

PBS-exposed sections served as controls. For the preabsorption test, some sections were incubated with the anti-HGF antibody that had been preabsorbed with an excess amount of human recombinant HGF. Bound antibodies were visualized by the avidin-biotin-immunoperoxidase complex (ABC) method using the appropriate Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Dako, Glostrup, Denmark) as the chromogen.

#### Western blot analysis

This analysis was carried out on three fresh autopsy specimens from spinal cord cervical segments: two SALS cases [2.5 years after onset (case 18 in Fig. 1, age 63 years) and 11 years 5 months after onset (case 38 in Fig. 1, age 51 years)], and one normal individual (age 68 years). In brief, specimens were homogenized in Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA) containing 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 25% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.01%

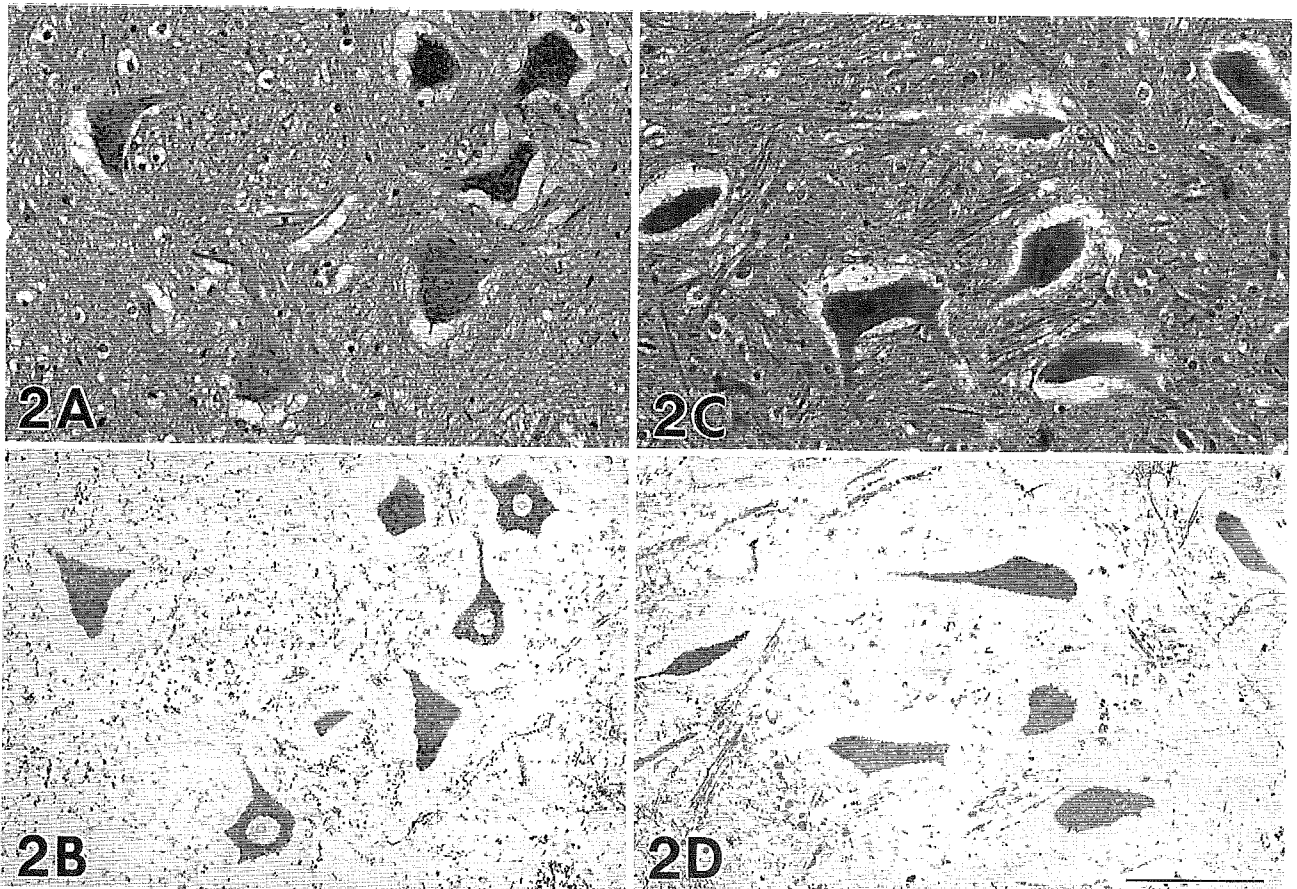
bromophenol blue, and 62.5 mM TRIS-HCl (pH 6.8). The samples were heated at 100°C for 5 min. Soluble protein extracts (20 µg) from the samples were separated on SDS-polyacrylamide gels (4%–20% gradient, Bio-Rad) and transferred by electroblotting to Immobilon PVDF (Millipore, Bedford, MA). After blocking with 5% nonfat milk for 30 min at room temperature, the blots were incubated overnight at 4°C with the antibodies against human HGF and c-Met. Binding to HGF and c-Met was visualized with the Vectastain ABC Kit and DAB. Appropriate molecular weight markers (Bio-Rad) were included in each run.

## Results

### Histopathology

An essential histopathological finding of the spinal cord in ALS was loss of motor neurons throughout the course of the disease. In the specimens we examined, neuronal loss was most easily recognized in the cervical and lumbar enlargements. The surviving motor neurons showed shrinkage, and lipofuscin granule-filled neurons stood out. Among these residual motor neurons, some that were smaller in size appeared normal. The number of motor neurons decreased with ALS disease progression. Reactive astrogliosis and gliosis were also observed in the affected areas. In the affected antero-lateral columns that were most pronounced in the crossed and uncrossed corticospinal tracts, there was a loss of large myelinated fibers in association

**Fig. 2** Detection of HGF and its receptor, c-Met, in the normal anterior horn cells of the spinal cord. **A** Light microscopic preparation of the anterior horn cells stained with H-E. **B** Immunostaining with an antibody against HGF of the section consecutive to that shown in **A**. HGF immunoreactivity is identified in almost all of the motor neurons. Cytoplasmic staining is observed. No counterstaining. **C** Normal anterior horn cells stained with H-E. **D** Immunoreactivity for c-Met of the serial section of that shown in **C**. Almost all of the normal motor neurons are immunopositive for c-Met. Diffuse staining of the cell bodies and proximal dendrites is evident. No counterstaining. (HGF hepatocyte growth factor, H-E hematoxylin and eosin). Bar A–D 100 µm



with variable degrees of astrocytic gliosis. Fiber destruction was associated with the appearance of lipid-laden macrophages.

Analysis of the essential changes in the five cases of FALS revealed a subtype of FALS with posterior column involvement (PCI). This subtype is characterized by degeneration of the middle root zones of the posterior column, Clarke nuclei, and the posterior spinocerebellar tracts, in addition to spinal cord motor neuron lesions. A patient who had survived for a long period, with a clinical course of 11 years (case 2 in Table 1), showed multi-system degeneration in addition to the features of FALS with PCI. Neuronal Lewy body-like hyaline inclusions (LBHIs) were present in all five FALS cases.

The spinal cords of normal individuals did not exhibit any distinct histopathological alterations.

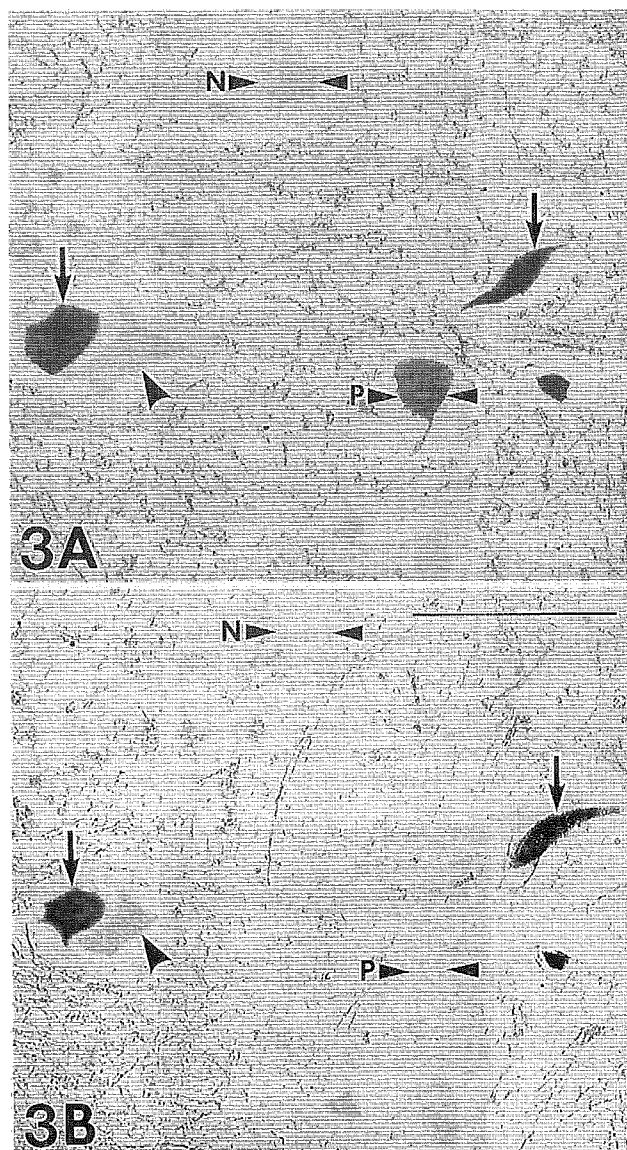
### Immunohistochemistry

When control and representative paraffin sections were incubated with PBS alone (i.e., no primary antibody), no staining was detected. In addition, incubation of sections with anti-HGF antibody that had been pretreated with an excess of recombinant human HGF produced no staining in any of the sections. HGF immunoreactivity in normal spinal cords was identified in almost all of the motor neurons: cytoplasmic staining was observed with various staining intensities (Fig. 2A, B). A similar staining pattern was also observed for c-Met, the cell bodies and proximal dendrites being stained (Fig. 2C, D). Almost all of the motor neurons in normal spinal cords co-expressed both HGF and c-Met, although the staining intensity of positively stained neurons varied. No significant immunoreactivity for HGF and c-Met was seen in astrocytes and oligodendrocytes from normal subjects.

As for the anterior horn cells in ALS patients, some residual neurons expressed both HGF and c-Met strongly within about 2 years of disease onset (cases 1–15 in Fig. 1). Both antibodies produced a cytoplasmic staining pattern. Other neurons were either faintly stained by both antibodies or unstained (*big arrowhead*). However, neither the HGF-positive neuron (*small arrowheads with P*) nor the HGF-negative neuron (*small arrowheads with N*) in the HGF section shown in A appears in the section stained for c-Met in B. No counterstaining. Bar B (also for A) 100  $\mu$ m

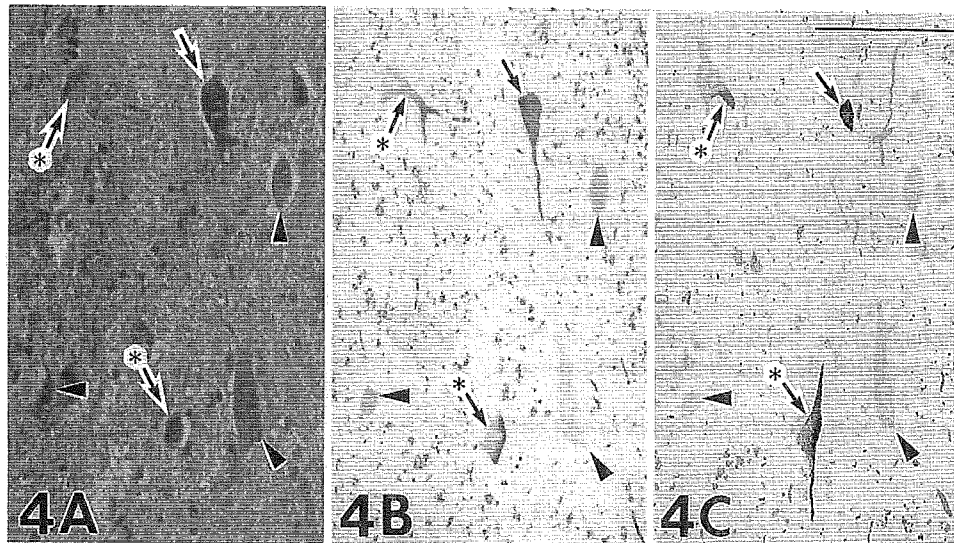
As for the anterior horn cells in ALS patients, some residual neurons expressed both HGF and c-Met strongly within about 2 years of disease onset (cases 1–15 in Fig. 1). Both antibodies produced a cytoplasmic staining pattern. Other neurons were either faintly stained by both antibodies or unstained (*big arrowhead*). However, neither the HGF-positive neuron (*small arrowheads with P*) nor the HGF-negative neuron (*small arrowheads with N*) in the HGF section shown in A appears in the section stained for c-Met in B. No counterstaining. Bar B (also for A) 100  $\mu$ m

As for the anterior horn cells in ALS patients, some residual neurons expressed both HGF and c-Met strongly within about 2 years of disease onset (cases 1–15 in Fig. 1). Both antibodies produced a cytoplasmic staining pattern. Other neurons were either faintly stained by both antibodies or unstained (*big arrowhead*). However, neither the HGF-positive neuron (*small arrowheads with P*) nor the HGF-negative neuron (*small arrowheads with N*) in the HGF section shown in A appears in the section stained for c-Met in B. No counterstaining. Bar B (also for A) 100  $\mu$ m



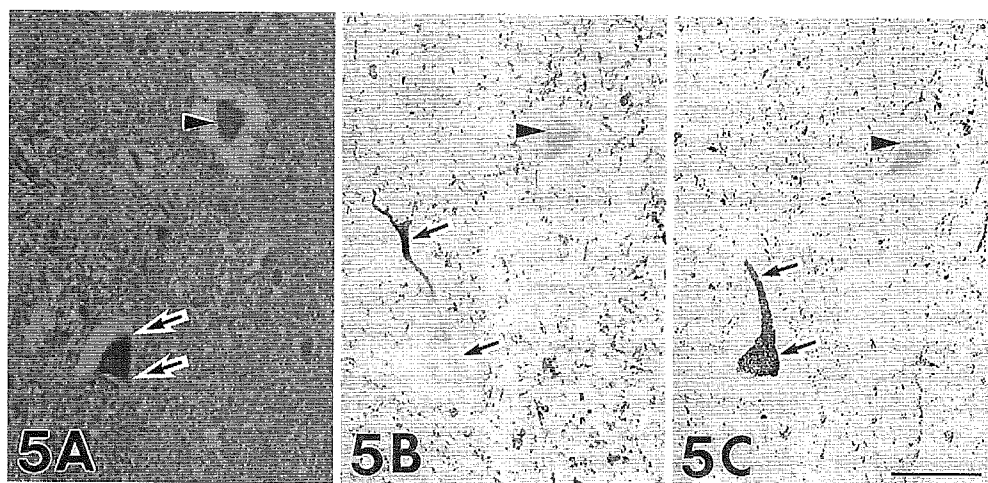
**Fig. 3** Serial sections of spinal anterior horn cells in a patient with sporadic ALS after a clinical course of 2.5 years (case 18 in Fig. 1) immunostained with antibodies against HGF (A) and c-Met (B). Residual neurons intensely expressing both HGF and c-Met are evident (*arrows*). The staining pattern is diffuse in the cytoplasm. Other neurons are either faintly stained by both antibodies, or unstained (*big arrowhead*). However, neither the HGF-positive neuron (*small arrowheads with P*) nor the HGF-negative neuron (*small arrowheads with N*) in the HGF section shown in A appears in the section stained for c-Met in B. No counterstaining. Bar B (also for A) 100  $\mu$ m

every ALS patient. Expression of HGF and c-Met by only part of the neuronal cytoplasm and/or dendrites was observed more often as ALS-associated degeneration progressed (Figs. 4, 5). Observation of only the H-E-stained sections revealed no difference between the neurons positive for HGF and c-Met and those negative for both proteins (Figs. 4, 5).



**Fig. 4** Serial sections of the anterior horn cells in a patient with sporadic ALS after a clinical course of 4 years 8 months (case 31 in Fig. 1). **A** In the H-E preparation, residual motor neurons appear to be atrophic. There is no distinction among these atrophic neurons when observed in the H-E preparation alone. **B** Immunostaining with the antibody against HGF. The number of residual neurons intensely expressing HGF (arrow) is reduced in comparison with that in the ALS patient after a clinical course of 2.5 years (Fig. 3). Only part of the neuronal cell body and dendrite expresses HGF

(arrows and asterisks). The number of HGF-negative neurons is increased (arrowheads). No counterstaining. **C** Immunostaining with the c-Met antibody. Similarly to the anti-HGF immunostaining, the number of c-Met-immunopositive neurons is diminished (arrow). In contrast, the number of c-Met-immunonegative neurons is increased (arrowheads). However, only part of the neuronal cytoplasm and dendrite is positive for c-Met (arrows and asterisks). No counterstaining. Bar C (also for A, B) 100  $\mu$ m

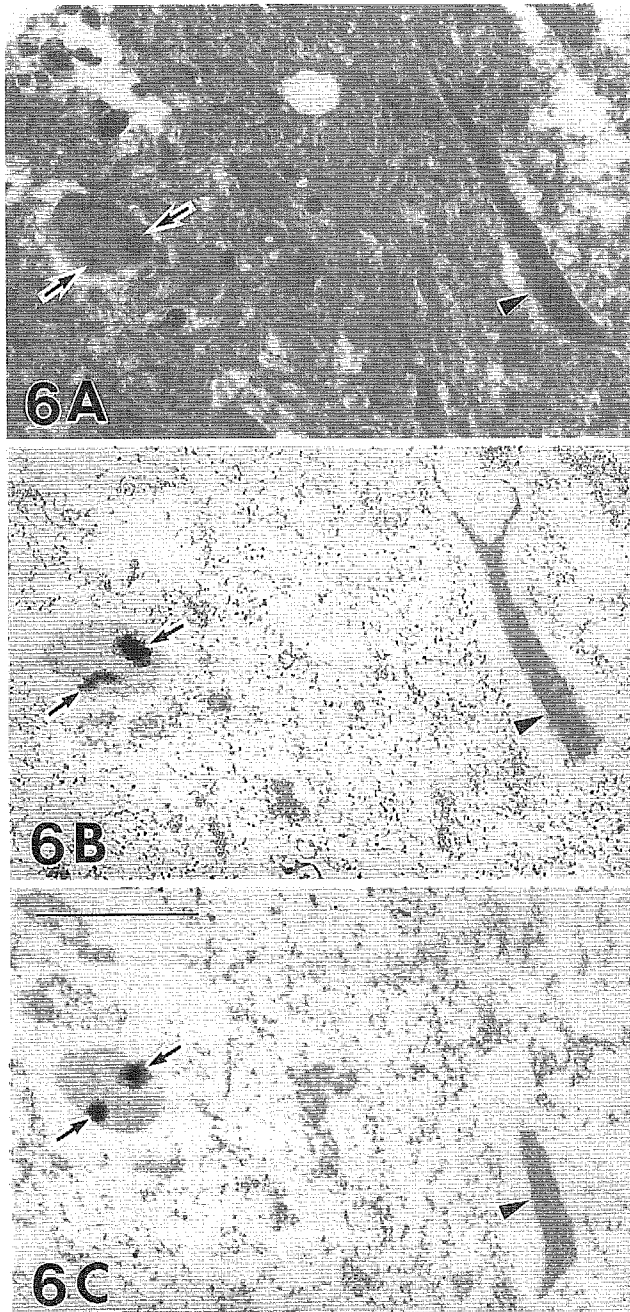


**Fig. 5** Expression of HGF and c-Met detected by immunohistochemistry in a patient with sporadic ALS after a clinical course of 11 years 5 months (case 38 in Fig. 1). **A** Light microscopic preparation stained with H-E. Small and atrophic motor neurons are seen. **B** HGF immunoreactivity of the section consecutive to that shown in A. Although the residual neuron (double arrows) appears to be atrophic in the H-E preparation, this residual neuron expresses HGF: only a dendrite is HGF-positive (double arrows). No counterstaining. **C** c-Met immunoreactivity of the section consecutive to that shown in B.

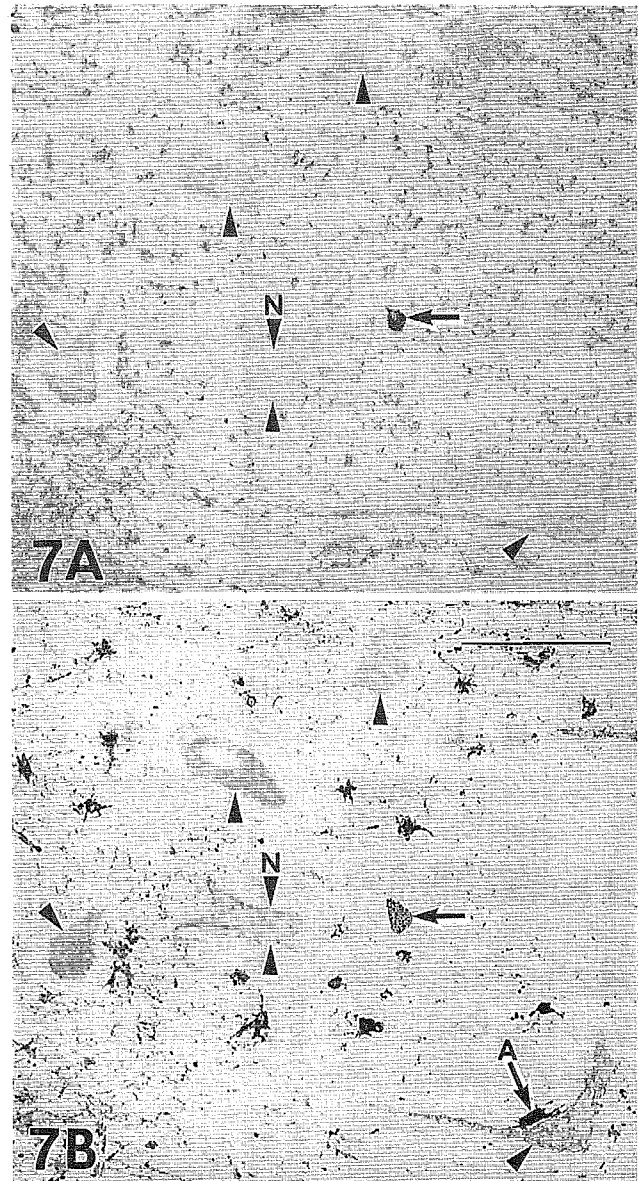
The residual neuron that appears to be atrophic in the H-E preparation is stained by the anti-c-Met antibody (double arrows). A neuron negative for both HGF and c-Met can be also observed (arrowhead). No counterstaining. Observation of the H-E-stained section in A reveals no difference between the atrophic neuron positive for HGF and c-Met (indicated by double arrows) and the atrophic neuron negative for both proteins (marked by an arrowhead). Bar C (also for A, B) 50  $\mu$ m

With respect to the LBHI-bearing neurons in the anterior horns of FALS patients with SOD1 mutations, LBHIs in the anterior horn cells showed co-aggregation of both HGF and c-Met (Fig. 6). However, the intensity of cytoplasmic HGF and c-Met staining in LBHI-bearing neu-

rons was either weak or negative. Except for the LBHI-bearing neurons, the stainability and intensity of HGF and c-Met staining in the residual neurons of SOD1-mutated FALS patients were identical to those of the SALS patients.



**Fig. 6** Serial sections of neuronal LBHIs in a familial ALS patient with an *SOD1* mutation (case 2 in Table 1). **A** In the H-E preparation, the neuronal LBHIs consist of eosinophilic cores with paler peripheral halos (arrows). An atrophic anterior horn cell without inclusions is also seen (arrowhead). **B** Immunostaining with the c-Met antibody is strongly positive for the neuronal LBHI core (arrows). However, the cytoplasmic staining intensity of the LBHI-bearing neuron is weak. By contrast, c-Met expression is evident even in the atrophic neuron (arrowhead). No counterstaining. **C** Immunostaining with the HGF antibody. The LBHIs show co-aggregation of both HGF and c-Met (arrows). Even though the cytoplasm of the shrunken neuron is positive for both HGF and c-Met (arrowhead), the cytoplasmic staining intensity of the LBHI-bearing neuron to HGF and c-Met is weak. No counterstaining. (LBHI Lewy body-like hyaline inclusion, *SOD1* superoxide dismutase 1). Bar C (also for A, B) 50  $\mu$ m



**Fig. 7** HGF and c-Met expression in reactive astrocytes in a patient with sporadic ALS after a clinical course of 4 years 1 month (case 30 in Fig. 1). **A** Although only part of the neuronal cytoplasm is HGF-positive (arrow), almost all of the neurons are either faintly stained by the anti-HGF antibody, or not at all (arrowheads). No significant HGF immunoreactivity is evident in astrocytes. No counterstaining. **B** c-Met immunoreactivity of the section consecutive to that shown in A. c-Met expression is observed in reactive astrocytes. In general, c-Met-positive reactive astrocytes are frequently present around the neurons negative for HGF and c-Met (arrowheads). An astrocyte in contact with a neuron negative for both proteins intensely expresses c-Met (arrow and A). Only part of the neuronal cytoplasm is immunopositive for HGF and c-Met (arrow). A c-Met-negative neuron (arrowheads and N) in the section stained for c-Met in B does not appear in the section stained for HGF in A. No counterstaining. Bar B (also for A) 100  $\mu$ m

Although no significant HGF immunoreactivity was found in reactive astrocytes in any of the ALS patients throughout the disease course, c-Met was expressed in these cells. These c-Met-positive reactive astrocytes were frequently seen around neurons that were negative for HGF and c-Met (Fig. 7). Reactive astrocytes in contact with neurons negative for both proteins showed intense expression of c-Met. The number of reactive astrocytes expressing c-Met tended to reach a peak around 3–4 years after ALS onset (Fig. 7), and thereafter decreased along with disease progression after patients had begun to require respiratory assistance. Oligodendrocytes showed no significant expression of HGF and c-Met.

#### Western blot analysis

When the tissue homogenate of each fresh cervical segment of the spinal cord was examined by immunoblotting for HGF, double bands at positions corresponding to approximately 34 kDa and 69 kDa were observed, i.e., those with the same mobility as human HGF (Fig. 8A). Im-

munoblotting showed that the intensity of HGF immunoreactivity in the SALS patient with a clinical course of 2.5 years (case 18 in Fig. 1) appeared to be identical to, or slightly stronger than, that in a normal subject. In the SALS patient with a clinical course of 11 years 5 months (case 38 in Fig. 1), HGF expression was less than that in the normal subject. This observation supported the results of HGF immunohistochemistry.

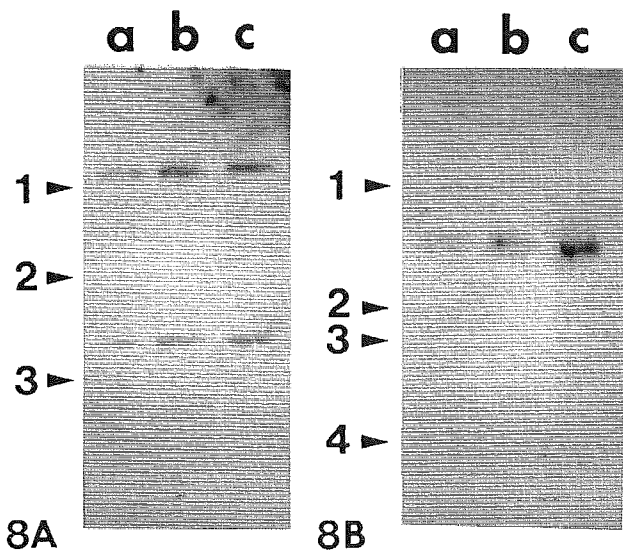
Immunoblotting for c-Met revealed a single band corresponding to about 140 kDa in two SALS cases and a normal subject (Fig. 8B). This molecular mass was compatible with that of human c-Met. In the SALS case at 2.5 years after disease onset (case 18 in Fig. 1), c-Met was expressed more strongly than in the normal subject. However, the level of c-Met expression in the SALS case at 11 years 5 months after onset (case 38 in Fig. 1) decreased below that in the normal subject. This finding reflected the c-Met immunohistochemistry results.

#### Discussion

HGF is a heterodimeric protein composed of two polypeptide chains (69 kDa  $\alpha$  chain and 34 kDa  $\beta$  chain) linked together by disulfide bonds [25]. HGF has four intrachain disulfide loops, called "kringle" domains, in its  $\alpha$  chain [25]. In vitro, HGF is one of the most potent neurotrophic factors for motor neurons [6]. The HGF antibody used in the present study recognizes both the  $\alpha$  and  $\beta$  chains. HGF acts via its receptor, c-Met, which is a transmembrane protein of 190 kDa, consisting of a 50-kDa extracellular  $\alpha$  subunit and a 140-kDa  $\beta$  subunit with a tyrosine kinase domain [29]. According to the manufacturer (Santa Cruz), the c-Met antibody recognizes only the  $\beta$  subunit. This is consistent with the results of Western blot analyses, where use of a normal tissue homogenate yielded double bands of approximately 69 kDa and 34 kDa with the anti-HGF antibody, and a single band of about 140 kDa with the anti-c-Met antibody.

Under normal physiological conditions, HGF and c-Met immunoreactivity in the human spinal cord anterior horns was primarily identified in the neurons: cytoplasmic staining with antibodies against both proteins was observed in almost all of the anterior horn cells. Considering that HGF has extremely potent neurotrophic activity and acts through c-Met, our immunohistochemical findings indicate that even under normal physiological conditions, spinal motor neurons maintain themselves via an HGF-c-Met autocrine and/or paracrine system. No significant HGF and c-Met immunoreactions were seen in astrocytes and oligodendrocytes. Even if the astrocytes and oligodendrocytes produced only infinitesimal traces of HGF and c-Met, the protein production levels were below the limits of immunohistochemical detection.

A very striking feature was the presence of certain residual motoneurons intensely co-expressing both HGF and c-Met throughout the disease course of ALS. This suggests that the HGF-c-Met system may represent an endogenous survival mechanism that is activated by ALS



**Fig. 8** Western blot analyses using the antibodies against HGF (A) and c-Met (B). A 20- $\mu$ g amount of the soluble protein extract from each sample has been applied to each lane. **A** Molecular mass markers: 1 bovine serum albumin (66 kDa); 2 ovalbumin (45 kDa); 3 carbonic anhydrase (31 kDa). *Lane a* A sporadic ALS patient with a clinical course of 11 years 5 months (case 38 in Fig. 1), *lane b*: normal control, *lane c*: a sporadic ALS patient with a clinical course of 2.5 years (case 18 in Fig. 1). Double bands with molecular masses of approximately 69 kDa and 34 kDa are observed in all samples. The intensity of HGF immunoreactivity in *lane c* (ALS case 18) appears to be identical to, or slightly stronger than, that in *lane b* (normal). In contrast, HGF expression in *lane a* (ALS case 38) appears to be lower than that in *lane b* (normal). **B** Molecular mass markers: 1 myosin (200 kDa); 2  $\beta$ -galactosidase (116 kDa); 3 phosphorylase B (97.4 kDa); 4 bovine serum albumin (66 kDa). A single band corresponding to about 140 kDa is detected in each sample. Expression of c-Met in *lane c* (case 18) is stronger than in *lane b* (normal). However, the level of c-Met expression in *lane a* (case 38) is decreased below that seen in *lane b* (normal)

stress. Although some neurons co-expressed HGF-c-Met, while many were negative for both proteins among the residual motoneurons affected by ALS, there was no apparent difference among these residual ALS neurons when observed in H-E preparations alone. Those residual neurons showing high co-expression of HGF and c-Met would be less susceptible to ALS stress and protect themselves from ALS neuronal death. In addition, the residual neurons that are immunopositive for HGF and c-Met might maintain their viability via an autocrine and/or paracrine mechanism involving the HGF-c-Met system. This hypothesis is supported by the fact that HGF is one of the most potent survival-promoting factors for motor neurons, being comparable to GDNF *in vitro* [6]. Because of the neurite outgrowth-promoting property of HGF *in vitro* [7, 10, 22], residual neurons that are immunoreactive for HGF and c-Met might show enhanced neurite outgrowth to other neurons and regenerate the neuronal network to compensate for any functional deficiency and neuron loss. In other words, those motor neurons showing up-regulation of the HGF-c-Met cell-survival system, which is normally present in neurons, might show enhanced cell survival in the presence of ALS stress. In contrast, breakdown of the HGF-c-Met system in ALS motor neurons that are barely viable would result in cell death, and many residual neurons that are unable to express HGF and c-Met would be ultimately moribund. It remains to be determined whether this HGF-c-Met up-regulation is a direct or an indirect effect based on the pathogenesis of ALS itself, or whether HGF and c-Met play a primary or a secondary role in attenuating ALS-related neuronal death.

Focusing on FALS with SOD1 mutations, the SOD1 protein (probably the mutant form) aggregates in the anterior horn cells as neuronal LBHIs [14, 15, 33]. It is of great interest that these LBHIs corresponded to structures immunostained by both antibodies against HGF and c-Met. The cytoplasm of these LBHI-bearing neurons was only weakly immunopositive, or even immunonegative, for HGF and c-Met. Such sequestration into LBHIs has also been observed for normal constitutive proteins such as tubulin and tau protein [15, 16, 17], and this resulted in partial impairment of the maintenance of cell metabolism [15, 16, 17]. Although we cannot readily compare the sequestration of normal constitutive proteins with internalization of a cell-survival ligand-receptor system like HGF and c-Met, these findings lead us to speculate that internalization of HGF and c-Met into LBHIs in FALS patients may partly contribute to the breakdown of HGF autocrine and/or paracrine trophic support in these neurons and may be one of the endogenous mechanisms that accelerate neuronal death. This hypothesis would appear to be compatible with the aggregation toxicity theory.

Reactive astrocytosis and gliosis were observed in the anterior horns of patients with SALS and FALS. Based on observations of H-E preparations alone, these findings suggest that the reactive astrocytes merely fill the spaces created by neuronal loss. It is noteworthy that these reactive astrocytes in both types of ALS expressed c-Met. Thus, it appears that c-Met induction in reactive astrocytes is a

common feature in ALS patients. It should be noted that astrocytes, in contact to neurons that were immunonegative for both proteins, intensely expressed c-Met. This may reflect c-Met regulation in astrocytes through an astrocyte-neuron relationship. Astrocytes play important roles in sustaining environments within the central nervous system, including neuronal maintenance [20, 32, 34, 37, 39]. Neuronal vulnerability to oxidative stress or toxicity is greater in neurons cultured alone than in neurons co-cultured with astrocytes [4, 5]. It has been shown that the activity of the glial-specific glutamate transporter (EAAT2/GLT1) in spinal cord astrocytes is selectively diminished in human SALS [30, 31] as well as in the SOD1-mutated ALS model transgenic animals of G85R [2], A4V [38], I113T [38], and G93A [1, 13]. Therefore, it can be postulated that HGF might protect c-Met-positive reactive astrocytes from down-regulation of the glial-specific glutamate transporter (EAAT2) via the HGF-c-Met system, and increase glutamate clearance, thereby leading to a reduction in glutamatergic neurotoxicity and resulting in promotion of neuronal survival [35]. However, 3–4 years after ALS onset, the number of c-Met-positive reactive astrocytes decreased along with disease progression. These findings suggest that breakdown of the HGF-c-Met system is involved in the impairment of both astrocytic function itself and astrocyte-neuron relationship at the terminal stage of ALS. It remains to be determined whether this consideration applies to a degenerative condition such as ALS, in which affected astrocytes do not have a normal control mechanism. Taken together with the fact that overexpression of HGF has been reported to attenuate motor neuron death and prolong the life-span of FALS transgenic mouse model [35], our data in this report may lead to the development of a new HGF-based therapy for ALS, which for over 130 years has had an unknown etiology.

**Acknowledgements** This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (c) (2) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology for Japan (S.K.: 13680821) and by a Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare (S.K. and H.F.).

## References

1. Bendotti C, Tortarolo M, Suchak SK, Calvaresi N, Carvelli L, Bastone A, Rizzi M, Rattray M, Mennini T (2001) Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J Neurochem* 79:737–746
2. Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327–338
3. Charcot JM, Joffroy A (1869) Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antéro-latéraux de la moelle épinière. *Arch Physiol (Paris)* 2: 744–760
4. Dawson VL, Brahmabhatt HP, Mong JA, Dawson TM (1994) Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glia cortical cultures. *Neuropharmacology* 33:1425–1430

5. Desagher S, Glowinski J, Premont J (1996) Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 16:2553–2562
6. Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG Jr, Bladt F, Birchmeier C, Barres BA, Tessier-Lavigne M (1996) Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* 17:1157–1172
7. Funakoshi H, Nakamura T (2001) Identification of HGF-like protein as a novel neurotrophic factor for avian dorsal root ganglion sensory neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 283:606–612
8. Funakoshi H, Nakamura T (2003) Hepatocyte growth factor (HGF): from diagnosis to clinical applications. *Clin Chim Acta* 327:1–23
9. Giordano S, Di Renzo MF, Narsimhan RP, Cooper CS, Rosa C, Comoglio PM (1989) Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene* 4:1383–1388
10. Hamanoue M, Takemoto N, Matsumoto K, Nakamura T, Nakajima K, Kohsaka S (1996) Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on central nervous system neurons in vitro. *J Neurosci Res* 43:554–564
11. Hirano A (1996) Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology* 47:S63–S66
12. Honda S, Kagoshima M, Wanaka A, Tohyama M, Matsumoto K, Nakamura T (1995) Localization and functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain: implication as neurotrophic factor. *Brain Res Mol Brain Res* 32:197–210
13. Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD (2002) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1604–1609
14. Kato S, Shimoda M, Watanabe Y, Nakashima K, Takahashi K, Ohama E (1996) Familial amyotrophic lateral sclerosis with a two base pair deletion in superoxide dismutase 1 gene: multi-system degeneration with intracytoplasmic hyaline inclusions in astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:1089–1101
15. Kato S, Hayashi H, Nakashima K, Nanba E, Kato M, Hirano A, Nakano I, Asayama K, Ohama E (1997) Pathological characterization of astrocytic hyaline inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 151:611–620
16. Kato S, Takikawa M, Nakashima K, Hirano A, Cleveland DW, Kusaka H, Shibata N, Kato M, Nakano I, Ohama E (2000) New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 (SOD1) gene mutations: inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes. *ALS Other Motor Neuron Disord* 1:163–184
17. Kato S, Nakashima K, Horiuchi S, Nagai R, Cleveland DW, Liu J, Hirano A, Takikawa M, Kato M, Nakano I, Sakoda S, Asayama K, Ohama E (2001) Formation of advanced glycation end-product-modified superoxide dismutase-1 (SOD1) is one of the mechanisms responsible for inclusions common to familial amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 gene mutation, and transgenic mice expressing human SOD1 gene mutation. *Neuropathology* 21:67–81
18. Kato T, Hirano A, Kurland LT (1987) Asymmetric involvement of the spinal cord involving both large and small anterior horn cells in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol* 6:67–70
19. Kurland LT, Mulder DW (1955) Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. II. Familial aggregations indicative of dominant inheritance. *Neurology* 5:249–268
20. LoPachin RM Jr, Aschner M (1993) Glial-neuronal interactions: relevance to neurotoxic mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 118:141–158
21. Maina F, Klein R (1999) Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat Neurosci* 2:213–217
22. Maina F, Hilton MC, Andres R, Wyatt S, Klein R, Davies AM (1998) Multiple roles for hepatocyte growth factor in sympathetic neuron development. *Neuron* 20:835–846
23. Matsumoto K, Nakamura T (1997) HGF: its organotrophic role and therapeutic potential. *Ciba Found Symp* 212:198–211; discussion 211–214
24. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A (1984) Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122:1450–1459
25. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S, Kazama T, Isemura M, Sato Y (1989) Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. Immunohistochemical localization of heparan sulfate-containing proteoglycan in normal human skin with monoclonal antibodies: comparison with that of fibronectin. *Nature* 342:440–443
26. Nakano I, Hirano A, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G (1984) Familial amyotrophic lateral sclerosis. Neuropathology of two brothers in American “C” family. *Neurol Med (Tokyo)* 20:458–471
27. Novak KD, Prevette D, Wang S, Gould TW, Oppenheim RW (2000) Hepatocyte growth factor/scatter factor is a neurotrophic survival factor for lumbar but not for other somatic motoneurons in the chick embryo. *J Neurosci* 20:326–337
28. Okura Y, Arimoto H, Tanuma N, Matsumoto K, Nakamura T, Yamashita T, Miyazawa T, Matsumoto Y (1999) Analysis of neurotrophic effects of hepatocyte growth factor in the adult hypoglossal nerve axotomy model. *Eur J Neurosci* 11:4139–4144
29. Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G (1987) Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6379–6383
30. Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326:1464–1468
31. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73–84
32. Schmitt A, Asan E, Puschel B, Jons T, Kugler P (1996) Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 71:989–1004
33. Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Siddique T, Deng HX, Hung WY, Kato T, Asayama K (1996) Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:481–490
34. Silani V, Ciammola A, Pizzuti A, Cardin V, Scarlato G (1999) Motor neurone metabolism. *J Neurol Sci* 169:161–169
35. Sun W, Funakoshi H, Nakamura T (2002) Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci* 22:6537–6548
36. Takahashi K, Nakamura H, Okada E (1972) Hereditary amyotrophic lateral sclerosis. Histochemical and electron microscopic study of hyaline inclusions in motor neurons. *Arch Neurol* 27:292–299
37. Tower DB (1992) A century of neuronal and neuroglial interactions, and their pathological implications: an overview. *Prog Brain Res* 94:3–17
38. Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH Jr, Hediger MA (1999) SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* 2:427–433
39. Van Bockstaele EJ, Colago EE (1996) Selective distribution of the NMDA-R1 glutamate receptor in astrocytes and presynaptic axon terminals in the nucleus locus coeruleus of the rat brain: an immunoelectron microscopic study. *J Comp Neurol* 369:483–496
40. Yamamoto Y, Livet J, Pollock RA, Garces A, Arce V, de Lapeyriere O, Henderson CE (1997) Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons. *Development* 124:2903–2913

## 治療戦略に有用な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の 動物モデルの開発\*

青木 正志\*\*      糸山 泰人\*\*

**Key Words** : amyotrophic lateral sclerosis, Cu/Zn superoxide dismutase, mutation, transgenic mice, transgenic rat

### はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は上位および下位運動ニューロンを選択的かつ系統的に障害し、呼吸筋を含む全身の筋萎縮をきたす進行性疾患である。加えて現在までに有効な治療薬や治療法がほとんどないため、ALSは神経疾患のなかで最も過酷な疾患とされ、早期に病因の解明と有効な治療法の確立が求められている。遺伝学的解析法の進歩により、1993年に家族性ALSにおいてその一部の原因遺伝子がCu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) であることが明らかになり<sup>1-3)</sup>、さらにはこのCu/Zn SOD遺伝子の突然変異をマウスに導入することにより、ヒトALSの病態を非常によく再現することに成功した<sup>4-6)</sup>。ALSに対する治療法の開発には、①臨床型および病理像を忠実に再現した動物モデルの作製とその病態機序の解明、および、②その動物モデルに対する治療法の開発の二つのステップが重要である。本稿では前半の①にあたる現在最も汎用されているトランスジェニック (Tg) マウス、および最近はじめに確立したTgラットによるALSモデル動物の開発を中心に述べる。

### I. 変異Cu/Zn SOD遺伝子導入によるALSマウスモデル

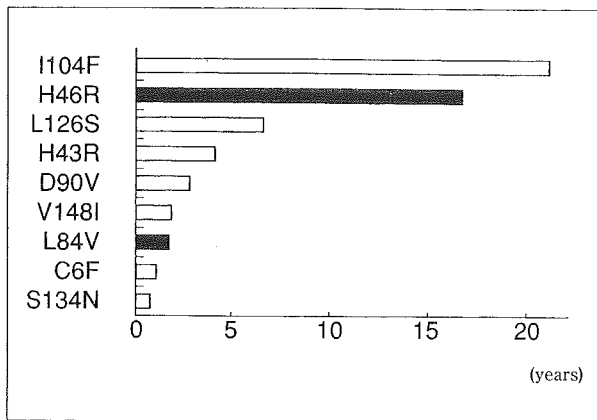
#### 1. 変異Cu/Zn SODを導入したトランスジェニック (Tg) マウスによるALSモデル

Cu/Zn SOD遺伝子変異による家族性ALSの発症メカニズムはまだ十分には解明されていないが、変異によるSOD活性の低下が直接の原因ではなく、変異Cu/Zn SODが新たに獲得した“gain of toxic function”によるものと考えられている<sup>7)</sup>。その最大の根拠は変異Cu/Zn SODを導入したTgマウスが、ヒトALSにきわめてよく似た表現型と病理所見を示す一方で<sup>4-6)</sup>、Cu/Zn SOD遺伝子をノックアウトしてもALS症状は示さないことである<sup>8)</sup>。これまでに数種類のヒト変異Cu/Zn SOD遺伝子を導入したマウスが報告されて<sup>4-6)</sup>、その一部は米国Jacksonラボラトリーにより世界中に供給されている。わが国においても新潟大学の中野・菊川らがヒトALS患者の病理像が明らかとなっているI113T変異<sup>9)</sup>を導入したTgマウスの作製に成功している。このマウスは変異蛋白の発現量が生理的なレベルに近く、しかも後肢の脱力という表現型が現れる時期が12カ

\* Development of New Transgenic Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis.

\*\* 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 Masashi AOKI and Yasuto ITOYAMA : Department of Neurology, Tohoku University School of Medicine



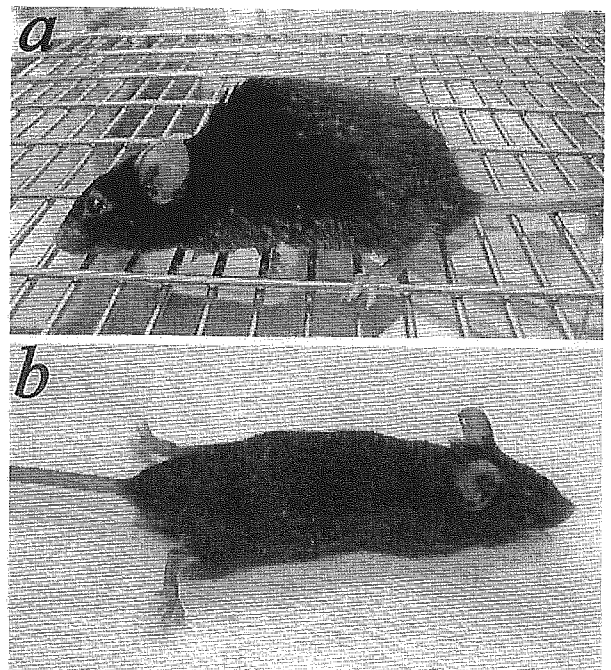


**Fig. 1** Relationship between the duration of the disease and the mutations in the Cu/Zn SOD gene that have been reported from the Department of Neurology, Tohoku University School of Medicine. The mutations that we have introduced to Tg mice are indicated by the solid bars.

月と中年期以降の発症でかつ症状の進行も緩徐であるため、神経細胞の障害機構の解析や治療薬の薬効の評価に有用と考えられる。Cu/Zn SOD 遺伝子変異に伴う家族性ALSおよび既存の変異Cu/Zn SOD 遺伝子導入Tgマウスにおける病理像については加藤らの総説を参照されたい<sup>10)</sup>。

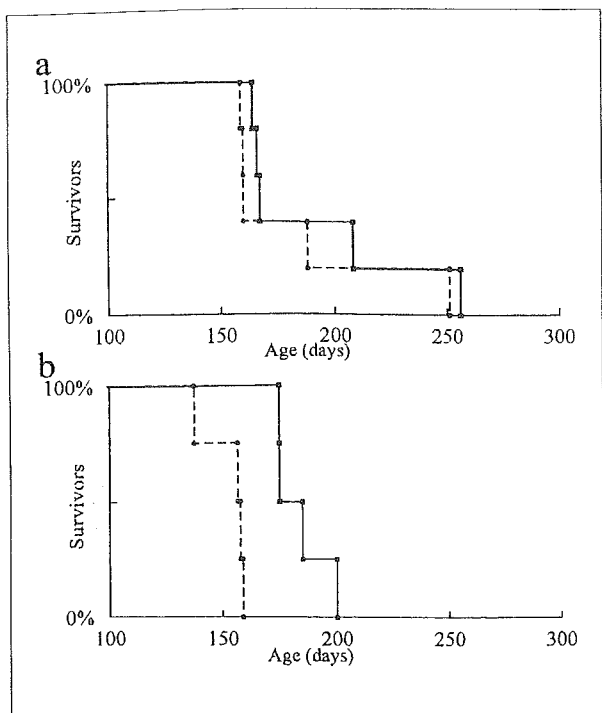
## 2. 新しいTgマウスモデルの作製による臨床型の再現

東北大学神経内科ではこれまでに、日本人13家系の家族性ALSにおいて10種類のCu/Zn SOD 遺伝子変異を報告してきた。これまでの臨床型の検討により、各点突然変異によりおよその罹病期間が決まっており、例えばH46R変異を伴う家系の患者は例外なく平均 $16.8 \pm 6.8$ 年にわたるきわめて緩徐な進行を示した<sup>11)</sup>。すなわち同じ遺伝子に変異をもちながら臨床型に大きな違いがみられている (Fig. 1)<sup>12~14)</sup>。そこでわれわれは各点突然変異による臨床型の違い、特に臨床経過の速さを決定する要因を検討するために、臨床経過が非常に緩徐なH46R変異および経過が急速なL84V変異<sup>15)</sup> (Fig. 1)を導入したマウスを同一の遺伝的背景で作製することを開始した。このためにまずヒトゲノムライブラリーからプロモーター領域を含むヒトCu/Zn SOD 遺伝子全長を単離し、site-directed mutagenesis法を用いて点突然変異 (H46RおよびL84V) を導入しTgマウス



**Fig. 2** a, An affected mouse from the L84V-*l51* line mutant developed weakness in the forelimbs. b, An affected mouse from the H46R-*h70* line developed weakness in the hind limbs. The mice in H46R-*h70* line always develop weakness in their hindlimbs.

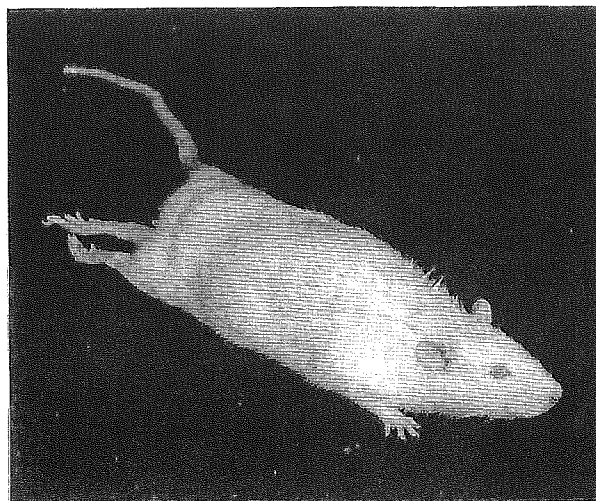
の作製を行った。これまでにH46R変異を導入したTgマウスは2系統得られ、このうち導入した変異Cu/Zn SOD蛋白が多く発現したマウス (*h70* 系統) は、生後約150日目に後肢の脱力で発症し、四肢麻痺へと進行して約30日の経過で死亡した。脊髄における総蛋白量あたりのCu/Zn SOD活性は低下していた。病理所見は、脊髄前角の運動ニューロンの変性・消失がみられ、ALS患者に認められるLewy body-like hyaline inclusionに類似した封入体が認められている<sup>16)</sup>。一方、L84V変異を導入したTgマウスは数系統得られ、このうち3系統に発症がみられている。ここで興味深いことにはH46R変異を導入したマウスはすべて後肢からの発症であるのに対して、L84V変異を導入したマウスは一部ではあるが前肢からの発症が認められた (Fig. 2)<sup>17)</sup>。このことはヒト家族性ALSにおいてH46R変異を伴う家系は全て下肢から発症が認められるのに対して、L84V変異を伴う家系では上肢から発症が認められることをよく再現している。さらには全生存期間が約180日とほぼ同等の系統 (*l51*と*h70*



**Fig. 3** a, Kaplan-Meier survival curves illustrating the age of onset (mean 184 d) and death (mean 189 d) for the L84V-I51 line. b, Kaplan-Meier survival curves illustrating the age of onset (mean 153 d) and death (mean 184 d) for the H46R-h70 line. The dashed lines with black dots designate the onset curves (percentage without weakness), whereas the solid lines with black square data points designate the survival curves (percentage surviving).

系統)でH46R変異とL84V変異を比較すると、発症から死亡までの経過はL84V変異(I51)が13.8日とH46R変異(h70)の25.7日と比較して急速であった(**Fig. 3**)。このことは各点突然変異によるヒトALSの罹病期間の違いもよく再現している<sup>17)</sup>。

また今回作製したTgマウスはH46R, L84V両変異ともにSOD活性を上昇させず、組織学的にも空胞変性が少なかった。このことは従来のマウスに比較してこれらのマウスはよりヒトの病態に近いモデルであると考えられる<sup>17)</sup>。今後はこれらのマウスを用いて、臨床型の違いを決定する因子を探索が可能であると同時に、治療法の開発の促進が期待される。



**Fig. 4** An affected transgenic rat from H46R-4 demonstrates hindlimb weakness and abnormal posturing with segmental spasticity of the tail.

## II. トランスジェニック (Tg) ラットによる新しいALSモデル

前述のように、ALSのモデル動物としては従来マウスが用いられてきたが、特に病態の首座である脊髄の解析には、その個体の大きさによる研究上のさまざまな制約があった。さらには脊髄の運動ニューロンに対して効率よく、しかも副作用を回避できる薬物の投与ルートとして髄腔内投与が注目されており、実際に米国ではALS患者への持続注入ポンプを用いた神経栄養因子の髄腔内投与が試みられている(日本でも岡山大学神経内科で治験が始まっている)。そこで東北大学の永井らは動物モデルにおける脊髄や脊髄腔に対する治療的なアプローチを可能とするために、世界にさきがけて変異Cu/Zn SOD導入TgラットによるALSモデルの作製に成功した(**Fig. 4**)<sup>18)</sup>。

マウスと同様に臨床経過が非常に緩徐なH46R変異および経過が一般的でTgマウスが世界的に供給されているG93A変異<sup>4)</sup>をもつCu/Zn SOD遺伝子をSDラット受精卵にマイクロインジェクションし、生まれたラットの尾からDNAを抽出し、遺伝子の導入を確認した。H46R変異を導入したTgラットは5系統、G93A変異を導入したTgラットは7系統得られた。導入したヒト変異Cu/Zn SOD蛋白の発現量は、H46R-4系統で最

**Table 1** Lines of transgenic rats expressing human Cu/Zn SOD with H46R or G93A mutations<sup>18)</sup>

	Relative Cu, Zn SOD protein level (human/rat)	Age of onset (days)	Duration (days)
H46R-4	6.0	144.7 ± 6.4	24.2 ± 2.9
H46R-13	3.0	-	-
G93A-39	2.5	118.6 ± 14.1	8.3 ± 0.7
G93A-24	0.8	-	-

も多く、内因性のラット Cu/Zn SOD との比をとると約6倍であった (Table 1)。

H46R変異およびG93A変異をもつTgラットともに導入された変異ヒト Cu/Zn SOD 蛋白が多く発現した系統 (H46R-4およびG93A-39) において運動ニューロン病の症状の発現が認められている (Table 1)。発症は、二つの変異を導入したTgラットとも後肢の筋力低下で始まり、対麻痺、四肢麻痺へと進行し死に至った (Fig. 4)。H46R-4は144.7日で発症し、24.2日の経過で死亡した。G93A-39は118.6日で発症し、8.3日の経過で死亡した。変異 Cu/Zn SOD 蛋白の発現量はG93A-39の方がH46R-4に比較して少ないにもかかわらず、G93A-39はより早期に発症し、かつ非常に急速な進行を示している (Table 1)。これは前述のTgマウスと同様にラットにおいても導入した変異がG93A変異の家系は速い経過を示し、H46R変異が緩徐な経過を取ることをよく再現していた<sup>18)</sup>。

今回作製されたTgラットでは従来のマウスに比較して約20倍の大きさをもつために、脳脊髄液 (髄液) の採取および解析ならびに薬剤や遺伝子治療用のベクターの髄腔内投与がきわめて容易である。将来的な遺伝子治療を含めた新しい治療法開発のために非常に有用なモデルとなることが期待される。実際われわれはこの新しいTgラットに対し、ポンプを利用して脳由来神経栄養因子 BDNF やわが国で開発された新規の栄養因子である肝細胞増殖因子 HGF などの神経栄養因子の髄腔内投与を持続的に行いその治療効果を判定している。将来的には神経幹細胞の髄腔内投与や脊髄への移植も可能であり、今後の研究の発展に役立つことが期待される。

#### おわりに

1993年のALSにおけるCu/Zn SOD遺伝子変異の発見は家族性のALSとはいえきわめて意義が大きい。この遺伝子異常を導入したモデル動物の作製が進んでいるが、SODの異常によりなぜ選択的に運動ニューロンが障害を受けるのかの病態機序は依然として不明であり、これからの課題である。ALSの病態の解明あるいは新しい治療法の開発のためにはモデル動物の利用およびその解析は必須と思われる。また、2001年には東海大学の秦野・池田らにより新規ALS原因遺伝子ALS2の同定が行われ、このALS2遺伝子は Guanine nucleotide exchange factor をコードすることが推定されている<sup>19)</sup>。さらにはDNAマイクロアレイなどを利用した発現遺伝子プロファイリング解析に基づくALS病態関連遺伝子の同定の試みも進行しつつあり<sup>20)</sup>、新たな知見に基づく遺伝子改変動物の作製も必要と考えられる。

#### 文 献

- 1) Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y et al : Mild ALS in Japan associated with novel SOD mutation [published erratum appears in Nature Genet. 6 : 225, 1994]. Nature Genet 5 : 323-324, 1993
- 2) Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al : Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362 : 59-62, 1993
- 3) Deng HX, Hentati A, Tainer JA et al : Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. Science 261 : 1047-1051, 1993
- 4) Gurney ME, Pu H, Chiu AY et al : Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. Science 264

- : 1772-1775, 1994
- 5) Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR et al : An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14 : 1105-1116, 1995
  - 6) Bruijn LI, Becher MW, Lee MK et al : ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18 : 327-338, 1997
  - 7) Julien JP : Amyotrophic lateral sclerosis, unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104 : 581-591, 2001
  - 8) Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK et al : Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genet* 13 : 43-47, 1996
  - 9) Kikugawa K, Nakano R, Inuzuka T et al : A missense mutation in the SOD1 gene in patients with amyotrophic lateral sclerosis from the Kii Peninsula and its vicinity, Japan. *Neurogenetics* 1 : 113-115, 1997
  - 10) Kato S, Takikawa M, Nakashima K et al : New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase (SOD1) gene mutations : Inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1 : 163-184, 2000
  - 11) Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y et al : Familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Japan associated with H46R mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene : a possible new subtype of familial ALS. *J Neurol Sci* 126 : 77-83, 1994
  - 12) Andersen PM, Morita M, Brown RH Jr. : Genetics of amyotrophic lateral sclerosis : an overview. *Amyotrophic lateral sclerosis* (Robert H Brown Jr., Vincent Meininger, Michael Swash). Martin Dunitz, London, 2000, pp223-250
  - 13) Kato M, Aoki M, Ohta M et al : Marked reduction of the Cu/Zn superoxide dismutase polypeptide in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis with the homozygous mutation. *Neurosci Lett* 312 : 165-168, 2001
  - 14) 中野亮一 : SOD1変異家族性ALSの臨床像. *Brain Medical* 14 : 11-17, 2002
  - 15) Aoki M, Abe K, Houi K et al : Variance of age at onset in a Japanese family with amyotrophic lateral sclerosis associated with a novel Cu/Zn superoxide dismutase mutation. *Ann Neurol* 37 : 676-679, 1995
  - 16) Nagai M, Aoki M, Miyoshi I et al : Transgenic mice expressing an H46R mutation of human Cu/Zn superoxide dismutase, *Ecerpta Medica International congress series 1221 Neurology, Molecular mechanism and therapeutics of amyotrophic lateral sclerosis*, (Koji Abe) Elsevier, Amsterdam, 2000, pp273-279
  - 17) Kato M, Aoki M, Nagai et al : Transgenic ALS mice with SOD1 mutations associated with rapid and extremely slow progression —Relationship among mutations, clinical phenotype and Lewy body like inclusions— in submission
  - 18) Nagai M, Aoki M, Miyoshi I et al : Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis : associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci* 21 : 9246-9254, 2001
  - 19) Hadano S, Hadano S, Hand CK et al : A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nature Genet* 29 : 166-173, 2001
  - 20) Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N et al : Dornin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J Biol Chem* 277 : 36793-36798, 2002

# Development of New Transgenic Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Masashi AOKI and Yasuto ITOYAMA

Department of Neurology, Tohoku University School of Medicine

Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) have been linked to some familial cases of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In order to reproduce the different degree of toxicity to the mutant protein by mutations, we generated new transgenic mice with two mutations from which the progression of the disease in human family is rapid (L84V) or extremely slow (H46R). By comparing the two transgenic mice with different SOD1 mutations, we demonstrate that the time course and the first symptoms in these mice were likely to human SOD1-mediated familial ALS. Similarly to the previous studies of SOD1 mutant familial ALS patients and mutant SOD1-expressing transgenic mice, Lewy body-like hyaline inclusions in the motor neurons in spinal cords are seen in the L84V and H46R transgenic mice. These transgenic mice do not have elevated dismutation activity. It is probable the reason why these mice has little

vacuolar pathology. Because the vacuoles are usually undetectable in human ALS spinal cord, we think that L84V and H46R ALS transgenic mice precisely demonstrate pathological changes that occur in human ALS.

In addition, we report here that rats that express a human SOD1 transgene with two different ALS-associated mutations (G93A and H46R) develop striking motor neuron degeneration and paralysis. As in the human disease and transgenic ALS mice, pathological analysis demonstrates selective loss of motor neurons in the spinal cords of these transgenic rats. The larger size of this rat model as compared with the ALS mice will facilitate studies involving manipulations of spinal fluid (implantation of intrathecal catheters for chronic therapeutic studies ; CSF sampling) and spinal cord (e.g., direct administration of viral- and cell-mediated therapies).

## 2. ALS と神経栄養因子

### — HGF による新しい治療法開発の可能性 —\*

船 越 洋\*\* 中 村 敏 一

**Key words :** hepatocyte growth factor (HGF), c-Met, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), neurotrophic, glutamatergic neurotoxicity

**要旨** 筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動ニューロンが特異的に変性脱落し、最終的に死に至る難治性神経変性疾患である。この疾患の大部分は特発性に分類されることから、その治療法開発には家族性と特発性 ALS の共通病態である運動ニューロン変性に対するアプローチに焦点が当てられている。その中心にあるのが神経栄養因子による治療法開発研究である。筆者らは HGF が動物モデルにおいて ALS の運動ニューロン変性を抑制し、その運動機能を改善し、寿命を延長することを明らかにしてきた。本稿ではこの結果に加え HGF の作用分子メカニズムについても概説する。

#### はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は、運動ニューロン特異的神経変性疾患で、米国で大リーガーのスター選手であったルー・ゲーリックがこの病気になったことから米国では別名ルー・ゲーリック病とも呼ばれている。また、宇宙論で有名な英国のホーキング博士が罹患していることでも知られる。30～50歳で発症し次第に運動麻痺が進行し3～6年で死亡する致死性疾患である。現在のところ運動麻痺に対する対症療法を除き十分有効な治療法は見い出されていない。5～10%が家族性で、原因として superoxide dismutase 1 (SOD1) 遺伝子の変異が60カ所以上報告されている (gain of function 型)。また、ALS2 遺伝子も原因遺伝子として最近報告された<sup>8)</sup>。しかし、残り約90%は遺伝的背景がはっきりせず特発性に分類される。家族性と特発性 ALS は共に上位および下位運動ニューロンとその神経線維が特異的に変性・脱落し、運動麻痺が進行、最終的に死に至る点で共通している。したがって、大部分を占める特発性 ALS を含めた ALS に有効な治療法を開発するには、

いかに運動ニューロン変性・死滅を阻止するかが鍵を握ると考えられている。そこでニューロトロフィンなどの運動ニューロン生存促進作用 (神経栄養活性) をもつ因子による治療法開発に期待が寄せられている<sup>3)</sup>。

#### I. HGF の運動神経栄養作用

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) は、初代培養肝細胞の増殖活性を指標に肝細胞増殖の本体として Nakamura らにより精製・クローニングされた増殖因子であるが<sup>14,15)</sup>、その後の研究発展により HGF が多様な細胞を標的とし、その増殖、細胞移動、分化、生存作用、さらには器官形成・血管新生促進作用を持つことが明らかとなってきた<sup>16,6)</sup>。HGF の神経細胞に対する作用は、1995年 Honda ら<sup>10)</sup>が海馬ニューロンに対して神経栄養活性を報告したのを皮切りに、中脳ドーパミン作動性、大脳皮質、運動、感覚、交感ニューロン、小脳顆粒細胞、交感神経芽細胞など種々の神経細胞に対する新しい神経栄養因子であることが明らかとなっている<sup>4,5,9,13)</sup>(表1)。なかでも運動ニューロンに対する神経生存促進活性は強力で、数ある運動神経栄養因子のなかでも強力とされるグリ

\* Neurotrophic Factors and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) — Therapeutic Potential of a New Neurotrophic Factor : HGF in ALS —

\*\* 大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学講座分子組織再生分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2) Hiroshi Funakoshi, Toshikazu Nakamura : Division of Molecular Regenerative Medicine, Course of Advanced Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

表1 神経栄養活性を示す HGF の標的神経細胞と  
関連神経変性疾患

標的神経細胞	関連神経変性疾患
海馬ニューロン	アルツハイマー病
大脳皮質ニューロン	アルツハイマー病
中隔ニューロン	アルツハイマー病
中脳ドーパミン作動性 ニューロン	パーキンソン病
運動ニューロン	筋萎縮性側索硬化症(ALS)
小脳顆粒細胞	
感覚ニューロン	
交感ニューロン	
交感神経芽細胞	

ア細胞由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor: GDNF), 脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) やニューロトロフィン-4 (neurotrophin-4: NT-4) に匹敵もしくはそれ以上と報告されている。Ebens ら<sup>2)</sup>は発生過程で運動ニューロンが筋肉に神経を投射させる内因性ガイダンス分子の精製過程で HGF に行きついている。また, HGF の受容体 (c-Met) の細胞内シグナルに重要なアミノ酸の一部に変異を入れたノックインマウスでは運動ニューロン数の減少や運動神経線維の一部が変異することが報告されている<sup>12)</sup>。このように, 内因性 HGF が *in vivo* においても重要な運動ニューロン栄養因子であることが明らかとなっている。

## II. HGF の ALS モデルトランスジェニックマウスに対する効果

ALS の運動ニューロン死を抑制できる因子の探索が続けられている。HGF は既知の運動ニューロン生存促進活性をもつ因子の中でも特に活性が強いことが知られるため, ALS 治療に寄与できる可能性が期待されるが, 実際 HGF は ALS の運動ニューロン死を抑制し, 疾患進行を抑制し, 寿命を延長できるであろうか。筆者らは, ヒト ALS 患者さんで認められる変異ヒト SOD1 (G93A) 遺伝子を発現する ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg)<sup>7)</sup> に対する HGF の効果を解析した。

### 1. HGF 受容体 (c-Met) は ALS-Tg において, 病態進行に応じて発現制御を受ける

正常脊髄および ALS-Tg の病態進行過程における c-Met の発現を免疫染色法で評価した。正常脊髄においては c-Met は運動ニューロンに発現しており, グリア細胞に発現を認めなかった。一方 ALS-Tg においては病態初期には正常脊髄と同じ発現パターンであった

が, 病態末期になると運動ニューロン数が減少し, 残存運動ニューロンにおける c-Met の発現レベルが若干強くなった。さらに正常には認めなかったグリア細胞 (反応性アストロサイト) で発現を認めた。これらの結果から, HGF が ALS の運動ニューロンにおいて, また ALS 病態末期には残存運動ニューロンに加え反応性アストロサイトにおいても重要な機能を持つことが示唆された<sup>18)</sup>。また, 病態末期には内因性 HGF と c-Met mRNA が脊髄において増加することが明らかとなった<sup>17,18)</sup>。以上から, HGF が ALS の病態を通して運動ニューロンに, また病態末期には反応性アストロサイトで重要な機能を担っていることが示唆された。

### 2. HGF 遺伝子発現は ALS マウスの運動ニューロン死を抑制する

HGF 遺伝子を神経特異的に発現するマウス (HGF-Tg) を作成し, HGF-Tg と ALS-Tg とのダブルトランスジェニックマウス (ALS/HGF-Tg) を作成することで, ALS-Tg の神経細胞に HGF 遺伝子を発現させた効果を解析した (図1)。野生型 (wildtype) マウスと HGF-Tg はいずれも脊髄前角に大型の運動ニューロンを多数認め両者に差を認めないが, ALS-Tg ではその数が著明に減少しわずかに萎縮した残存運動ニューロンを認める。一方 ALS/HGF-Tg においては健常大型運動ニューロンを多数認めたことから, HGF により ALS-Tg における運動ニューロン死が抑制できることが明らかになった (図2A)。次いで, ALS においては運動ニューロン変性により起こる神経線維変性に着目し解析すると, ALS/HGF マウスでは運動ニューロンの神経線維変性も抑制されることが明らかとなった (図2B)。

### 3. HGF の作用メカニズム (図3)

それではいかにして HGF が ALS の運動ニューロン変性を抑制するのであろうか。ALS の初期, 中期および末期におこる各病態について HGF が与える効果を順次解析していった。その結果, HGF は ALS-Tg の病態中期における運動ニューロンへのカスパーゼ1の発現増加を抑制すること, NOS の発現誘導を抑制することが明らかとなった。これらは, HGF が運動ニューロンに直接作用して運動ニューロン変性, 細胞死を阻止する方向に働いていることを意味している。すなわち, ALS において HGF が運動ニューロンへの神経栄養作用をもつことが明らかになった。一方 c-Met の発現制御パターンから, HGF は病態末期には反応性アストロサイトにも作用している可能性が示唆される。筆者らは細胞間隙のグルタミン酸のクリアランスに重要なグリア細胞特異的グルタミン酸トランスポー

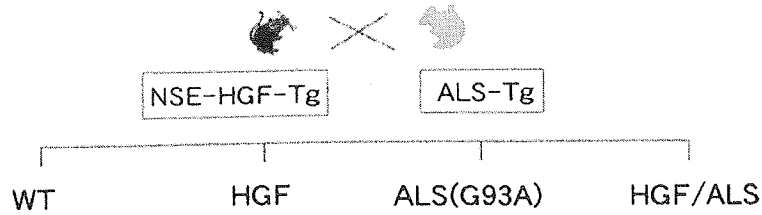


図1 HGF-TgとALS-Tg交配の模式図 NSE-HGF-TgはNeuron-specific enolaseのpromoterの下流にrodent HGF geneを繋いだconstructにより作成した神経特異的にHGFを発現するトランスジェニックマウス。ALS-TgはヒトALS原因遺伝子であるSOD1(G93A)を発現しヒトALSと同様の病態を示すALSモデルトランスジェニックマウス。

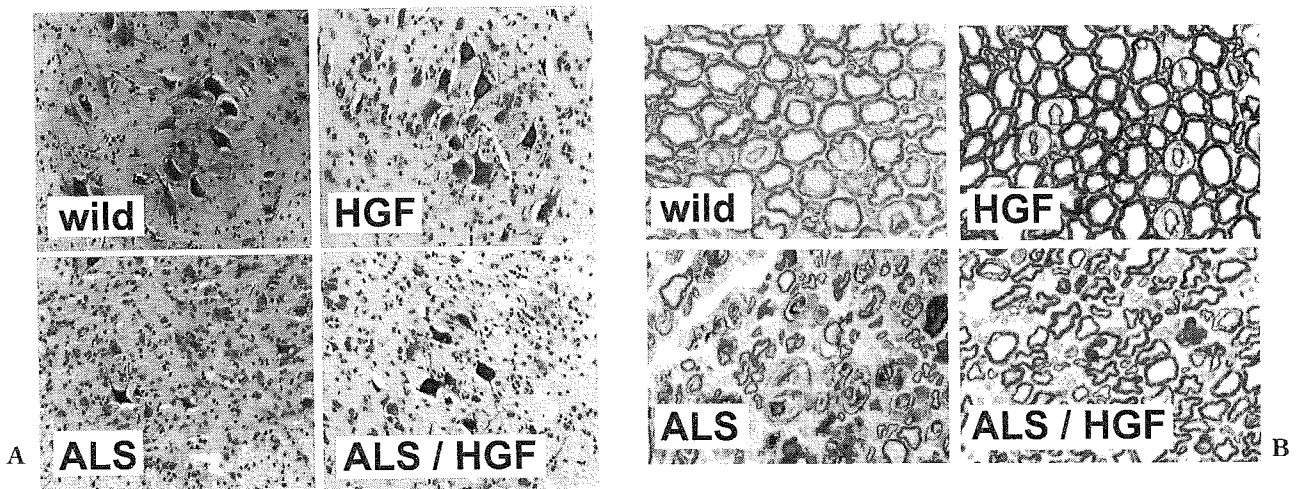


図2 HGFの脊髄運動ニューロン細胞体およびその神経線維(軸索)に対する作用 HGFは脊髄運動ニューロンの細胞体とその軸索の変性、神経細胞死を抑制する。A:運動ニューロン細胞体(脊髄前角のCresyl violet染色像)。B:運動ニューロン神経線維(軸索)。脊髄前根(運動神経線維)のトルイジンブルー染色像。wild: wildtypeマウス。HGF: HGF-Tg, ALS: ALS-Tg, ALS/HGF: ALS/HGFダブルトランスジェニックマウス

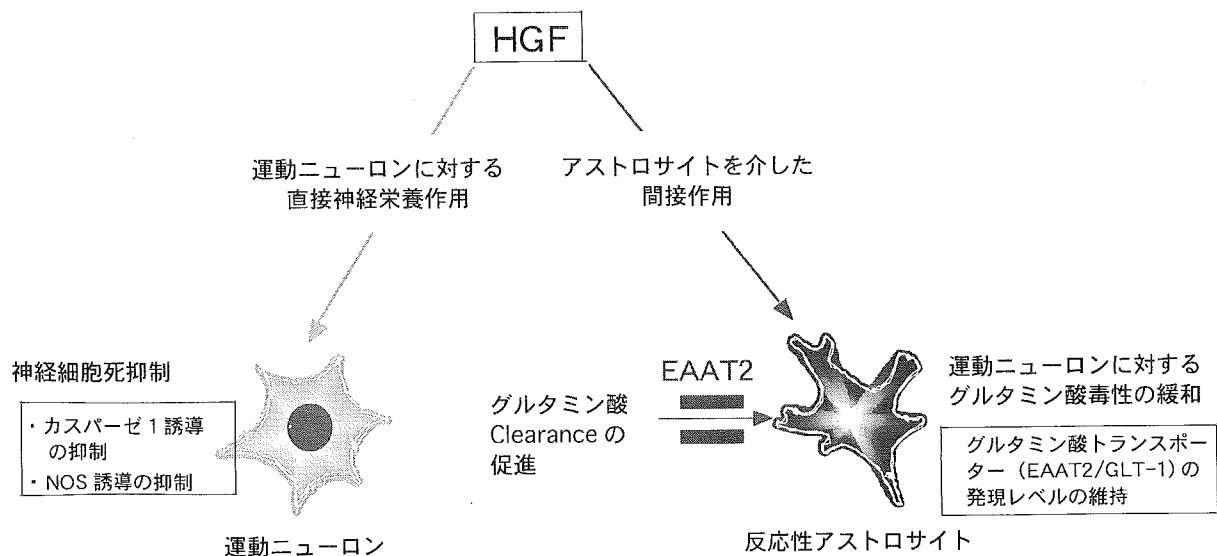


図3 HGFの作用分子メカニズムの模式図 HGFは、1)運動ニューロンに直接作用し、カスパーゼ1の発現誘導やNOSの発現誘導を抑制することで運動ニューロン死を抑制する、いわゆる神経栄養作用と、2)アストロサイトに発現するグリア細胞特異的グルタミン酸トランスポーターの発現低下を抑制することで間接的に運動ニューロンへのグルタミン酸毒性を抑制する、従来の神経栄養因子に報告のない作用の2つの作用メカニズムを介してALSの病態改善に寄与すると考えられる。



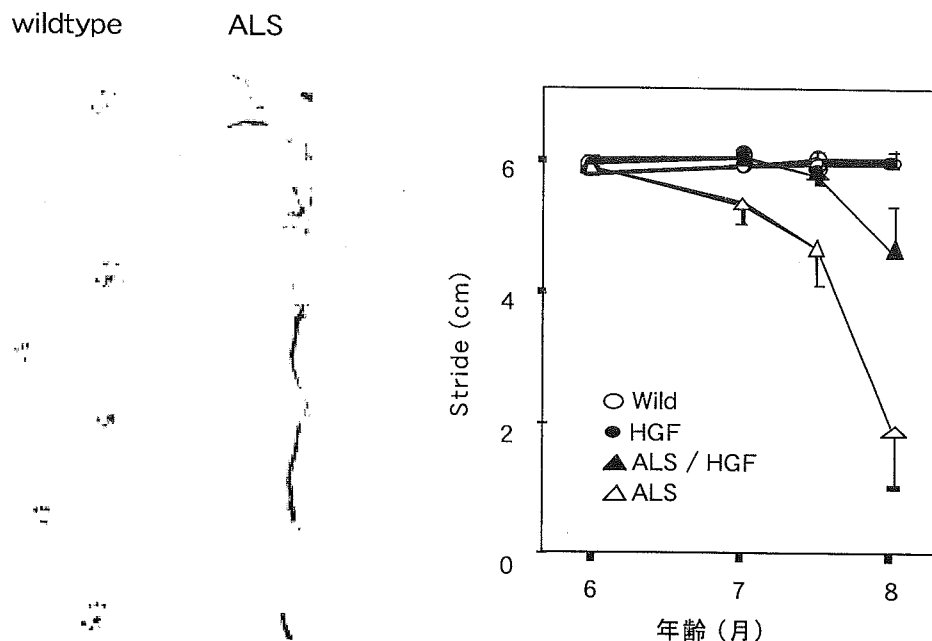


図4 HGFの運動機能に対する作用 HGFは運動機能を改善する。WildマウスとALS-Tgのフットプリント像(左)とその歩幅を定量したもの(右)。

ター(EAAT2/GLT-1)が、ALSの患者さんにおいては、反応性アストロサイトの運動ニューロンに向け伸展している足部(astrocytic foot)において発現低下していることに着目し、HGFのEAAT2発現レベルに対する効果を評価した。その結果、HGFがALS-Tg末期におこる脊髄EAAT2発現レベルの著明な低下を抑制できることが明らかとなった。この作用がHGFのアストロサイトに対する直接作用か否かを評価するため、wildtypeマウスおよびALS-Tgマウスからアストロサイトを培養し、HGFが培養アストロサイトにおけるEAAT2発現レベルを増加できるか評価した。ウェスタンブロット解析の結果、HGFによりwildtypeのみならずALS-TgのアストロサイトのEAAT2も増加できることが明らかとなった。以上から、HGFはALS病態末期には運動ニューロンのグルタミン酸毒性をアストロサイトを介して間接的に減弱させていることが示唆された<sup>18)</sup>。EAAT2の発現制御は既知の神経栄養因子に報告のない作用である。

#### 4. HGFは、ALS-Tgの運動機能を維持し、寿命を延長する(図4)

それではHGFの上記作用がALS-Tgの運動機能や寿命改善に反映されるのであろうか。HGFのALS-Tgに対する運動機能に対する効果を後肢反射テストとフットプリントテストによる歩幅で評価すると、両

者ともにALS/HGF-Tgにおいて運動機能が大幅に改善されていた。さらにALS/HGF-Tgにおいては麻痺発症時期と寿命が約1カ月延長した。これはヒトに単純換算すると約6年間の寿命延長効果に相当する<sup>18)</sup>。以上から、家族性ALSを反映するALS-Tgについて、HGFがALSの病態を著明に改善できることが明らかになった。

#### 5. HGFとc-MetはヒトALSにおいても同様に発現制御を受けている

ヒトALS症例ではc-MetとHGFの発現レベルが高くなっている運動ニューロンと低いニューロンが混在していたが、ヒトALS患者さんの脊髄においてもHGFとc-Metの発現制御はALS-Tgと基本的に同じパターンを示した<sup>11)</sup>。特に家族性ALSのみならず特発性ALSにおいてもALS-Tg同様の発現制御を受けていたことから、HGF-c-Metシステムが家族性と特発性ALSの共通病態に呼応して発現制御を受け病態進行抑制に働く内因性増殖因子と考えられた。HGFがALS-Tgの病態を改善し、寿命延長効果を示すこと、またHGFとc-MetがヒトALS患者さんにおいて、家族性・特発性にかかわらずALS-Tgと同様の発現制御を受けていたことから、HGFはヒトにおいては家族性のみならず特発性ALSに対しても重要な治療薬となる可能性が期待される。

### III. 今後の展望

HGF 遺伝子治療が、大阪大学医学部附属病院で閉塞性動脈硬化症(ASO)の患者さんへ HGF 遺伝子プラスミド投与の形で開始され、現在までその効果が確認されると共にその安全性についても明らかとなりつつある<sup>1)</sup>。したがって、HGF の ALS に適した安全かつ有用な供給方法が開発できたら、家族性と特発性 ALS 両方に対して多機能性神経栄養因子である HGF が現実的治療因子となる可能性が期待される。今後は、実際ヒト ALS においても治療効果を示すかどうか検討していくための基盤研究が必要である。筆者らは、この目的のために、1)ヒトリコンビナント HGF 蛋白質、2)HGF 遺伝子の両方の観点から供給法の検討を進めている。さらなる ALS 研究が進み、ごく近い将来 ALS に対する新しい治療法が開発されることを期待している。

### 文 献

- 1) 青木元邦, 森下竜一, 荻原俊男: 21世紀の新しい治療医学: 動脈硬化の遺伝子治療. 現代医療 34: 25-41, 2002
- 2) Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG Jr, Bladt F, Birchmeier C, Barres BA, Tessier-Lavigne M: Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* 17: 1157-1172, 1996
- 3) Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H, Ibanez CF: Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 268: 1495-1499, 1995
- 4) Funakoshi H, Nakamura T: Identification of HGF-like protein as a novel neurotrophic factor for avian dorsal root ganglion sensory neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 606-612, 2001
- 5) 船越 洋, 中村敏一: 21世紀の新しい治療医学: 神経栄養因子による神経難病治療の可能性. 現代医療 34: 245-253, 2002
- 6) Funakoshi H, Nakamura T: Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clin Chim Acta* 327: 1-23, 2003
- 7) Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al: Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264: 1772-1775, 1994
- 8) Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH Jr, Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR, Ikeda JE: A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29: 166-173, 2001
- 9) Hamanoue M, Takemoto N, Matsumoto K, Nakamura T, Nakajima K, Kohsaka S: Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on central nervous system neurons in vitro. *J Neurosci Res* 43: 554-564, 1996
- 10) Honda S, Kagoshima M, Wanaka A, Tohyama M, Matsumoto K, Nakamura T: Localization and functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain: implication as neurotrophic factor. *Brain Res Mol Brain Res* 32: 197-210, 1995
- 11) Kato S, Funakoshi H, Nakamura T, Kato M, Nakano I, Hirano A, Ohama E: Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. *Acta Neuropathol (Berl)* 106: 112-120, 2003
- 12) Maina F, Klein R: Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat Neurosci* 2: 213-217, 1999
- 13) 中村健二, 船越 洋, 中村敏一: 神経の再生-神経再生因子としての肝細胞増殖因子(HGF)-. 脳の科学(増刊): 108-115, 2003
- 14) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 1450-1459, 1984
- 15) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342: 440-443, 1989
- 16) 中村敏一, 荻原俊男 監: HGF の分子医学. メディカルレビュー社, 1998
- 17) Sun W, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T: A sensitive quantification method for evaluating the level of hepatocyte growth factor and c-met/HGF receptor mRNAs in the nervous system using competitive RT-PCR. *Brain Res Brain Res Protoc* 5: 190-197, 2000
- 18) Sun W, Funakoshi H, Nakamura T: Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci* 22: 6537-6548, 2002

## 肝細胞増殖因子 (HGF) は 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の進行を遅らせる\*

船越 洋\*\* 中村 敏一\*\*

**Key Words :** amyotrophic lateral sclerosis (ALS), hepatocyte growth factor (HGF), c-Met, neurotrophic, glutamate

### はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は、運動ニューロン変性疾患で、米国野球メジャーリーグのスター選手であったルー・ゲーリックがこの病気になったことから米国では別名ゲーリック病とも呼ばれている。5~10%が家族性ALS (familial ALS : FALS) で、原因として superoxide dismutase 1 (SOD1) 遺伝子の変異が60箇所以上報告されている (gain of function型)。最近、秦野らによりALS2遺伝子も原因遺伝子として報告された<sup>1)</sup>。しかし残りの約90%は遺伝的背景や原因のはっきりしない特発性に分類される。30~60歳で発症し次第に運動麻痺が進行し3~6年で人工呼吸器を必要とする難病である。大部分を占める特発性ALS (sporadic ALS : SALS) を含めたALSに有効な治療法を開発するには、FALSとSALSに共通する病態にアプローチする必要があると考えられる。FALSとSALSはともに上位および下位運動ニューロンとその神経線維が特異的に変性・脱落し、運動麻痺が進行、最終的に死に至る点で一致していることから、両者共通の治療法開発にはいかに運動ニューロン変性・死滅を阻止するかが鍵

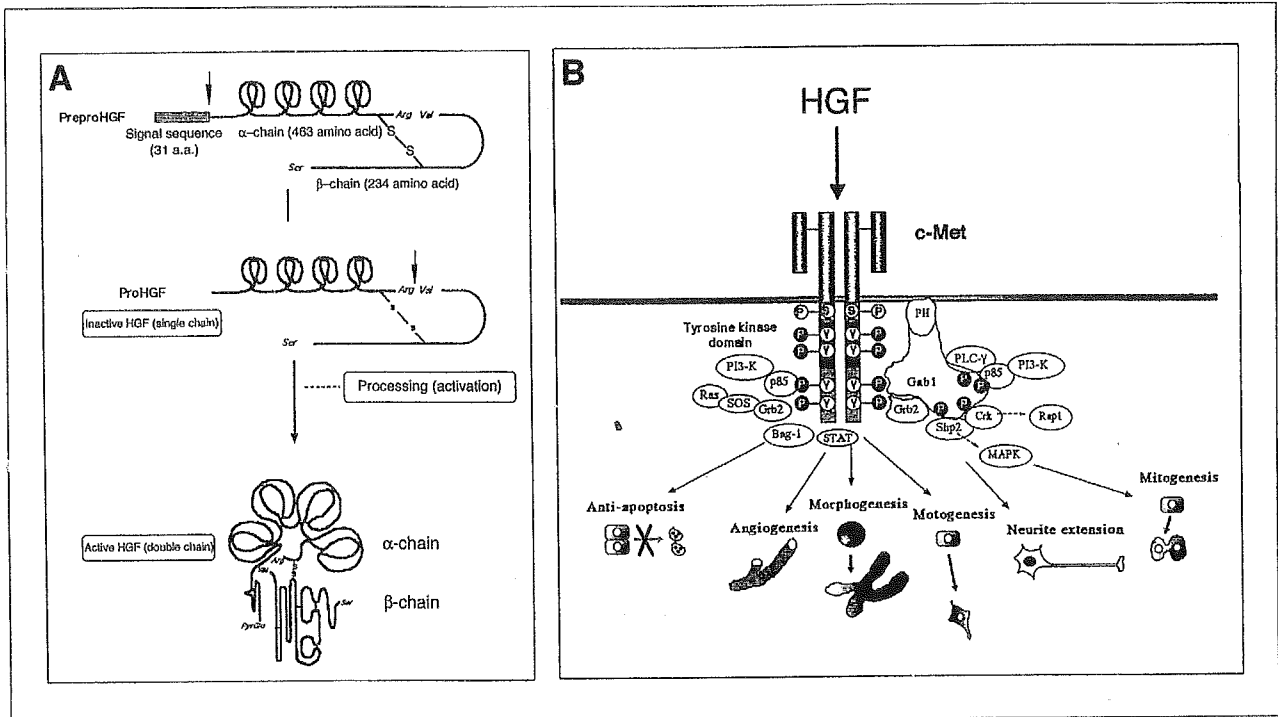
を握ると考えられてきた。そこでこれまで運動ニューロン生存促進作用をもつニューロトロフィンなどの神経栄養因子による治療法開発に期待が寄せられてきた<sup>2, 3)</sup>。本稿では、日本で発見された増殖因子である hepatocyte growth factor (HGF) のALSモデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) に対する病態進行遅延作用とその作用分子機構について概説したい。

### I. 新しい運動神経栄養因子としてのHGF

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) は、中村らにより精製・クローニングされた増殖因子である<sup>4, 5)</sup>。HGFは四つのクリングル構造をもつアルファ鎖とセリンプロテアーゼ様構造をもつベータ鎖からなるヘテロダイマーで、初め1本鎖HGFとして産生され作用時にアルファ鎖とベータ鎖の間 (Arg-Val間) でプロセッシングを受け活性型 (2本鎖の形) となり、細胞表面にあるチロシンキナーゼ型受容体 (c-Met) に結合し細胞内にシグナルを伝達する (Fig. 1A)。HGFは初代培養肝細胞の増殖活性を指標に肝細胞増殖の本体として同定されたが、その後の研究発展によりHGFが多様な細胞を標的とし、その

\* Hepatocyte Growth Factor (HGF) Retards Progression of ALS.

\*\* 大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学講座分子組織再生分野 Hiroshi FUNAKOSHI, Toshikazu NAKAMURA : Division of Molecular Regenerative Medicine, Course of Advanced Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine



**Fig. 1** Schematic structure of mature HGF processed from proHGF (A), and biological activities of mature HGF mediated by intracellular signals of the c-Met/HGF receptor (B). A, HGF is synthesized and secreted as a biologically inactive single-chain precursor form, and further processing by serine proteases into the two-chain form is coupled to its activation. Serine proteases responsible for the activation of HGF include the HGF activator and urokinase-type plasminogen activator (uPA). B, The receptor for HGF was identified as a c-met proto-oncogene product. The c-Met receptor is composed of a 50-kDa  $\alpha$ -chain and 145-kDa  $\beta$ -chain. The  $\alpha$ -chain is exposed extracellularly, while the  $\beta$ -chain is a transmembrane subunit containing an intracellular tyrosine kinase domain. Binding of HGF to the c-Met receptor induces activation of tyrosine kinase, an event that results in subsequent phosphorylation of C-terminally clustered tyrosine residues. Phosphorylation of these tyrosine residues recruits intracellular signaling molecules containing the src homology (SH) domain, including Gab-1, phospholipase  $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), Ras-GTPase activating protein (Ras-GAP), phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase (PI-3 kinase), c-Src, Shp-2, Crk, and Grb-2. A potential contribution of Bag-1 and STAT3 for HGF signaling was also reported. These intracellular signaling pathways driven by HGF-c-Met receptor coupling lead to multiple biological responses in a variety of cells, including mitogenic, motogenic (enhancement of cell motility), morphogenic, neurite extension, and anti-apoptotic activities.

増殖, 細胞移動, 分化, 生存作用, さらには器官形成・血管新生促進作用をもつことが明らかとなってきた<sup>6, 7)</sup> (Fig. 1B). 神経細胞も例外ではなく1995年にはHondaらが海馬ニューロンに対して報告したのを皮切りにHGFは中脳ドーパミン作動性, 大脳皮質, 運動, 感覚, 交感ニューロン, 小脳顆粒細胞, 交感神経芽細胞など種々の神経細胞に対する新しい神経栄養因子であることが明らかとなっている<sup>8-12)</sup>. 中でもHGFの培養運動ニューロンに対する神経生存促進活性は強力で, 数ある運動神経栄養因子のなかでも強力とされるグリア細胞由来神経栄養因子 (glial cell

line-derived neurotrophic factor : GDNF), 脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) やニューロトロフィン-4 (neurotrophin-4 : NT-4) に匹敵すると報告されている. さらに *in vivo* においても内因性HGFが重要な運動ニューロン栄養因子であることが明らかとされている. Ebensらは発生過程で運動ニューロンを筋肉に投射させる内因性ガイダンス分子を精製する過程でHGFを同定している<sup>13)</sup>. また, HGF受容体 (c-Met) の細胞内シグナルに重要なアミノ酸の一部に変異を入れたノックインマウスでは運動ニューロン数の減少や運動神経線維の