

2005007109A
厚生労働科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症に対する
肝細胞増殖因子（HGF）を用いた
挑戦的治療法の開発をその基盤研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 糸山泰人 / 東北大学大学院医学系研究科神経内科
平成18年3月 印刷

目 次

I. 研究者一覧

II. 総括研究報告書

東北大学大学院医学系研究科神経内科

糸山泰人

III. 分担研究報告書

1. ヒトCu/Zn-SODのCys111の2-メルカプトエタノール化と安定性の獲得に関する研究

大阪大学大学院医学系研究科生化学

谷口直之

2. SOD1変異体をターゲットとする新規ヒトユビキチンリガーゼNEDL1の機能解析とその神経細胞死における役割に関する研究

千葉県がんセンター研究所

中川原 章

3. HGFは広範囲（脊髄に加え脳幹）ALS運動ニューロンに効率よくシグナル伝達し、神経細胞死およびグリオシスを抑制する

大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

船越 洋

4. 肝細胞増殖因子（HGF）-cMetシステムに基づいた筋萎縮側索硬化症（ALS）ストレスによる運動神経細胞死阻止に関する基盤研究：ヒト剖検例に関する病理組織学的解析

鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門

加藤信介

5. 抗HGF抗体の髄腔内投与によるALSラット病態進行の促進およびHGFなどの神経栄養因子による神経前駆細胞賦活の試み

東北大学病院神経内科

青木正志

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 研究成果に関する刊行物

研究者一覽

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた
挑戦的治療法の開発とその基盤研究

研究者一覧

主任研究者	糸山 泰人	東北大学大学院医学系研究科神経内科	教授
分担研究者	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
	中川原 章	千葉県がんセンター研究所	所長
	船越 洋	大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻 組織再生医学講座分子組織再生分野	助教授
	加藤 信介	鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設脳神経病理	助教授
	青木 正志	東北大学病院神経内科	助手

總 括 研 究 報 告 書

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた挑戦的治療法の
開発とその基盤研究

主任研究者 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学講座神経内科学分野 教授

研究要旨：本研究の目的は神経難病でも最も苛酷な筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対して肝細胞増殖因子（HGF）を用いた挑戦的治療法を開発することとそれに関わる基盤研究を進めることにある。ALSの病因研究および治療研究には変異 Cu/Zn superoxide dismutase（SOD）遺伝子導入 ALS ラットが重要な役割を果たしている。私共はこの ALS ラットを用いて運動ニューロンに対し神経栄養因子作用を有するヒトリコンビナント Hepatocyte Growth Factor（HGF）の髄腔内持続投与で ALS に対する有効性を示してきた。今回 ALS への臨床応用を目指し ALS ラットにおける発症後からの HGF の髄腔内持続投与を行ない、対照 ALS ラットに比べ約 1.6 倍の延命効果を認めた。一方、抗 HGF 抗体を ALS ラットの髄腔内へ投与し HGF を中和させると病態を悪化させるので、HGF が ALS 病態の進行を抑制していることが示された。また、孤発性 ALS 患者の脊髄での残存運動ニューロンに HGF とその受容体 c-Met が発現していることが明らかにされ、外来性 HGF の投与が孤発性 ALS の病態進行抑制に有効である根拠が示された。この事実は今後の ALS への HGF 治療の臨床応用について大きなステップと考えられる。新規治療法開発の次なる段階としては、齧歯類に比べヒトにより近い霊長類における HGF 投与の安全試験が必要であり、ヒトの前臨床試験に向けて今後の開発研究の進展が期待される。

分担研究者

谷口直之（大阪大学大学院医学系研究科
生化学）

中川原 章（千葉県がんセンター
生化学研究部）

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）

加藤信介（鳥取大学医学部 神経病理）

青木正志（東北大学病院 神経内科）

ーロンの選択的な細胞死が惹起されて、全身の筋萎縮と脱力が進行する原因不明の難治性神経筋疾患である。しかも 2～3 年の経過で呼吸筋の麻痺をきたす極めて予後不良な疾患であるが、現状では有効な治療法がない。ALS の病因と病態の解明を行ない、それを基盤にした新規治療法の開発が世界的に切望されている。

わが国で発見された神経栄養因子である肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor、以下 HGF）は、運動ニューロンに対する強力な保護作用が知られており、私

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動ニュー

共は遺伝子工学的に ALS マウスにおける HGF の運動ニューロン死に対する抑制効果を明らかにしてきている。本研究の目的は、ALS の臨床応用を目指し、私共が開発した大型 ALS 動物モデルである変異 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) 導入 ALS ラットに対して HGF 蛋白の髄腔内投与実験を行い、その有効性を確立することにある。

B. 研究方法

ALS の新規治療法の開発を目指し ALS ラットに対してヒトリコンビナント HGF 蛋白の髄腔内持続投与による治療効果を明らかにし、ALS に対する HGF の臨床応用を目指して投与用量、投与時期および有効性の機序解明を行う。

1) 新規治療法開発の基盤となる変異 Cu/Zn SOD の特性の検討と神経細胞死の機序解明

① Cu/Zn SOD にはシステイン残基が 4 つあり Cys6 と Cys111 はフリーのシステインで、Cys57 と Cys146 は S-S 結合をしている。Cys111 は蛋白質の外側にある Greek key loop 内に存在し、ホモダイマーが向かい合った位置に存在するため、Cys111 の SH 基は特に反応性が高いと予想される。この Cys111 の SH 基に SS 交換反応で 2-メルカプトエタノール (2-ME) を導入し、その Cu/Zn SOD 蛋白質の酸化や安定性に及ぼす影響を検討した。

② 今まで神経組織特異的に発現する新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 を同定し、この NEDL1 は変異 Cu/Zn SOD とのみ強固な結合体を形成し、細胞内封入体に沈着

することを確認してきた。また、NEDL1 はコロニー形成能の抑制とアポトーシス誘導能を有することを明らかにしてきた。今回は細胞死における NEDL1 の関与を検討する目的で培養細胞に NEDL1 および p53 の発現ベクター遺伝子導入して 2 週間にわたって形成された colony formation assay を行った。

2) 臨床応用を目指した ALS ラットに対する HGF の髄腔内投与実験の完成と HGF の運動ニューロン死の抑制機序の解明

① HGF の臨床応用を目指して ALS ラットに対する HGF の髄腔内投与実験を行った。G93A Tg ラットの髄腔内にヒトリコンビナント HGF (hr HGF) を浸透圧ポンプ (Alzet Model 2004) を用いて平均発症時期の 115 日齢から hr HGF 200 μ g/匹を持続投与して、死亡するまでの経過を観察した。内因性ラット HGF が ALS 病態に与える影響を検討する為に、内因性 HGF が誘導されてくる週齢から 4 週間、ウサギポリクローナル抗ラット HGF 特異抗体を 5 μ g/体重 (g) 髄腔内に持続投与し、発症日、死亡日を観察した。

② 今まで変異 Cu/Zn SOD 導入 ALS マウスにて脊髄運動ニューロン変性に対する HGF の抑制効果を示してきたが、脳幹運動ニューロンに対する神経保護効果は不明であった。G93A Tg マウスと HGF Tg マウスを交配してダブルトランスジェニックマウスを作製し、脳幹運動ニューロン (顔面神経核・舌下神経核) の変化と c-Met のチロシンリン酸を解析した。

③ 家族性 ALS 患者の脊髄残存前角神経細胞における HGF 及びそのレセプターである c-Met の発現を免疫組織学的に解析した。

孤発性 ALS 40 例、変異 Cu/Zn SOD を伴う家族性 ALS 2 家系 5 症例の各脊髄剖検材料を human HGF 抗体と human c-Met 抗体を用いて免疫染色を行った。

3) HGF を用いた将来的な ALS 治療としての再生医療や遺伝子治療の可能性

HGF を用いた再生医療の開発を目的に ALS ラットにおける内在性神経前駆細胞の HGF に対する反応を解析した。ALS Tg に対して hr HGF (総量 100 μ g/匹) を 2 週間にわたって髄腔内に持続投与した後、BrdU で標識される新生細胞数を検討した。また、発症後の ALS ラットに対して上皮細胞成長因子 (EGF) および線維芽細胞成長因子 (FGF-2) を同時投与した群と単独投与群での内在性神経前駆細胞の賦活の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は本学 DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は同動物実験指針に従った上で動物愛護面に配慮しかつ利用動物数を極力減らすように務めた。

C 及び D. 研究結果及び考察

1) 新規治療法開発の基盤となる変異 Cu/Zn SOD の特性の検討と神経細胞死の機序解明

① Cys111 にのみ 2-ME が結合するが、Cys6 には結合していないことが MALD-TOF-MASS 解析で確認された。2-ME がついた 2-ME-SOD は 75°C 以上になると元の SOD に較べて熱に安定であることが示された。この結果から、2-ME 化した SOD は野生株の SOD よりも熱に安定で酸化されにくいことが明らかになった。

以上の結果は、Cys111 の SH 基を 2-ME でマスクすると SOD を安定化させることが可能であることを示唆する。変異 SOD の Cys111 の SH を特異的に保護する薬剤の開発は家族性 ALS の治療につながる可能性がある。

② NEDL1 は総体的には変異 Cu/Zn SOD などのミスフォールド蛋白を認識する品質管理ユビキチンリガーゼである可能性が示唆されるが、長期的にはこの分解システムに破綻をきたし組織内凝集体の核になると考えられる。NEDL1 が細胞増殖あるいはアポトーシスにどのような機能を担うかを調べるため、培養細胞に NEDL1 を過剰発現させて colony formation assay を行った結果、アポトーシスが誘導された。そこで、細胞のアポトーシス誘導の重要な蛋白質である p53 の関与の有無について H1299 (p53^{-/-}) と SH-SY5Y (野生型 p53) を用いて colony formation assay 法にて検討したところ、NEDL1 による細胞死の誘導は p53 を介した機構であることが明らかになった。NEDL1 が核内において p53 と結合し、その安定化を介してアポトーシスを誘導する機能を有していることは、家族性 ALS における神経細胞死の分子機序を考えるうえで、極めて重要な知見と考えられる。

2) 臨床応用を目指した ALS ラットに対する HGF の髄腔内投与実験の完成と HGF の運動ニューロン死の抑制機序の解明

① ALS ラットに対して hr HGF の髄腔内持続投与を ALS 発症期から行うことによって、平均死亡は HGF 投与群が 154.3 \pm 16.4 日、対照群が 143.25 \pm 17.0 日 (p = 0.02323) と HGF 投与群が対照群より有意

に遅延した。発症から死亡までの平均罹病期間が、HGF 投与群が 27.5 ± 11.1 日間、対照群が 16.9 ± 8.17 日間と、HGF 投与群では対照群の 62.7%の増大を示し、発症期の投与によっても HGF が Tg ラットの罹病期間を大幅に延長させることが示された。発症時期からの投与により罹病期間延長効果が得られたことは、臨床への応用という点に関して注目すべき結果と考える。また、本 ALS モデルラットにおいて運動ニューロン脱落とともに誘導されてくる内因性のラット HGF を抗 HGF 抗体の髄腔内投与によって中和すると、コントロール群に比して抗 HGF 抗体投与群では、より早期に発症する傾向 ($p=0.1843$)、有意に速い進行 ($p=0.0299$)、より早期の死亡が認められ ($p=0.0463$)、病態が悪化することが明らかとなった。このことから、HGF が ALS 様病態の進行を遅らせている重要な生理的抑制因子であることが示唆された。

② ダブルトランスジェニックマウスでは脳幹の運動ニューロン（顔面神経や舌下神経）の変性が ALS マウスに較べて抑制されていることが示された。また c-Met のチロシンリン酸化により HGF のシグナルを評価すると、HGF は ALS の神経細胞においてより効率的にシグナル伝達することが明らかになった。

③ ALS 患者脊髄組織の免疫染色の結果は、発症後約 3 年までの孤発性 ALS 脊髄残存神経細胞の一部には、HGF とその受容体 c-Met が発現していた。しかし、それ以降の臨床経過の長い孤発性 ALS では経過と共に HGF-c-Met システムが up-regulate している残存神経細胞数は激減していった。これらの免疫染色の結果は ALS での大部

分の残存神経細胞は HGF-c-Met システムが破綻するために細胞死に至るが、一部には HGF-c-Met システムを発現して存在する可能性を保っていることが判明した。

以上より、外来性 HGF の供給は生理的な HGF の病態進行抑制作用を強化するという点でヒト ALS に対する有力な新規治療法になり得ると考えられる。

3) HGF を用いた将来的な ALS 治療としての再生医療や遺伝子治療の可能性

これまでに、ALS ラットモデルの脊髄では発症期以前からグリア新生 (gliogenesis) の亢進が認められるとともに、末期には未分化神経前駆細胞も増殖することを報告してきた。HGF 投与によって病期の進行に伴い、BrdU 陽性細胞数が増加し、ALS 病態下で増加しつつある新生細胞をさらに HGF が増加させることが示された。さらには EGF と FGF-2 を同時に髄腔内持続投与することによって発症後の ALS ラットモデルの脊髄での新生細胞をさらに増加させることが示された。今後はより効果的な内在性神経前駆細胞活性化のために至適投与時期と投与量の検討が必要と考えられる。

E. 結論

本研究の目的は神経難病でも最も苛酷な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対して肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた挑戦的治療法を開発することとそれに関わる基盤研究を進めることにある。ALS の病因として最も重要視されている変異 Cu/Zn SOD による選択的運動ニューロン死のメカニズムはまだ十分明らかにされていないが、変異 Cu/Zn SOD 導入による ALS Tg ラットは病

因・治療研究に極めて有用なモデルと考えられている。

今回の治療実験で ALS ラットにおける発症後からの HGF の髄腔内持続投与にて明らかな延命効果が認められた。この事実は今後の ALS の HGF 治療の臨床応用について大きなステップと考えられる。また、抗 HGF 抗体を ALS ラットの髄腔内へ投与し HGF を中和させると病態を悪化させるので、HGF が ALS 病態の進行を抑制していることが示された。また、孤発性 ALS 患者の脊髄での残存運動ニューロンに HGF とその受容体 c-Met が発現していることが明らかにされ、外来性 HGF の投与が ALS の病態進行抑制に有効である根拠が示された。新規治療法開発の次なる段階としてはこれらの結果をふまえ、齧歯類に較べヒトにより近い霊長類における HGF 投与の安全試験が必要であり、ヒトの前臨床試験に向けて今後の研究進展が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 83: 119-133, 2006
- 2) Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y. Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene.

Neuropathology 25: 365-370, 2005

- 3) Kato S, Kato M, Abe K, Matsumura T, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E. Rodex system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1)-mutated ALS animal models. *Acta Neuropathol* 110: 101-112, 2005
- 4) Fujiwara N, Miyamoto Y, Ogasahara K, Takahashi M, Ikegami T, Takamiya R, Suzuki K, Taniguchi N. Different immunoreactivity against monoclonal antibodies between wild-type and mutant Copper/Zinc superoxide dismutase linked to amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 280: 5061-5070, 2005

2. 学会発表

- 1) 割田 仁 ほか、外来性再生誘導因子投与による ALS モデルラット脊髄神経前駆細胞賦活の試み、第 46 回日本神経学会総会 2005.5 鹿児島
- 2) Fujiwara N, Suzuki K Taniguchi N. Conformational changes in Greek key loop structure of Cu/Zn-SOD and its implication in ALS: IRN 2005 The 3rd Meeting of International Redox Network, November 9-11, Kyoto, Japan (Abstract,28).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録

ラットを用いた ALS モデル（出願済）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分 担 研 究 報 告 書

厚生省研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

（分担）研究報告書

「筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた挑戦的治療法の開発とその基盤研究」

『ヒト Cu/Zn-SOD の Cys111 の 2-メルカプトエタノール化と安定性の獲得に関する研究』

分担研究者 谷口直之 大阪大学大学院医学系研究科生化学・教授

研究要旨 家族性筋萎縮性側索硬化症 (familial ALS; FALS) の原因遺伝子の 1 つは Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) である。FALS 患者や変異 SOD1 トランスジェニックマウスだけでなく、孤発性の ALS 患者でも Cu/Zn-SOD 免疫陽性の封入体が観察されており、ALS では凝集した Cu/Zn-SOD の関与が示唆されている。Cu/Zn-SOD にはシステイン残基が 4 つあり、Cys6 と Cys111 はフリーのシステインで Cys57 と Cys146 は S-S 結合をしている。Cys111 はタンパク質の外側にある Greek key loop 内に存在し、ホモダイマーが向かい合った位置するため、Cys111 の SH 基は特に反応性が高いと予想される。この Cys111 の SH 基に SS 交換反応で 2-メルカプトエタノール (2-ME) を導入した Cu/Zn-SOD タンパク質の酸化や安定性に及ぼす影響を検討した。その結果、2-ME 化した SOD は野生型の SOD よりも熱に安定で酸化されにくいことが明らかになった。以上の結果は、Cys111 の SH 基を 2-ME でマスクすると SOD を安定化させることが可能であることを示唆する。変異 SOD の Cys111 の SH を特異的に保護する薬剤の開発は FALS の治療につながる可能性があると考えられる。

研究協力者

谷口直之（大阪大学大学院医学系研究科生化学）

共同研究者

藤原範子（兵庫医科大学生化学）、中の三弥子（大阪大学大学院医学系研究科生化学）、鈴木敬一郎（兵庫医科大学生化学）

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) のうち、20%は Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (Cu/Zn-SOD) 遺伝子 (SOD1) の変異が原因であ

ることが報告されて以来、現在まで 100 種類以上の変異が報告されている。この変異 Cu/Zn-SOD が toxic な作用を有することは様々な実験で明らかにされているが、その毒性の本体、さらにはいかなるメカニズムで運動神経を障害するかは全く不明である。また、FALS 患者や変異 SOD1 トランスジェニックマウス、および孤発性の ALS 患者では Cu/Zn-SOD 免疫陽性の封入体が観察されている。特に変異 Cu/Zn-SOD は生体内で構造変化を起こし、凝集化しやすいうことが示唆されている。凝集化の起こしやすさはそのタンパク質の不安定性と関連していると考えられている。逆に不安定なタンパク質を

安定なタンパク質にしてやれば、凝集化を防ぐことが可能になると考えられる。変異 Cu/Zn-SOD を生体内で安定なタンパク質にすることは可能かどうか？という発想で、新規治療法を探ることにした。

これまで、我々は FALS 変異 Cu/Zn-SOD が不安定で、野生型 Cu/Zn-SOD よりもグライクーションを受けやすく、過酸化水素を発生させやすいこと、Greek key loop を認識するモノクローナル抗体との反応性が野生型 Cu/Zn-SOD とは異なること、などを見いだしてきた。特にタンパク質の外側にある Greek key loop は Cu/Zn-SOD タンパクの安定性に深い関わりがあり、立体構造を保つのに重要な役割を果たしていると考えられている。Cys111 はこの Greek key loop 内に存在し、Cu/Zn-SOD ホモダイマーが向かい合った位置に存在するため、Cys111 の SH 基は特に反応性が高いと予想される。(ヒト Cu/Zn-SOD にはシステイン残基が 4 つあり、Cys6 と Cys111 はフリーのシステインで Cys57 と Cys146 は S-S 結合をしている)。哺乳類ではヒトだけが 111 番目の Cys を持っており、他の哺乳類、酵母や植物では、システインがセリンに置き換わっている。セリンに置き換わった SOD の方が安定であるという報告もある。そこで、この反応性が高いと考えられる Cys111 の SH 基に SS 交換反応で 2-メルカプトエタノール (2-ME) を導入した Cu/Zn-SOD タンパク質の安定性を検討した。

B. 研究方法

2-ME 修飾 Cu/Zn-SOD タンパク質は宇部興産から供与されたものを用いた。しかし、その修飾

の確認がなされていなかったため、Cys111 のみに 2-ME が結合し、他の Cys には 2-ME が結合していないことを MALD-TOF-MASS 解析で確認した。さらに 2-ME を加えることで Cys111 の 2-ME がはずれて元の野生型 SOD に戻るかどうかを MALD-TOF-MASS 解析で検討した。その結果、20 mM の 2-ME で処理すると Cys111 から完全に 2-ME がとれた野生型 Cu/Zn-SOD に戻ることを確認した。そこで、2-ME がついた Cu/Zn-SOD を 2-ME-SOD、はずして元に戻った Cu/Zn-SOD を re-SOD と呼ぶことにする。この 2 つの SOD における熱安定性を円偏光二色性 (CD) 解析で検討した。また両 Cu/Zn-SOD に過酸化水素を添加し、酸化 (分解) の程度を SDS-PAGE で解析した。さらに酸化 SOD を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーである MonoQ カラムで分画し、ウエスタンブロットングにて酸化分解の程度を検討した。

C. 研究結果

Cys111 にのみ 2-ME が結合していること、もう 1 つのフリーのシステインである Cys6 には 2-ME が結合していないことを MALD-TOF-MASS 解析で確認した。さらに 20 mM の 2-ME とインキュベートすることで、Cys111 の 2-ME がはずれて元の SH 型のシステインになることを確認した。2-ME がついた 2-ME-SOD と元に戻した re-SOD を種々の温度下で CD 解析を行った。70°C までは両者とも安定で差は認められなかったが、75°C 以上になると差が出始め、re-SOD の方が 2-ME-SOD よりも不安定であることがわかった。この結果は Cys111 の SH を 2-ME で修飾させると熱安定性を高めることができるこ

とを示している。

次に種々の濃度の過酸化水素を両 SOD に加え 20 分間インキュベート、希釈した後、SDS-PAGE を行った。過酸化水素の濃度が 1 mM 以上になると、re-SOD では主に 2 本のバンドになり、時間がたつと SOD が分解された分子量の小さいバンドが増え、メインバンドの色が薄くなっていく様子が見られた。一方、2-ME-SOD も分解はされたが、その程度は低く、2 本目のバンドも認められなかった。従ってこの 2 本目のバンドは Cys111 に由来することが予想される。両 SOD を過酸化水素で酸化したのち MonoQ カラムにかけると、1 本だったピークは複数のピークに分離した。それぞれのピーク部分をウエスタンブロットティングすると、SOD のメインバンドの下に分解物のバンドが見られた。またカラムに残ったものを 0.5 M の塩化カリウムで洗い出した部分には高分子の SOD に由来するバンドが見られた。MonoQ カラムのパターンは両 SOD と同じだったが、2-ME-SOD よりも re-SOD の方に分解物や高分子のバンドが多く認められた。つまり、2-ME-SOD は酸化による分解や凝集も起こしにくいことが明らかになった。

過酸化水素を添加しないマイルドな条件で酸化させた re-SOD を MonoQ カラムで分画すると大きく 2 つのピークに分離した。両画分をウエスタンブロットした所、前のピークに存在する SOD は 1 本バンド、後ろのピークにある SOD は 2 本のバンドになっていた。この 2 本バンドのうち上のバンドがどんな酸化修飾を受けているのかを調べるために、バンドを切り取って MS 解析を行っているところである。

D. 考察

Cys6 には家族性 ALS を引き起こす変異が認められているが、Cys111 の変異は報告例がない。つまり、すべての FALS 変異 Cu/Zn-SOD には Cys111 のフリーの SH 基が存在し、酸化や他分子との会合が起こりやすい状態にある。以上の結果より、Cys111 のフリーの SH 基を修飾することによって変異 Cu/Zn-SOD の不安定性や凝集性を低減できる可能性が示唆された。今後は、変異 SOD にも 2-ME を修飾させ、安定性が増大するかどうかの検討を行っていく。また安定な 2-ME-SOD とダイマーを形成させることで変異 SOD が安定化するかどうかの検討も行なっていきたいと考えている。変異 SOD の Cys111 の SH を特異的に保護できる無毒性の低分子 SH 化合物の開発や安定な野生型 SOD の補充は FALS の新規治療法の開発につながると考えられる。

E. 結語

Cys111 を 2-ME で修飾した Cu/Zn-SOD は熱に安定で酸化分解や凝集を起こしにくい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujiwara N., Miyamoto Y., Ogasahara K., Takahashi M., Ikegami T., Takamiya R., Suzuki K. and Taniguchi N. (2005) Different Immunoreactivity against Monoclonal Antibodies between Wild-type and Mutant Copper/Zinc

Superoxide Dismutase Linked to Amyotrophic Lateral Sclerosis. J. Biol. Chem. 280, 5061-5070

Takamiya R., Takahashi M., Park Y.S. Tawara Y., Fujiwara N., Miyamoto Y., Gu J., Suzuki K. and Taniguchi N. (2005) Overexpression of Mutated Cu,Zn-SOD in Neuroblastoma Cells Results in Cytoskeletal Change. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 288, C253-259

2. 学会発表

Fujiwara N., Suzuki K. and Taniguchi N. (2005) CONFORMATIONAL CHANGES IN GREEK KEY LOOP STRUCTURE OF CU/ZN-SOD AND ITS IMPLICATION IN ALS: IRN 2005 The 3rd Meeting of International Redox Network, November 9 –11, Kyoto, Japan, (Abstract, 28)

Fujiwara N., Miyamoto Y., Takahashi M., Ookawara, T., Eguchi, H., Suzuki K. and Taniguchi N. (2005) Mutant Copper/Zinc superoxide dismutases linked to amyotrophic lateral sclerosis exhibit a lowered immunoreactivity against monoclonal antibodies recognizing Greek key loop VI compared with wild type under denatured conditions. Neuroscience 2005, Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting, November 12 –16, Washington DC, USA, (Program No. 429.12. 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

SOD1 変異体をターゲットとする新規ヒトユビキチンリガーゼ NEDL1 の機能解析と
その神経細胞死における役割に関する研究

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所 所長

研究要旨

家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）の約20%はSOD1遺伝子の生殖系統における変異から生じるが、その詳細な分子機構はまだ不明である。我々はこれまでの報告で、小児神経芽腫 cDNA ライブラリーより神経組織特異的に発現する新規ヒトユビキチンリガーゼとして同定した NEDL1 が、SOD1 変異体とのみ特異的に結合し、ユビキチン化による分解を引き起こす一方、強固な結合体を形成し、細胞内封入体中に沈着することを見いだした。また、NEDL1 が Wnt 細胞内情報伝達系の重要な制御因子である Dishevelled-1 (Dvl-1) をユビキチン化の基質とすること、さらに、NEDL1 がコロニー形成能の抑制とアポトーシス誘導能を有することを報告した。本年度は、これらの結果を踏まえて、以下のことを明らかにした。1) NEDL1 によるアポトーシス誘導は p53 依存性であった。2) NEDL1 は核内にも存在し、p53 蛋白質と直接結合した。また、その結合部位は p53 の COOH 側多量体形成領域であった。3) NEDL1 は p53 と結合してもそれをユビキチン化することなく、むしろ安定化した。その結果、NEDL1 は p53 のターゲット遺伝子である p21^{WAF1} や Bax の転写を亢進した。4) NEDL1 は多分化能を有する神経芽腫幹細胞様細胞株に特異的に発現し、神経発生の極めて早期に機能している可能性が示唆された。これらの結果より、NEDL1 は脊髄運動神経細胞を含む神経組織に特異的に発現し、神経発生に関与する Wnt シグナルを調整するとともに、p53 を介して神経細胞のアポトーシスを誘導することが示唆された。

A. 研究目的

これまでの我々の研究により、神経組織特異的に発現する新規ヒトユビキチンリガーゼ NEDL1 は Wnt 細胞内情報伝達系で重要な制御因子である Dishevelled-1 (Dvl-1) をユビキチン化の基質とするものの、一方において、正常な SOD1 とは結合せず SOD1 変異体と特異的に結合し、ユビキチン化による分解を引き起こした。また、興味深いことに、その結合、ユビキチン化、分解の程度は、その SOD1 変異体が原因となる FALS の臨床的重症度と強く相関し、FALS の発症に深く関与することが示唆された。また、前年度の報告で、NEDL1 の過剰発現が細胞のアポトーシスを誘導することが明らかになった。そこで本年度は、NEDL1 によるアポトーシス誘導の分子機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) Colony formation assay

培養細胞に NEDL1 および p53 の発現ベクターを遺

伝子導入し、G418 抗生物質で選び、2週間に渡って形成された colony を染色した。細胞は、H1299 (p53^{-/-})、SH-SY5Y (野生型 p53)、U2OS (野生型 p53) を用いた。

(2) 免疫沈降および Western Blotting

培養細胞に NEDL1 あるいは p53 遺伝子発現ベクターを導入し、免疫沈降法および Western Blotting により結合の確認を行った。

(3) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポーターとしては、p21^{WAF1} および Bax 遺伝子のプロモーターを用いた。細胞は U2OS または COS7 を使い、遺伝子はリポフェクタミンにより細胞に導入した。

C. 研究結果

(1) NEDL1 による p53 依存性アポトーシスの誘導

前年度までの報告で、NEDL1 を過剰発現させると細胞のアポトーシスが誘導されることを報告したが、

そのメカニズムは不明であった。そこで、細胞のアポトーシス誘導の重要な蛋白質である p53 の関与の有無について、colony formation assay 法を用いて検討した。その結果、H1299 (p53^{-/-}) に NEDL1 を遺伝子導入してもアポトーシスの誘導は見られなかった。一方、SH-SY5Y (野生型 p53) または U2OS (野生型 p53) に NEDL1 を過剰発現させた場合には、コロニー形成能が強く抑制されアポトーシスが誘導された。したがって、NEDL1 による細胞死の誘導は p53 を介した機構であることが明らかになった。また、細胞分画により細胞質と核における NEDL1 の存在を検討したところ、NEDL1 蛋白質は主に細胞質に存在したが、核内にも存在が確認された。

(2) NEDL1 と p53 の結合と結合ドメインの同定次に、NEDL1 と p53 の相互作用の有無について検討した。NEDL1 と p53 を細胞に発現させ両者の結合の有無を免疫沈降法により検討したところ、両者は共沈降してきた。そこで、同じ免疫沈降法を用いて p53 側の結合ドメインを調べたところ、NEDL1 は p53 の COOH-端、多量体形成領域に結合することが明らかになった。

(3) NEDL1 による p53 の安定化と転写活性化能の亢進

NEDL1 は構造的にも機能的にも HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼであるので、NEDL1 が p53 をユビキチン化により分解するかどうかについて検討した。その結果、驚いたことに、NEDL1 は p53 に結合してもそれをユビキチン化せず、むしろそれを安定化した。そこで、この現象が p53 の機能にどのように影響するかを p53 ターゲット遺伝子のレポーターアッセイ法により調べたところ、NEDL1 により安定化した p53 はそれらの転写活性を促進した。したがって、NEDL1 は p53 を直接安定化し、その転写活性化能を増強することによりアポトーシスを誘導することが明らかになった。

(4) NEDL1 は神経芽腫幹細胞様細胞株に特異的に発現する

NEDL1 の神経系における生物学的意義について検索するために、米国 Sloan-Kettering Memorial Cancer Research Institute において確立された神経芽腫細胞株である N-type cells, S-type cells, I-type cells を用いて発現の特異性について検討した。その結果、NEDL1 は神経芽腫幹細胞様培養細胞株である I-type cells にのみ特異的に発現していた。した

がって、NEDL1 は多分化能を有する神経幹細胞に発現する遺伝子であることが示唆された。

D. 考察

SOD1 変異体は 1993 年 FALS の原因遺伝子として発見されたが、FALS 発症の詳細な分子機構はまだ不明であり、有効な治療法も確立されていない。従って、SOD1 変異体と相互作用し、SOD1 変異体の存在により制御される因子の同定は、SOD1 変異体由来の FALS 発症機構の解明に重要とである。これまでの研究により、我々が同定した NEDL1 は Wnt 細胞内情報伝達系の重要な制御因子である Dvl-1 および SOD1 変異体と結合し、ユビキチン化による分解を引き起こすことが明らかになったが、昨年度報告したように、NEDL1 は細胞への過剰発現によりアポトーシスを誘導した。しかし、その分子メカニズムについては不明であった。今年度、その分子機構について解析を行ったところ、NEDL1 は核内において p53 と結合し、その安定化を誘起させることにより細胞死を誘導することが判明した。しかし、驚いたことに、NEDL1 は HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼであるにもかかわらず p53 はユビキチン化されていなかった。したがって、脊髄運動神経細胞を含む神経系細胞に特異的に発現している NEDL1 は、特異な蛋白質間相互作用を有する巨大 HECT 型分子であり、その未知の特性が FALS 発症の原因のひとつとなっている可能性が示唆された。また、神経芽腫幹細胞様細胞株に特異的に発現していたため、NEDL1 は神経幹細胞の特性を決定する重要な遺伝子である可能性も考えられた。

E. 結論

FALS 発症に関わる重要な遺伝子と考えられる NEDL1 のターゲット分子が p53 であったことは、その発症の分子機構を考えるうえで極めて重要な知見であった。今後、NEDL1 を介した Wnt シグナルの異常がどのように FALS 発症に関わっているか解析をすすめる必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. [Nakagawara A.](#) Chapter 5. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In

- Neuroblastoma, Eds. N-K. Cheung & S. Cohn, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg, pp41-53.
2. Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24:938-944, 2005
 3. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65:828-834, 2005
 4. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* 228:5-11, 2005
 5. Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, Nakagawara A, Koseki H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* 24:3385-3396, 2005
 6. Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.* 228:29-35, 2005
 7. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. *Cancer Cell* 7:337-350, 2005
 8. Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A. Identification of protein kinase A catalytic subunit beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* 280:16665-16675, 2005
 9. Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, Nakagawara A, Sugimoto T. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative PCR. *J. Clin. Oncol.* 23: 5205-5210, 2005
 10. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol.* 167:213-222, 2005
 11. Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, Tokita H, Ohira M, Nakagawara A. LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. *Cancer Res.* 65:4587-4597, 2005
 12. Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 96:653-660, 2005
 13. Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.* 96:729-737, 2005
 14. Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogene* (in press)
 15. Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A. UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. *Oncogene* (in press)
 16. Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr. Blood Cancer* (in press)
 17. Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic *BMCC1*, a novel gene with the *BNIP2* and *Cdc42GAP* homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene* (in press)
 18. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T., Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* (in press)
 19. Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Lett.* (in press)
 20. Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Mol. Cell. Biol.* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願中 1件

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書
「筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた
挑戦的治療法の開発とその基盤研究」

HGFは広範囲（脊髄に加え脳幹）ALS運動ニューロンに効率よくシグナル伝達し、
神経細胞死およびグリオシスを抑制する
分担研究者：大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学 船越洋、角山圭一、中村敏一

研究要旨

ALSは運動神経特異的変性を起こす致死性疾患で現在有効な治療法がない。ALSでは脊髄運動ニューロンの変性が先行することが多いが、脳幹運動ニューロンの変性も次第に深刻化し、ALS病態進行の主役の1つである。HGFは強力な運動神経栄養因子であり、もしALSの神経に効率的にHGFシグナルを伝達できたら神経変性抑制に有用と期待される。私達はこれまでALSモデルトランスジェニックマウス（ALS-Tg）と神経特異的HGF発現Tgマウス（HGF-Tg）の交配研究により、HGFがALS脊髄運動神経の変性を抑制すること示してきたが、脳幹運動神経への機能や作用分子機構の解析は不十分であった。今回は、HGFのALS脳幹運動神経への効果とシグナル分子機構についてc-Met/HGF受容体のチロシン残基へのリン酸化の観点から評価した。その結果ALS/HGF-Tgではこれまで報告してきた脊髄に加え、脳幹運動神経の変性も抑制されることが明らかとなった。またc-Metのチロシンリン酸化によりHGFのシグナルを評価すると、HGFはALSの神経細胞においてより効率的にシグナル伝達し、即ちALS神経細胞により特異的に作用することが明らかとなった。臨床適用可能な効率的HGF供給法が確立できれば、HGFはALS治療に有用と期待された。

はじめに

ALSは、脊髄・脳幹運動ニューロンが特異的に変性脱落する致死性疾患であり、現時点で有効な治療法がない。高齢化社会を迎え神経変性疾患の重要性が益々高まってきていることに加え、家族の方やまわりの方々を巻き込んだ疾患である社会的意味でも今世紀解決すべき主要標的疾患と言える。ALSにおいては、脊髄での運動ニューロン変性が先行することが多い。私達は、これまでヒトALSの原因遺伝子（SOD1G93A）発現Tgマウス（ALS-Tg）にHGFをトランスジェニックマウスのアプローチで神経特異的に供給することで、ALS-Tgの運動神経細胞（脊髄）の変性を抑制し、四肢運動機能の改善および寿命の延長効果が得られることを報告した（Sun, Funakoshi et al., 2002）。その上ヒトALS患者の脊髄病理組織において、HGFとc-MetがALS-Tgと同様の発現制御を受けることが明らかとした。また家族性ALS

（FALS）に加え、弧発性ALS（SALS）においても同様の発現制御を受けたことから（Kato et al., 2003）、HGFはFALSに加えてSALSについても有効と期待されている。これまでの結果から、HGFがALS進行抑制に機能する生理的因子である可能性が示唆されている。今後抗HGF抗体等により内因性HGFの機能阻害実験による証明が必要である。このように脊髄運動ニューロンに対するHGFの発現調節や変性抑制機能の解析が進む一方で、HGFの脳幹部運動ニューロンに対する機能は不明である。脳幹部運動ニューロンのALS病態形成における重要性を考慮すると、HGFのALSの脳幹運動ニューロンに対する機能の解析は避けて通ることのできない重要課題である。私達は、脳幹部運動ニューロンの代表として2つの運動神経核（顔面神経核・舌下神経核）について解析を進めた。また、将来HGFのALSへの臨床適用を考慮するにあたり、HGFはALSに罹患