

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 *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。

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、フリーラジカー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ブ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 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療結果では重症度の 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

(資 料) -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

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。本年度の成果としては①ALS 患者脊髄から得られた単一運動ニューロンの解析から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 編集率の低下が関与している。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、臨床的に ALS を発症した後に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。現在、細胞毒性を担う 2A プロテアーゼ領域を欠落させ HGF mRNA を組み込んだポリオウイルスが外来 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。

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の開発を進めている。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いる。一方、将来的な ALS の治療法として遺伝子治療や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。

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の分子病態の解析

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を認めてきた。今回は 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を明らかにしている。今回、ポリオウイルス RNA に 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。また、ラット培養神経細胞における GFP 融合ポリオウイルスの逆行性軸索輸送システムを解析した。

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。

(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. ポリオウイルスペクターの開発

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。一方、ラットの神経細胞の初代培養系では、ポリオウイルスとその受容体を併せ持つ小胞体の逆行性輸送が観察され

た。

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。

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 の段階で行われていることが示された。

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。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 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

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

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

研究成果の刊行に関する一覧表

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 名	掲 載 誌 名	巻 ページ	出版年
Matsuno K, Ito M, Hori K, Miyashita F, Suzuki S, Kishi N, Arravantis-Tsakonas S, Okano H	Involvement of a proline-rich motif and a RING-H2 finger in a function of Deltex as a regulator of Notch signaling	Development	129 1049-1059	2002
Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Toyama Y, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, Okano H	Transplantation of in vitro expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats	J Neurosci Res	69 925-933	2002
Kuranaga E., Kanuka H, Igaki T, Sawamoto K, Ichijo H, Okano H, Miura M	Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK	Nature Cell Biol	4 705-710	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 15194-9	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	Journal of Neuro Virology	8(1) 14-23	2002
Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G	HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SEMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein	J Neurosci	in press	2003

著者	論文タイトル名	掲載誌名	巻ページ	出版年
Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa N, Yoshikawa H, Ohnishi A, Hayasaka K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G and the Study Group for Hereditary Neuropathy in Japan	Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients	Brain	126(1) 134-151	2003
Takeuchi H, Kobayashi Y, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G	Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis	J Biol Chem	277(52) 50972	2002
Koike H, Misu K, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Ando E, Yamamoto M, Hattori N, Sobue G	Type I (transferrin Met30) familial amyloid polyneuropathy in Japan: early- vs late-onset form	Arch Neurol	59(11) 1771-1776	2002
Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G	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
Ishigaki S, Liang Y, Yamamoto M, Niwa J, Ando Y, Yoshihara T, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G	X-linked inhibitor of apoptosis protein is involved in mutant SOD-1 mediated neuronal degeneration	J Neurochem	82 576-584	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

著者	論文タイトル名	掲載誌名	巻ページ	出版年
Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, Doyu M, Murata S, Tanaka K, Taniguchi N, Sobue G	Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity	J Biol Chem	277(39) 36793-8	2002
Sasaki S, Warita H, Abe K, Iwata M	nNOS immunoreactivity in the spinal cord of transgenic mice with G93A mutant SOD1 gene	Acta Neuropathol	103 421-427	2002
Manabe Y, Warita H, Murakami T, Shiote M, hayashi T, Omori N, Nagano I, Shoji M, Abe K	Early decrease of the immunophilin FKBP52 in the spinal cord of a transgenic model for ALS	Brain Res	935 124-128	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 model mice for ALS	Apoptosis	7 329-334	2002
Warita H, Manabe Y, Murakami T, Shiote M, Shiro Y, hayashi T, nagano I, Shoji M, Abe K	Tardive decrease of astrocytic glutamate transporter protein in transgenic mice with ALS-linked mutant SOD1	Neurol Res	24 577-581	2002
Ilieva H, Nagano I, Murakami T, Shiote M, Manabe Y, Abe K	Change in superoxide dismutase 1 protein localization towards mitochondria: an immunohistochemical study in transgenic G93A mice	Neurosci Lett	332 53-56	2002
Nagano I, Murakami T, Manabe Y, Abe K	Early decrease of survival factors and DNA repair enzyme in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice that express a mutant SOD1 gene	Life Sci	72 541-548	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	Neuroscience	117 139-146	2003

著者	論文タイトル名	掲載誌名	巻ページ	出版年
Funakoshi H and Nakamura T	Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications	Clin Chim Acta	327 36182	2003
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 6537-48	2002
Sun W, Funakoshi H, Nakamura T	Localization and functional role of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-met in the rat developing cerebral cortex	Mol Brain Res	103 36-48	2002
Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matsumoto K, Nakamura T	Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons	J Neurosci Res	68 150-60	2002
Kishi YA, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T	Molecular cloning, expression and partial characterization of Xksy, Xenopus member of the Sky family of receptor tyrosine kinases	Gene	288 29-40	2002

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社	巻ページ	出版年
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 1622-7	2002
永井真貴子、青木正志 糸山泰人、三好一郎 笠井憲雪	筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新しいモデルとしてのトランスジェニックラットの作製		アニテックス	研成社	14 189-192	2002
Sawamoto K, Okano H	Direct isolation of mesencephalic precursor cells and dopaminergic neurons	Calne, DB, Mizuno Y	Recent Res. Devel. Mol. Cell Biol.	Research Signpost	243-253	2002
船越 洋、中村 敏一	神経栄養因子による神経難病治療の可能性		現代医療		Vol. 34 245-253	2003
中村 健二、船越 洋 中村 敏一	神経再生因子としての肝細胞増殖因子 (HGF)		脳の科学		108-115 (増刊号： 神経の再生)	2003
永野 功、村上哲郎、 塩手美冬、阿部康二	SOD1変異マウスにおけるVEGF誘導異常	赤池紀扶、東英徳、 阿部康二、久保千春	脳機能の解明 ー生命科学の主潮流ー	ガイア出版会	307-310	2002

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

著者	論文タイトル名	掲載誌名	巻 ページ	出版年
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 E3 Ubiquitin ligase for dishevelled1, targets mutant superoxide dismutase 1	J Biol Chem	in press	
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 (Berl)	107 149-58	2004
Tobisawa S, Hozumi Y, Arawaka S, Koyama S, Wada M, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Goto K, Kato T	Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice	Biochem Biophys Res Commun	303 496-503	2003
Tonchev A.B., Yamashima T, Zhao L., Okano H	Differential proliferative response in the posts ischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of adult primates	Glia	42 209-224	2003
Tonchev A.B., Yamashima T., Zhao L., Okano H, J. and Okano H	Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys	Mol Cell Neurosci	23 292-301	2003
Kuo H.-C., Pau F.K.Y., Yeoman R.R., Mitalipov S.M., Okano H, Wolf D.P.	Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages	Biol Reprod	68 1727-1735	2003
Kayahara, T., Sawada, M., Takaishi, S., Fukui, H., Seno, H., Fukuzawa, H., Suzuki, K., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., Chiba, T	Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine	FEBS Lett	535 131-135	2003

	Implication of	J	2003
Sasaki T, Kitagawa K, Sugimura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S, Yagita Y, Okano H, Matsumoto M, Hori M	Cyclooxygenase-2 on Enhanced Proliferation of Neural Progenitor Cells in the Adult Mouse Hippocampus After Ischemia	Neurosci Res	72 461-471
Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Yamamoto A, Kanemura Y, Hara M, Suzuki A, Yamasaki M, Okano H	Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development	Lab Invest	83 479-489
Yuasa Y, Okabe M, Yoshikawa S, Tabuchi K, Xiong W-C, Hiromi Y, Okano H	Drosophila homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors	Development	130 2419-2428
Uchida K, Okano H, Hayashi, T, Mine Y, Tanioka Y, Nomura T, Kawase T	Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogeneic rat neurons	J Neurosci Res	72 661-669
Kokuzawa J, Yoshimura S, Kitajima H, Shinoda J, Kaku Y, Iwama T, Morishita R, Shimazaki T, Okano H, Kunisada T, Sakai N	Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neural differentiation of neural stem cells from mouse embryos	Mol Cell Neurosci	24 190-197
Ishizuya-Oka A, Shimizu K, Sakakibara SI, Okano H, Ueda S	Thyroid hormone-upregulated expression of Musashi-1 is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling	J Cell Sci	116 3157-3164
Kanuka H, Kuranaga E, Hiratou T, Igaki T, Nelson B., Okano H, Miura M	Cytosol-endoplasmic reticulum interplay by Sec61alpha translocon in polyglutamine-mediated neurotoxicity in Drosophila	Proc Natl Acad Sci USA	100 11723-11728
Baker H, Kobayashi K, Okano H, Saito-Saito S	Cortical and striatal expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neonatal and adult mice	Cell Mol Neurobiol	23 503-518
Tamaki T, Akatsuka A, Okada Y, Matsuzaki Y, Okano H, Kimura M	Growth and differentiation potential of main- and side-population cells derived from murine skeletal muscle	Exp Cell Res	291 83-90
Miyanomori Y, Kobayashi H, Imai T, Watanabe M, Nagata T, Uesugi S, Okano H, Katahira M	Origin of higher affinity to RNA of the N-terminal RNA-binding domain than that of the C-terminal one of a mouse neural protein, musashi1, as revealed by comparison of their structures, modes of interaction, surface electrostatic potentials, and backbone dynamics	J Biol Chem	278 41309-41315

Yoshida T, Tokunaga A, Nakao K, Okano H	Distinct expression patterns of splicing isoforms of mNumb in the endocrine lineage of developing pancreas	Differentiation	71 486-495	2003
Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Natesan S, Ng YK, Ling EA, Israel A, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Schachner M, Pallan CJ, Watanabe K, Xiao ZC	F3/Contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation	Cell	115 163-175	2003
Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Ohsugi Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y, Okano H	Blockade of interleukin-6 receptor ameliorates functional recovery in spinal cord injury	J Neurosci Res	In press	2004
Yamashima T, Tonchev B.A., Soki T, Sawamoto K, Okano H	Vascular adventitia generates neuronal progenitors in monkey hippocampus after ischemia	Hippocampus	In press	2004
Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan, RC., Okano H	Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cell	Immunity	20 87-93	2004
Murata J, Murayama A, Horii A, Doi K, Harada T, Okano H, Kubo T	Expression of Musashi1, a neural RNA-binding protein, in the cochler of young adult mice	Neuroscience Letter	354 201-204	2004
Katsuno M, Adachi H, Sobue G	Sweat relief for Huntington's disease	Nat Med	in press	2004
Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G	Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): Ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspective	J Mol Med	in press	2004
Koike H, Misu K, Sugiura M, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Mukai E, Ando Y, Ikeda S, Sobue G	Pathologic differences between early- and late-onset type I (TTR Met30) familial amyloid polyneuropathy	Neurology	in press	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	in press	2004