

Takamiya R., Takahashi M., Park Y.S., Tawara Y., Fujiwara N., Miyamoto Y., Suzuki K. and Taniguchi N. (2003) OVEREXPRESSION OF MUTATED CU, ZN-SODS IN NEUROBLASTOMA CELLS RESULTS IN CYTOSKELETAL CHANGE. HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX Joint World Congress, October 8 -11, Montreal, Canada (Late Breaking Abstracts, 23, 2003.)

Fujiwara N., Miyamoto Y., Takahashi M., Ookawara T., Eguchi H., Ogasahara K., Endo T., Takamiya R., Honke K., Tsukihara T., Suzuki K. and Taniguchi N. (2003) Differences in conformational change monitoring with monoclonal antibodies between wild-type and mutant Cu, Zn-SOD linked with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. :第 76 回日本生化学会大会. 10. 15-18, 横浜. (生化学, 75, 862, 2003.)

Takamiya R., Takahashi M., Park Y.S., Tawara Y., Fujiwara N., Miyamoto Y., Suzuki K. and Taniguchi N. (2003) Overexpression of Mutated Cu, Zn-SOD in Neuroblastoma Cells Results in Cytoskeletal Change. : 第 76 回日本生化学会大会. 10. 15-18, 横浜. (生化学, 75, 829, 2003.)

藤原範子、宮本泰豪、高橋素子、大河原知水、江口裕伸、谷口直之、鈴木敬一郎 (2004) 家族性筋萎縮側索硬化症 (FALS) の原因となる変異 Cu/Zn-スーパーオキシドディスムターゼの構造変化と不安定性. 過酸化脂質・フリーラジカル学会第 28 回大会. 10. 28-29, 名古屋. (過酸化脂質研究, 28, 42, 2004.)

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 3<sup>rd</sup> 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。

家族性筋萎縮性側索硬化症における新規ヒト E3 ユビキチンリガーゼ NEDL1 の  
機能的役割に関する研究

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遺伝子の変異によって引き起こされることが明らかになっているが、その詳細な分子機構は不明である。我々は、自然退縮を引き起こす神経芽種よりクローニングし、神経組織特異的に発現する新規 HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ NEDL1 を同定した。その生理的機能を明らかにするために、Yeast two-hybrid 法を用いて結合する蛋白質の検索を行ったところ、NEDL1 は FALS 発症の原因のひとつである変異型 SOD1 と特異的に結合し、その結合は疾患の重症度に相関することを見いだした。また、NEDL1 は生理的には Dishevelled-1(Dvl-1)をユビキチン化の基質とすることを明らかにした。免疫組織化学染色において NEDL1 はヒト FALS 並びに SOD1 変異体 Tg マウスの脊髄運動ニューロン Lewy body-like hyaline inclusions (LBHI)に陽性であった。さらに、細胞に NEDL1 を過剰発現したところ、p53 依存性アポトーシスが誘導されることを見いだした。また、NEDL1 と p53 は直接結合し、その結合領域は p53 の COOH 側多量体形成領域であった。しかし、不思議なことに、NEDL1 は p53 をユビキチン化せず、安定化を誘導してその転写活性化能を促進し、その結果アポトーシスが誘導された。したがって、NEDL1 は Dvl-1 を介した Wnt シグナルの制御経路とともに、p53 を介した神経細胞死を誘導することが明らかとなり、FALS の発症病態を考えるうえで重要な知見が得られた。

**A. 研究目的**

我々は、自然退縮する神経芽種の遺伝子発現解析の過程で、新規 HECT 型ユビキチンリガーゼ NEDL1 をクローニングした。そこで、その生理機能を明らかにするために、NEDL1 に結合するタンパク質の検討を酵母 two-hybrid 法により行ったところ、小胞体トランスロコンを構成し SOD1 変異体と結合することが報告されている TRAP- $\delta$ が同定された。そこで、NEDL1 が、品質管理ユビキチンリガーゼとしても機能し、ミスフォールド蛋白としての SOD1 変異体に作用するのか、作用するならばそれは FALS の発症および進展に関与するのかを明らかにするために、系統的な研究を行った。

**B. 研究方法**

(1) NEDL1 の全長同定、マウス ortholog の同定、組織発現、細胞内局在、活性同定

独自に作成した神経芽種 cDNA ライブラリー、およびヒト胎児脳 cDNA ライブラリーを用いた。発現解析は、ノザンプロット及びヒト脳部位別 cDNA を用いた RT-PCR を行った。細胞内局在の検討には共焦点顕微鏡を用いた。また *in vitro* の再構成系によるユビキチンリガーゼ活性の検討を行った。

(2) 相互作用因子、基質同定、チェイス実験、NEDL1 基質蛋白間での相互作用

酵母 two-hybrid 法を利用した相互作用因子、基質同定を行った。また、得られた相互作用候補因子は培養細胞を用いた一過性の遺伝子発現による免疫沈降法並びにウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* 転写/翻訳法によりで結合の確認を行った。また、培養細胞内でのユビキチン化の検討も行った。さらに蛋白質合成阻害剤サイクロヘキシミドを用いたチェイス実験により SOD1 変異体蛋白の半減期の

検討も行った。

(3) 結合部位同定

NEDL1 の機能ドメインに対する欠失変異体及び部分変異体を作製し一過性の遺伝子発現による免疫沈降法及びプルダウン法により結合部位を決定した。

(4) 免疫組織化学染色

NEDL1 特異抗体を用い、コドン 126 の 2 塩基フレームシフト家系の FALS 症例、及び H46R 変異の Tg マウスを用いた免疫組織化学染色を行った。

(5) 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<sup>-/-</sup>)、SH-SY5Y (野生型 p53)、U2OS (野生型 p53) を用いた。

(6) 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。

(7) 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<sup>WAF1</sup> 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 を用い、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) 新規 HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ NEDL1 のクローニングとその機能

神経芽種、ヒト胎児脳ライブラリーに対するスクリーニング及びゲノム情報に基づき、ヒト NEDL1 の全長配列 (1,585 アミノ酸) を同定した。NEDL1 の組織別発現は、成人脳、胎児脳、脊髄などほぼ神経組織に特異的であり、細胞内局在は細胞質であった。さらに *in vitro* 再構成系による検討により、NEDL1 のユビキチンリガーゼ活性が証明された。

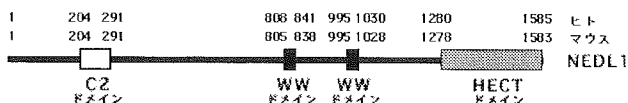


図1. NEDL1のドメイン構造

C2ドメイン：カルシウム/リン脂質に結合する。WWドメイン：プロリン残基に富む配列に結合する。HECTドメイン：ユビキチン結合酵素(E2)と結合し、ユビキチン付加活性を持つ。上段、下段数字はヒト、マウスのアミノ酸番号。アクセッション番号：Human *NEDL1*, AB048365; mouse *Nedl1*, AB083710。

(2) NEDL1 の基質としての Dvl-1 の同定

酵母 two-hybrid 法を利用して NEDL1 のふたつの WW ドメインをベイトとした相互作用因子の探索を行ったところ、TRAP- $\delta$ や Wnt シグナルの重要なシグナル分配因子である Dvl-1 が相互作用分子として同定された。さらに Dvl-1 は NEDL1 によりユビキチン化を受け分解に導かれることが明らかになった。

(3) NEDL1 の標的としての SOD1 変異体の同定

TRAP- $\delta$ は SOD1 変異体(G85R 及び G93A)と特異的に結合することが報告されていた(Kunst *et al.*, Nat. Genet. 15:91-94, 1997)ことから、我々は NEDL1 が品質管理ユビキチンリガーゼとしても機能し、ミスフォールド蛋白としての SOD1 変異体に TRAP- $\delta$  を介して作用している可能性を考え、免疫沈降法で両者の結合の確認を行った。すると予想通り NEDL1 は正常な 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プロテアソーム依存的分解を引き起こした。しかし、興味深いことに、その結合、ユビキチン化、分解、および SOD1 変異体の二量体化の程度は SOD1 変異体を引き起こす疾患の重症度と相関性を示した (図2)。また、FALS に特徴的な前角運動ニューロンの細胞質 Lewy body-like hyaline inclusion に NEDL1 の

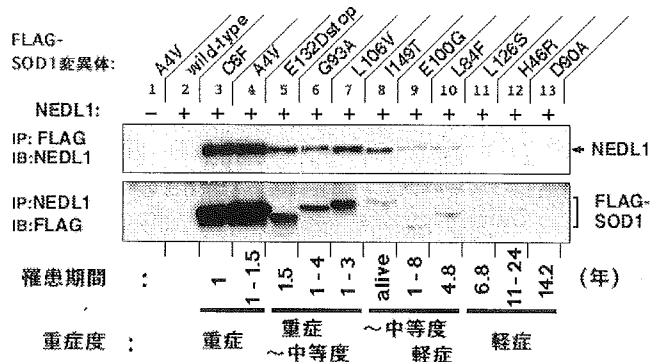


図2. NEDL1、SOD1変異体の結合

NEDL1はSOD1変異体と結合するが変異体によって結合の強さは大きく異なる。SOD1変異体を引き起こす疾患の重症度と相関性がある。WTのSOD1とは結合しない。

沈着が認められた。

(4) NEDL1 による p53 依存性アポトーシスの誘導

NEDL1 の機能を調べるために、細胞に過剰発現させたところアポトーシスが誘導された。そこで、細胞のアポト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ところ、H1299 (p53<sup>-/-</sup>) 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。しかし、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。なお、NEDL1 は p53 の COOH-端、多量体形成領域に結合した。

#### (5) NEDL1 による p53 の安定化と転写活性化能の亢進

次に、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。

#### D. 考察

自然退縮を引き起こす神経芽種より同定した神経組織特異的に発現する新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 は、生理的には Wnt シグナルの重要分子である Dvl-1 をユビキチン化してネガティブに制御し、また、小胞体膜タンパク TRAP- $\delta$  などと相互作用して変異 SOD1 などミスフォールド蛋白質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た。しかし長期的には（或いはある閾値を超えると）、SOD1 変異体の凝集活性のために（ $\beta$ -シートからなる SOD1 タンパクは元々強い凝集性を秘めたタンパクである）その分解システムに破綻を来たし細胞内凝集体の核となってしまうと考えられた。

TRAP- $\delta$  は小胞体トランスロコンの構成タンパクとして TRAP 四量体を形成しトランスロコンを介した小胞体関連分解に関与することが示唆されている。また酵母では HECT 型ユビキチンリガーゼが小胞体-ゴルジを介した品質管理に関わっている可能性が示されている。さらに、NEDL1 の基質である Dvl-1 は Wnt シグナルのシグナル変換分子であり平面内細胞極性などの形態形成に関わる分子である。従って、NEDL1 は、SOD1 変異体で誘導される細

胞障害として生じるゴルジ装置の崩壊や小胞体ストレスの惹起、さらには細胞骨格系の異常などの分子機構と関連していることが示唆された。ちなみに、Wnt 細胞内情報伝達系は、HGF のそれとクロストークしていることが報告されている。

また、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、FALS 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であった。また、我々は NEDL1 のファミリー遺伝子である NEDL2 が p73 を特異的に安定化することも見いだしており、これらの知見は FALS における運動神経細胞死の予防法開発に大きな手掛かりを与えてくれた。

#### E. 結論

自然退縮する神経芽腫からクローニングした NEDL1 とそのファミリー遺伝子である NEDL2 は、Wnt および p53 ファミリー分子のシグナルを介して、（家族性）筋萎縮性側索硬化症の発症と病状の進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tomioka N, Kobayashi H, Kageyama H, Ohira M, Nakamura Y, Sasaki F, Todo S, Nakagawara A, Kaneko Y. Chromosomes that show partial loss or gain in near-diploid tumors coincide with chromosomes that show whole loss or gain in near-triploid tumors: Evidence suggesting the involvement of the same genes in the tumorigenesis of high- and low-risk neuroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* 36:139-150, 2003.
2. Kawamoto T, Ohira M, Hamano S, Hori T, Nakagawara A. High expression of the novel endothelin-converting enzyme genes, *Nbla03145/ECEL1* and , is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. *Int. J. Oncol.* 22:815-822, 2003.
3. Saito-Ohara F, Imoto I, Inoue J, Nakagawara A, Sugimoto T, Inazawa J. PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res.* 63: 1876-1883, 2003.
4. Sakiyama S, Yu L, Tomizawa M, Shimada H, Kadomatsu K, Muramatsu T, Ikematsu S, Nakagawara A, Tagawa M. Utilization of the promoter region of the midkine gene as a tool to drive therapeutic genes in a tumor specific manner. *Advan. Enzyme Regul.*

- 43:57-66, 2003.
5. Ozaki T, Watanabe K, Nakagawa T, Miyazaki K, Takahashi M, Nakagawara A. Function of p73, not of p53, is inhibited by the physical interaction with RACK1 and its inhibitory effect is counteracted by pRB. *Oncogene* 22:3231-3242, 2003.
  6. Okamoto Y, Ozaki T, Miyazaki K, Aoyama M, Miyazaki M, Nakagawara A. UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin conjugating enzyme. *Cancer Res.* 63:4167-4173, 2003.
  7. Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Sakuma S, Wakai K, Muramatsu T, Kadomatsu K. Correlation of elevated level of serum midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br. J. Cancer* 88:1522-1526, 2003.
  8. Ohira M, Morohashi A, Inuzuka H, Shishikura T, Kawamoto T, Kageyama H, Nakamura Y, Isogai E, Takayasu H, Sakiyama S, Suzuki Y, Sugano S, Goto T, Sato S, Nakagawara A. Expression profiling and characterization of 4,200 genes cloned from primary neuroblastomas: Identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets. *Oncogene* 22:5525-5536, 2003.
  9. Miyazaki K, Ozaki T, Kato C, Hanamoto T, Fujita T, Irino S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:106-113, 2003.
  10. Nakamura Y, Ozaki T, Koseki H, Nakagawara A, Sakiyama S. Accumulation of p27<sup>KIP1</sup> is associated with BMP2-mediated growth arrest and neuronal differentiation of human neuroblastoma-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307:206-213, 2003.
  11. Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 279: 11327-11335, 2004.
  12. Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A. Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of *Nbla10449/hNLRR-1* and *Nbla10677/hNLRR-3* with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int. J. Oncol.* 24:1457-1466, 2004
  13. Ohtori S, Isogai E, Hasue F, Ozaki T, Nakamura Y, Nakagawara A, Koseki H, Yuasa S, Hanaoka E, Shinbo J, Yamamoto T, Chiba H, Yamazaki M, Moriya H, Sakiyama S. Reduced inflammatory pain in mice deficient in the differential screening-selected gene abrrative in neuroblastoma. *Mol. Cell. Neurosci.* 25:504-514, 2004.
  14. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279:25549-25561, 2004.
  15. Hiyama E, Yamaoka H, Matsunaga T, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Horie H, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Nakagawara A, Ohnuma N, Yokoyama T. High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer* 91:972-979, 2004.
  16. Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the *Plk1* oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene* 23:5901-5911, 2004.
  17. Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int. J. Cancer* 112:365-375, 2004.
  18. 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
  19. 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
  20. 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
  21. 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
  22. 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
  23. 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
  24. 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
25. 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
  26. Nakagawara A, Sawada T, Brodeur GM, Matthay KK. Professor Yoshiaki Tsuchida, MD, PhD (1936-2005). *Pediatr. Blood Cancer.* 45:609-610, 2005
  27. 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
  28. Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.* 96:729-737, 2005
  29. 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)
  30. 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)
  31. 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)
  32. 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)
  33. 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)
  34. 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. *Moll. 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）  
総合研究報告書  
「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のALS治療薬としての可能性  
—HGFの広範囲運動ニューロンに対する機能・作用分子機構解析—

分担研究者：大阪大学医学系研究科分子再生医学 ○船越洋、角山圭一、宮澤大介、中村敏一

研究要旨

ALSは致死性の運動神経特異的変性疾患で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。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。しかし、脳幹運動ニューロンへの治療効果や臨床適用可能な投与方法の開発は依然重要な課題として残されている。本研究ではHGFのALS脳幹運動神経への効果の解析、HGFの作用分子機構の解析と臨床適用可能な投与方法の開発に向け研究を進めた。ALS-TgマウスとHGF-TgのダブルTgマウスを詳細に解析した結果、HGFは脊髄にとどまらず広範囲の脳幹運動ニューロンの変性を抑制する機能があることが明らかとなった。HGF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、HGFはALSの脳幹運動神経の変性やグリオシスを大幅に遅延させることが明らかとなった。また、複数のウイルスベクターによるHGF遺伝子治療法の可能性をラットで解析した。遺伝子治療法の開発は依然未完成であるが、これらの結果はHGFのALS治療適用への可能性を示す重要な基盤データである。今後は、HGFの臨床適用に向けさらに基礎研究を進展させていきたい。

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

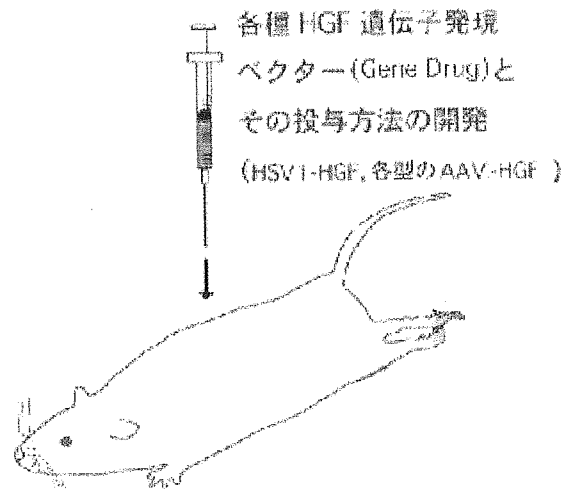
とを報告した（Sun, Funakoshi et al., 2002）。その上ヒトALS患者の脊髄病理組織において、HGFとc-MetがALS-Tgと同様の発現制御を受けることが明らかとした。また家族性ALS（FALS）に加え、弧発性ALS（SALS）においても同様の発現制御を受けたことから（Kato, Funakoshi et al., 2003）、HGFはFALSに加えてSALSについても有効と期待されている。これまでの結果から、HGFがALS進行抑制に機能する生理的因子である可能性が示唆されている。今後抗HGF抗体等により内因性HGFの機能阻害実験による証明が必要である。このように脊髄運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に罹患した神経細胞により有効に機能するのか、それとも一般的にc-Met発現細胞に機能する、いかえるとHGF治療を考える際、ALSに罹患しHGFが作用してほしい細胞により有効に作用するかそれともそうでない多くの細胞にも機能するかどうかを解析することは重要である。本研究では、HGFの実際のシグナル伝達細胞をc-Met受容体へのチロシンリン酸化で評価した。さらにHGFの特異的シグナル伝達HGFのc-Met受容体側からみたHGFの特異的分子機構についても研究を進めた。最後に、HGFの実際の臨床適用には臨床に適したHGF投与方法の開発が不可欠である。蛋白質投与の方法は、いつでも開始と終了をできること、さらに投与量の調節がしやすい点で理想的である。一方、もし一回投与で長期間HGF遺伝子を慢性変性疾患であるALS患者に供給できたら有用と考えられる。本研究では後者をめざした各種複製能欠失型ウイルスベクターによるHGF遺伝子供給法について検討した。

## 方法

### [HGF発現ウイルスベクターの調整と解析]

- (1) コンストラクトの作成：ラットHGF遺伝子にTagを付けた配列を複製能を欠失させた各種ウイルス発現ベクター（HSVおよびAAV）に挿入し作成した。配列はシーケンスにより確認した。コントロールベクターとしてLacZ発現ベクターを用いた。
- (2) ウイルスベクターの動物への投与と解析：各種条件で動物への投与後、5日後に発現を免疫染色法およびELISA法により確認した。



トランスジェニックマウス（HGF-Tg）を交配することで Wildtype, HGF-Tg, ALS-Tg, ALS/HGF-Tg の4群を作成した（Sun, Funakoshi et al., J. Neurosci., 2002に準じた）。

### [マウスの解析]

組織解析に加えて、c-Metのチロシンリン酸化を評価することでHGFの細胞へのシグナル伝達の指標とした。一方、c-Met抑制に機能するのはjuxtamembrane領域のSerのリン酸化は、同領域のリン酸化ペプチドを作製し免疫して得たSerのリン酸化ペプチドポリクローナル抗体を用いて免疫染色により評価した。

## 結果と考察

### [HGF発現ウイルスベクターの調整と解析]

複製能を欠失したHGF発現各種ウイルスベクター（1型単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクター、各種アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター）を調製し、動物投与に用い、対象としてHGFのかわりにLacZを発現するベクターを用いた。脳定位固定装置を用いた動物の神経組織への直接投与と脳脊髄液中への投与とを詳細に比較検討した。その結果、HGFの発現が免疫染色法とELISA法で確認された。神経組織中への直接投与では、HGFの発現は投与部位ではAAVがHSVに比べ高い発現を示したが、一方組



織中に於ける広がり、HSVがAAVに比較して広い特徴を示した。しかしHSVとAAVへの神経組織中への直接1カ所投与では、広範囲の運動ニューロン変性阻止は難しかった。したがって神経組織中への直接遺伝子ベクター投与では、複数箇所への投与が必須と考えられた。これに対して、脳脊髄液中へのウイルスベクター投与は、広範囲の運動ニューロンへの遺伝子供給が可能であることが、HSV、AAVいずれの場合にも確認された。したがって、広範囲な運動ニューロンが変性するALSでは後者の投与方法が有利と示唆された。各種AAVの投与の比較により、HGFの脳脊髄液中への投与での広範囲神経へのHGF供給には、AAVの中の型による相違が大きいことが明らかとなった。

#### [c-Metの脳幹運動神経細胞における発現]

c-Met受容体は、顔面・舌下といった脳幹部の成体運動神経細胞において発現していた。さらにALS-Tgにおいてもc-Met受容体が発現していた。

#### [HGFの脳幹運動ニューロンに対する機能]

HGFが脳幹運動ニューロンに発現するc-Metに作用することで、ALSの神経変性を抑制するか否かをALS-TgとHGF-Tgを交配することで評価した。その結果、これまで明らかにしてきた脊髄の運動ニューロンと同様に、HGFはALSの脳幹運動ニューロンの神経変性を抑制することが明らかとなった。そこで、これまで明らかにしてきた脊髄運動神経細胞に加えて、HGFが脳幹運動神経の変性を抑制すること、すなわちHGFがALSに罹患変性することが知られる広範囲運動神経細胞に機能できることが明らかとなった。

#### [ALSによるc-Metのチロシンのリン酸化の神経特異性]

HGFのシグナル伝達をc-Metのチロシンリン酸

化により評価した。運動神経細胞のc-Metチロシンリン酸化は、正常マウスにおいては検出限界以下であった。驚くことに、HGF単独のTgマウス(HGF-Tg)では、運動神経細胞におけるc-Metのチロシンリン酸化はdetection limit以下であった。このことから、HGFは正常運動神経細胞に比べて、ALS神経細胞でより効率よく濃度依存的にシグナルを伝達できることが明らかとなった。このことは、ALSに対する安全なHGF治療法開発の基盤となり得ることを示唆している。本研究ではその分子機構についても解析した。

#### [HGFのグリオシスに対する機能]

本研究では脳幹部運動神経核におけるグリオシスを詳細に解析した。その結果、HGFによりアストロサイトとミクログリアの両方のグリオシスが抑制されることが明らかとなった。グリオシスの初期にはグリア細胞におけるc-Metの受容体の発現を免疫染色上認めない。本研究ではHGFがいかにして運動ニューロンに機能してグリオシスを抑制するかその分子機構を解析・考察した。

#### [HGFの筋肉に於ける機能の示唆]

HGFとc-Metは筋肉において発現し、筋肉運動を制限することで発現制御を受けることが明らかとなった。今後は筋肉に於けるHGF、c-Metの発現制御から見たALSに有用なHGFと理学治療法の開発も視野に入れて研究を進展させていきたい。

以上の研究成果は、まさにHGFが広範囲ALS運動ニューロン変性を抑制し、治療薬となる可能性を強く示唆するものである。一方2005年に入り、ヒトALSへのHGFの生理的機能を示唆する研究成果が他施設から発表された。弧発性ヒトALS患者脊髄に対するDNAアレイ法において、HGF mRNAがALS脊髄運動ニューロンで発

現上昇を認めることが明らかにされた (Jiang YM et al., Ann Neurol, 2005)。これらの治療は、加藤らによる弧発例ALSの免疫染色結果を支持しHGFが家族性に加えて弧発例でもALS治療薬となる可能性を示唆している。

#### まとめ

HGFは従来報告してきた脊髄に加え脳幹運動神経での神経変性進行阻止に向けて機能することが明らかとなった。HGFはALS神経により効率的に作用することからALSに安全な治療薬となることが期待される。今後HGFのヒトALS臨床適用に向け蛋白質治療・遺伝子治療の両面から研究を進展させたい。

#### 研究協力者

青木正志、糸山泰人、東北大神経内科  
加藤信介、鳥取大学脳研病理  
水上浩明、小澤敬也、自治医科大学分子病態治療センター  
宮武伸一、大阪医科大学脳神経外科  
立野勝彦、金沢大学基礎理学療法科

#### 文献

Funakoshi H et al., Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. Clin Chim Acta. 327(1-2):1-23, 2003.  
Funakoshi H et al., Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis (ALS)--therapeutic potential of a new

neurotrophic factor: HGF in ALS. 脳と神経 55(10):841-5, 2003.

Kato S, Funakoshi H et al., Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. Acta Neuropathol (Berl). 106(2):112-20, 2003.

Zhao MZ, et al., Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector. J Cereb Blood Flow Metab 18:1-13, 2006.

Ishihara N, et al., Inhibition of apoptosis-inducing factor translocation is involved in protective effects of hepatocyte growth factor against excitotoxic cell death in cultured hippocampal neurons. J Neurochem 95(5):1277-1286, 2005.

Isogawa K, et al., Anxiolytic effect of hepatocyte growth factor infused into rat brain. Neuropsychobiology 51(1):34-38, 2005.

Tanaka S, et al., Expression of Hepatocyte Growth Factor in Rat Skeletal Muscle. J Phys Ther Sci 17:109-113, 2005.

大谷若菜, 船越洋他., Hepatocyte growth factor (HGF) 日本臨床:116-122, 2005.

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とその基盤研究  
総合研究報告書

肝細胞増殖因子（HGF）-cMet システムに基づいた筋萎縮性側索硬化症（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

分担研究者 加藤信介 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 助教授

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症（ALS）の脊髄残存前角神経細胞における肝細胞増殖因子（HGF）及び cMet の発現について解析した。症例は、孤発性 ALS（SALS）40 例，変異 SOD1 を伴う家族性 ALS（FALS）2 家系 5 症例、正常対照 20 例の各脊髄剖検材料を用いた。SALS 臨床経過は発症後 6 ヶ月から 11 年 5 ヶ月だった。免疫組織化学的解析には、一次抗体に human HGF 抗体，human cMet 抗体を用いた。同時に、発症後 2 年 6 ヶ月，11 年 5 ヶ月の SALS と正常対照の脊髄組織で Western blot 解析を行った。SALS40 症例の全経過においては、SALS の臨床経過と共に、HGF 及び cMet 両者陰性の HGF-cMet システムが破綻した残存神経細胞が増加していた。発症後約 3 年までの SALS 脊髄残存神経細胞の一部には、HGF-cMet システムが up-regulate している残存神経細胞が存在していたが、それ以後の臨床経過の長い SALS では経過と共に HGF-cMet 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。しかし、注目すべき点は、SALS40 症例全例において脊髄残存神経細胞の一部には、必ず HGF あるいは cMet 陽性の残存神経細胞が存在していたことである。ALS のどの時期においてもアストロサイトでの HGF の発現は認められなかったが、発症後 3-4 年をピークに、一部の反応性アストロサイトに cMet が高発現していた。cMet 強陽性を示す反応性アストロサイトは HGF と cMet の発現量が減少している神経細胞の近傍に集簇していた。Western blot の結果では、HGF は、発症後 2 年 6 ヶ月の症例で正常に比べ発現量が増加し、発症後 11 年 5 ヶ月の症例で HGF の発現量は減少した。cMet も HGF と同様だった。即ち、SALS においては、大部分の残存神経細胞は HGF-cMet システムが破綻するために細胞死に至るが、残存神経細胞の一部には、経過中に必ず HGF-cMet システムを発現している残存神経細胞が存在していて、ALS ストレスから自らを守って生存する可能性を探っていることが判明した。大部分の反応性アストロサイトは、神経細胞死による空間を埋め合わせる組織再構築のためと考えられるが、cMet を発現している反応性アストロサイトは、HGF を取り込むことによりアストロサイト自らの機能回復を行うことにより、アストロサイトと神経細胞との relationship を介する神経細胞生存のメカニズムの一つとして考えられた。この HGF-cMet 生存機構に基づき、ALS の脊髄残存前角神経細胞に HGF を直接導入することにより、ALS ストレスに対して、脊髄残存前角神経細胞は自らを守って生存し続けると、本研究から結論づけた。

研究協力者：加藤雅子<sup>1</sup>，船越 洋<sup>2</sup>，中村敏一<sup>2</sup>，青木正志<sup>3</sup>，糸山泰人<sup>3</sup>

<sup>1</sup>鳥取大学医学部病院病理、<sup>2</sup>大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野、<sup>3</sup>東北大学大学院医学系研究科神経内科分野

#### A. 研究目的

孤発性 ALS（SALS）では原因不明の ALS ストレスによって脊髄前角細胞死が生じ、変異 SOD1 を伴う

家族性 ALS（FALS）では変異 SOD1 ストレスによって脊髄前角細胞死が生ずるが、一方では、残存前角細胞も存在していることも事実である。今回我々は、ALS の脊髄残存前角細胞に着目し、これら残存神経細胞が、ALS ストレスから、どのようなメカニズムで自らを守って生存しているのかについて解析した。この解明に際し、我々はヒト ALS 剖検例として SALS と変異 SOD1 を伴う FALS の両者を詳細に解析することにより、肝細

胞増殖因子(HGF)とそのリセプターである cMet に着目し, ALS での脊髄残存前角細胞の生存機構の一つに HGF-cMet システムが存在していたことを解明し得た.

## B. 研究方法

1. 材料: 症例は SALS 例と変異 SOD1 を伴う FALS2 家系 5 症例の脊髄を用いた. 正常対照として, 中枢神経系に異常を認めない 20 例(年齢: 38-75 歳)の脊髄剖検材料を用いた. SALS の臨床経過と臨床的特徴については, 図 1 に示した発症後 6 ヶ月症例から 11 年 5 ヶ月症例までの 40 症例である. FALS は変異 SOD1 として 2 塩基欠損を示した Japanese Oki Family と A4V を示した American C Family の 2 家系 5 症例であった(表 1).

2. 組織化学的及び免疫組織化学的解析: ホルマリン固定, パラフィン包埋切片を用いた. 組織化学的解析には, ヘマトキシリン・エオシン染色, Kliver-Barrera 染色, Bielschowsky 染色の各ルーチン染色を施行した. 免疫組織化学的解析として, 一次抗体には human HGF 抗体, human cMet 抗体を用いた. 免疫反応産物は, avidin-biotin-immunoperoxidase complex 法を用いて 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 発色にて可視化した.

3. Western blot 解析: 発症後 2 年 6 ヶ月症例と発症後 11 年 5 ヶ月症例の SALS と正常対照の各脊髄組織を用いた.

本研究は, 鳥取大学倫理委員会にて, 第 2001-150 号の許可を受けて実施した.

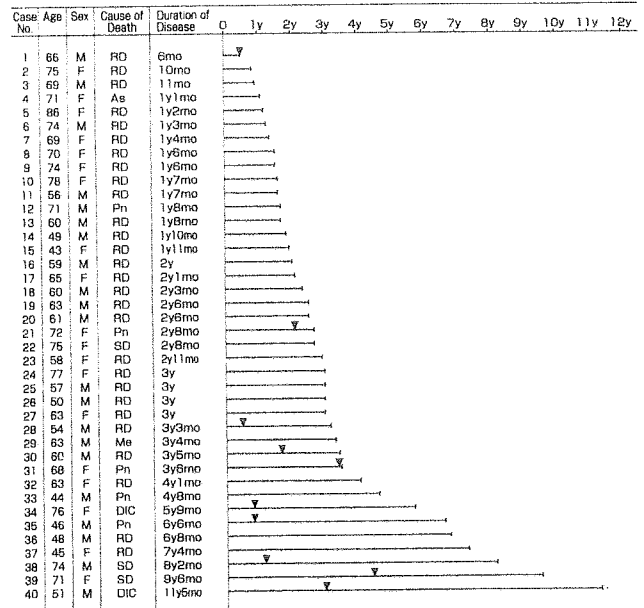


図 1. 40 症例の SALS の特徴. 矢頭は人工呼吸器装着時期を示す. (*M* male, *F* female, *RD* respiratory distress, *As* asphyxia, *Pn* pneumonia, *SD* sudden death, *Me* melena, *DIC* disseminated intravascular coagulation, *y* years, *mo* months)

表 1. 変異 SOD1 を伴う FALS の特徴

Case No.	Age	Sex	Cause of Death	FALS Duration	SOD1 Mutation	FALS Subtype	Neuronal LBHI
<u>Japanese Oki Family</u>							
1	46	F	As	18mo	2-bp deletion (126)	PCI	+
2	65	M	IH	11y	2-bp deletion (126)	PCI and degeneration of other systems	+
<u>American C Family</u>							
3	39	M	RD	7mo	A4V	PCI	+
4	46	M	Pn	8mo	A4V	PCI	+
5	66	M	Pn	1y	ND	PCI	+

*FALS* familial amyotrophic lateral sclerosis, *SOD* superoxide dismutase, *LBHI* Lewy body-like hyaline inclusion, *M* male, *F* female, *mo* months, *y* year(s), *2-bp* two-base pair, *PCI* posterior column involvement type, + detected, *ND* not determined, *As* asphyxia, *IH* intraperitoneal hemorrhage, *RD* respiratory distress, *Pn* pneumonia

### C. 研究結果

1. 病理組織学的解析：脊髄における SALS の本質的病理組織学的所見は、脊髄前角細胞の変性・脱落・消失であった。脊髄前角細胞の消失に伴って、その軸索の伝導路である脊髄前根の大径有髄線維は消失していた。脊髄残存前角細胞は萎縮し、リポフスチン充満神経細胞が目立った。SALS40 症例を詳細に病理組織学的な解析を行うと、ほぼ病期期間の長さ に比例して脊髄残存前角細胞は減少していた (図 2)。

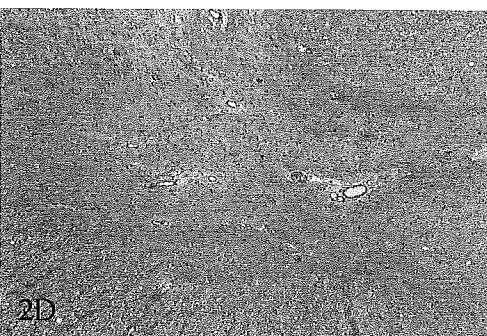
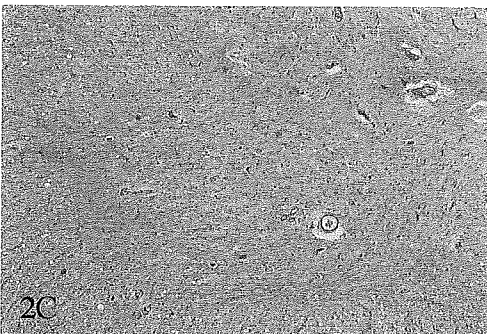
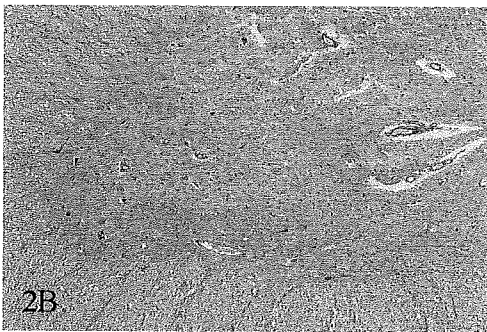
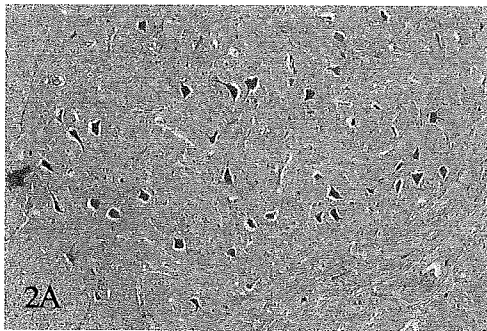
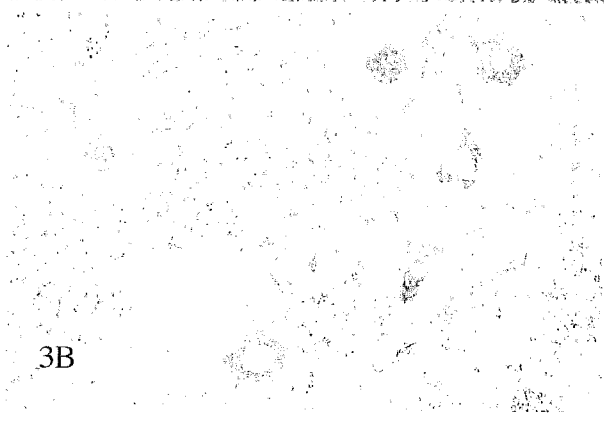
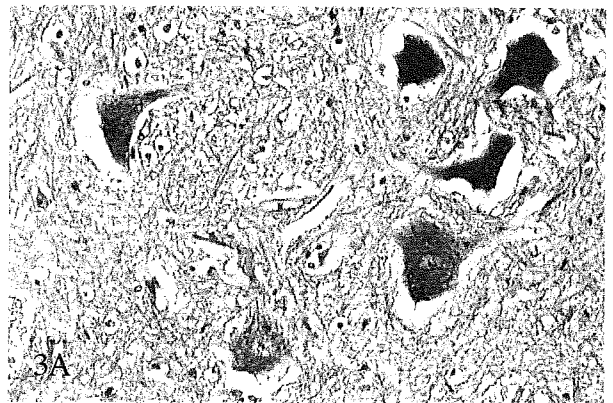


図 2. SALS の病理組織学的経過. A. 正常対照. B. 2年6ヶ月 SALS 症例. C. 4年8ヶ月 SALS 症例. D. 11年5ヶ月 SALS 症例. A-D は全て同一倍率で、左前角を示す. 正常脊髄前角に認められた多数の前角細胞は、SALS の経過と共に前角細胞は脱落・消失し、残存前角細胞は減少している. HE 染色.

反応性アストロサイトやグリオシスもまた脊髄前角細胞の脱落・消失した部位に著明に認められた. 上位運動神経細胞の伝導路である外側皮質脊髄路や前皮質脊髄路の大径有髄線維が高度に障害されていた. FALS の病理組織像は脊髄前角細胞の変性・脱落・消失に加え、脊髄 Clarke 核と後索の中間根帯も障害される後索型 FALS であった. FALS の 2 家系 5 症例全例とも変異 SOD1 の形態的 hallmark である neuronal LBHI (Lewy body-like hyaline inclusion) を認めた.

2. 免疫組織化学的解析：正常脊髄前角細胞における HGF 及び cMet の染色性は、細胞体全体がびまん性に陽性を呈し、ほとんど全ての正常脊髄前角細胞が染色された (図 3)。



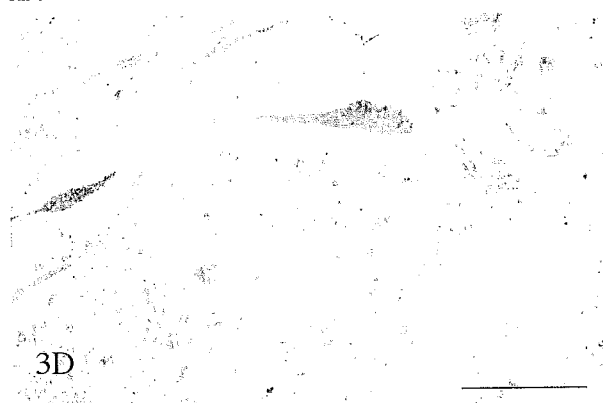
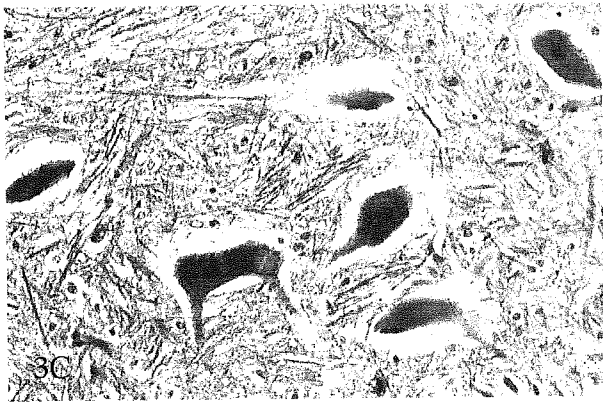


図3. 正常脊髄前角細胞における HGF 及び cMet の染色性. A, B 及び C, D はそれぞれ連続切片を示す. A, C は HE 染色. B は HGF 免疫染色. D は cMet 免疫染色. ほとんど全ての正常脊髄前角細胞が HGF と cMet に染色される. Bar=100 $\mu$ m.

SALS での残存神経細胞における HGF 及び cMet の発現は、発症後 3 年までの SALS 症例 (図 1 : 症例 1 - 症例 27) の残存神経細胞のごく一部に高度な発現が認められた. 注目すべき所見は、連続切片を用いた解析から、ほとんどの場合、HGF 強陽性神経細胞は同時に cMet 強陽性神経細胞でもあった (図 4).

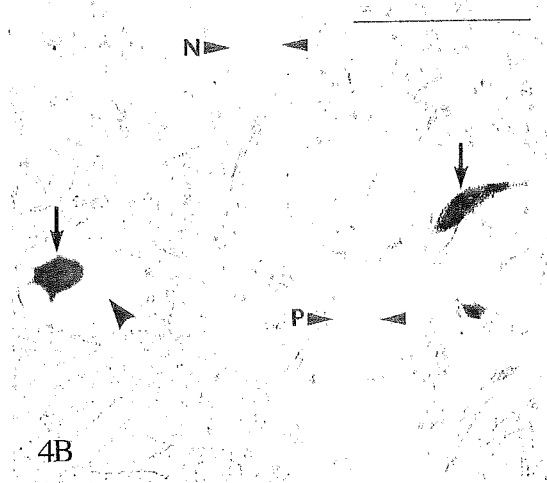
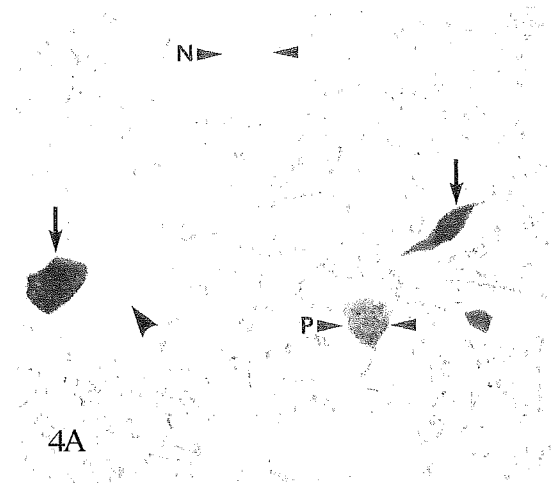


図4. 発症後 2 年 6 ヶ月 SALS 症例 (図 1 の症例 18) の HGF (A) と cMet (B) との連続切片を示す. HGF と cMet との両者強陽性を示す残存神経細胞 (矢印) を認め、HGF-cMet システムを up-regulate している免疫組織像を示している. 一方では、HGF と cMet との両者陰性を示す残存神経細胞 (左大矢頭) も認められる. Bar=100 $\mu$ m.

発症後 3 年以後の SALS (図 1 : 症例 28 - 症例 40) では、臨床経過が長くなるにつれて、HGF 及び cMet の両方を強発現している残存神経細胞の数は激減し、時に HGF, cMet 共に胞体の一部のみが陽性の残存神経細胞が観察されたり、どちらか一方のみ陽性である残存神経細胞が認められた. 発症後 3 年以後の SALS において、目立った所見は HGF-cMet システムの破綻した両者陰性の残存神経細胞数が極めて増加していた像であった. 発症後 7 年以後 11 年 5 ヶ月までの症例 (図 1 : 症例 37 - 症例 40) においては、残存神経細胞自身もわずかしか認めず、しかも萎縮を示すものがほとんどであった. ほとんどの萎縮残存神経細胞は HGF 及び cMet の両者は陰性で、HGF-cMet システムは破綻していた. しかし、萎縮残存神経細胞のごく一部には、HGF 及び cMet の両者陽性の萎縮残存神経細胞があった (図 5).

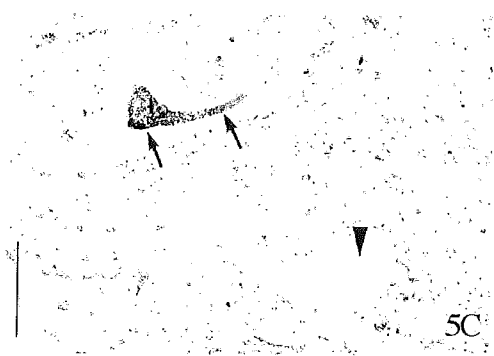
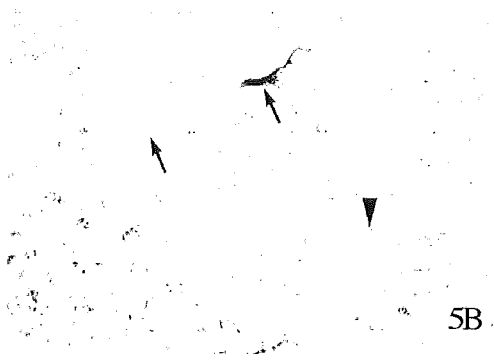
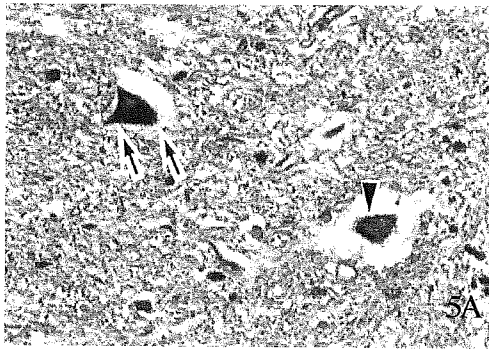


図5. 発症後1年5ヶ月 SALS 症例 (図1の症例40) の HE (A), HGF (B), cMet (C) との3連続切片を示す. HE 染色では、矢頭の神経細胞と2重矢印の神経細胞とはともに萎縮残存神経細胞としか HE 染色上は同定出来なく、両者を区別出来ない. 矢頭の残存神経細胞は HGF・cMet の両者は陰性を示し、HGF-cMet システムは破綻している. 一方、2重矢印の残存神経細胞は、HGF・cMet 両者陽性を示し、HGF-cMet システムを作用させることにより、ALS ストレスから自らを守って生存する免疫組織像ととらえることが出来る. Bar (vertical)=50 $\mu$ m.

即ち、SALS 脊髄残存前角細胞において、HGF-cMet システムの up-regulate していた脊髄残存前角細胞は、SALS 40 症例の全経過において、少数ではあるが必ず存在していた.

SALS40 症例全例において脊髄前角細胞消失とともに反応性アストロサイトの出現と gliosis

を認めた. 特に反応性アストロサイトにおける HGF-cMet システムの発現に関する結果は、HGF においては SALS 40 症例全症例において、いずれの時期においても反応性アストロサイトでの有意な発現は認められなかった. 発症後約3年から4年の SALS 症例をピークに、一部の反応性アストロサイトに cMet が高発現していた. cMet 強陽性を示す反応性アストロサイトは HGF 及び cMet の両方の発現量の減少している神経細胞の近傍に集簇する傾向を示した (図6). 反応性アストロサイト内 cMet 発現は、残存神経細胞、特に HGF 及び cMet の両方の発現量の低下している残存神経細胞への foot process に最も強く認められた (図6).

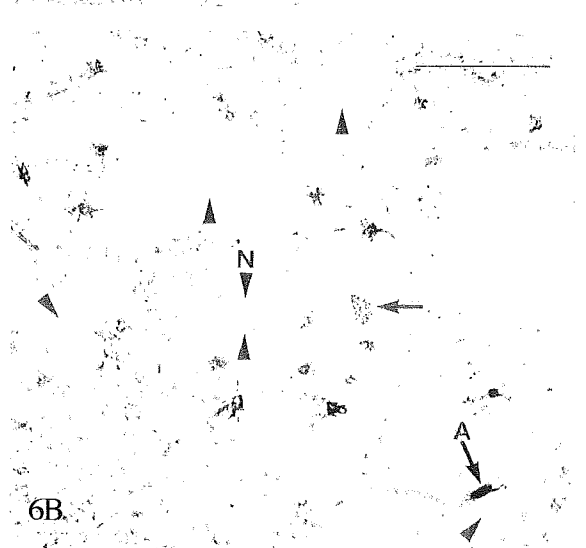
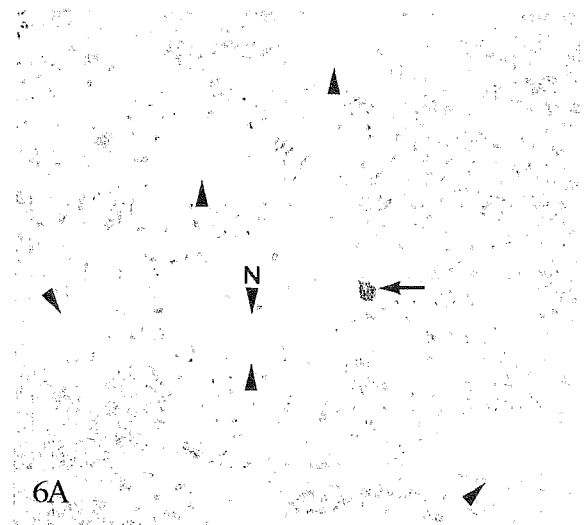


図6. 発症後4年1ヶ月 SALS 症例 (図1の症例32) の HGF (A), cMet (B) との連続切片を示す. A. 神経細胞の胞体の一部分が標本化されていて、HGF・cMet 両者

陽性を示している残存神経細胞は1個存在する（矢印）が、矢頭で示した多数の残存神経細胞は HGF・cMet 両者の発現量が減少している。cMet 陽性を示す反応性アストロサイトは HGF 及び cMet の両方の発現量の減少している残存神経細胞の近傍に集簇している。反応性アストロサイト内 cMet 発現は、特に残存神経細胞への foot process に最も強く認められた（矢印と A）。  
Bar=100 $\mu$ m.

変異 SOD1 を伴う FALS における、封入体を形成しない脊髄残存前角細胞及び反応性アストロサイトにおける HGF-cMet システムの動態は、SALS の結果と全く同一であった。LBHI 形成神経細胞における HGF-cMet システムの動態に関しては、次の2点に集約出来る。第1点は、封入体である LBHI に HGF と cMet とが internalization を生じ、封入体内に凝集してしまっている。第2点は、HGF と cMet が封入体内に凝集してしまうために、LBHI 形成神経細胞の胞体内の HGF 及び cMet の発現量が減少し、LBHI 形成神経細胞では HGF-cMet システムが破綻していた（図7）。

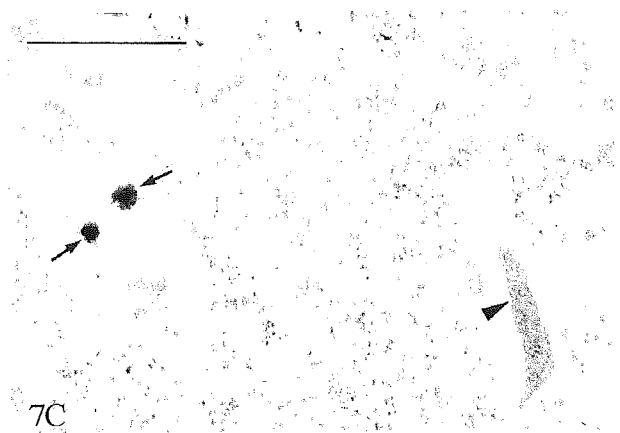
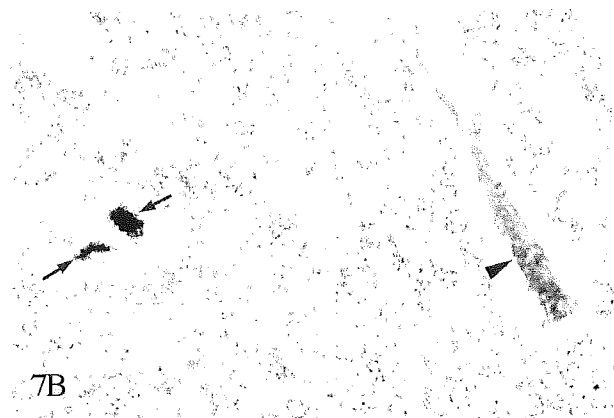
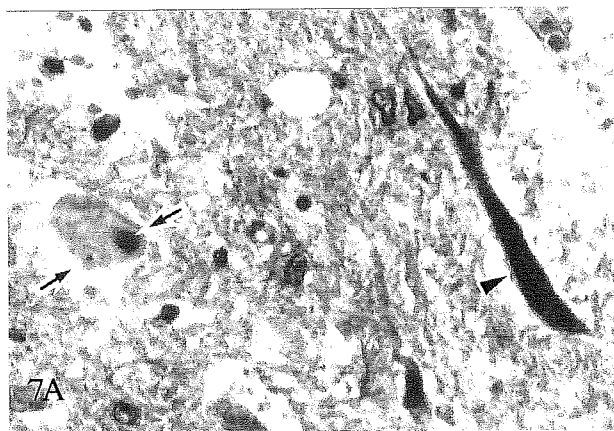


図7. 変異 SOD1 を伴う FALS (表1の症例2) の HE (A), cMet (B), HGF (C) との3連続切片を示す。封入体である LBHI (A における矢印) に HGF と cMet とが internalization を生じ、封入体内に凝集するために (B, C における矢印)、LBHI 形成神経細胞の胞体内の HGF 及び cMet の発現量が減少し、HGF-cMet システムが破綻している。矢頭の神経細胞は単なる萎縮残存神経細胞としか HE 染色上は同定出来ないが、連続切片で解析すると、HGF 及び cMet は発現していて、HGF-cMet システムを作用させることにより、変異 SOD1 ストレスから自らを守って生存する免疫組織像ととらえることが出来る。Bar=50 $\mu$ m.

3. Western blot 解析：Western blot では、HGF については、約 69 kDa の  $\alpha$  鎖と約 34 kDa の  $\beta$  鎖との2重のバンドが出現した。HGF の発現量をみてみると、発症後 2年6ヶ月の SALS 症例では、正常対照に比べ HGF の量がわずかに増加していた。発症後 11年5ヶ月の SALS 症例では、HGF の発現量は減少していたが、HGF は同定でき、ごく少数にもかかわらず HGF 陽性神経細胞が免疫組織化学的に存在していたことと一致していた。cMet では約 140 kDa の単一バンドが出現した。発現量をみてみると、cMet も HGF と同様の傾向を示した。即ち、発症後 2年6ヶ月 SALS では、正常対照に比べ cMet の量が増加し、発症後 11年5ヶ月 SALS では、cMet の発現量は減少していた（図8）。



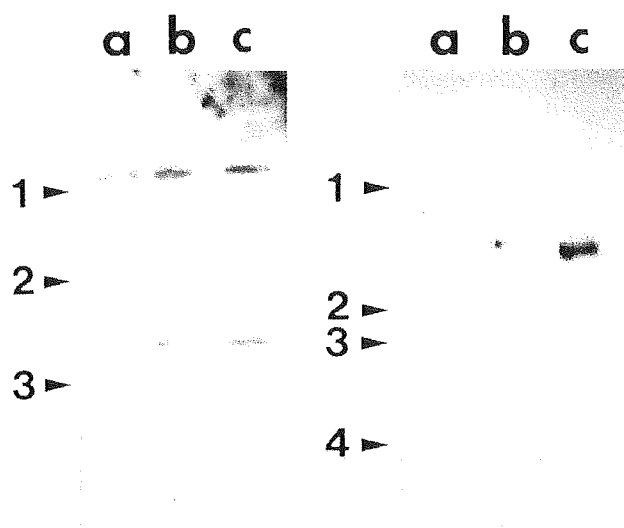


図8. HGF (左) と c-Met (右) の Western blot 解析.  
 HGF (左) については、発症後 2 年 6 ヶ月の SALS 症例 (左 c) は、正常対照 (左 b) に比べ HGF の量がわずかに増加していた。発症後 11 年 5 ヶ月の症例 (左 a) では、HGF の発現量は減少していた。cMet (右) も HGF と同様の傾向を示し、発症後 2 年 6 ヶ月 SALS (右 c) では、正常対照 (右 b) に比べ cMet の量が増加し、発症後 11 年 5 ヶ月 SALS (右 a) では、cMet の発現量は減少していた。  
 左の分子量マーカー: 1 bovine serum albumin (66 kDa); 2 ovalbumin (45 kDa); 3 carbonic anhydrase (31 kDa).  
 右の分子量マーカー: 1 myosin (200 kDa); 2  $\beta$ -galactosidase (116 kDa); 3 phosphorylase B (97.4 kDa); 4 bovine serum albumin (66 kDa).

#### D. 考察

今回の正常脊髄の解析により、ヒトの正常状態においては、脊髄前角細胞は、HGF と cMet の両方を一定のレベル発現し、自分自身による autocrine、あるいは神経細胞間の paracrine によって、正常状態を維持していることが明らかとなった。

SALS に罹患すると、脊髄前角細胞は、原因不明の ALS ストレスにより、最終的には細胞死を生ずる。しかし、本研究の解析により、原因不明の SALS ストレスに対して、脊髄前角細胞は無抵抗に細胞死を受け容れているのではないことが解明した。最も注目すべき所見は、SALS 経過中に脊髄残存前角細胞の一部は、HGF と cMet の両方を高発現し、HGF-cMet システムを up-

regulate していた所見が存在していたことである。即ち、SALS 脊髄残存前角細胞において、HGF-cMet システムの up-regulate していた脊髄残存前角細胞は、SALS 40 症例の全経過において、少数ではあるが必ず存在していた。このことは、原因不明の SALS ストレスに対して、SALS 脊髄残存前角細胞の一部は HGF-cMet システムを up-regulate することにより、自らを守って生存する機構の 1 つとしていたことが判明したのである。一方では、SALS の経過にほぼ比例して、HGF-cMet システムの破綻した HGF 及び cMet 両者陰性の SALS 脊髄残存前角細胞は多数認められた。このような HGF-cMet システムの破綻した SALS 脊髄残存前角細胞は、やがては細胞死に至るものと考えられ、SALS の経過と共に脊髄前角細胞が変性・脱落・消失する像が増加する病理組織学的結果と一致していた。

cMet の発現に関しては、残存神経細胞自身の HGF-cMet システムによる回復機構が破綻する時期から、HGF 及び cMet の発現量の少ない残存神経細胞近傍の反応性アストロサイトが cMet を高発現していた。大部分の反応性アストロサイトは、神経細胞死による空間を埋め合わせる組織再構築のためと考えられている。しかし、SALS におけるアストロサイト内 EAAT2 機能低下がアストロサイトと神経細胞との relationship の障害の一つであることを考慮した場合、アストロサイトの cMet 発現はこの ALS におけるアストロサイトの EAAT2 機能低下を含めた機能障害に対して、HGF をより多く取り込むことにより機能障害を回復したい表れであると考えられる。この cMet 陽性のアストロサイト自身の機能障害回復の免疫組織化学像は、アストロサイトと神経細胞との relationship を介する神経細胞生存のメカニズムの一つであると考えられた。

変異 SOD1 を伴う FALS における、封入体を形成しない脊髄残存前角細胞及び反応性アストロサイトにおける HGF-cMet システムの動態は、SALS のそれと全く同一であったという結果は、ALS における HGF-cMet システムの動態の普遍性を示した結果と言える。

本研究から、SALS における原因不明の ALS ス

トレスに対しても、変異 SOD1 を伴う FALS における変異 SOD1 ストレス (毒性) に対しても、脊髄残存前角細胞の一部は HGF-cMet システムを細胞死阻止・生存機構の 1 つとしていたことが解明できたのである。この解明は、HGF-cMet 生存機構に基づき、ALS の脊髄前角細胞に HGF を直接導入することにより、これらストレスに対して、脊髄前角細胞は自らを守って生存し続ける極めて高い可能性があることと本研究から結論づけられた。

## E. 結論

ALS ストレスに対して、脊髄残存前角細胞の一部は HGF-cMet システムを細胞死阻止・生存機構の 1 つとして作用させていたことを解明した。この HGF-cMet 生存機構に基づき、ALS の脊髄残存前角神経細胞に HGF を直接導入することにより、脊髄前角細胞死阻止が可能となることを結論づけられ、本研究が ALS に対する HGF を用いた挑戦的治療法確立の基盤研究の一助となった。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kato S, Kato M, Abe Y, Matsumura T, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E: Redox system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1)-mutated familial ALS, and SOD1-mutated ALS animal models. *Acta Neuropathol* 2005, 110(2): 101-112.
- 2) Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y: Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. *Neuropathology* 2005, 25(4): 365-370.
- 3) Ikeda K, Aoki M, Kawazoe Y, Sakamoto T, Hayashi Y, Ishigaki A, Nagai M, Kamii R, Kato S, Itoyama Y, Watabe K: Motoneuron degeneration

after facial nerve avulsion is exacerbated in presymptomatic transgenic rats expressing human mutant Cu/Zn superoxide dismutase. *J Neurosci Res* 2005; 82(1): 63-70.

- 4) Fukada M, Kato S, Miyoshi M, Yamaguchi K, Imoto T, Watanabe T: Systemic administration of lipopolysaccharide upregulates angiotensin II expression in rat renal tubules: immunohistochemical and ELISA studies. *Peptides* 2005, 26(11): 2215-2221.

### 2. 学会発表

- 1) 加藤信介、加藤雅子、青木正志、糸山泰人、阿部靖子、西野武士、朝山光太郎、栗屋昭、平野朝雄、大浜栄作. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における残存運動神経細胞生存機序としてのレドックス機構 upregulation の解明. 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005, 宇都宮).
- 2) 加藤信介. 脱髄疾患の病理 (含 PML): 第 46 回日本神経学会教育コース「神経病理学の基礎」第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005, 宇都宮).
- 3) 加藤信介. SOD1 遺伝子異常を伴う生体系における細胞死のメカニズム: AGE 形成に伴う凝集毒性. 第 15 回日本メイラード学会 (2005, 大阪).
- 4) 加藤雅子、加藤信介、青木正志、糸山泰人、阿部靖子、西野武士、朝山光太郎、大浜栄作. 変異 SOD1 を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症のモデル動物における肝の経時的病理組織像の検討: 肝細胞と脊髄前角細胞の比較. 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005, 宇都宮).
- 5) 加藤雅子、加藤信介、堀江 靖. 肝細胞癌における fetal glycoprotein 68 の発現の検討. 第 94 回日本病理学会総会 (2005, 横浜).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし.
2. 実用新案登録: なし.
3. その他: なし.

## ALS に対する HGF などの神経栄養因子を用いた新規治療法の開発

分担研究者 青木正志 東北大学病院神経内科

**研究要旨** 筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対する新規治療法の開発のため、これまでに ALS の動物モデルである SOD1 トランスジェニック（Tg）ラットに対するヒトリコンビナント（hr）肝細胞増殖因子（HGF）の発症前髄腔内持続投与を行い、発症遅延の効果を報告してきた。今回の研究により発症期からの rhHGF 投与によっても ALS ラットの死亡の遅延が確認され、臨床での効果が期待される。HGF の脊髄前角運動神経細胞死抑制の機序として神経細胞の caspase 活性の抑制、内因性の XIAP 保持、EAAT2 の発現増加が確認された。また、この HGF が ALS 様病態進行を抑制する重要な生理的因子であるか否かを明らかにするため、抗 HGF 抗体を用いた内因性 HGF の中和による病態悪化を確認した。

ALS ラット脊髄における未分化な神経前駆細胞の増殖は、運動ニューロン脱落が進行した発症後期から末期になりはじめて有意なものとなる。このような細胞群を早期から賦活し組織修復に役立てることを目的として、再生誘導因子の1つである HGF の髄腔内投与を試みたところ、本モデルラット脊髄の新生細胞増殖の促進が確認された。さらには再生誘導因子 EGF と FGF-2 を同時に髄腔内投与した群では発症後にもかかわらず新生細胞の増加、未分化神経前駆細胞の増殖、グリア前駆細胞の増殖が促進された。将来的に種々の再生誘導因子を組み合わせ髄腔内投与することによって新規治療法開発につながる可能性がある。

分担研究者：青木正志

東北大学病院神経内科助手

研究協力者：割田 仁<sup>1</sup>、石垣あや<sup>1</sup>、永井真貴子<sup>1</sup>、松本有史<sup>1</sup>、加藤昌昭<sup>1</sup>、船越 洋<sup>2</sup>、中村敏一<sup>2</sup>、加藤信介<sup>3</sup>、加藤雅子<sup>4</sup>、岡野栄之<sup>5</sup>、糸山泰人<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東北大学大学院医学系研究科神経内科

<sup>2</sup> 大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野

<sup>3</sup> 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、<sup>4</sup> 病院病理部

<sup>5</sup> 慶應義塾大学医学部生理学

### A. 研究目的

系統的な運動ニューロン死を特徴とする神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）は致死的にもかかわらず有効な治療法が未だなく、これほど新規治療法開発が強く希求されている疾患はない。しかし、優性遺伝性 ALS の一部における Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子変異の発見から現在まで依然として病態には不明な点が多い。これまでに私たちは ALS の新しい動物モデルとしてヒト変異 SOD1 トランスジェニックラット（Tg ラット）を確立した。従来のマウスモデルではなく、このラットモデルを用いることで髄腔内

投与や細胞移植などの実験的治療を行うことがきわめて容易となった。

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) は細胞分裂・形態形成・細胞遊走促進、細胞死抑制、そしてアポトーシス抑制といった多様な作用をもつ生体内物質である。この HGF を外来性に ALS モデル動物に供給することで運動ニューロン死を抑制し生存期間を延長できることが、(1) 変異 SOD1 遺伝子導入マウスと中枢神経系内に HGF を過剰発現する HGF 遺伝子導入マウスの交配実験で確認されている。

この HGF を用いた新規治療法の臨床応用にために、最初に私たちは、ALS の動物モデルの G93A SOD1 Tg ラットに対する発症前の 100 日齢からの hr HGF の髄腔内持続投与による腰髄運動神経細胞の脱落抑制と発症の遅延を確認した。次には hrHGF を発症期にあたる 115 日齢から G93A SOD1 Tg ラットの髄腔内に投与し、病態進行抑制効果の有無とその作用機序を検討した (研究①)。さらに研究②では、Tg ラットにおける内因性肝細胞増殖因子 (HGF) の ALS 様病態進行に対する生理的意義を明らかにするため、抗 HGF 抗体を髄腔内投与して中和すると病態が悪化するか否かを検討した。

近年までに正常成体脊髄にも神経前駆細胞が存在し潜在的神経再生能があることが報告されてきた中で、a) 細胞移植 だけではなく b) 内在性神経前駆細胞を活性化することが ALS の新規治療戦略として注目されている。神経前駆細胞の増殖、分化調節、突起伸展、生存維持に関わるさまざまな因子が報告され、損傷、脱髄モデルでは脊髄における *in vivo* での再生誘導実験が試みられているが、ALS のような変性病態における内在性神経前駆細胞の活性化の報告はまだない。

本研究③および④では、ALS の画期的治療法となりうる脊髄の再生医療開発を念頭に、

ALS ラットモデル脊髄へ代表的な再生誘導因子である HGF、上皮細胞成長因子 (EGF) および線維芽細胞成長因子 (FGF-2) を髄腔内持続投与して、内在性神経前駆細胞の活性化を試みた。

## B. 研究方法

### ①ALS ラットに対する HGF 髄腔内投与による病態進行抑制の試み

東北大学神経内科で確立・系統維持している Gly93Ala(G93A)変異 SOD1 Tg ラットと正常同腹仔ラットを用いて実験を行った。平均発症時期頃の 115 日齢から hrHGF200 $\mu$ g/匹と、対照群として PBS をそれぞれメス G93A Tg ラット 8 匹ずつに 4 週間髄腔内持続投与し、死亡するまで経過を観察した。これとは別に検体採取用に 115 日齢からメス G93A SOD1 Tg ラットに hrHGF100 $\mu$ g/匹と、対照群として PBS をそれぞれ 2 週間髄腔内持続投与後腰髄を採取し、第 5 腰髄の免疫染色と前角運動神経細胞数の計測、ウェスタンブロットを行い、採取するまでの期間 foot print と体重の計測を行った。

### ②抗 HGF 抗体の髄腔内投与

G93A 変異 SOD1 Tg ラットと正常同腹仔ラット腰髄の内因性ラット HGF レベルを酵素免疫測定法で明らかにした。その結果をもとに同 Tg ラットを対象に内因性 HGF が誘導されてくる週齢から 4 週間、皮下に留置した浸透圧ポンプよりウサギポリクローナル抗ラット HGF 特異抗体を 5  $\mu$ g/体重(g) 髄腔内に持続投与した。コントロールとしては同量の正常ウサギ IgG を投与した (各群 n=5)。ラットは注意深く連日観察し発症日 (四肢のいずれかに筋力低下が明らかとなった日)、死亡日 (筋力低下により立ち直り反射が得られなくなった日) を特定した。今回の病理学的検討には、死亡時の腰髄灌流固定凍結切片を用いた。