において HSP27 は上昇を示したが、対照的に HSP105 は減少を示した。野生型マウスの脊髄前角の免疫染色では、SMI32 で染色される運動ニューロンは HSP105 でも染色され、HSP105 は運動ニューロンに多いことが判明した。

D. 考察

HSP105 は HSP110family に属し、HSP70 と homology がある。Neuron に多く発現するが、HSP70 と異なることとして folding 活性が明らかでないことが挙げられている。HSP105 は ATP が減少している環境下でも変性蛋白と結合して蛋白凝集を防ぐこと、また HSP105 はむしろ HSP/HSC70 の活性を抑制することが報告されていて、細胞内 ATP レベルが高度に減少するような激しいストレスにさらされている細胞において、HSP/HSC70 の代わりに変性蛋白の凝集を防いでいると考えられている。運動ニューロン

が非常に長い軸索を伴う大型細胞でありエネルギー需要が大きいことを考慮すると、このことは非常に興味深いと考えられる。HSP105 が伸長 CAG リピートを持つアンドロゲン受容体の凝集と細胞毒性を抑制するという報告があり、変異 SOD1 毒性に対しても HSP105 が細胞保護的に作用している可能性が高いと思われる。また、G93A SOD1 transgenic マウスの運動麻痺の進行期に HSP105 が減少することは、変異 SOD1 は HSP105 を消費することにより毒性の一部を発揮している可能性を示唆した。今後 HSP105 transgenic マウスを使用して、変異 SOD1 transgenic マウスの延命効果に関する検討が必要と考える。

E. 結論

変異 SOD1 毒性に対して、HSP105 が治療のターゲットになる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanki R, Nakamizo T, Yamashita H, Kihara T, Sawada H, Uemura K, Kawamata J, Shibasaki H, Akaike A, Shimohama S: Effects of mitochondrial dysfunction on glutamate receptor-mediated neurotoxicity in cultured rat spinal motor neurons. Brain Res 1015:73-81, 2004

2. 学会発表

山下博史、神吉理枝、下濱俊

川又純、大川克也

免疫沈降法と質量分析を用いた変異 SOD1 結合蛋白の検索 第 45 回日本神経学会総会(臨床神経学 2004 VOL.44 NO.12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定はない

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

「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「ラット一過性脳虚血モデルに対する骨髄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

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：われわれはこれまでアデノウイルスベクターを用いた塩基性繊維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor-2; 以下 FGF-2）遺伝子導入により、様々なげっ歯類モデルにおける神経保護、神経再生を証明してきた。この結果をふまえ、より長期、安全に脊髄前角細胞に選択的に遺伝子を発現せしめる新規ウイルスベクターとして、複製不能型 1 型単純ヘルペスウイルスベクター（herpes simplex virus vector type 1 ベクター; 以下 HSV-1 ベクター）を構築した。また、同ウイルスベクターは脊髄前角細胞のみならず、骨髄間質系細胞（bone marrow stromal cell; 以下 MSC）への安全でかつ効果的な遺伝子導入も可能であった。FGF-2 および肝細胞増殖因子（hepatocyt growth factor; 以下 HGF）を目的遺伝子として同ベクターにて MSC に遺伝子導入を行いラット中大脳動脈一時遮断モデル作成後脳内に投与したところ、移植脳内にて長期にわたり MSC は目的遺伝子を発現していた。また、神経症状の改善を認めた。われわれの開発した新規ウイルスベクター単独、もしくは MSC との複合投与で、筋萎縮性側索硬化症をはじめとする神経変性疾患に対する治療実験を継続中である。

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。これまで神経栄養因子の一つとして、FGF-2 に着目し、アデノウイルスベクターを用いた FGF-2 遺伝子導入により、様々なげっ歯類モデルにおける神経保護、神経再生を証明してきた。また、これまでわれわれは、より長期、安全に脊髄前角細胞に選択的に遺伝子を発現せしめる新規ウイルスベクターとして、複製不能型 HSV-1 ベクターの開発を行ってきた。同ウイルスベクターに

FGF-2, HGF を candidate gene として組み込み、これら遺伝子を発現する組み換え HSV-1 ベクターを作成した。

骨髄間質系細胞（MSC）は多分化能を有し、かつ多様なサイトカインソースとされ、脳虚血病変、筋萎縮性側索硬化症をはじめとする神経変性疾患、神経外傷性疾患に対する治療 material として最近注目されている。骨髄由来細胞へのウイルスベクターを用いた遺伝子導入は比較的困難とされているが、われわれが開発した複製不能 HSV-1 ベクターを用いて同細胞への高効率の遺伝子導入が可能であるかを検討した。また、神経変性疾患に対する新たなアプローチとして、ウイルスベク

あるかを検討した。また、神経変性疾患に対する新たなアプローチとして、ウイルスベクターによる神経栄養因子遺伝子導入を行った骨髄由来細胞を用いることで、これら疾患の病態を更に強力に改善させうるか、研究をおこなった。

B. 研究方法

1) HSV-1 ベクターによる MSC への遺伝子導入効率の検討: ICP34.5, 4, VP16 欠失、LAT promoter 制御下 GFP 発現複製不能型 HSV-1 ベクターを構築し、MSC への遺伝子導入効率、安全性について検討した。

2) 目的発現遺伝子として FGF-2、HGF それぞれを発現する複製不能型 HSV-1 ベクターを構築し、MSC への遺伝子導入効率について検討した。

3) ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける FGF-2 および HGF 遺伝子導入 MSC による治療実験: あらかじめ *ex vivo* にて FGF-2、HGF 遺伝子を MSC に複製不能型 HSV-1 ベクターを用いて遺伝子導入した。ラット右中大脳動脈閉塞 2 時間後に再灌流し、FGF-2 遺伝子導入 MSC 群では 24 時間後、HGF 遺伝子導入 MSC 群では 6 時間後に右側脳内へ遺伝子導入 MSC を投与し、神経症状の改善、脳梗塞巣の広がりを検討した。

4) 脳内神経系細胞への遺伝子導入: ラット右中大脳動脈閉塞モデルの右側脳内へ HGF 発現複製不能型 HSV-1 ベクターを移植し、脳内神経細胞における遺伝子導入、および遺伝子発現期間について検討した。

B. 研究結果

1) 複製不能型 HSV-1 ベクターによる MSC への遺伝子の導入: 複製不能型 HSV-1 ベクターを用いて MSC へ高効率の遺伝子導入が可能であった。また、骨髄 MSC への感染後 9 時間以降にウイルス複製を認めず、遺伝子構造から予測されるとおりの安全なウイルスベクターであることを確認した。

2) FGF-2、HGF それぞれを発現する複製不能型 HSV-1 ベクターにて骨髄間質系細胞に遺伝子導入をおこなったところ、感染強度依存性に細胞内外への FGF-2、HGF 産生を認めた。

3) ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける FGF-2、HGF 遺伝子導入 MSC による治療効果: 脳内移植した神経栄養因子遺伝子導入 MSC は、移植脳内に生着し、強力に目的増殖因子を分泌していることが確認された。また増殖因子遺伝子導入 MSC 治療群では FGF-2 遺伝子、HGF 遺伝子導入群共に、遺伝子未導入 MSC に比し、脳梗塞巣縮小は認められなかったものの、運動機能、感覚障害、反射等の神経症状は改善させることができた。

4) 脳内神経系細胞への効率的、安定した HGF 産生を認めた。

C. 考察

われわれはこれまでに独自に作成した複製不能型組み換え HSV-1 ベクターにより、末梢神経からの逆行性感染法により脊髄前角細胞への遺伝子導入が可能なることを証明した。今回われわれは同ウイルスベクターに FGF-2、HGF を candidate gene として組み込み、これら遺伝子が発現する組み換え HSV-1 ベクタ

ーを作成し、脳内神経細胞への遺伝子導入も可能であることを証明した。同ウイルスベクターの特徴のひとつは、LAT promoter 制御下に目的遺伝子を発現させるため、長期間の遺伝子発現を可能とすることである。また、もうひとつの特徴としては、感染後のウイルス複製を不可能とせしめる遺伝子構造を有することで、今回のわれわれの実験でもその構造どおりの安全性を証明した。以上より、同ベクターをもちいて、脊髄前角細胞および脳内神経細胞へ安定して神経栄養因子遺伝子を導入し、神経変性疾患への治療へと応用していきたい。

また、神経変性疾患への新しいアプローチとして、最近注目されつつある骨髄由来細胞および今回われわれが作成した複製不能型 HSV-1 ベクターを用いた複合治療を行うことを考えた。骨髄由来細胞へのウイルスベクターを用いての遺伝子導入は比較的困難とされるが、複製不能型 HSV-1 ベクターを用いることにより高効率の遺伝子導入を可能とした。同ベクターを用いて神経栄養因子 (FGF-2, HGF) 遺伝子導入 MSC を作成し、ラット中大脳動脈閉塞モデルに投与することにより強力な神経症状改善効果を得ることが出来た。また、脳内移植された MSC は生着し、目的神経栄養因子分泌が賦活されていることを証明した。神経症状改善効果が、神経栄養因子遺伝子導入 MSC によって分泌された神経栄養因子による 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、内因性神経再生賦活もしくは移植 MSC 分化に伴う神経再生による症状の改善か今後の検討を要する。筋萎縮性側索硬化症をはじめとする神経変性疾患に対しても上記複合治療を応用していきたい。すなわち、神経栄養因子遺伝子

導入 MSC を用いることで元来 MSC より分泌される多様なサイトカインに加え、遺伝子導入により賦活化された神経栄養因子分泌による神経保護効果、もしくは MSC が有する多分化能による神経再生効果が治療効果を発揮するものと期待している。

D. 結論

われわれの作成した複製不能型 HSV-1 ベクターをもちいて脊髄前角細胞、脳内神経系細胞、骨髄由来細胞への効果的な目的遺伝子導入が可能であった。また神経栄養因子遺伝子を導入した骨髄細胞を用いて脳虚血病変に対して強力な治療効果を証明した。今後、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患に対しての応用が期待される。

E. 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Naosuke Nonoguchi, Zhou Ming, Fumitaka Matsuda, Daisuke Furutama, Naokado Ikeda, Hiroshi Funakoshi, Daisuke Miyazawa, Takuji Watanabe, Yoshinaga Kajimoto, Fumiharu Kimura, Robert S. Coffin, Toshihiko Kuroiwa and Shin-ichi Miyatake : Efficient gene transfer to Bone marrow stromal cells using replication-incompetent HSV-1 vector to combine cell transplantation and gene therapy. Cell Transplantation in press.

Takuji Watanabe, Yasuaki Okuda, Naosuke

Nonoguchi, Ming Zhu Zhao, Yoshinaga Kajimoto, Daisuke Furutama, Hiroyuki Yukawa, Masa-Aki Shibata, Yoshinori Otsuki, Toshihiko Kuroiwa, and Shin-Ichi Miyatake Post-ischemic intraventricular administration of FGF-2 expressing adenoviral vectors improves neurological outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004 Nov;24(11):1205-13.

Ishii S, Koyama H, Miyata T, Nishikage S, Hamada H, Miyatake S, Shigematsu H. Appropriate control of ex vivo gene therapy delivering basic fibroblast growth factor promotes successful and safe development of collateral vessels in rabbit model of hind limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2004 Mar;39(3):629-38.

・ 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* 34:1519-1525,2003.

2. 学会発表

・ 第3回再生医療学会 平成16年3月24日

野々口直助、宮武伸一、黒岩敏彦：Efficient gene transduction into bone marrow stromal cells with replication incompetent HSV-1 vectors.

・ 第9回遺伝子医療研究会 平成16年3月4日

池田直廉、黒岩敏彦、宮武伸一：複製不能型単純ヘルペスウイルスベクターを用いた

中枢神経組織および骨髄由来細胞への効果的な遺伝子導入

・ 第3回日本分子脳神経外科学会 平成16年9月5日

池田直廉、宮武伸一、黒岩敏彦：脳虚血病変に対する骨髄細胞と複製不能型 FGF-2 産生 HSV-1 ベクターを用いた複合治療

・ 第3回日本分子脳神経外科学会 平成16年9月6日

趙明珠、黒岩敏彦、宮武伸一：Novel therapeutic strategy combining bone marrow stromal cells and HGF gene with HSV-1 vector after stroke in rats.

・ 第63回日本脳神経外科学会総会 平成16年10月5日

池田直廉、宮武伸一、黒岩敏彦：脳虚血病変に対する骨髄細胞と複製不能型 FGF-2 産生 HSV-1 ベクターを用いた複合治療の可能性

・ 第63回日本脳神経外科学会総会 平成16年10月5日

趙明珠、黒岩敏彦、宮武伸一：Novel therapeutic strategy combining bone marrow stromal cells and HGF gene with HSV-1 vector after stroke in rats.

・ 3rd Shanghai international conference of neurosurgery. 平成16年11月20日

Ming Zhu Zhao, Shin-Ichi Miyatake, Toshihiko Kuroiwa; Novel therapeutic strategy combining bone marrow stromal cells and HGF gene with HSV-1 vector after stroke in rats.

ischemia in gerbils.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特に予定はない。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服対策研究事業）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

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

研究協力者： 加藤信介 鳥取大学医学部附属脳神経生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、運動神経細胞が選択的に細胞死を惹起させるが、残存運動神経細胞が存在していることも事実である。この事実は、一部の残存運動神経細胞がALSストレスに対し生存機序を持つことを同時に意味する。我々は、この生存機序の1つとして、胎生期に発現する新しい神経成長因子であるミッドカインに着目した。ヒトでは、胎生期の胎齢13週から40週齢の一部のneuroblastと幼若な神経細胞においてミッドカインの発現がみられたが、正常成人の神経細胞においてはミッドカインの発現はもはや見られなくなった。原因不明のSALSにおいて、一部の残存運動神経細胞はミッドカインの高度再発現が認められた。変異SOD1を伴う生体系においても、SALSと同様に、残存運動神経細胞の一部はミッドカインの高度再発現機序が存在していた。即ち、運動神経細胞はALSストレスによって細胞死を生じるが、一部の残存運動神経細胞は、胎生期に発現する神経成長因子であるミッドカインを再発現することによって、ALSストレスからの生存機序を内因性で獲得しているものと考えられた。このことは、このミッドカインが運動神経細胞死を抑制する効果を求めて、ALSの新規治療に活用できる可能性を示している。

共同研究者：加藤雅子¹、青木正志²、糸山泰人²、篠原隆雄³、平塚雅雄⁴、大兵衛作⁵：¹鳥取大学医学部附属病院神経科、²東北大学大学院医学系研究科神経内科、³早稲田大学大学院理工学研究科生命理工学、⁴Montefiore Medical Center 神経病理部門、米国、⁵鳥取大学医学部附属脳神経生疾患研究施設脳神経病理部門

瘍、肝細胞癌、胆管癌及び甲状腺癌において発現していることも世界に先駆けて証明してきた。今回我々は、ヒト中枢神経系において、生理的にMKが胎生期に発現していることを確認した上で、このMKに神経細胞死を抑制する効果を求めて、難治性疾患であるALSの新規治療に活用できる独自の可能性をここに提示する。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動神経細胞が選択的に障害される疾患単位であり、単一の病因によって生じる病態ではなく、原因不明の孤発性ALS (SALS)、変異SOD1を伴う家族性ALS (FALS)およびヒト変異SOD1を導入したALSモデル動物がこの疾患範疇に入る。ALSストレスによって、運動神経細胞が細胞死に至るが、残存運動神経細胞が存在していることも事実である。この事実は一部の残存運動神経細胞がALSストレスに対し、自らを守って生存しようとする機序を持つことを同時に意味している。我々は、この生存機序の1つとして、ミッドカイン(midkine, MK)に着目した。MKは、マウスの妊娠中期に発現する成長促進因子の1つで、器官形成に関与すると報告されてきた。神経系では、神経細胞の生存を助け、神経突起伸長を促進することが神経細胞を用いた実験系で証明されている。ヒトにおけるMKの発現については従来より我々が報告しており、ヒト肝、腎の胎生組織での発現を証明し、ヒトの個体発生上、器官形成に寄与していることを初めて明らかにした。また、小児や成人では、種々の腫瘍組織：脳腫

B. 研究方法

材料：ヒト剖検定例として、胎児10症例（胎齢13週-40週）、乳児1症例（3ヶ月）、幼児2症例（18ヶ月、2歳）と成人20症例の異常のない中枢神経系組織を用いた。ALSとしては、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）と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(AAV) 3症例（7ヶ月、8ヶ月、1年）の脊髄を検索した。対照として20症例の正常脊髄を使用した。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(G1H)とlow copy群(G1L)の脊髄を検索した。対照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、G93A TgRでは生後70日から終末期（200日）までの6時点、G1H-G93A TgMでは生後90日から終末期（120日）までの4時点、G1L-G93A TgMでは、生後90日から終末期（250日）までの9時点で脊髄採取

を行い、実験に供した。

方法: ヒトMKに対するモノクローナル抗体の作製に関しては、ヒトMKのC-terminal peptide(104-121)をペプチド合成機により合成後、Freund's adjuvantと共にWistar ratに接種した。接種後のラット spleen cell と myeloma cell との hybridoma を作製し、その後 Dot immunoassay 法にて clone を選抜し、Ouchterlony 法により isotype を確定した。そして、hydroxyapatite column chromatography にて精製モノクローナル抗体を作製した。ヒト、ラット、マウスに共通するMKポリクローナル抗体の作製については、ヒト、ラット、マウスに共通するMKの25個のpeptideをペプチド合成機にて合成し、Freund's adjuvant と共に家兎に接種した。接種感作後の家兎から採血し、その血清をprotein G-sepharose gel columnにて精製ポリクローナル抗体とした。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、新たに作製した2種類の抗MK抗体を一次抗体として用い、ABC法との組み合わせにて行った。Western blot 解析は、ヒト胎児正常大脳3症例(胎齢15週、23週、28週)、ヒト正常成人脊髄1症例とSALS脊髄1症例の新鮮凍結組織を解析した。MK mRNAの解析は、MK DNAのexon 2と5に対するantisense及びsenseのそれぞれのoligonucleotide probeをDNA自動合成装置にて新たに作製し、digoxigenin nucleic acid 検出方法を用いたin situ hybridization法を行った。

C. 研究結果

1. 病理組織学的解析結果

1) ヒト胎児・新生児・乳児・成人の大脳皮質病理組織学的解析結果: ヒト胎児13週齢から18週齢での大脳皮質を構成しているほとんどすべての細胞はneuroblastであった。23週齢では大脳皮質の細胞は、まだほとんどがneuroblastであるが、ごく一部は、極めて幼若な神経細胞への分化傾向を示したものも存在した。28週齢の大脳皮質では、一部に錐体細胞が同定できた。33週齢では、錐体細胞の数が増加し、40週齢の大脳皮質前頭葉では6層構造が完成していた。新生児から幼児にかけては、大脳皮質の構造とそれを構成する神経細胞が成人とほぼ同一組織形態であった。

2) SALSおよびFALSの脊髄病理組織学的解析結果: ヒトSALSの脊髄前角の基本病理組織学的所見は、前角神経細胞数の消失・減少とそれに伴うgliosisであった。残存前角細胞は、変性、萎縮し、リボ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、残存前角細胞数は減少していった。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、胞体内封入体としてのレビー小体様消子様封入体(Lewy body-like hyaline inclusion, LBHI)が一部の残存前角神経細胞に認められた。

3) ALSモデル動物の脊髄病理組織学的解析結果: 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、経過の長いものほど、前角細胞の変性脱落の程度は高度であった。また、胞体内封入体として神経細胞内LBHI形成も認められた。

2. 抗MK抗体特異性解析結果

ヒトMKモノクローナル抗体に関しては、Dot immunoassay法より、すべてのcloneがヒトMKと特異的に反応することを確認後、clone 26を選抜した。IsotypeはOuchterlony法により、IgG_{2b}と同定された。抗体の特異的反応性はWestern blot法により確認され、ヒトMK蛋白と特異的に反応した。MKポリクローナル抗体では、non-competitive ELISA法により、ヒト、ラット、マウスの各MKと特異的に反応した。

3. ヒト正常胎児・新生児・乳児・成人、SALS、FALS及びALSモデル動物における免疫組織化学的解析結果

1) ヒト正常胎児・新生児・乳児・成人の免疫組織化学的解析結果: ヒト正常中枢神経系組織における生理的なMKの発現は、胎生期の13週齢から40週齢にかけての一部のneuroblast及び幼若な神経細胞に認められた。生後18ヶ月以後の幼児及び成人の成熟した神経細胞では、MKは生理的には発現していなかった。

2) SALS、FALS及びALSモデル動物の免疫組織化学的解析結果: SALSの40症例の脊髄を検索したところ、40症例のうちのある症例では、残存脊髄前角細胞の一部に、高度なMKの再発現を認めた。これらのMKの再発現機構を有する症例は、主に発症後3年までの人工呼吸器を装着してはいない症例であった。MKを再発現している残存脊髄前角細胞と再発現していない細胞の両者はHE染色上での染色性及び細胞形態からは区別がつかなかった。また、HE染色、MK免疫組織化学染色、MK吸気曝露の三重検出法の結果から、残存神経細胞の一部においてMKが特異的に再発現していることが示された。しかし、長期にわたる臨床経過を有するSALS症例においては、残存前角細胞数そのものの減少が高度であることも相まって、高度にMKを再発現している前角細胞の存在は明らかではなかった。FALSにおいてはLBHIを認める残存前角細胞では、一部のLBHIでは封入体を形成する際に、細胞内に再発現されたMKを取り込むために、LBHI自体がMK陽性を呈した。しかし、封入体を形成する残存前角細胞の胞体自身はMKは陰性であった。一方、LBHIを形成しない残存前角細胞はSALS

と同様、少数ではあるが、MKの再発現機序を認める残存前角細胞が存在した。ALSモデル動物のMK免疫組織化学的染色法の結果は、TgR、TgMともに同一であった。封入体を形成しない残存前角細胞の大部分は、やはりMKを再発現していなかったが、一部はヒトのSALS、FALSと同様にMKを再発現する残存前角細胞が認められた。MKの再発現時期は、H4GR TgRでは、生後160日、170日時点、G93A TgRでは、生後130日、150日時点、G1Lでは、生後215日、230日時点、G1Hでは、110日時点で顕著であった。ヒトFALSと同様に、LBHIを持つ残存前角細胞の胞体自身はMK陰性だが、一部のLBHIにおいてはMK陽性を示した。

4. Western blot 解析結果

ヒト正常胎児大脳の新陳代謝組織を用いた解析では、胎齢15週、23週、28週の各胎齢において、約15kDaのMKのバンドの出現を認めた。ヒト正常成人とSALSの新陳代謝脊髄組織においては、ヒト正常成人脊髄ではMKの発現はみられなかったが、SALS脊髄では、MKの再発現がみられた。

5. In situ hybridization 法によるMK mRNA 解析結果

MK免疫組織化学的解析にて、MKの再発現を認めた症例において、MK mRNAの発現が確認された。即ち、ALSの残存神経細胞の一部では、MKの再発現は、mRNAレベルから発現していて、最終的に蛋白レベルでの再発現をしていることが判明した。

D. 考察

MKIは、従来よりマウスにおいてよく調べられてきており、マウスの胎生中期のみ発現する118アミノ酸残基からなる成長因子の1つである。ヒトMKIは、121アミノ酸残基からなり、第11番染色体短腕(11p11.2)に位置する。MK遺伝子は、5つのexonからなり、最終的にMK蛋白としてコードされるのはExon2, 3, 4, 5からであり、ヒトは143アミノ酸残基、マウスとラットでは、140アミノ酸残基のMKが発現される。N末端からleader peptideとして22個のアミノ酸が切断されるために、ヒトMKでは最終的に121アミノ酸残基、ラットとマウスでは118アミノ酸残基よりなる。MKの構造は、N-domainとC-domainの2つのdomainからなり、一般的に、C-domainの64-104の43アミノ酸残基が活性中心となる。

このMKをパラフィン切片上で、可溶性に検索するために、MKIに対する抗体を作製した。今回我々が作製した抗ヒトMKモノクローナル抗体およびヒト、ラット、マウスのMKを共通で認識するポリクローナル抗体は、それぞれにヒト、ラット、マウスのMKを特異的に認識することが証明された。また、今回MK DNAのexon2, 5に対するantisense oligonucleotideとsense

oligonucleotideをDNA合成装置にて作製し、これを用いてin situ hybridization法にて、パラフィン切片上にてMK mRNAの可視化に成功した。ヒト正常中枢神経系組織における生理的なMKの発現は、胎生中期以降の胎齢13週から40週にかけての一部のneuroblast及び幼若な神経細胞で認められた。生後18ヶ月以後の幼児及び成人の成熟した神経細胞では、MKは生理的にはもはや発現していないことが判明した。また、Western blot解析からも同様の結果を証明し得た。即ち、MKIは、ヒト胎生中期以後の個体研究時期においてのみ神経細胞の分化・成長因子として発現しているが、個体研究が完成した時期のヒトの成熟した神経細胞では、もはやMKIは発現せず、MKの神経成長因子としての役目を終えていることが明らかとなった。

我々は、今までにヒトMKがヒト胎児組織：肝、腎で発現し、個体発生上、器管形成に関与していることをヒトにおいて初めて報告してきた。また、成人では、ヒト腫瘍組織：脳腫瘍、肝細胞癌、胆管癌、及び甲状腺癌において発現し、一部の腫瘍細胞ではかつて胎生期に生理的に機能していた増殖・成長因子であるMKを再発現することより自らの増殖機序を利用して、世界に先駆けて証明してきた。また、正常成人の中枢神経系では、MKIは全く発現しないが、我々は、多系統萎縮症の病理組織学的hallmarkであるoligodendrogliaの細胞質内封入体；glial cytoplasmic inclusion (GCI)にMKが特異的に凝集していることを初めて証明してきた。

ALSは単一な病因によって惹起される病態ではなく、原因不明なSALS、変異SOD1を伴うFALS、ヒト変異SOD1を導入したALSモデル動物もこの範疇に入る疾患単位である。このALSの基本病態は、運動神経細胞死である。即ち、運動神経細胞はALSストレスにより細胞死を起こすが、ALSを病理学的に解析すると、残存運動神経細胞が存在していることも事実である。この事実は、一部の残存運動神経細胞がALSストレスに対して、内因性生存機序を持つことを意味する。このALSストレス下における残存運動神経細胞の内因性生存機序を解析したところ、成人の成熟運動神経細胞では、生理的に決して発現することのないMKが、ALS残存運動神経細胞の一部で高度再発現していた。この再発現は、MK mRNAとMK蛋白の両レベルで証明し得た。特筆すべき所見は、原因不明のSALSのみならず、変異SOD1を伴うFALSとヒト変異SOD1を導入したモデル動物の残存運動神経細胞の一部にもMKの再発現が認められた。このことは、変異SOD1ストレスというはっきりとした病因によって、運動神経細胞死が惹起されるが、一部の運動神経細胞はこの変異SOD1ストレスに対して、MKを再発現して、反応していることを意味する。一方、MKが生理的に、胎生中期以後に発現する神経成長因子であることを考慮した場合、

変異SOD1ストレス下の残存運動神経細胞の一部は、胎生期に利用していたMK発現機構を再び利用して、変異SOD1ストレスに対して自らを守って生きようとする内因性機構として再発現していたと考えられる。この内因性生存機構としてのMK再発現機構は、原因不明のALSの残存運動神経細胞にも存在していた。即ち、単一病因ではないALSストレスに対して、残存神経細胞の一部は、生体反応として、MKを再発現させることによって、自らの内因性生存機構の1つとしていることが判明した。このことは、このMKに神経細胞死を抑制する効果を求めて、ALSの新規治療法に活用できることを意味することにはかならない。

E. 結論

ALSの残存運動神経細胞の一部は、胎生期に発現していた神経成長因子であるMKを再発現することにより、ALSストレスに対しての内因性生存機構の1つとしていた。このことは、このMKに神経細胞死を抑制する効果を求めて、ALSの新規治療法に活用できることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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(2): 149-158, 2004
2. 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(12): 11372-11335, 2004

3. Urushitani M, Kurisu J, Tateno M, Hatakeyama S, Nakayama K, Kato S, Takahashi R. CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. *J Neurochem* 90(1): 231-244, 2004

4. Kato M, Shinozawa T, Kato S, Terada T. Aberrant expression of a fetal glycoprotein 68 in hepatocellular carcinoma: a comparative study on the expression of alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen. *Histol and Histopathol* 19 (3): 701-706, 2004

5. 加藤信介、加藤雅子、大浜栄作: ALS運動ニューロンの細胞病理 神経研究の進歩 48(3): 357-368, 2004

2. 学会発表

1. 加藤信介, 青木正志, 糸山泰人, 阿部晴子, 西野武士, 加藤雅子, 朝山光太郎, 粟屋 昭, 平野朝雄, 大浜栄作: 筋萎縮性側索硬化症(ALS)とそのモデル動物におけるレドックスシステムの解析. 第45回日本神経病理学会総会学術研究会(2004, 前橋)
2. 隅 寿恵, 長野清一, 藤村晴俊, 佐古田三郎, 加藤信介: 変異SOD1(G93A)トランスジェニックマウスにおける空胞形成過程とその意義. 第45回日本神経学会総会(2004, 東京)
3. 大井長和, 鍋島一樹, 加藤信介, 矢澤省吾, 京洛 格, 高嶋伸幹, 川端國旦, 杉本精一郎, 武知進士: Hyaline inclusion を認めたSOD1のHis46Arg変異を伴うFALSについて. 第45回日本神経学会総会(2004, 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: 準備中
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・病態に関わる新規治療法の開発に関する研究」

研究報告書

「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」

森泰丈、山岸覚、小山佳久、片山泰一、遠山正彌

（大阪大学大学院医学系研究科・ポストゲノム疾患解析学講座）

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から、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が高い。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細胞を作製した。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)凝集物をHEで染めると、エオジン陽性に染まる、4)ゴルジ装置が崩壊する、というALS患者及びモデルマウスの運動神経における臨床学的知見と共通した点が観察された。また、野生型SOD1を恒常的に発現させた細胞においては、この凝集体の形成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、SOD1の凝集体やLewy body-like hyaline inclusion(LBHI)様の封入体が観察された。この封入体はLBHIと同様にSOD1とユビキチン、共に陽性を示した。その上、電子顕微鏡を用いてその微細構造を観察したところ、LBHIで観察される、直径15-25nmの異常線維、granul-coated fibrilも観察された。また、凝集体と同様、封入体も小胞体のマーカーであるKDEL抗体陽性であった。

以上の結果から、L84V SOD1細胞はALSモデルとして適切であることが示され、また、ALSにおける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た。

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、死にいたる可能性が非常に高い神経変性疾患である。現在考えられている発症原因としては、グルタミン酸が神経細胞の過興奮を引き起こすという説が有力であるが、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択的に脱落するのかという、根源的な原因究明には至っていない。

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から、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が高い。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はアルツハイマー研究のように神経細胞の初代培養が容易にはできない為、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がしばしば出されており、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、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 を発現する細胞を得た。この細胞に ER ストレスとして 1 μ g/ml のツニカマイシンを 24 時間負荷した時に変異 SOD1 の凝集物の他に、封入体も観察されたので、次の項目について検討を行った。

1) 本細胞種に ER ストレスを負荷した際形成された封入体について、ALS 患者の運動神経における臨床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）、抗 SOD1 抗体（カルピオケム）を用いた。ヘマトキシリン、エオジン（HE）染色も封入体同定のため行った。また、電子顕微鏡（日立）を用いて封入体の構造物を解析した。

2) 凝集物と同様に、封入体と小胞体は関連があるか？

使用した抗体は抗 KDEL 抗体（ストレスジェン）を用いた。

C 研究結果

1) 細胞種に ER ストレスとしてツニカマイシンを処置し、24 時間後細胞を固定し、HE 染色にて Lewy body-like hyaline inclusions (LBHI) 様の封入体形成細胞を同定した。脱色した後に 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、形成された封入体は、両方の抗体とも陽性を示した。また、電子顕微鏡を用いてその封入体の超微細構造を解析した。驚くべきことに、FALS 患者の運動ニューロンに形成された LBHI に含まれる、15-25nm の異常線維、granul-coated fibril と顆粒成分が観察された。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、そのような封入体の形成は観察されなかった。これは L84V SOD1 を獲得した結果もた

らされた現象である。これら上記の一連の結果は ALS 患者及の運動神経における LBHI の臨床学的知見と共通した点が観察されたため、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更に強く示唆された。

2) 次にこのモデル細胞において、封入体と小胞体の関連性について検討を行った。ER のマーカーである抗 KDEL 抗体を用いて、免疫染色を行った結果、形成した封入体は陽性を示した。我々は既に凝集した変異 SOD1 と小胞体の関連性を明らかにしており、今回の結果は、家族性 ALS 患者における変異 SOD1 の凝集や LBHI の形成に小胞体が関与していることが示唆された。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 の局在化に一石を投じる結果となった。

D 考察

SOD1 の野生型及び変異体 L84V 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 2 種類の変異 SOD1 の凝集物が生成した。1 つは変異小胞体に局在する小さな顆粒状の凝集体、もう一つは、FALS 患者の LBHI や astrocytic hyaline inclusion (Ast-HIs) に相当する巨大な封入体である。LBHI に含まれる蛋白は SOD1 を始め copper chaperone for SOD (CCS) や glutathione peroxidase 1、チューブリンやタウ、ニューロフィラメントのような細胞骨格等様々である。しかしながら、その形成の起源は明らかでない。我々の結果は、家族性 ALS 患者における変異 SOD1 の凝集や LBHI の形成に小胞体が関与していることが示唆された。このことは小胞体ストレスの過程を阻害することにより、新しい FALS の予防や治療法に繋がる可能性を秘めている。

E 結論

以上の結果から、小胞体ストレス負荷した L84V SOD1 細胞で形成された封入体は、FALS 患者で観察される LBHI と同じ臨床的所見を持つということが明らかとなり、このモデル系の有用性が示された。今後はこのモデル系を用いることにより、DNA マイクロアレイ法を行い、野生型 SOD1 を恒常的に発現するヒト由来神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞と比較して、発現の変動する因子について解析する。これらの因子は ALS の病態に関与すると思われ、これらの機能解析と病態との関連を検討する予定である。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

特になし

H 知的財産権の出願・登録状況

特になし

「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
研究報告書

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

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し、以下の2点について検討した。1. 傷害運動ニューロンに変異 SOD1 を発現させることにより病変を増悪しうるかを明らかにする目的で、ヒト正常および変異 SOD1 組換えアデノウイルス・ベクターを作製し、正常ラット運動ニューロン損傷への投与を試みた。顔面神経または頸髄根の切断後にウイルスを接種すると、1-2 週後の免疫染色により2割程度の損傷運動ニューロンに正常あるいは変異 SOD1 の著明な発現を認めた。しかし、正常、変異 SOD1 とともにその細胞内分布はびまん性で、封入体形成や軸索の病変を認めず、細胞死も明らかではなかった。2. 成体ラット末梢神経引き抜き損傷により惹起される運動ニューロン死に対して、肝細胞増殖因子(HGF)組換えアデノウイルス・ベクターを局所投与したところ、損傷運動ニューロンの生存促進効果を認め、ヒト運動神経損傷や運動ニューロン疾患に対する HGF 投与の有効性が示唆された。

共同研究者：林祐一¹、川添陽子¹、坂本剛¹、
池田憲²、保住功³、青木正志⁴、糸山泰人⁴、
船越洋⁵、中村敏一⁵

¹東京都神経科学総合研究所分子神経病理研究部門

²PL 東京健康管理センター神経内科

³岐阜大学大学院医学研究科神経内科・老年学分野

⁴東北大学大学院医学系研究科神経内科

⁵大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学講座

A. 研究目的

ヒト変異 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子導入トランスジェニック・マウス、ラットは家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)のモデル動物であるが、変異 SOD1 をニューロンだけに発現させても運動ニューロン病変を惹起しないと報告されている(Pramatarova et al. 2001, Lino et al. 2002)。一方、成体ラットの末梢神経切断では運動ニューロン死は目立たないが、末梢神経引き抜き損傷では障害運動ニューロンの著明な脱落を認める。我々はこれまで、ヒト変異 SOD1 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促進されることを見出した。本研究では、傷害運動ニューロンに変異 SOD1 を発現させることにより病変を増悪しうるかを明らかにする目的で、ヒト正常および変異 SOD1 組換えアデノウイルス・ベクターを作製し、正常ラット運動ニューロン損傷への投与を試みた。

一方、肝細胞増殖因子(HGF)は、運動ニューロンに対して強力な神経生存促進活性を示し、その効果は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)に匹敵するといわれる。しかし、近位軸索損傷による成体運動ニューロン死に対する HGF の保護効果はこれまで検討されていない。そこで本研究では成体ラット末梢神経引き抜き損傷により惹起される運動ニューロン死に対して、肝細胞増殖因子(HGF)組換えアデノウイルス・ベクターを局所投与しその保護効果について検討した。

B. 研究方法

ヒト正常および H46R, G93A 変異 SOD1 組換え

アデノウイルス（それぞれ AxCAhSOD1, AxCAH46R, AxCAG93A）を作製し、発現確認のため COS1 細胞に感染させた。12 週齢ラット顔面神経または第 7 頸髄根を切断し、切断近位部に各組換えウイルスを局所接種した。接種 1,2 週後に 4% paraformaldehyde 灌流固定し、パラフィン切片を作製、SOD1 免疫染色を施行した。

また、ヒト HGF 組換えアデノウイルス (AxCAhHGF) を作製し、発現確認のため COS1 細胞に感染させた。12 週齢ラット右顔面神経または第 7 頸髄根を引き抜き除去後、同ウイルスを傷害部の茎乳突孔または椎間孔にそれぞれ注入接種した。接種 4 週後に灌流固定、パラフィン連続切片を作製し、Nissl 染色標本を作製した。

C. 研究結果

AxCAhSOD1, AxCAH46R, AxCAG93A を COS1 細胞に感染させ、プロテアソーム阻害剤 lactacystin を負荷することにより AxCAH46R, AxCAG93A の感染では細胞内封入体を形成することを確認した。顔面神経または頸髄根の切断後に各ウイルスを接種すると、1-2 週後の免疫染色により 2 割程度の損傷運動ニューロンに正常あるいは変異 SOD1 の著明な発現を認めた。しかし、正常、変異 SOD1 ともにその細胞内分布はびまん性で、封入体形成や軸索の病変を認めず、細胞死も明らかではなかった。

一方、AxCAhHGF を COS1 細胞に感染させて得られた培養上清に含まれる HGF を ELISA, western blot で、その活性を MDCK 細胞による scatter assay でそれぞれ確認した。右顔面神経または第 7 頸髄根の引き抜き損傷 4 週間後、残存する顔面神経核・第 7 頸髄前角運動ニューロン数を連続切片の Nissl 染色標本で算定したところ、PBS 投与群(顔面神経核 $30.2 \pm 6.7\%$, 頸髄前角 $44.6 \pm 9.3\%$)では傷害側顔面神経核運動ニューロンの脱落を認めたが、AxCAhHGF 投与群(顔面神経核 $58.8 \pm 5.9\%$, 頸髄前角 $75.4 \pm 4.4\%$)では脱落が有意に抑制された。この AxCAhHGF による保護効果はこれまでに報告

した GDNF, BDNF 組換えアデノウイルス・ベクターと同程度であった。

D. 考察

正常ラットの神経切断後に変異 SOD1 を強制発現させても FALS に特徴的な運動ニューロン病変を認めず、病変惹起にはプロテアソーム阻害剤などの併用が必要と考えられた。また現在、末梢神経引き抜き損傷部にウイルスを接種し病変の増悪を惹起しうるか検討中である。

一方、既報告の GDNF, BDNF 遺伝子導入に加えて、成体ラット末梢神経引き抜き損傷による運動ニューロン死に対する HGF 遺伝子導入の生存促進効果を認め、ヒト運動神経損傷や運動ニューロン疾患に対する HGF 投与の有効性が示唆された。

E. 結論

正常ラットの神経切断後に変異 SOD1 を強制発現させても FALS に特徴的な運動ニューロン病変を認めなかった。一方、末梢神経引き抜き損傷による運動ニューロン死に対する HGF 遺伝子導入の生存促進効果を認めた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sango K, Tokashiki A, Ajiki K, Horie M, Kawano H, Watabe K, Horie H, Kadoya T. Synthesis, localization and externalization of galectin-1 in mature dorsal root ganglion neurons and Schwann cells. *Eur J Neurosci* 2004;19:55-64.
- 2) 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.
- 3) Shirakura M, Inoue M, Fujikawa S, Washizawa K, Komaba S, Maeda M, Watabe K, Yoshikawa Y,

Hasegawa M. Postischemic administration of Sendai virus vector carrying neurotrophic factor genes prevents delayed neuronal death in gerbils. *Gene Ther* 2004;11:784-790.

- 4) Shen J-S, Meng X-L, Yokoo T, Sakurai K, Watabe K, Ohashi T, Eto Y. Widespread and highly persistent gene transfer to the CNS by retrovirus vector *in utero*: Implication for gene therapy to Krabbe disease. *J Gene Med* (in press).
- 5) Watabe K, Hayashi Y, Kawazoe Y. Peripheral nerve avulsion injuries as experimental models for adult motoneuron degeneration. *Neuropathology* (in press).

2. 学会発表

- 1) Watabe K. Peripheral nerve avulsion as an experimental model for adult motoneuron degeneration. The 6th Ajou Brain Conference, From Neuron To Brain. Yongin, Korea, April 24, 2004.
- 2) 渡部和彦, 坂本剛, 沈勁松, 川添陽子, 伊藤聰一郎, 江口和, 上野照剛. LacZ 標識マウス, ラット培養シュワン細胞株の樹立と移植の試み. 第 45 回日本神経学会総会, 東京, 2004 年 5 月 12 日.
- 3) 池田憲, 坂本剛, 川添陽子, 渡部和彦. 成体ラット顔面神経引き抜き損傷後の運動ニューロン死に対する MCI-186 の保護効果. 第 45 回日本神経学会総会, 東京, 2004 年 5 月 14 日.
- 4) 渡部和彦. 顔面神経引き抜き損傷における運動ニューロン死. 第 45 回日本神経病理学会総会学術研究会, ワークショップ 2: 運動ニューロン疾患: 最近の動向, 前橋, 2004 年 5 月 27 日.
- 5) Watabe K, Shen JS, Hayashi Y, Kawazoe Y, Itoh S. Establishment of LacZ-labeled mouse and rat Schwann cell lines for neural transplantation., 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA, October 23, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし