

Fig. 2 Approach to analyze the effect of HGF in ALS. To explore the effects of HGF on ALS, we first generated transgenic mice overexpressing rodent HGF under the regulatory control of the neuron-specific enolase (NSE) promoter (NSE-HGF-Tg). Then hemizygous HGF mice were crossed with hemizygous G93A mice. The mating results in the generation of four groups of mice: 1) wildtype (Wildtype), 2) HGF single transgenic (HGF), 3) G93A single transgenic (ALS), and 4) G93A and HGF double transgenic (ALS/HGF).

一部が変異することが報告された¹⁴⁾。このように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、特に活性が強い内因性因子であることが知られることから、HGFがALS治療に寄与できる可能性が期待される。

II. HGFはALSモデルトランスジェニックマウスの病態を改善し寿命を延長する

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

HGF受容体 (c-Met) の発現制御を、ヒトALS患者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)¹⁵⁾を用い解析した。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もつことが示唆された¹⁶⁾。また、正常脊髄前角においてもHGFとc-met messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現を認めたが、病態末期には内因性HGFとc-met mRNAがともに増加することが明らかとなった^{16, 17)}。これらの結果は、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を示唆している。

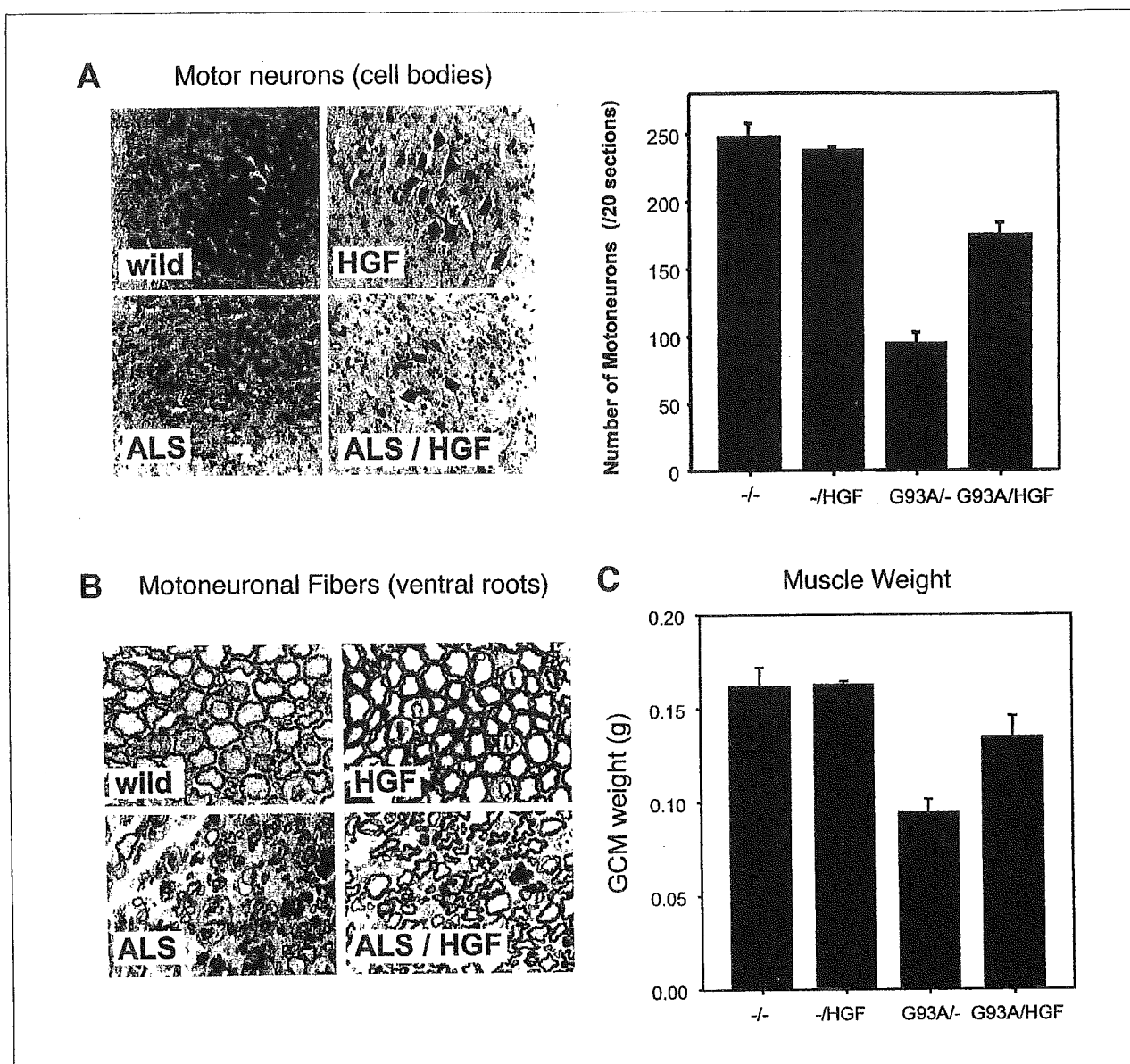


Fig. 3 Neuroprotective effects of HGF in a transgenic mouse model of ALS. A, The effect of HGF on motoneuronal death. Cresyl violet staining of lumbar spinal cords. Only a small number of motoneurons remained at 8 months of age in the ALS mice, compared with wildtype or HGF single transgenic littermates. The remaining motoneurons in the ALS mice were atrophic. In contrast, double transgenic (ALS/HGF) mice retained a significantly larger number of spinal motoneurons with a healthier morphology than ALS mice. B, The effects of HGF on axonal degeneration. Degeneration of the ventral root was evident in 8-month-old ALS mice, while in double transgenic littermates, degeneration of the ventral root was slight. C, The effect of HGF on muscle weight. Neuroprotective effects of HGF are also indicated from the delayed loss of weight of the gastrocnemius muscle.

2. HGFの神経細胞への供給によりALSマウスの運動ニューロン死は抑制される

ALS-Tgマウスの神経細胞にHGF蛋白質を長期間供給するには、血液脳関門の存在や長期間供給の難しさが問題となる。そこで私達はまずHGF遺伝子を神経特異的に発現するトランスジェニックマウス(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遺伝子を長期間にわたり発現させることで、HGFのALS-Tgに対する効果を解析した(Fig. 2)。脊髄前角部に野生型(wildtype)マウスとHGF-Tgはいずれも大型の運動ニューロンを多数認め、その数とサイズに差

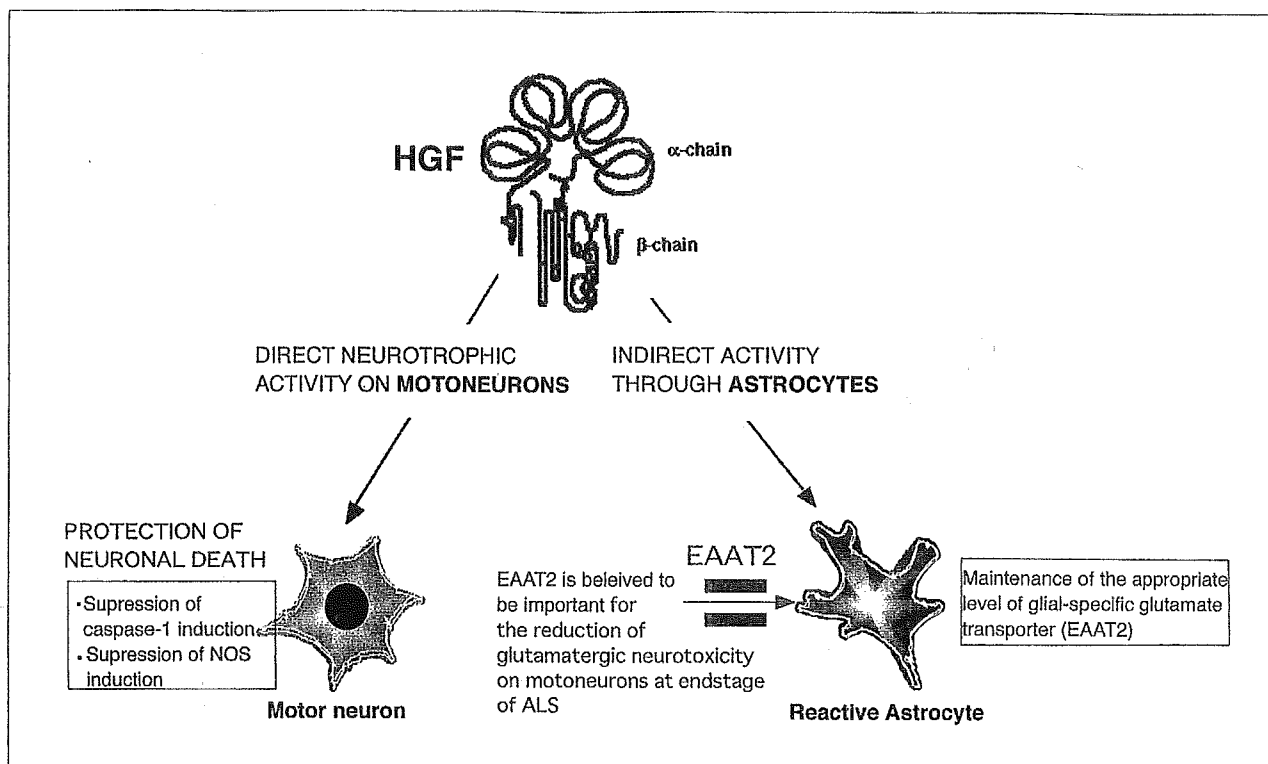


Fig. 4 Bifunctional role for HGF in delaying ALS progression. As HGF acts on both survival and axonal regeneration of motoneurons and astrocytes, we propose that HGF is the first example of an endogenous cytokine that plays a dual role in ALS. This could take place through 1) direct neurotrophic activities on motoneurons, i.e. preventing the up-regulation of the proapoptotic protein “caspase-1” in motoneurons and 2) indirect modification of glutamate neurotoxicity in motoneurons by maintaining appropriate levels of the glial-specific glutamate transporter “EAAT2” in astrocytes, which is known as the main contributor to glutamate clearance.

を認めない。これに対しALS-Tgにおいては運動ニューロン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大幅に抑制されることが明らかになった (**Fig. 3A**)。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ついても、ALS/HGFマウスではALS-Tgに比べ著明に抑制されることが明らかとなった (**Fig. 3B**)。さらにALS/HGFマウスでは骨格筋の筋萎縮もよく抑制された (**Fig. 3C**)。

3. HGFのALS改善の作用メカニズム

HGFがALSの運動ニューロン変性を抑制するメカニズムを知る目的でALSの初期、中期および末期に起こる各病態についてHGFが与える効果を順次解析したところ、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、nitric oxide synthase (NOS)の発現誘導を抑制することが明らかとなった¹⁵⁾。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、すなわちHGFが運動ニューロンへの直接神経栄養作用をもつことが明らかになった。一方e-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。私達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ター (EAAT2)が、ALSの患者においては、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末期に起こる脊髄EAAT2発現レベルの著明な低下を抑制できたことから、病態末期の

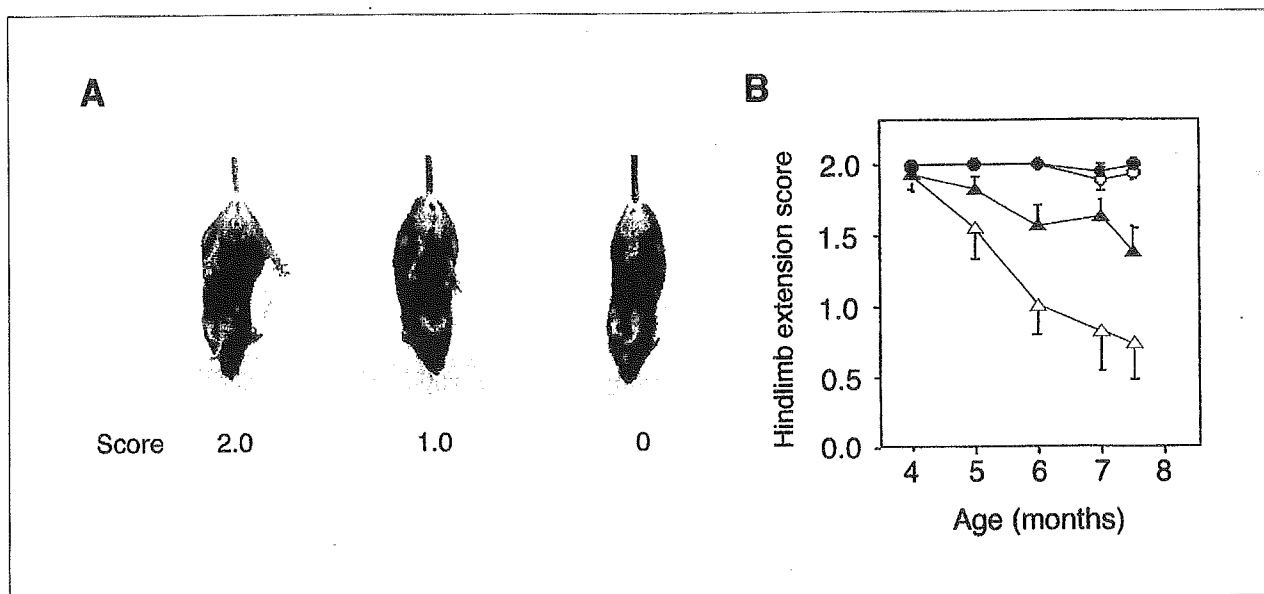


Fig. 5 HGF improved motor performance. Comparison of motor performance in wildtype, HGF, ALS, and ALS/HGF mice, determined using the hind limb reflex test, revealed that the reflex score was markedly decreased in ALS/HGF mice, while the score was retained in ALS/HGF mice. The left column shows a schematic representation of the hind limb reflex test. The right column shows quantitative values of the hind limb reflex test in different mice. ○, Wildtype (n = 14); ●, HGF (n = 15); ▲, ALS (n = 16); and △, ALS/HGF mice (n = 16).

アストロサイト EAAT2 低下によるグルタミン酸の clearance の低下が、間接的に増強していると考えられる運動ニューロン毒性を緩和する方向に作用していることが示唆された。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。ウエ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¹⁶⁾。以上から、HGF は病期全般にわたって運動ニューロンに神経栄養に働くと同時に、ALS 病態末期にはアストロサイトを介して運動ニューロンのグルタミン酸毒性を間接的に減弱させていることが示唆された (Fig. 4)。

4. HGF は、ALS-Tg の運動機能を維持し、寿命を延長する

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か否か、HGF が ALS-Tg の運動機能に作用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したところ、病態末期に起こる歩幅の減少を両者ともに

ALS/HGF-Tg において運動機能が大幅に改善されていた¹⁶⁾。さらに、後肢反射テスト (Fig. 5 左) で運動機能を評価すると、HGF は病態中期から起こる運動機能低下も抑制する作用をもつことが明らかとなった (Fig. 5 右)。さらに ALS/HGF-Tg においては麻痺発症時期と寿命が約 1 ヶ月延長した (Table 1)。これは人に単純換算すると約 6 年間の寿命延長効果に相当する。これらの結果から、HGF が家族性 ALS を反映する ALS-Tg の運動機能を著明に改善し寿命を延長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 患者の脊髄においても 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すことが明らかとなった¹⁹⁾。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。一方 ALS-Tg では解析不能な人工呼吸器をつけた時期の ALS の患者においては、HGF と c-Met のレベルがともに低下し

Table 1 HGF delays the onset of paralysis and prolongs the life span in a transgenic mouse model of ALS.

	G93A(+/-)	G93A(+/-)/HGF(+/-)	P value
Onset	243.8 ± 4.7	271.9 ± 5.6	0.004*
Length	15.7 ± 1.6	14.8 ± 1.6	0.686
Mortality	259.5 ± 5.0	286.8 ± 6.5	0.003*
	G93A(+/-)	G93A(+/-)/HGF(+/-)	P value
Onset	137.8 ± 2.4	161.5 ± 3.4	0.007*
Length	12.0 ± 2.0	13.8 ± 3.4	0.457
Mortality	147.5 ± 5.7	175.3 ± 6.5	0.007*

*statistical significance was evaluated by t-test

ていた。この結果は、内因性HGF-c-Metシステムが維持できなくなる時期と、病態が急速に進行する時期が一致している結果であった。興味深いことにその時期c-Metのレベルの高い健全にみえる残存運動ニューロンが認められたことは、この時期においてもHGFに応答しうる運動ニューロンがあり、不足したHGFを補うことで病態進行を抑制できる可能性が示唆された。HGFがALS-Tg動物の病態を改善、寿命延長効果を示すこと、またHGFとc-MetがヒトALS患者において、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。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ともにその安全性についても明らかとなりつつあることから¹⁹⁾、ALS患者へのよい投与方法が見出せれば、HGFの臨床適用が現実となるかも知れない。

III. 今後の展望

今後は、HGFを含めたALSの病態を改善する分子の作用分子機構の解析に加え、それらの分子が実際ヒト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重要である。私達は、HGFのより詳細な作用分子機能を解析していくとともに、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していきたいと考えている。さらなる

ALS研究が進み、ごく近い将来患者に還元できるALSに対する新しい治療法が開発されることを私達は切に願っている。

文 献

- 1) Hadano S, Hand CK, Osuga H et al : A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29 : 166-173, 2001
- 2) Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B et al : Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science* 265(5175) : 1107-1110, 1994
- 3) Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E et al : Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 268 : 1495-1499, 1995
- 4) 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
- 5) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M et al : Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342 : 440-443, 1989
- 6) 中村敏一, 萩原俊男 監 : HGFの分子医学. メディカルレビュー社 1998
- 7) Funakoshi H, Nakamura T : Hepatocyte growth factor : from diagnosis to clinical applications. *Clin Chim Acta* 327 : 1-23, 2003
- 8) Honda S, Kagoshima M, Wanaka A et al : Localization and functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain : implication as neurotrophic factor. *Brain Res Mol Brain Res.* 32(2) : 197-210, 1995

- 9) Hamanoue M, Takemoto N, Matsumoto K et al : Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on central nervous system neurons in vitro. *J Neurosci Res* 43 : 554-564, 1996
- 10) 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
- 11) 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 (1) : 245-253, 2002
- 12) 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
- 13) Ebens A, Brose K, Leonardo ED et al : Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* 17 : 1157-1172, 1996
- 14) Maina F, Klein R : Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat Neurosci* 2 : 213-217, 1999
- 15) 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
- 16) 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
- 17) Sun W, Funakoshi H, Matsumoto K et al : 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 Protoc* 5 : 190-197, 2000
- 18) Kato S, Funakoshi H, Nakamura T 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
- 19) 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 (1) : 25-41, 2002

Hepatocyte Growth Factor (HGF) Retards Progression of ALS

Hiroshi FUNAKOSHI, Toshikazu NAKAMURA

Division of Molecular Regenerative Medicine, Course of Advanced Medicine, Osaka University
Graduate School of Medicine

We reviewed the role of HGF in retarding the progression of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Gene transfer of hepatocyte growth factor (HGF) in the nervous system attenuates motoneuronal death and axonal degeneration, and prolongs the life span of transgenic mice overexpressing mutated Cu²⁺/Zn²⁺ superoxide dismutase 1. HGF prevents induction of caspase-1 in motoneurons and retains the levels of the glial-specific glutamate transporter (EAAT2/GLT-1) in reactive astrocytes. We proposed that HGF could alleviate the symptoms of ALS by dual mechanisms i.e. direct neurotrophic activities on motoneurons and indirect activi-

ties on glial cells, presumably favouring a reduction in glutamatergic neurotoxicity. The latter activity was not reported for known neurotrophic factors, which may be an advantage of using HGF for ALS treatment. In addition, we recently reported that HGF and its receptor, c-Met, are similarly regulated in patients with familial ALS and sporadic ALS, suggesting the endogenous regulation of HGF and c-Met in retarding disease progression. These findings raise the possibility that HGF could be used for the treatment of both familial and sporadic ALS.

神経再生因子としての肝細胞増殖因子 (HGF)

中村 健二*, 船越 洋*, 中村 敏一*

抄 録 肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) は種々の細胞に対して増殖促進活性をはじめ多様な生物活性を示す多機能性因子であり, 様々な臓器における疾患・障害に対して, 内因性の修復・再生効果を発揮する再生因子である。HGF は海馬, 中脳ドーパミン作動性および運動ニューロン等のアルツハイマー病やパーキンソン病などの難治性神経変性疾患の標的神経細胞を含む, 種々のニューロンに対して神経栄養活性を示す。実際にダブル Tg マウスの解析から, HGF が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態進行を緩和する可能性が示唆され, また, 動物モデルを用いた虚血に伴う梗塞・神経障害に対する研究では HGF の効果が実証されつつある。HGF の神経再生の分子機序として神経細胞に対する直接的な保護作用に加え, アストロサイトや血管内皮細胞を介した間接的な作用も明らかとなりつつあり, HGF の様々な神経疾患に対する臨床応用の可能性が期待される。 脳の科学 (2003 年増刊号) 108-115, 2003

Key words : *hepatocyte growth factor, HGF-like protein, amyotrophic lateral sclerosis, ischemia, neurotrophic factor*

I. はじめに

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) は成熟ラット初代培養肝細胞に対する増殖促進活性を指標に, 筆者らの研究室においてはじめて発見・単離・クローニングされた増殖因子である¹⁾。その後の研究の結果, HGF は肝細胞に限らず種々の細胞に対して増殖促進活性を示すのみならず, 分化, 遊走, 形態形成誘導, 抗アポトーシス, 血管新生などの多様な生物活性を示す

ことが明らかとなってきた²⁾。これらの機能はすべて組織の構築, 維持, 修復, 再生といった生体を維持するための必須の機構に関わるものである。実際に HGF は閉塞性動脈硬化症, 劇症肝炎, 肝硬変, 慢性腎症等の様々な臓器における疾患・障害に対して, 内因性の保護, 修復, 再生因子としての生物活性を発揮することが明らかとなりつつある³⁾。本稿では, 他臓器における HGF の知見は他誌に譲り¹⁰⁾, 神経系における HGF の神経再生因子としての機能を最近の知見を中心に述べたいと思う。

II. HGF ファミリーとその受容体の構造と活性化機構

HGF は構造的にはヘアピンループと4つのリング構造を持つ α 鎖 (分子量約69kD) とセリンプロテアーゼ様構造を持つ β 鎖 (分子量約34kD) からなるヘテロダイマーで, 1本鎖の不活性型 pro HGF として産生され, urokinase

Hepatocyte growth factor as a neuroregeneration factor.
*大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻組織再生医学講座分子組織再生分野
[〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2]
Kenji Nakamura, Hiroshi Funakoshi, Toshikazu Nakamura: Course of Advanced Medicine, Division of Molecular Regeneration Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine. 2-2 Yamada-Oka, Suita, Osaka, 565-0871 Japan.

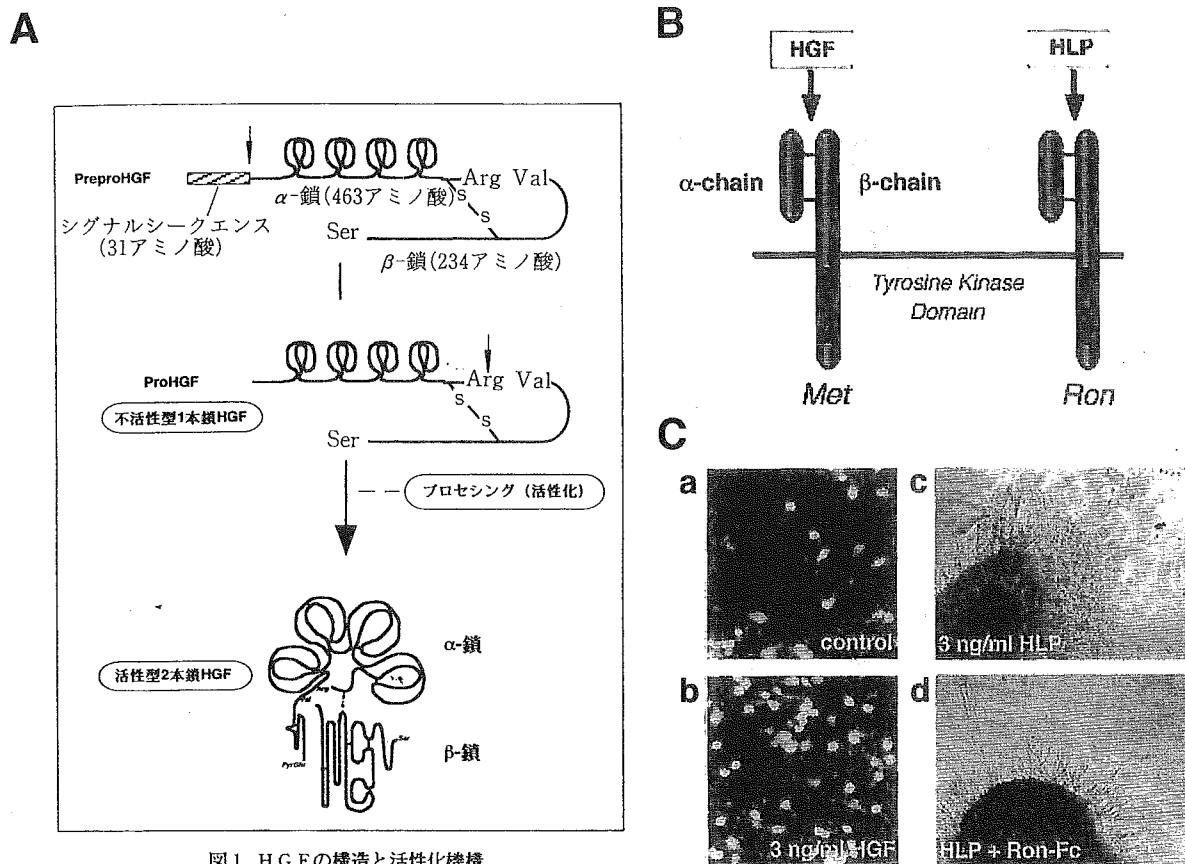


図1. HGFの構造と活性化機構

図1 HGFとそのファミリー分子 HGF-like protein (HLP) の構造, 受容体特異性と神経栄養作用

A: HGFの構造と活性化, B: HGFファミリー分子のリガンド-受容体対応関係, C: HGFとHLPの神経栄養作用の例。HGFの活性化にはVal-Arg間の切断による2本鎖へのプロセシングが必要である(A)。HGFとHLPはチロシンキナーゼ型受容体であるc-MetとRonをそれぞれ特異的受容体とする(B)。血清除去により起こる大脳皮質ニューロン死(C-a)はHGFによってよく阻止される(C-b)。一方, HLPによって鶏感覚神経節の神経突起伸長および運動能が促進され(C-c), それがRon-Fcによって特異的に阻止される(C-d)。

type plasminogen activator (u-PA) や HGF activator (HGFA) 等により Arg-Val 間で切断 (プロセシング) され 2 本鎖活性型 HGF となる (図 1 A)。活性型 HGF は, c-Met チロシンキナーゼ型受容体を特異的受容体とし細胞内シグナルを伝達する。一方, HGF のファミリー分子である HGF-like protein (HLP) も同様な α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーからなり, Ron チロシンキナーゼ型受容体を特異的受容体としている (図 1 B)。

III. 神経栄養因子としての HGF ファミリー分子

HGF の神経栄養作用については1995年に筆者

らの研究室において, *in vitro* で HGF がラットの海馬ニューロンに対する神経生存促進 (抗アポトーシス) 作用を有することを明らかにしたのを皮切りに⁵⁾, 大脳皮質ニューロン, 中脳ドーパミン作動性ニューロン, 運動ニューロン, 感覚ニューロン等の種々のニューロンに対して神経栄養活性を示すことが明らかとなっている⁷⁾。更に *in vivo* において, 発生過程での交感, 感覚および運動ニューロンに対して, また大脳皮質の層構造形成過程での大脳皮質ニューロンに対して突起伸長, 遊走促進, 生存促進作用が示されている^{6,13)}。一方, HLP については2001年に HLP の運動ニューロンおよび感覚ニューロンに対する神経生存促進および突起伸長作用がはじめて明らか

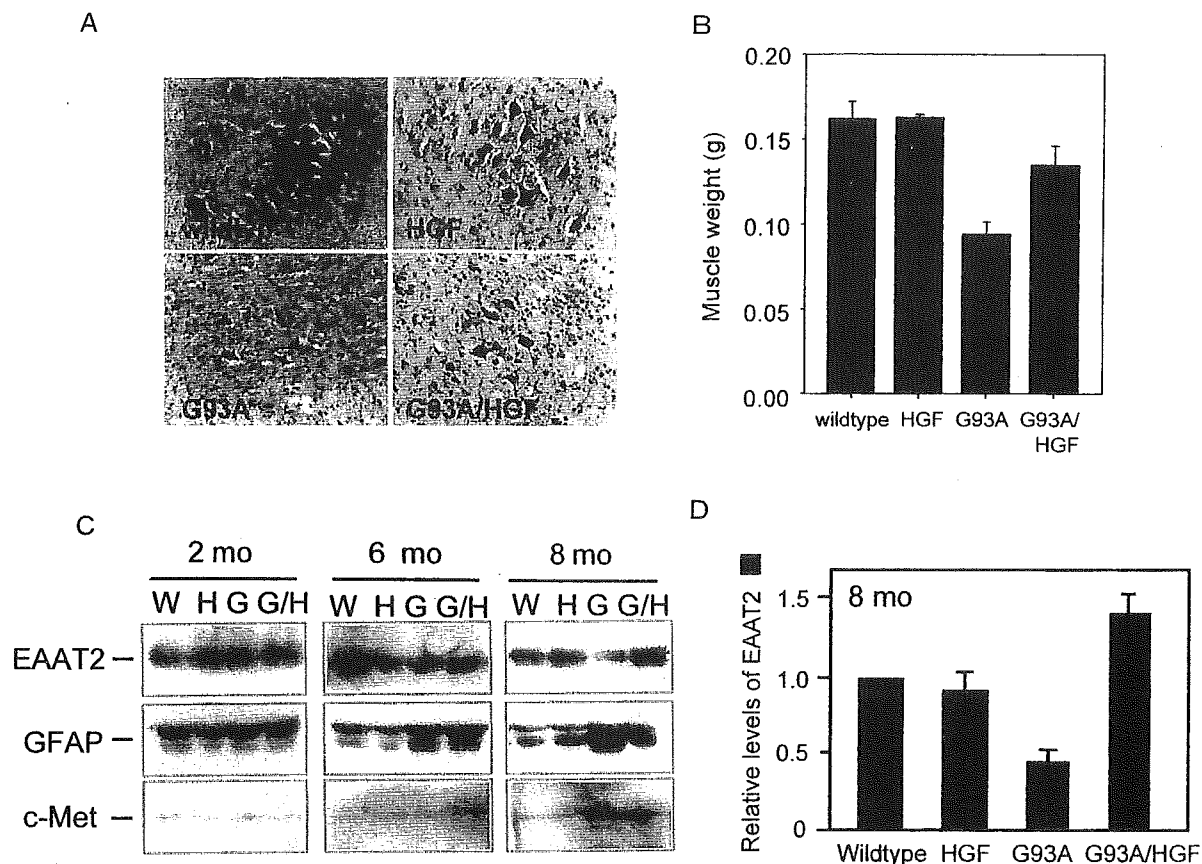


図2 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子 (SOD1) の Tg モデルマウス (G93A) に神経系特異的 HGF 発現 Tg マウスを掛け合わせたダブル Tg マウス (G93A/HGF) の解析

A: 生後 8 ヶ月目のそれぞれのマウスの lumbar spinal cord の ventral horn のクレジールバイオレット染色像, B: ひ腹筋組織の重量, C and D: 神経毒性を示すグルタミン酸トランスポーター (EAAT2) 蛋白質の定量的解析。ALS-Tg マウスでは運動ニューロン数が大幅に減少するが, ALS/HGF マウスではよく保たれており (A), 筋組織の重量も ALS/HGF マウスでは比較的保たれている (B)。ALS-Tg マウスに比して ALS/HGF マウスではアストロサイトのグリオシス (GFAP 蛋白質の発現) が抑制されており, グルタミン酸のスカベンジに寄与しているトランスポーターの発現が亢進しているのが認められる (C and D)。

とされた^{2,12)} (図 1 C)。注目すべきはこれらの神経の多くが難治性神経疾患に対する治療の標的神経細胞であることであり, HGF ファミリー分子の臨床応用への可能性が強く示唆される (表 1)。

IV. モデル動物を用いた神経再生因子としての機能解析

HGF の脳神経系疾患に対する治療を目指して, モデル動物を用いた *in vivo* における研究が行われており, その成果は HGF への期待をますます高めるものとなっている。特に現在のところ, HGF の臨床応用への実現の可能性が高いと考えられる脳虚血モデルに対する効果は多くの研究で

実証されている。虚血モデルについては次の項で詳しく述べるとして, この項ではまず筆者らの研究室で世界に先がけて示された, 難治性神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウスにおける HGF の病態進行遅延効果について述べたい。

筆者らは HGF の ALS の病態に対する効果を解析するにあたって, ALS のモデル動物としてヒトの ALS に類似した病態進行を示す, 家族性 ALS の原因変異遺伝子 (SOD-1) のトランスジェニック (Tg) マウス: G93A を用いた。これらのマウスの脳内に持続的に HGF 蛋白質を供給するために HGF 遺伝子を神経特異的に発現する

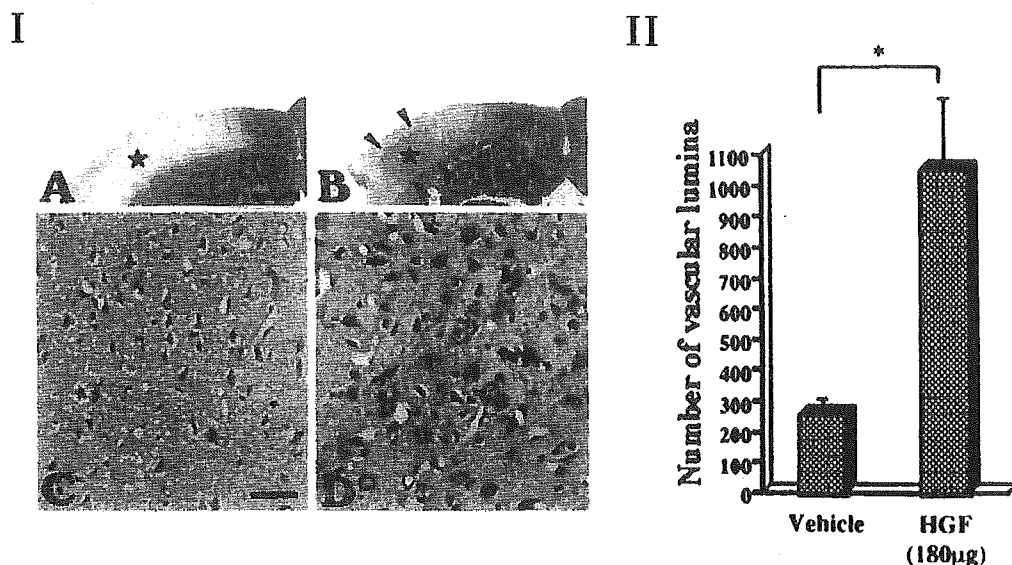


図3 ラット一過性脳虚血モデルにおける HGF リコンビナント蛋白質投与による神経細胞死抑制効果 (中大脳動脈 (MCA) および総頸動脈 (CCAs) 閉塞モデル)

I : MCA 支配領域の梗塞巣の HE 染色像, (A, C) コントロール群, (B, D) HGF 投与群。II : 梗塞巣における血管数。Vehicle 投与群では梗塞巣が明瞭で (I-A), 神経細胞死が MCA 支配領域全体にわたって認められる (I-C)。これに対して HGF 投与群では梗塞巣の境界が明瞭でなく救済された領域 (矢頭) が認められ (I-B), そこには生存神経細胞が多数認められる (I-D)。また, コントロール群に比して HGF 投与群では救済された領域に多くの新生血管が認められ, その全体数は約 4 倍になる (II)。

表1 HGF および HLP の標的神経細胞

HGF は大脳皮質, 海馬, 中脳ドーパミン作動性や運動ニューロンなど難治性神経疾患であるアルツハイマー病, パーキンソン病, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に重要なニューロンを標的細胞としている。

○: 神経栄養作用を認めるもの, N.D.: not determined, #: 他の神経栄養因子との強調作用が認められるもの, *: 極微量の他の神経栄養因子存在下で強い神経栄養作用を示すもの。

標的神経細胞	HGF	HLP
大脳皮質ニューロン	○	N.D.
海馬ニューロン	○	N.D.
中脳ドーパミン作動性ニューロン	○	N.D.
小脳顆粒細胞	○	N.D.
運動ニューロン	○#	○
感覚ニューロン	○*	○*
交感ニューロン	○*	N.D.
交感神経芽細胞	○	N.D.
副交感ニューロン	○*	N.D.

Tg マウスを作成し, ALS-Tg マウス (G93A) と HGF-Tg マウスを交配させたダブル Tg マウス (G93A/HGF) の解析を行った。その結果, 神経特異的な HGF の遺伝子供給により ALS-Tg マウスの運動ニューロン死がよく阻止され (図 2 A), 筋組織の萎縮および運動機能の発症の時期を遅らせることができ (図 2 B), 結果として寿命が延びることが明らかとなった。組織的には HGF により運動ニューロンの変性に伴って誘導されるアストロサイトのグリオシスが抑制されることが認められた。更に, 神経毒性活性を示すグルタミン酸に対するスカベンジャーとして機能するグルタミン酸トランスポーター (EAAT 2) の発現が ALS-Tg ではグリオシスに伴い減少していくが, この発現が HGF によって回復することが明らかとなった¹⁴⁾ (図 2 C, D)。

これらのことから HGF は, これまでの研究からも推察されるような運動ニューロンに対する直接的な機能亢進および生存促進 (抗アポトーシ

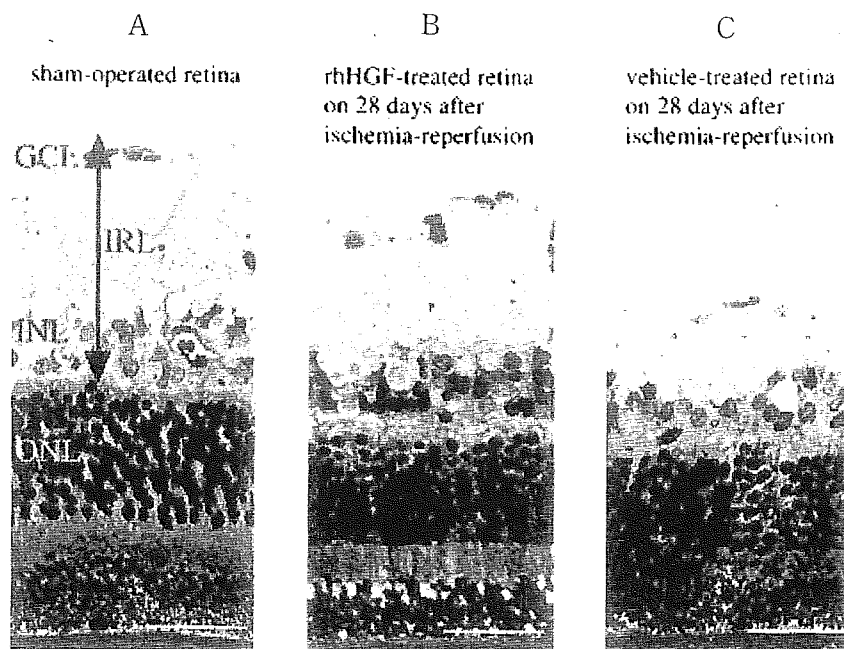


図4 ラットの網膜虚血再還流モデルにおけるリコンビナント HGF 蛋白質処理による網膜の層構造維持効果

再環流後28日目の網膜縦断面のトルイジンブルー染色像。A: シャム手術群, B: リコンビナント HGF 処理群, C: Vehicle 処理群。HGF 処理群では Vehicle 処理群に比して, inner retinal layers (IRL) の細胞死が抑制され構造が比較的良好に維持されている。

GCL: 神経節細胞層, INL: 内顆粒層, ONL: 外顆粒層

ス) 効果に加え, アストロサイトなどの神経組織を構成する他の細胞群にも働きかけ, 機能的な組織環境の修復, 再生に働くことが考えられる。この様な HGF の機序は ALS に限らずアルツハイマー病やパーキンソン病などの他の神経変性疾患に対しての HGF の効果を期待させるものである。

V. HGF を用いた神経疾患の治療的研究

これまで述べてきたように, *in vitro* において HGF は種々の神経細胞に対して機能および生存促進活性を有することから (表 1), 様々な神経疾患に対する治療への応用が期待されるが, 中でも虚血に伴う梗塞, 遅発性神経障害に対しては方法もより洗練され現実的なものとなってきた。この項では最近の研究の成果を紹介したい。

1. リコンビナント蛋白質投与方法

1) 一過性脳虚血モデル

ラットの中脳動脈 (MCA) および総頸動脈 (CCAs) を 2 時間結紮することにより一過性脳虚血モデルを作成し, 右側脳室へミニポンプを用いて Vehicle あるいはヒトリコンビナント HGF (hrHGF) を 24 時間持続的に供給した。再環流後 72 時間における脳組織の観察の結果, Vehicle 投与群では大脳皮質の MCA 支配領域に明瞭な梗塞巣の形成が認められるのに対して (図 3I-A, C), HGF 投与群では梗塞巣の境界が明瞭ではなく, 救済された領域が認められる (図 3I-B, D)。また HGF 投与群では同領域に多数の新生血管が認められ, Vehicle 投与群と比べてその全体数は約 4 倍になる¹⁵⁾ (図 3 II)。この結果から HGF の神経生存促進作用と血管新生作用が共に梗塞巣における神経細胞死を抑制しているものと考えられ, HGF の多様な機能が複合的に組織の再生に寄与していることが示唆される。

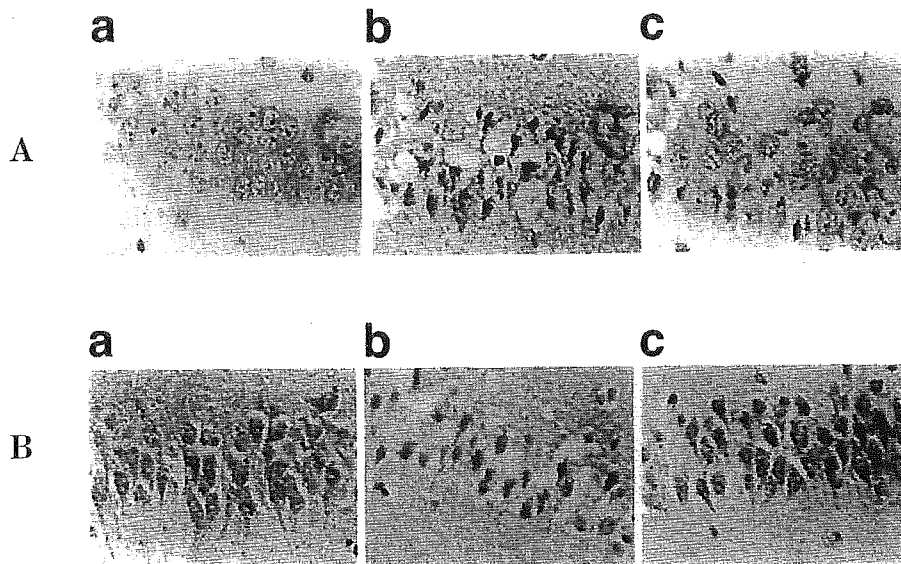


図5 スナネズミ一過性脳虚血モデルにおけるHVJリポソームを用いたHGF遺伝子導入による海馬CA1領域の遅発性神経細胞死抑制効果
 A:一過性前脳虚血7日目のTUNEL染色像, B:虚血4日目のBax蛋白質の免疫染色像。(a) シャム手術群, (b) コントロールベクター導入群, (c) ヒトHGF遺伝子導入群。遺伝子導入は術後5分後に実施。コントロール群に比べてHGF遺伝子導入群では神経細胞死が抑制されており(A), 核移行によりアポトーシスを誘導するBax蛋白質が細胞質内に維持されているのが認められる(B)。

2) 網膜虚血障害モデル

眼球内への生理食塩水注入により45分間、眼内圧を110mm Hgまで上昇させ網膜虚血を誘起したラット網膜に、血液再環流1分後、6μgのhrHGFを眼内投与し、経時的にVehicle投与群と比較した。Vehicle投与群では虚血障害によりHGF, c-MetのmRNAおよび蛋白質共に再環流から約6時間から発現上昇が認められ、12時間後に一度低下した後、24時間後に再び上昇する。c-Met蛋白質は網膜の遅発性神経細胞死に伴って6時間後にはinner retinal layers (IRL)の神経節細胞層(GCL)に、24時間後には内顆粒層(INL)において発現が上昇してくる。これに比してHGF投与群ではGCLやINLの細胞死が抑制されており、網膜のIRLの層構造および神経機能がよく保たれることが明らかとなった¹¹⁾(図4)。糖尿病性網膜症患者を含め多くの網膜障害の病態機構が神経細胞のアポトーシスによることが明らかとなっていることから、HGFを用い

た治療法の効果が期待される。

2. 遺伝子治療法

HGFが海馬ニューロンに対して神経生存促進作用を示すことは、*in vitro*および一過性脳虚血モデルにおいて既にリコンビナント蛋白質を用いた解析で明らかとされているが⁷⁾、ここではHVJリポソームを用いた遺伝子導入法における成果を紹介する。

スナネズミの両側の頸動脈を5分間結紮することで一過性脳虚血モデルを作成し、術後コントロールベクター、ヒトHGFベクターをリポソーム法により、くも膜下腔(大層)にステレオタキシックに注入した。β-ガラクトシダーゼ遺伝子を用いた解析から、この方法により遺伝子導入後約6時間後にはβ-ガラクトシダーゼ陽性細胞を認め、導入後7日目には大脳皮質細胞、海馬、脈絡膜叢において強く認められる。遺伝子導入後7日目の海馬CA1領域における神経細胞死を

TUNEL法で同定したところ、コントロール群に比べて、HGF遺伝子導入群では神経細胞死がよく抑えられていることが確認された(図5A)。また、遺伝子導入後4日目のBax蛋白質の免疫染色像から、核移行により細胞にアポトーシスを誘導すると考えられているBax蛋白質の局在が、コントロール群では虚血により多くが核に移行するのが認められるのに対して、HGF遺伝子導入群では虚血後もBax蛋白質が細胞質内に留まっているのが確認された⁴⁾(図5B)。このことから脳虚血により誘発される遅発性神経細胞死がHGF遺伝子の導入により阻止されること、その機序の一つがHGFの有する神経生存促進作用によるものであることが示唆された。

おわりに

以上、最近の研究の知見を基にHGFファミリー分子の神経再生因子としての分子機序および臨床応用の可能性について述べてきた。先にも述べたが *in vitro* において明らかとされているHGFファミリー分子による種々の神経細胞に対する活性は、*in vivo* においてもその効果が実証されつつある。

実際、HGFおよびその受容体であるc-Met蛋白質は、様々な神経疾患モデルにおいて、組織の異常に伴って局所的な発現が亢進してくることが認められている。特にc-Met蛋白質は神経細胞においても発現亢進が認められることから、外来的にHGFを供給することで損傷あるいは変性神経細胞の生存を促進しつつ機能を維持し、かつアストロサイトや血管内皮細胞等の周囲の細胞群に働きかけ組織を修復・再生に向かわせるという、神経再生の「トータルコーディネーター」として神経組織全体の機能維持および組織改変に働く機構が想起される。このようなHGFの作用機構は、本稿でも紹介した筋萎縮性側索硬化症(ALS)はもちろん、アルツハイマー病やパーキンソン病などの難治性神経変性疾患の治療への応用も期待できるものと考えている。

文 献

- 1) 船越洋, 松本邦夫, 中村敏一: 神経栄養因子研究の新しい展開; HGFの神経疾患治療への展望. 神経研究の進歩, 44: 414-421, 2000.
- 2) 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.
- 3) Funakoshi, H., Nakamura, T.: Hepatocyte growth factor (HGF): from diagnosis to clinical application. Clin. Chim. Acta, 2002. in press.
- 4) Hayashi, K. et al.: Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor: in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons. Gene Therapy, 8: 1167-1173, 2001.
- 5) Honda, S. et al.: Localization and functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain: implication as neurotrophic factor. Mol. Brain Res., 32: 197-210, 1995.
- 6) Maina, F. et al.: Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. Nat. Neurosci., 2: 213-217, 1999.
- 7) Miyazawa, T. et al.: Protection of hippocampal neurons from ischemia-induced delayed neuronal death by hepatocyte growth factor: a novel neurotrophic factor. J. Cereb. Blood Flow Metab., 18: 345-348, 1998.
- 8) Nakamura, T. et al.: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. Nature, 342: 440-443, 1989.
- 9) 中村敏一, 監修: HGFの分子医学. メディカルレビュー社, 東京, 2000. 荻原俊男
- 10) 中村敏一: 再生医学におけるHGFの意義. 炎症・再生, 22: 29-37, 2002.
- 11) Shibuki, H. et al.: Expression and neuroprotective effect of hepatocyte growth factor in retinal ischemia-reperfusion injury. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 43: 528-536, 2001.
- 12) Stella, M.C. et al.: Macrophage stimulating protein is a novel neurotrophic factor. Mol. Biol. Cell, 12: 1341-1352, 2001.
- 13) Sun, W., Funakoshi, H., Nakamura, T.: Localization and functional role of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-met in the rat developing cerebral cortex. Mol. Brain Res., 103: 36-48, 2002.
- 14) Sun, W., Funakoshi, H., Nakamura, T.:

Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a trans-genic mouse model of ALS. *J. Neurosci.*, 2002.in press.

reduces the infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurol. Res.*, 23:417-424, 2001.

15) Tsuzuki, N. et al.: Hepatocyte growth factor

(資料 2.)

平成16年度

総括研究報告書

研究成果の刊行に関する一覧表およびその刊行物

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

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

主任研究者 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野 教授

分担研究者

谷口直之（大阪大学大学院医学系研究科
生化学）

中川原 章（千葉県がんセンター生化学
研究部）

船越 洋（大阪大学大学院医学系研究科
分子組織再生学分野）

青木正志（東北大学病院神経内科）

に ALS トランスジェニック (Tg) マウスに有用であることが示され、ALS の新規の治療薬として注目されている。今までの HGF を用いた治療実験では、本研究グループで開発された ALS Tg ラットに対して髄腔内投与にて明らかな延命効果を認めてきている。運動ニューロンの選択的細胞死のメカニズムと HGF の有効性の機序を解明しつつ HGF を用いた ALS の新規治療法を確立していきたい。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は病因不明の進行性の難治性神経筋疾患である。運動ニューロンの選択的な細胞死が惹起されて、全身の筋萎縮と脱力が進行し、最終的には呼吸筋の麻痺をきたす極めて予後不良な疾患であり、未だ筋萎縮の進行を止める有効な治療法が確立していない。世界的にも ALS に対する新たな治療法が切望されているが、国内外での臨床治験の結果は絶望的なものと云わざるをえない。本研究の目的はこの神経難病 ALS に対して挑戦的な治療法の開発と確立をめざすことである。

日本で発見された新規の神経栄養因子である肝細胞増殖因子 (HGF) は遺伝子工学的

B. 研究方法

ALS の病因と病態は不明であるが、家族性 ALS の病因遺伝子 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) の関与が最も重要なものと考えられる。本研究グループは変異 SOD1 導入 ALS モデルのなかでも従来のマウスに較べてより大型の ALS ラットを用いて HGF の髄腔内投与治療実験を完成させ、早期に臨床応用にもってゆくことを目的としている。

その為に、①新規治療法開発の基盤となる ALS Tg ラットにおける神経細胞死の機序の解明、②ALS ラットに対する HGF の髄腔内投与実験の完成と HGF の運動ニューロン死抑制機序の解明の研究、③HGF を用いた将来的

な ALS 治療として再生医療や遺伝子治療の可能性の研究を行う。

1) 新規治療法開発の基盤となる ALS Tg ラットにおける神経細胞死の機序解明

①変異 SOD1 は生体内で構造変化を起こし神経細胞傷害を示すことが考えられている。この細胞傷害の機序を解析する為に神経芽細胞 Neuro 2a (N2a) に野生株 (WT) および変異型 SOD1 (G37R、G93A) を高発現させて細胞周期の検討と細胞骨格の変化の検討を行なった。

今まで、神経芽種の cDNA ライブラリーより神経組織特異的に発現する新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 を同定してきている。この NEDL1 は正常な SOD1 とは結合せず変異 SOD1 と結合し、ユビキチン化による分解を引き起こす一方、強固な結合体を形成し、細胞内封入体に沈着することを確かめてきている。また NEDL1 は Wnt 細胞内情報伝達系の重要な制限因子である Dishevelled-1 (Dvl-1) をユビキチン化の基質とし細胞傷害を引き起こす可能性も考えられている。細胞死における NEDL1 の関与を検討する目的で培養細胞に NEDL1 の発現ベクターを遺伝子導入して colony formation assay を行った。又、培養細胞に SOD1 変異体 (A4V) を導入し免疫沈降法などで結合物質を検討した。

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

次世代の ALS 治療薬として注目されている HGF の臨床応用を目指して ALS ラットに対する HGF の髄腔内投与実験を行なった。G93A Tg ラットの髄腔内にヒトリコンビナント HGF (hr HGF) を浸透圧ポンプ (Alzet Model 2004) を用いて発症前の 100 日齢から持続投

与して、発症の遅延と運動ニューロン死の抑制を認めてきた。今回は ALS 患者に対する臨床応用を目指して、hr HGF を発症期にあたる 115 日齢から ALS ラットの髄腔内に投与し、病態の進行抑制の有無とその作用機序を検討した。

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

HGF を用いた再生医療の開発を目的に ALS ラットにおける内在性神経前駆細胞の HGF に対する反応性の解析を開始した。ALS Tg ラット脊髄では運動ニューロン脱落前からグリア細胞新生 (gliogenesis) が認められるとともに、発症後期から末期に至って未分化な神経前駆細胞が増殖していることを確認している。今回、Tg ラット髄腔内に HGF を投与することで、内在性神経前駆細胞の賦活を試みた。

HGF の ALS モデルラットへの臨床的な有効性は示されているが、将来的に ALS 治療として確立する為には髄腔内投与に勝る方法で HGF を安定した量で脊髄の広範囲にわたって発現する必要がある。この目的で HGF 発現遺伝子治療ベクターをアデノ随伴ウイルスベクター (AAV2、AAV4、AAV5) および複製能欠失型単純ヘルペス I 型ウイルスベクター (HSV1) で脊髄での HGF 発現蛋白量を検討した。

C. 及び D. 研究結果及び考察

1) 新規治療法開発の基盤となる ALS Tg ラットにおける神経細胞死の機序解明

①変異 SOD1 高発現の N2a 細胞を作製した結果、変異 SOD1 高発現細胞では、cell growth の遅れがあり、その原因として G2/M 期の遅延が認められた。G2/M 期の遅延には細胞骨

格の異常が考えられるため、細胞骨格系タンパクの免疫染色を行ったところ、ファロイジンによるアクチンの染色が低下しており、アクチン骨格に異常が生じていることが確認された。また、抗 SOD1 抗体による免疫沈降後に二次元電気泳動を行ったところ、変異型 SOD1 細胞抽出液には野生型には認められない、いくつかのスポットが認められ、そのスポットの一つはアクチンであることが確認された。以上の結果より、変異 SOD1 はアクチンとの結合により細胞骨格に異常をもたらしている可能性があり、それに伴い G2/M 期の遅延が起きている可能性が考えられた。

②NEDL1 が細胞増殖あるいはアポトーシスにどのようなファンクションを担うかを調べるため、培養細胞に NEDL1 を過剰発現させて colony formation assay を行った。その結果、NEDL1 の過剰発現により colony 形成の数はコントロールと比べ有意に減少した。さらに、*in situ* TUNEL assay により、NEDL1 を過剰に発現した細胞では、TUNEL 陽性細胞の比率がコントロールに比し有意に高くなることが判明した。また、新たにクローニングした NEDL2 は、Dv1-1 をユビキチン化による分解のターゲットにしていたが、変異型 SOD1 をユビキチン化する機能はほとんどなかった。これらから NEDL1 を含む HECT 型ユビキチンリガーゼは、ターゲットとしての変異型 SOD1 および Dv1-1 に対し redundancy と specificity を有しているものと考えられた。

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

これまで ALS ラットに対する hr HGF の発症前のタイミングで髄腔内持続投与を行い、発症遅延の効果を得てきた。今回は発症期か

らの HGF を髄腔内に投与することによって、発症から死亡までの平均罹病期間が延長するか否かを調べた。その結果、HGF 投与群が 27.5 ± 11.1 日間、対照群が 16.9 ± 8.17 日間と HGF 投与群が 62.7% の罹病期間の増大を示し ALS ラットの死亡遅延が確認され、今後の臨床への応用が期待される。

HGF 投与による病態進行抑制の機序として、caspase cascade の主な実行因子とされている caspase-3、9 の抑制効果を認めたことから caspase cascade、またはその上流の細胞死機序を抑制することが示唆された。また、EAAT2 が発現増加し XIAP が保持されたことから、細胞保護機能の維持・増強が示され、またアストロサイトなどの神経細胞以外の神経組織構成細胞にも HGF が作用することが示された。

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

ALS ラット脊髄における未分化な神経前駆細胞の増殖は、ALS が進行した発症後期から末期になり認められはじめる。これらの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、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。現在、HGF により賦活された細胞群の形質と局在について検討中であるが、将来的に HGF をはじめとした外来性再生誘導因子の投与が新しい治療法開発につながる可能性がある。

ALS の遺伝子治療のベクターとして検討しているアデノ随伴ウイルスベクター (AAV2 と AAV4) と HSV1 は、直接脊髄中にベクターを投与すると注入近傍の大型運動ニューロンに発現がみられた。また、髄腔内への投与においては広範囲の脊髄レベルにおいても

発現細胞が認められた。これらの投与系にて HGF 発現ウイルスベクター投与による HGF 蛋白レベルを測定すると、内因性 HGF レベルの 3~5 倍に上昇することが脊髄注入実験で認められた。さらに期待されることは、髄腔内投与実験においては広範囲の脊髄においても HGF 蛋白が発現することが確かめられ将来的に ALS の治療に適切な方法と考えられた。

E. 結論

本研究の目的は苛酷な神経難病である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する次世代の新規治療薬として期待される肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた挑戦的治療法の開発とそれに関わる基盤研究を進めることにある。ALS の病因として最も重要視されている変異 SOD1 による選択的運動ニューロン死のメカニズムはまだ十分明らかにされていないが、変異 SOD1 タンパクは細胞骨格タンパクであるアクチンや新規ユビキチンリガーゼの NEDL1 と結合しながら細胞の機能を変化させ最終的には細胞死にいたらせるものと考えられる。いずれにしろ現状では ALS の新規治療薬の開発には HGF が極めて重要であり、今回の治療実験において ALS 発症後からの HGF の髄腔内投与にても明らかな延命効果が認められた。この事実は今後の ALS の HGF 治療の臨床応用について大きなステップと考えられる。また、その有効性の機序としては caspase 3、9 の抑制やアストロサイトでの EAAT2 の保持が関与することも明らかとなった。将来的な ALS の HGF 治療の新たな投与方法の研究においては、HGF 遺伝子を組み込んだアデノウイルス随伴ベクターや HSV1 ベクターを髄腔内に 1 回投与することにより脊

髄内の運動ニューロンに HGF を発現することが動物実験で示され、将来的な ALS に対する HGF の治療に希望を与える結果である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) Takamiya R, Takahashi M, Park Y.S, Tawara Y, Fujiwara N, Miyamoto Y, Gu J, Suzuki K, Taniguchi N. Overexpression of mutated Cu, Zn-SOD in neuroblastoma cells results in cytoskeletal change. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:253-259, 2005
- 3) Fujiwara N, Miyamoto Y, Ogasahara K, Takahashi M, Ikegami T, Takamiya R, Suzuki K, Taniguchi N. Different immunoreactivity against monoclonal antibodies between wild-type and mutant Copper/Zinc superoxide dismutase linked to amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 280:5061-5070, 2005
- 4) Kato S, Saeki Y, Aoki M, Nagai M, Ishigaki A, Itoyama Y, Kato M, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E. Histological evidence of redox system breakdown caused

by superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation is common to SOD1-mutated motor neurons in humans and animal models. Acta Neuropathol 107: 149-158, 2004

5) Oshima K, Shimamura M, Mizuno S, Tamai K, Doi K, Morishita R, Nakamura T, Kubo T, Kaneda Y. Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats. FASEB J 18(1):212-214, 2004.

6) 船越 洋、中村 敏一、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。神経治療学 Vol.20 No.5: 533-540, 2003

2. 学会発表

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.)

H. 知的財産の出願・登録状況

ラットを用いた ALS モデル (出願済)