

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14～16年度 総合研究報告書

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

———— 2002 ~ 2004 ————

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 泰文		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. 総合研究報告書

「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」

東北大学大学院医学系研究科神経学講座神経内科 教授

糸山 泰人

(資料)

1. 「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14年度 総括研究報告書
2. 「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15年度 総括研究報告書
3. 「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 総括研究報告書
4. 別掲論文

III. 研究成果の刊行に関する一覧

IV. 研究成果に関する刊行物

総合研究報告

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・治療研究としては変異 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。

最終年度までの成果を以下に示す。①ALS における運動ニューロン死には、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から明らかにされた。その機序としては RNA 編集酵素の ADAR2 低下が推定されるが、同酵素の活性は様々な splice variant が関与している可能性を明らかにした。②ALS の新規治療薬の可能性が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、脊髄における運動ニューロンの細胞死減少を認めた。また、臨床的に ALS を発症した後に HGF を投与しても明らかに延命効果があることが示された。③さらに効率的な ALS 治療には各種の遺伝子導入ベクターの開発は重要である。なかでも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。細胞毒性を担う 2A プロテアーゼ領域を欠落させ 2184 塩基と長い HGF mRNA を組み込んだポリオウイルスにて培養細胞に外来 mRNA を発現させる条件を検討している。④将来的な ALS の治療法としては神経幹細胞移植療法が重要である。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、これらの細胞を ALS Tg ラットの脊髄に移植したところ生着し、その一部は ChAT 陽性細胞へ分化していた。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が検討された。なかでもエダラボンが ALS 患者の症状改善に有用である可能性やカルニチンが ALS マウスにて運動ニューロン細胞死を抑制することが示された。

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

めて予後不良な難治性神経疾患であり、その病因解明と治療法の開発が切望されている。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法を確立することが目的である。本班は病因として変異 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子異常を重要と考え、SOD1 遺伝子導入 ALS ラットを世界に先駆けて開発し、この疾患モデルを用いての病因・病態解明ならびに治療法を開発を進めている。ALS の治療法の開発では神経栄養因子、なかでも本邦で発見された肝細胞増殖因子 (HGF) が ALS 動物モデルにおいて髄腔内投与にて有効性が示されており、臨床応用に向けての治療法開発が急がれている。一方、将来的な ALS の治療法として新規治療因子を運ぶウイルスベクターの開発を始めとした遺伝子治療や ES 細胞を用いた神経幹細胞移植の可能性の研究を進めている。本研究班は、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、具体的には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 の有用性を確立し、臨床への応用を検討する。③神経栄養因子等の薬剤を ALS 患者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 治療法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発見と開発を目指す。

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。本研究班は SOD1 の遺伝子変異説を最も重要視しているが、その他にもグルタミン毒性によるものや重金

属毒性などの病因を検討している。

1. ALS の運動ニューロン死に関する分子病態の解析

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。ALS の患者脊髄からの単一運動ニューロンでの検討では AMPA 受容体各サブユニットの GluR2 Q/R 部位における RNA 編集率が低下していることが示されている。この原因を探るために、RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) の mRNA variant をヒト脳で検討した。

一方、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を行い、運動ニューロン特異的な遺伝子発現を解析した。ALS 患者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。

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細胞保護作用を持ち、次世代の ALS 治療薬として期待されている。これまでにヒトリコンビナント (hr) HGF を ALS Tg ラットに投与して発症遅延と脊髄の運動ニューロン死の抑制を認めてきた。ALS の臨床応用を見据えて ALS ラットを用いて症状発症後に HGF の髄腔内投与を行い、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-1) は ALS Tg マウスに対し髄腔内投与で生存期間の延長を認めたので、実際に ALS 患者へ IGF-1 の髄注療法を開発した。ALS 患者 9 名に対し 9 ヶ月にわたり、IGF-1 の高容量 (3 μ g/kg 体重) と低容量 (0.5 μ g/kg 体重) の投与を行ない、その安全性と有用性を検討した。

3. 遺伝子治療に向けてのベクターの開発

ALS の治療には候補治療薬が変性運動ニュー

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 遺伝子治療におけるベクターの役割を果すべく研究開発を行う。今まで、ポリオウイルスの持つ神経毒性の中心的役割を果す 2A プロテアーゼの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つことが示されている。今回、ポリオウイルス RNA に 2184 塩基の HGF mRNA 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。

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

変異 SOD1 がどのような機序で神経細胞死を引き起こすかはまだ不明な点が多い。一方、この変異 SOD1 のみを認識する新規のユビキチンリガーゼの Dorfin 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 Dorfin を発現する Dorfin Tg マウスを作製し、それを ALS Tg マウスと交配して mSOD1/Dorfin ダブル Tg マウスを作り臨床症状の解析を行なった。

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 細胞から胚様体形成時にレチノイン酸を作用させることにより運動ニューロンの誘導が効率良く起こることを明らかにしてきている。また、誘導された細胞を ALS Tg ラットの腰髄へ ES 細胞由来神経系前駆細胞を移植し、細胞の生着とその動態を確かめた。

一方、再生医療の開発には内在性神経前駆細胞を賦活させる方法もある。ALS Tg ラット脊髄では運動ニューロン脱落后からグリア細胞

の新生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することを明らかにしてきている。今回、これらの細胞群を早期から賦活した場合に治療効果につながるかを HGF の髄腔内投与をした ALS ラットにて検討した。

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. ALS の運動ニューロン死の分子病態の解析

ALS 患者脊髄の運動ニューロンに生じている AMPA 受容体の GluR2 サブユニット Q/R 部位における RNA 編集異常の原因を探る目的で RNA 編集酵素である ADAR2 の mRNA variant を検討した。その結果、ヒト ADAR2 mRNA には 48 種類の splicing variant が存在し、ADAR2 の活性が RNA splicing の投与段階で行なわれていることが示された。

運動ニューロンでの遺伝子の特徴的に変動する遺伝子群を抽出すると、転写因子 (CRABP1、EGR3 など)・細胞骨格 (DCTN1、MAPs など) の関連遺伝子群が減少し、神経栄養因子 (GDNF、HGF など)・細胞周期 (CCNC、

CCNA など) の関連遺伝子群が増加していた。神経変性と神経保護、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。単離した運動ニューロンでの解析は極めて重要であり、今後は症例ごと、あるいは運動ニューロンごとの詳細な解析が必要と考える。

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たところ、平均発症は PBS 投与の対照群と差を認めなかった。しかし、死亡までの臨床経過が対照群の 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、脊髄の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 群では運動ニューロンの数が明らかに保存されていた。HGF の脊髄前角運動神経細胞死の抑制機序として神経細胞の caspase 活性の抑制、内因性 XIAP の保持および EAAT2 の発現増加が関与している所見が得られた。

一方、ALS 患者に対しての、IGF- I 髄注療法では、高容量投与群においては低容量群に比較して Norris score の低下が遅延し、運動機能低下を遅延させる可能性が示された。副作用としては 3 例に皮疹を一過性に認めたのみであった。今後はより多くの患者において長期間投与を行なってその有用性を検討する必要がある。

3. ポリオウイルスベクターの開発

ポリオウイルスの細胞毒性発現に中心的役割を担う 2A プロテアーゼ遺伝子領域を持たない RNA でも RNA レプリコン活性を持つが、実際に HGF mRNA を組み込んで Hela 細胞にトランスフェクションすると、RNA レプリコン活性は検出できなかった。この理由は不明であるが、現在プラスミド構築を再試行して実験条件を検討している。

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 ALS Tg ラットの脊髄へ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た。この結果は ES 細胞由来の前駆細胞が生体内で機能的な運動ニューロンに分化できる可能性を示すものである。

ALS Tg ラットの髄腔内に HGF を投与して内在性の神経前駆細胞の動態を調べた。その結果、対照に比べて HGF 群では BrdU 陽性細胞が増加することが明らかになった。今後、HGF の至適用量や投与期間の検討、他の再生誘導因子と組み合わせ投与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有効に賦活させる新規治療法につながる可能性がある。

変異 SOD1 とのみ統合する新規のユビキチンリガーゼである 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 マウスに較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較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 30 mg/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、多数例での長期のトライアルの結果が待たれる。

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。その低下には RNA 編集酵素である ADAR2 mRNA の splicing variant の関与が示された。

HGF に関しては ALS Tg ラットを用いて髄腔内投与での臨床応用をめざしての有用性の条件設定が行なわれ、ALS の発症直後からの投与にても延命効果を対照に較べて約 1.6 倍延長させることが明らかになった。これは実際の ALS 患者さんへの臨床応用に向けて重要な結果と考えられる。

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神経性を発揮し、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。現在、毒素を削除したポリオウイルスベクターを用いて実際に HGF の長い mRNA を組み込んだ遺伝子導入実験を行なっている。

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、これらの細胞を用いて ALS Tg ラットの脊髄への移植実験を行っている。移植した ES 細胞由来の細胞が生体に生着して運動ニューロンのマーカーを発現してい

ることが確認された。今後は移植後の神経突起伸長に有利な「場の環境」を検討する必要があるが、これらの事実は将来的に動物モデルを用いての神経細胞移植実験を経て ALS 患者に対する治療実験の可能性を期待させる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sun W, Funakoshi H, Nakamura T. Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci* 22: 6537-6548, 2002

Sakakibara S, Nakamura Y, Koike M, Takano H, Uchiyama Y, Noda T, Okano H. RNA-binding protein Musashi family, roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15194-15199, 2002

Katsuno M, Adachi H, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, Sang C, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G. Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 35: 843-854, 2002

Jia Q, Liang F, Ohka S, Nomoto A, Hashikawa T. Expression of brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system of mice using a poliovirusbased vector. *J Neurovirol* 8: 14-23, 2002

Manabe Y, Nagano I, Gazi MSA, Murakami T, Shiote M, Shoji M, Kitagawa H, Setoguchi Y, Abe K. Adenovirus-mediated gene transfer of GDNF prevents motor neuron loss of

- transgenic mice for ALS. *Apoptosis* 7: 329-334, 2002
- Nagano I, Murakami T, Shiote M, Abe K, Itoyama Y. Ventral root avulsion leads to downregulation of GluR2 subunit in spinal motoneurons in adult rats. *Neurosci* 117: 139-146, 2003
- 青木正志、永井真貴子、加藤昌昭、糸山泰人、新しい筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の動物モデル、最新医学、最新医学社、57: 1622-1627, 2002
- 青木正志、トランスジェニックラットによる新しい ALS モデル、Clinical Neuroscience、中外医学社 20: 858-859, 2002
- Miyazaki K et al. NEDL1, a novel E3 ubiquitin ligase for disheveled1, targets mutant superoxide dismutase 1. *J Biol Chem*. 279(12): 11327-11335, 2004
- Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Dofin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89(1): 64-72, 2004
- 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* 106: 112-120, 2003
- Saito K, Shiotani A, Watabe K, Moro K, Fukada H, 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, Kwak S: RNA editing and death of motor neurons in ALS. *Nature* 427: 801, 2004.
- Jiang Y et al.: Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57(2): 236-251, 2005
- Yanagiya A, Jia Q, Ohka S, Horie H, Nomoto A.: 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.
- 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. *Developmental Biology* 275(1): 124-142, 2004
2. 学会発表
- Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH Jr, Itoyama Y. Transgenic rats carrying human mutant copper-zinc superoxide dismutase genes with amyotrophic lateral sclerosis, 54th Annual Meeting of American Academic of Neurology, Denver, April 13-20, 2002
- 青木正志、永井真貴子、加藤昌昭、神位りえ子、糸山泰人、三好一郎、笠井憲雪、変異 SOD1 導入トランスジェニックラットにおける運動ニューロン死の病態解析：第 43 回日本神経学会総会、2002.5 札幌

青木正志、加藤昌昭、永井真貴子、三好一郎、
神位りえ子、石垣あや、笠井憲雪、糸山泰人、
臨床的特徴のある Cu/Zn SOD 遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスによる ALS
モデルの作製； 第 47 回日本人類遺伝学会、
2002.11 名古屋

Shiote M, Nagano I, Murakami T, Iliev H,
Nagata T, Yokoyama M, Shoji M, 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

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 年 5 月
東京

Kawahara Y, Ito K, Ito M, Tsuji S, Kwak S:
New alternative splicing sites of human
ADAR2 mRNA: lack of the exon encoding the
dsRNA-binding, and multiple C-terminal
splice, *the Gordon Research Conference on
RNA Editing*, Ventura, California, Jan 23-28,
2005.

Okada Y, Shimazaki T, Matsumoto A, Sobue
G, Okano H.: 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. 知的財産権の出願・登録状況

(1)ラットを用いた ALS モデル (特許申請中)

(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)

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

(3)記憶障害治療薬 (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 RNA、
cDNA およびプラスミド (特許取得)

(資 料) -1.

「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14年度 総括研究報告書

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

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る。現在 ALS の病態研究としては家族性 ALS の原因である変異 SOD 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・病態解明を行いながらも ALS の治療薬と治療法を新たに開発することにある。本年度の成果としては①肝細胞増殖因子（HGF）を本研究班で開発された大型 ALS 動物モデルである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、臨床的に発症の遅延を認めるとともに組織学的に脊髄における運動ニューロンの有意な細胞死減少を認めた。この結果は ALS 患者の新たな治療の試みとして極めて重要なものとする。②ALS の根本治療として遺伝子導入療法は極めて重要で、その為には有用なベクターの開発は必須である。ポリオウイルスは運動ニューロンに特異的に感染する特徴を持つために ALS 遺伝子導入治療のベクターとして有力視されている。現在、ベクターのゲノムを改変してポリオウイルスの特性を有しながら、どの程度の大きさの遺伝子が挿入可能かの検討を行い、ゲノムの改変により HGF を挿入可能であることが明らかとなった。③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が、今回マウス ES 細胞からの培養において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、かつそれらの細胞が培養レベルで myotube にコンタクトすることが明らかとなった。その他グルタミン酸の AMPA 受容体の GluR2 の遺伝子導入、ニコチン酸、カロニチン、エダラボンなどの薬剤が運動ニューロン細胞死の抑制ないしは ALS 治療での有用性の検討が報告されている。

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、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（SOD）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。また新規治療薬としては本邦で発見開発された肝細胞増殖因子（HGF）が ALS Tg マウスにおいて遺伝子工学的に治療が成功している。これらの研究成果の流れをくみ、新たに発足した研究班では、ALS の新規治療法を開発する目的のもとに、以下の 3 つを主な目的にして研究を行う。①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。②ALS 患者の変性しつつある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の検討を行う。③将来的な ALS 治療において神経幹細胞の導入を検討する。

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 SOD の遺伝子変異によるもの、興奮性アミノ酸であるグルタミン毒性による病因ならびに重金属毒性などが考えられている。これらの中でも SOD 病因論が最も重要なものと考えられ、現在では変異 SOD 遺伝子導入にて ALS 動物モデルが作成され、病態研究ないし本研究班の主要目的である新規治療法の開発研究に用いられている。

1. ALS 治療への肝細胞増殖因子（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、遺伝子操作により ALS に対する効果が認められている。この HGF を新たに作製された ALS 動物モデルである Tg ラットに対し髄腔内投与を行い、その治療効果を臨床的および組織学的に確かめる。また、遺伝子操作により HGF を筋肉特異的プロモーター（MCK プロモーター）を用いて筋肉に特異的に HGF を発現する Tg マウスを作製し、その発現が ALS に対して治療効果

を示すかを ALS Tg マウスとのダブル Tg マウスモデルにて検討する。また、HGF 以外の神経栄養因子として神経成長抑制因子（growth inhibitory factor :GIF）と塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）の神経保護作用の有無を調べるとともにこれらをベクターと組み合わせて動物モデルに対して治療応用可能かを検討した。

2. 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。これらの目的でアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターが検討されてきた。

ポリオウイルスは運動神経細胞に特異的に感染しそこで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。ポリオウイルスをベクターとして用いるには導入する候補薬剤遺伝子のサイズのために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すかが問題になる。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。

3. ALS 新規治療に対する神経幹細胞移植の可能性

ALS の将来的な治療として胚性幹細胞（ES 細胞）からニューロスフェアを作成し、そこ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、この過程で後分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可能かどうかを検討した。

4. その他の新規治療の可能性

ALS の病因論にはグルタミン酸毒性がある

が、その病態としては AMPA 受容体の GluR2 の編集率低下が考えられている。この病因仮説に従い GluR2 を高発現させる Tg マウスと ALS Tg マウスのダブル Tg マウスを作成し、GluR2 の運動ニューロン死の抑制効果を検討した。その他、神経保護作用を持つと考えられる vascular endothelial growth factor、カルニチン、ニコチン、フリーラジカルスカベンジャー（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.D. 研究結果と考察

1.HGF の ALS への治療応用

① Tg ラットに対する HGF 持続髄腔内投与の効果

Tg ラットに HGF 低容量（40 μ g）と高容量（200 μ g）投与を行った結果、高容量群では臨床的に発症が約 10 日間延長した。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 PBS のコントロール投与群に対して HGF では容量依存性に運動ニューロンの数が保存されていることが明らかになった。

② MCK プロモーターを用いて作成した HGF Tg マウスにおいて、HGF の mRNA とタンパク質レベルを RPA 法と ELISA 法で解析した結果、ラット HGF が筋肉特異的に発現する Tg マウスのラインを 3 系統確認した。これらのラインの筋抽出液には外来性 HGF タンパクが高レベルに発現していることが確認された。現在この筋肉 HGF Tg マウスと ALS Tg マウスとを交配させ、ダブル Tg マウスを作成し、筋肉 HGF の運動ニューロン保護効果を検討中である。

ある。

2.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。その結果、ウイルスゲノムのキャプシドタンパク質領域を約 1.8kb までの欠失させた RNA レプリコンはスタンダードウイルス株の重感染によりキャプシドタンパク質によりパッケージされることが明らかになった。現在のところ約 3kb の外来 mRNA の挿入が可能であることも明らかになっており、したがって新規の神経栄養因子である HGF や XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis factor) などの mRNA のコーディング領域はそれぞれ 2184 塩基、1491 塩基であるので、ポリオウイルスのベクターとしての可能性は十分あるものと考えられた。

3.神経幹細胞移植の可能性

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のマーカーである HB9 陽性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た。現在マウス胎児への移植の方法を検討している。

一方、ALS Tg ラットの腰髄では運動ニューロンの脱落前（15 週例）からコントロールラットに比べて優位に BrdU 陽性細胞が脊髄の後角、白質、中心管上衣細胞および前角後半に認められた。これらの多くは二重染色の結果アストログリア、マイクログリアなどのグリア系前駆細胞の可能性と考えられた。

4.その他の新規治療薬の開発

運動ニューロンにほぼ特異的に GluR2 遺伝子を過剰発現する Tg マウスが作成された。この Tg マウスと G93A SOD1 Tg マウスのダブル Tg マウスでは発症時期で約 19.3%、生存日

数で約 14.3%の遅延が認められ、この AMPA 型受容体を介した Ca^{2+} 流入は変異 SOD 毒性を助長させる大きな要因であることが示された。また、ミトコンドリア膜保護作用を持つカルニチン酸を ALS Tg マウスに経口投与 (400 mg/kg/day) を摂取させ、臨床経過をロタロットによる運動能力や発症時期および寿命を検討したところ、カルニチン投与群ではコントロールに比較して約 1 ヶ月発症が遅延しその寿命も約 1 ヶ月延長した。またラット脊髄初代培養系を用いてグルタミン酸毒性による運動ニューロン死に対してニコチン酸を加えることにより濃度依存性に運動ニューロン死が抑制された。この保護効果は $\alpha 4$ および $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬に抑制された。したがってこれらのニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬が ALS 治療薬としての可能性があることが示唆された。

E. 考察

本研究班では ALS の病因解明を行いつつ新規治療法を開発することにある。HGF を本研究班にて開発された大型 ALS モデルである Tg ラットに髄腔内投与を行ったところ、臨床的に ALS の発症を遅らせることができ、かつ脊髄前角細胞の運動ニューロン死の抑制効果を認めた。このことは今後臨床応用の道を開くもので重要と考える。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。運動ニューロンに特異的に感染し複製するポリオウイルスは、効率よく運動ニューロンに薬剤導入できる有効なベクターの候補である。本年度の研究において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特異感染性を発揮し、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 の治療実験の展開が可能であることを期待させる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sun W, Funakoshi H, Nakamura T. Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci* 22 (2002) 6537-48

Sakakibara S, Nakamura Y, Koike M, Takano H, Uchiyama Y, Noda T, Okano H. RNA-Binding Protein Musashi Family, Roles for CNS Stem Cells and a Subpopulation of Ependymal Cells Revealed by Targeted Disruption and Antisense Ablation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 15194-15199

Katsuno M, Adachi H, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, Sang C, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G. Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 35 (2002) 843-854

Jia Q, Liang F, Ohka S, Nomoto A, Hashikawa T. Expression of brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system of mice using a poliovirusbased vector. *Journal of Neurovirology*, 8 (2002) 14-23

Manabe Y, Nagano I, Gazi MSA, Murakami T, Shiote M, Shoji M, Kitagawa H, Setoguchi Y, Abe K. Adenovirus-mediated gene transfer of GDNF prevents motor neuron loss of transgenic model mice for ALS. *Apoptosis*, 7

(2002) 329-334

ラットを用いた ALS モデル (出願済)

Nagano I, Murakami T, Shiote M, Abe K, Itoyama Y. Ventral root avulsion leads to downregulation of GluR2 subunit in spinal motoneurons in adult rats. *Neuroscience* 117 (2003) 139-146

青木正志、永井真貴子、加藤昌昭、糸山泰人、新しい筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の動物モデル、最新医学、最新医学社、57 (2002) 1622-1627

青木正志、トランスジェニックラットによる新しい ALS モデル、*Clinical Neuroscience*、中外医学社 20 (2002) 858-859 他

2. 学会発表

Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH Jr, Itoyama Y. Transgenic rats carrying human mutant copper-zinc superoxide dismutase genes with amyotrophic lateral sclerosis, 54th Annual Meeting of American Academy of Neurology, Denver, April 13-20, 2002

青木正志、永井真貴子、加藤昌昭、神位りえ子、糸山泰人、三好一郎、笠井憲雪、変異 SOD 1 導入トランスジェニックラットにおける運動ニューロン死の病態解析；第 43 回日本神経学会総会 2002.5 札幌

青木正志、加藤昌昭、永井真貴子、三好一郎、神位りえ子、石垣あや、笠井憲雪、糸山泰人、臨床的特徴のある Cu/Zn SOD 遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスによる ALS モデルの作製；第 47 回日本人類遺伝学会 2002.11 名古屋 他

H. 知的財産権の出願・登録状況

(資 料) -2.

「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15年度 総括研究報告書