

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・治療法に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 祖 父 江 元
(名古屋大学大学院医学系研究科教授)

平成 18 (2006) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・治療法に関する研究	祖父江 元・・・ 1
II. 研究報告（分担研究者）	
1. 古細菌プロテアソームによる家族性 ALS 治療の試み	祖父江 元・・・ 7
2. 外来性再生誘導因子の複合投与による ALS ラットモデル 神経前駆細胞賦活の試み	糸山 泰人・・・ 10
3. ES 細胞を用いた運動ニューロンの再生	岡野 栄之・・・ 14
4. ALS における RNA 編集異常の検討	郭 伸・・・ 18
5. SOD1 凝集体の軸索内移動	高橋 良輔・・・ 22
6. オートファジーによる運動ニューロン疾患の治療法の開発	田中 啓二・・・ 24
7. AAV8 ベクターによる遺伝子導入の特性	中野 今治・・・ 29
8. HGF は ALS 運動ニューロンに効率よくシグナル伝達する -c-Met 受容体側の調節を介したシグナル調節-	船越 洋・・・ 32
III. 研究報告（研究協力者）	
9. ラット脊髄への幹細胞移植の試み	阿部 康二・・・ 35
10. レドックスシステムに立脚した ALS ストレスによる 細胞死回避に関する基盤研究	加藤 信介・・・ 37
11. 家族性筋萎縮性側索硬化症の細胞モデルにおける 分子シャペロン Mrj が及ぼす変異型 SOD1 の可溶性変化	小山 信吾・・・ 42
12. 脊髄スライス培養に対する骨髄間質細胞の効果	菊地 誠志・・・ 44
13. システイン残基を介した変異 SOD1 の毒性発現機構の解析	佐古田三郎・・・ 47
14. ヒト Cu/Zn-SOD の安定性に関与する Cys111 に関する研究	谷口 直之・・・ 50
15. 神経細胞のポリオウイルス抵抗性	野本 明男・・・ 53
16. siRNA 過剰発現による SOD1 ノックダウンマウスを用いた 筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療	水澤 英洋・・・ 56
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	59
V. 班会議プログラム	73
VI. 研究者一覧	79
VII. 研究成果の刊行物・別刷（別冊）	

I. 総括研究報告

筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・治療法に関する研究

主任研究者 祖父江 元

名古屋大学大学院医学系研究科細胞情報医学専攻
脳神経病態制御学講座神経内科学分野教授

研究要旨：筋萎縮性側索硬化症（ALS）を克服するため、基礎・臨床を問わず ALS 関連の研究者を結集し、集約的な研究を推進していく体制を構築することにより、本症の病態機序に基づくトランスレーショナル治療開発研究を推進する。本研究の目標は新規治療の開発、治療手段の開発、そして病態に関連する新規標的分子の探索同定であり、三者を有機的に結合させることによって成果の生産性を向上させ、本研究の早期目的達成を図る。

【ALS 新規治療法の開発】 1.HGF は XIAP 誘導により caspase 群の活性化およびグリオシスを抑制することが示された。2.変異 SOD1 特異的 E3 である Dorfin と CHIP との融合分子の開発に成功、その効果の検証に着手するとともに、より強力な古細菌プロテアソームを哺乳動物由来の細胞に発現させることにも成功、ALS 治療への応用が期待される。3.外来性再生誘導因子である EGF および FGF-2 を ALS モデルラットの髄腔内複合投与することにより脊髄内在性神経前駆細胞の腑活に成功した。4.siRNA に関しては、変異 SOD1-KO マウスの作成に成功、このマウスでは罹病期間が2倍以上に延長され、有意な延命効果が認められたことから、siRNA による画期的 ALS 治療の可能性が見いだされた。5.ES 細胞から運動ニューロンとその前駆細胞を生み出すニューロスフェアを誘導する培養法の開発に成功した。また ALS モデルラットを用いて脊髄への移植、生着誘導方法の開発に着手した。6.骨髄間質細胞と脊髄スライスの共培養実験では、骨髄間質細胞は損傷脊髄におけるグリオシスを抑制、これが内因性神経幹細胞を活性化できる可能性があることも突き止め、幹細胞を標的とした画期的治療にとって重要な知見と考えられる。

【ALS 治療手段の開発】 1.治療薬デリバリーシステムの確立については、AAV8 ベクターの静脈内投与による脳脊髄選択的遺伝子導入に向け全身臓器への拡散防止の改良中である。2.ポリオウイルスについては、神経毒性がキャプシド蛋白による可能性を突き止め、外来 mRNA の発現効率低下の問題が解消された。

【ALS 病態・新規標的分子の探索・同定】 1.変異 SOD1 の分子安定性を基盤にした新たな ALS 治療の可能性が示された。2.新たな分子シャペロン Mj1 に HSP70 と同等の変異 SOD1 凝集抑制効果が見いだされた。3.レドックスシステム基幹酵素 PrxI,II の大量調整に成功しており、ALS 治療応用に期待がかかる。4.オートファジー破綻がユビキチン化された分子を含む封入体を伴った神経細胞死が導かれることを世界で初めて明らかにした。5.SOD1 凝集体の軸索内移動は前根特異的に順行性に移動し、病期の進行とともに末梢にも出現して神経細胞毒性に関与する可能性を明らかにした。6.孤発性 ALS に特異的な運動ニューロンの GluR2 サブユニット Q/R 部位 RNA 編集低下が ADAR2 活性低下によるものであることが確認され、ADAR2 を標的分子とした孤発性 ALS に対する画期的治療法開発の可能性が期待される。

分担研究者

糸山 泰人	東北大学大学院医学系研究科 神経学講座神経内科学分野教授
岡野 栄之	慶応義塾大学医学部 生理学講座教授
郭 伸	東京大学大学院医学系研究科 臨床神経精神医学講座 神経内科学分野助教授
高橋 良輔	京都大学大学院医学研究科 脳病態生理学講座 臨床神経学分野教授
田中 啓二	東京都臨床医学総合研究所 先端医学センター所長
中野 今治	自治医科大学内科学講座 神経内科学部門教授
船越 洋	大阪大学大学院医学系研究科 組織再生医学講座 分子組織再生分野助教授

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動ニューロンの選択的細胞変性死によって発症後 3～5 年で死に至る神経難病である。ALS に対する有効な治療法は未だ確立しておらず、患者本人のみならず家族や社会にも重大な苦痛と損失を伴う疾患であり、一刻も早い克服が望まれている。本疾患の進行を阻止し有効な治療法の開発に結びつけるためには、基礎・臨床を問わず ALS 研究者を結集し、集約的な研究を推進していく体制を構築する必要がある。我々がこれまで集積してきた本症に関わる病態研究の成果は、変異 SOD1 による運動ニューロン死の病態解明、孤発性 ALS におけるグルタミン酸受容体機構の変異の解明、HGF、Dorfin、シャペロンなど神経細胞死抑制作用を持つ新規薬剤候補分子の開発、新規の ALS モデル動物の作出と病態解析、ES 細胞を用いた運動ニューロン再生治療法の模索、薬剤デリバリーシステムの開発、新たな治療薬発見のための薬剤スクリーニング

システムの開発など広範にわたっており、今や ALS 治療研究に向けたトランスレーショナルリサーチへの展開を期待できる段階に到達していると考えられる。本研究班の目的は、ALS の病態に基づく治療法の開発に向けて、ALS の病態を担う病態関連分子を探索・同定し、これを分子標的として有効な分子標的治療を開発することである。病態関連分子の同定は本症の分子マーカーの開発や、有効な診断法の開発にもつながるものである。一方では分子標的治療を具体化するための手段の開発を併せ行う必要があるが、この点でも我々は重要ないくつかの成果を挙げて来ている。さらにもう 1 つの本研究班の目的は孤発性 ALS の病態解明とそれに基づく標的分子の開発とさらには有効な治療法への道を探ることである。

B. 研究方法

本年度は研究内容をサブセクション毎に主任および分担研究者の各テーマに沿った独自の研究を進展させつつ情報交換を密に行って、研究組織としての有機的協力体制を強化した。さらに ALS 治療薬開発バイオマーカーの開発に向けた共同研究を継続的に推進する。

1、ALS 新規治療法の開発

<新規 ALS 候補標的分子の治療薬としての有効性検証>

本研究では、強力な神経栄養因子である HGF および EGF および FGF-2 などの再生誘導因子群の髄注あるいは遺伝子治療による ALS 治療効果および安全性を検討した。また新規治療薬候補分子である Dorfin による ALS 治療効果を検討するとともに、Dorfin-CHIP 融合分子あるいは古細菌プロテアソーム系を用いた変異 SOD1 分解促進剤開発の可能性を検証した。

さらに近年注目されている siRNA を用いた ALS の画期的治療法開発に向けて、SOD1 mRNA に対する siRNA を導入したマウスと ALS マウスとの交配実験を行い、siRNA の治療有用性を検証した。

<再生医療に基づくALS治療法開発>

本研究では、マウスES細胞を用いて運動ニューロン前駆細胞を生み出すニューロスフェアの誘導する培養法を確立し、ALS病態解析あるいは薬剤スクリーニングに応用するとともに、モデル動物脊髄への移植を試みた。

一方、細胞療法としての骨髄間質細胞に注目し、脊髄スライス培養を用いて本細胞の脊髄保護効果について検討した。

2、治療手段の開発：薬剤体内デリバリーシステム開発および投与方法改良

本研究では、治療薬デリバリー担体としてアデノ随伴ウイルスベクター（AAV8）およびポリオウイルスベクター（PV）に注目し、ALS治療応用に向けた改良を推進している。AAV8についてはGDNFの発現をトレーサーとして遺伝子導入特性を検討するとともに、静脈内投与による脳選択的遺伝子導入の可能性を検討した。またPVについては運動ニューロンに対する毒性発現現象を解析することにより治療応用に耐えうる至適PVを模索した。

3、病態に関連する新規標的分子等の探索

本研究では、家族性ALSならびに孤発性ALSの病態解明にも力点を置き、画期的治療法に向けた新たな標的分子の同定を目的に掲げている。その重要な足がかりとして、変異SOD1の分子安定性および毒性発現、SOD1凝集体軸索輸送、分子シャペロン、細胞内レドックスシステム、オートファジー、そして孤発性ALS特異的な病態であるGluR2 RNA編集低下およびその触媒分子ADAR2の機能に着目してこれらに関する解析データを集約した。

以上の研究ラインを円滑に稼働させて検証した各ALS候補治療薬について、臨床応用に向けた具体的方向性を打ち出すとともに、トランスレーションリサーチへの展開を目指す。

（倫理面への配慮）

採取した剖検組織等については、遺伝子解析を

含む医学研究への利用についてのインフォームド・コンセントを患者および患者家族より得た。剖検組織等のヒト由来試料を用いる研究については名古屋大学をはじめ、各分担研究者が所属する研究施設の倫理委員会から承認を得た。組み換えDNA実験を行う際には、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」ならびに「研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」および、「研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令の規程に基づき認定宿主ベクター系等を定める告示」に従った、名古屋大学をはじめとする各分担研究者が所属する研究施設での組み換えDNA実験規程に則って行った。また実験動物の取り扱いについては、カルタヘナ条約および、名古屋大学ならびに各分担研究者が所属する研究施設の動物実験指針に基づき、PIAレベルの実験室において動物の苦痛の除去、軽減に留意しつつ実験を行った。ヒトES細胞の使用については、文部科学省の「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針に基づき、平成14年11月7日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認されている。

C. 研究結果と考察

1. ALS 新規治療法の開発

HGFの神経細胞変性抑制メカニズムはXIAPを強力に誘導することによりcaspase群の活性化を抑制するとともにグリオーシス抑制にも働くことを突き止め、HGFがより有効なALS治療薬となることが示された。

変異SOD1特異的E3であるDorfinの有効性を高めるためCHIPとの融合分子の開発に成功、その効果の検証に着手するとともに、より強力な古細菌プロテアソームを哺乳動物由来の細胞に発現させることにも成功し、ALS治療への応用に進めていく予定である。

外来性再生誘導因子である EGF および FGF-2 を ALS モデルラットの髄腔内に複合投与することによって、脊髄内在性神経前駆細胞の臍活に成功、再生誘導をターゲットにした新たな治療法の確立に邁進している。

siRNA に関しては、SOD1 mRNA に対する siRNA を導入した Tg マウスと ALS モデルマウスとの wTg マウス、すなわち SOD1-KO マウスの作成に成功、このマウスでは罹病期間が2倍以上に延長され、有意な延命効果が認められたことから、siRNA による画期的 ALS 治療の可能性が見いだされた。

さらに ES 細胞から運動ニューロンとその前駆細胞を生み出すニューロスフェアを誘導する培養法の開発に成功した。またその一方では、ALS モデルラットを用いて脊髄への移植、生着誘導方法の開発に着手した。

また骨髄間質細胞と脊髄スライスの共培養実験では、骨髄間質細胞は損傷脊髄におけるグリオシスを抑制、これが内因性神経幹細胞を活性化できる可能性があることもつきとめており、幹細胞を標的とした画期的治療にとって重要な知見と考えられる。

2. ALS 治療手段の開発

治療薬デリバリーシステムの確立については、GDNF を組み込んだ AAV8 ベクターを比較的簡便な静脈内投与によって脳脊髄選択的な遺伝子導入が可能かどうかを検証したところ、肝をはじめとして全身臓器への拡散が認められた。従って全身臓器への拡散を防止するためのベクター改良が次の検討課題となった。

またポリオウイルスを応用した安全なドラッグデリバリーシステムの開発に関しては、神経毒性がキャプシド蛋白による可能性を突き止め、この領域を欠損させた改良ベクターでは 2A プロテアーゼの発現下でも神経細胞変性を来さず、従って外来 mRNA、すなわち治療薬としての分子の発現効率低下の問題が解消された。

3. ALS 病態・新規標的分子の探索・同定

変異 SOD1 自体を治療ターゲットとした研究で

は、Cys111 の銅親和性および SH 基の酸化修飾による分子安定性を基盤にした新たな ALS 治療の可能性を模索している。

一方、新たな分子シャペロン Mrj に HSP70 と同等の変異 SOD1 凝集抑制効果が見いだされており、分子シャペロン治療に新たな候補が加わった。また神経細胞死回避機構による ALS 治療の領域ではレドックスシステム基幹酵素 PrxII の大量調整に成功しており、今後に期待がかかる。

オートファジーにおける E1 様酵素 Atg7 を KO することによりニューロン特異的にオートファジーを不能にしたマウスを用いた実験で、オートファジーがプロテアソーム系と独立して細胞内異常蛋白分子のクリアランスに恒常的に寄与しており、その破綻によりユビキチン化された分子を含む封入体を伴った神経細胞死が導かれることを世界に先駆け明らかにしている。

SOD1 凝集体の軸索内移動は、前根特異的に順行性に移動し、病期の進行とともに末梢にも出現することが ALS における神経細胞毒性に関与する可能性を明らかにし、軸索輸送の観点から治療法の可能性を模索している。

孤発性 ALS では、運動ニューロンにおける GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集率低下が特異的に起こっており、これが ADAR2 活性低下によるものであることが確認された。これらの結果から、ADAR2 mRNA の発現低下が ADAR2 の活性低下、さらには GluR2 サブユニット Q/R 部位 RNA 編集低下を規定する因子であることが考察され、ADAR2 を標的分子とした孤発性 ALS の画期的治療法開発の可能性が確認された。

D. 結論

本研究が標的とする筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく治療法の確立は今世紀の最も重要な課題の1つであり、本疾患に対する有効な治療法の開発は、我々神経疾患の研究に携わる者にとっての使命である。本研究の新規治療開発に関する研究成果としては、Dorfin-CHIP 融合分子、古細菌プ

ロテアソームをはじめとするより強力な治療薬候補の開発、ファゴゾームシステム、siRNA 療法、ウイルスベクター開発、再生誘導因子の利用などが進捗した。そしてこれらは総じて具体的なヒトへの臨床応用に向けた治療法の開発に繋がる高いポテンシャルを持っており、今後これらの中から臨床試験への展望が開けるものについて積極的なトランスレーショナルリサーチへの展開を推進していきたい。一方孤発性筋萎縮性側索硬化症における運動ニューロン特異的な遺伝子発現の網羅的解析展開、GluR2 受容体編集の変異の解明、神経細胞変性に係わる候補分子の解析に関する研究成果は、病態診断マーカーや新規治療に繋がる大きな可能性を秘めている。本研究班が目指す ALS という難治性に対しての臨床応用に向けた分子標的治療の開発は、患者や家族にとっても大きな希望をもたらすものと考ええる。さらに運動ニューロンの過酷な変性死へのチャレンジは他の神経変性疾患研究への重要なインパクトを与えるものと考ええる。

E. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

F. 研究発表

論文発表

Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G: Gene expression profile of motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 57: 236-251, 2005

他の論文発表や学会発表は別掲。

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

II. 研究報告（分担研究）

古細菌プロテアソームによる家族性 ALS 治療の試み

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学神経内科 教授

研究協力者 山田新一、丹羽淳一、石垣診祐、高橋美穂、伊藤 隆、曾根 淳、
道勇 学 （名古屋大学神経内科）

研究要旨：20S プロテアソーム(PS)は細胞内蛋白の分解を行っているプロテアーゼ複合体である。古細菌は原始的な PS を持ち、その構造は単純で扱い易く、真核細胞の PS に比して分解力が強い可能性が示されている。我々は古細菌 *Methanosarcina mazei* の PS (Mm-PS)の構成サブユニット α と β をクローニングし、Neuro2a や HEK293 の培養細胞内で発現させ、 α と β は活性を持つ機能的な複合体を形成する事を確認した。また野生型及び変異 SOD1 と共発現させその効果を調べたところ、Mm-PS は用量依存的に変異体特異的に SOD1 の発現量を低下させた。Pulse chase 等の結果より、変異 SOD1 の発現量の低下は変異 SOD1 の分解が促進されている為であると考えられた。Mm-PS は変異 SOD1 による細胞毒性を軽減した。更に変異 SOD1 以外の異常凝集体を形成する蛋白の分解を促進した事からも本研究は家族性筋萎縮性側索硬化症の新しい治療法の可能性を示すのみならず、パーキンソン病やアルツハイマー病等の異常蛋白凝集体が関係する他の神経変性疾患の治療法としても有望であると考えられた。

A. 研究目的

20S プロテアソーム(PS)は不要となった細胞内蛋白の分解を行っているプロテアーゼ複合体である。アルツハイマー病、パーキンソン病、各種ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) など多くの神経変性疾患に PS の活性低下が関与していると考えられている。これらの疾患では、細胞内に分解されずに残った蛋白が異常な凝集体を形成していることが特徴である。家族 ALS においては、疾患モデルマウスの脊髄

前角組織において PS の局所的活性低下が示されており、変異 superoxide dismutase-1 (SOD1)による異常凝集体が運動神経細胞内に進行性に蓄積する。今回我々が用いた古細菌の PS は真核細胞の PS の祖先にあたり、その構成は単純だが、*in vitro* における作用は真核細胞の PS に比べて強力であると報告されている。本研究により我々は古細菌の PS が真核細胞内においても異常蛋白の分解を協力的に促進し、その細胞毒性を軽減しうる事を示した。本研究の目的は家族性

ALS については細胞内に異常蛋白凝集体を形成する他の神経変性疾患に共通する新規の治療法の開発を目指すものである。

B. 研究方法

37°Cが至適発育温度の古細菌 *Methanosarcina mazei* の PS (Mm-PS) を構成する2種類の subunit (α 及び β -subunit) をクローニングし、 β -subunit の C 末には Histidine タグを付けた。 β -subunit の活性中心 (Thr 1) を変異 (Thr→Cys) させ、PS 全体の活性を欠損させた変異 β -subunit (m β 1) を作成し、対照として全ての実験に用いた。Neuro2a や HEK293 細胞に Mm-PS α -, β -subunit を発現させ、PS の複合体形成を超遠心や Ni+カラムで確認し、PS の活性を測定した。また、野生型及び変異 SOD1 と共発現させその効果を調べた。その他の異常凝集体を形成する蛋白、伸長したポリグルタミン (Q) 鎖を持つアンドロゲンレセプター (AR)、 α -synuclein、tau においても同様の実験を行った。

C. 研究結果

Mm-PS は変異 SOD1-GFP 凝集体に局在し、Mm-PS の用量依存的に培養細胞内で変異 SOD1 の発現量を低下させた。また、Mm-PS は野生型 SOD1 の発現量には影響しなかった。Cycloheximide chase 及び pulse chase の結果より、Mm-PS は変異体特異的に SOD1 の分解を促進していることが示された。MTS assay および caspase-3 assay の結果から Mm-PS は変異 SOD1 蛋白による細胞毒性を軽減した。PS の活性中心を失活させた変異 β -subunit を含んだ変異 Mm-PS を発現させ

た場合には、変異 SOD1 の分解促進、毒性抑制効果は認められず、Mm-PS による上記の改善効果は Mm-PS の直接の働きによる物であると推定された。では認められなかった。また、Mm-PS は正常の AR の分解に影響を与えなかったが、凝集体を形成し易い、伸長した Q 鎖を持つ異常な AR の分解を変異 SOD1 と同様に促進した。更に Mm-PS はパーキンソン病で蓄積することで知られる α -synuclein やアルツハイマー病で蓄積する事で知られる tau の分解も促進した。また、Mm-PS の発現は正常細胞内に豊富に存在する α -tubulin や GAPDH や、過剰に発現させた凝集体を通常作らない GFP や Lac-Z などには影響を与えなかった。

D. 考察

我々は古細菌の PS が哺乳類の細胞内においても活性を持つ機能的な複合体を形成する事を確認し、更に細胞内で異常凝集体を形成し易い変異 SOD1 を初めとする神経変性疾患の原因となる蛋白の分解を特異的に促進する事を示した。Host 細胞の 19S との結合や、各種 HSP 蛋白の発現量変化が無いことや、活性の無い変異 β -subunit を有する変異 Mm-PS では異常蛋白の分解促進効果が消失した事から Mm-PS が哺乳類の細胞内で直接異常蛋白の除去に機能している事が推測される。今回用いた PS は 20Sのみであり、真核細胞の PS の 19S の一部にあたる古細菌での PAN に代表される regulatory complex は用いていない。また、 α -ring の gate を欠損させていない為分解するにはその gate が開くことが要求される。

Regulatory complex が無くしてどのようにして gate が開くのか等疑問が残るが、今後の研究の課題である。

E. 結論

古細菌の PS を、細胞内で処理出来ない異常凝集蛋白の処理機構として用いる本研究は家族性 ALS の新しい治療法の可能性を示すのみならず、異常蛋白凝集体が関係する他の多くの神経変性疾患に広く応用可能な治療法としても期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

• Ishigaki S, Hishikawa N, Niwa J, Iemura S, Natsume T, Hori S, Kakizuka A, Tanaka K, Sobue G. Physical and functional interaction between Dornfin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49):51376-85.

• Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, Doyu M, Murata S, Tanaka K, Taniguchi N, Sobue G. Dornfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J Biol Chem.* 2002 Sep 27;277(39):36793-8.

• Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Gene expression profile of spinal

motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2005 Feb;57(2):236-51.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

外来性再生誘導因子の複合投与による ALS ラットモデル 神経前駆細胞賦活の試み

分担研究者 糸山泰人 東北大学大学院医学系研究科神経内科 教授
研究協力者 割田 仁, 青木正志, 水野秀紀, 石垣あや, 松本有史, 加藤昌昭(東北大学神経内科)
船越 洋, 中村 敏一(大阪大学分子再生医学), 岡野栄之(慶応義塾大学生理学)

研究要旨 ヒト変異 *Cu/Zn SOD* トランスジェニックラットは、ALS の新しい動物モデルとしてマウスに勝る大きさを生かした治療開発研究を可能にした。脊髄における内在性神経前駆細胞を活性化することを目的に、再生誘導因子 EGF と FGF-2 を同時に髄腔内投与した。その結果、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。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, 以下 ALS) は系統的かつ進行性の運動ニューロン死を主徴とする変性疾患であり、致死的にもかかわらず有効な治療法が未だないため新規治療法の開発が強く求められている。しかし、優性遺伝性 ALS の一部における *Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD)* 遺伝子変異の発見から現在まで病態解明は十分でなく不明な点が多く残されている。

これまでに我々は ALS の新しい動物モデルとしてヒト変異 *Cu/Zn SOD* トランスジェニックラットを確立した(図 1)。この ALS ラットモデルでは従来のマウスモデルに勝る大きさを生かして、髄腔内投与や細胞移植などの治療法開発実験が優れて容易となったほか、分子生物学的および生化学的解析に必要な検体量も十分得られる利点がある。

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

発症後 (23 週齢) の His46Arg 変異 *Cu/Zn SOD* 遺伝子導入ラット (Tg ラット) を対象とし、上皮細胞成長因子 (EGF) および線維芽細胞成長因子 (FGF-2) の同時投与群 (EGF+FGF-2 群, n=5) と、人工髄液のみを投与する対照群 (n=5) に分けた。EGF+FGF-2 群に対してヒトリコンビナント EGF, ヒトリコンビナント FGF-2 各々 6,000 ng を常法にしたがい作成した人工髄液に希釈し、正常ラット血清アルブミン、ヘパリンを各々 100 mg/mL, 10 IU/mL となるように調整して総量 200 μ L とした。

これを浸透圧ポンプ (流量 1.0 μ L/時) 内に入ポリエチレンチューブに接続、ハロセン・笑気・酸素混合吸入麻酔下に Tg ラット腰椎 L3 レベル背側か

ら髄腔内へチューブを挿入。チューブ先端が脊髄腰膨大近傍に位置するよう調整して固定した後、ポンプ本体は右背部皮下に留置した。さらに同期間チミジン類似体 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 溶液 2 mL を左背部皮下に留置した浸透圧ポンプ(流量 10 μ L/時)より 150 mg/kg/day となるよう調整して持続投与、増殖性細胞を標識した。

上述の7日間投与終了翌日に、エーテル深麻酔下のラットより 4%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液による灌流固定および浸漬固定後の凍結切片を作成。腰膨大部脊髄の 12 μ m 厚切片において BrdU と各種選択的マーカーとの多重蛍光免疫組織化学を行った。さらに、Tg ラットにおける EGF 受容体(EGFR)、FGF 受容体 1 型(FGFR1)の局在、前角細胞脱落の程度、ユビキチン陽性封入体の存在についても免疫組織化学的に検討した。

共焦点レーザー顕微鏡(Olympus 製)下に取得した多重染色画像を画像解析し、対照(人工髄液投与)群と比較した。なお、多重陽性細胞の密度測定においては $5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ の関心領域を灰白質(両側前角、中間質中心部(中心管周囲)、両側後角)、白質(両側前索および側索、後索)の両者にそれぞれ5領域ずつ設定した。定量的解析の際には一頭あたり少なくとも 50 μ m 以上離れた5切片以上を解析し統計学的解析を行った。

画像取得、画像解析・定量、統計学的解析には専用のソフトウェアを各々使用した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

本研究対象ラットは発症後であり、いずれも脊髄前角細胞の脱落と同部位に散在するユビキチン陽性の封入体を認めた。EGF+FGF-2 群と対照群における NeuN(成熟神経細胞マーカー)陽性面積を前角で比較すると両者に有意差はなかった(図

2)。

BrdU 陽性の新生細胞は脊髄灰白質および白質において有意に EGF+FGF-2 群で増加しており、実質広くにわたって増殖促進されていた(図 3)。また、総じて灰白質より白質に分布する新生細胞が多く、この傾向は両群とも同様であった(図 3)。

より未分化な細胞群として nestin および NG2(それぞれ未分化神経前駆細胞およびグリア前駆細胞の選択的マーカー)を発現する新生細胞をみると、これも脊髄腹側を中心に EGF+FGF-2 群で有意な増加が認められた(図 4, 5)。さらに成熟グリア細胞への分化を検討するためアストログリアのマーカー GFAP 陽性の新生細胞を検索すると、これも EGF+FGF-2 群で有意に増加していた。現在、その他の細胞選択的マーカー(希突起膠細胞、神経細胞等)を発現する新生細胞についても検討中である。

一方、EGFR は主として神経細胞の胞体および神経突起に、また FGFR1 は神経細胞の胞体と中心管周囲の上衣層に明らかな陽性像を認め、前角および白質には FGFR1/GFAP 二重陽性細胞を多数確認できた。

D. 考察

本来、成体ラット脊髄では生理的条件下においても一定の新生細胞が存在し、おもにグリア細胞新生にあずかっているとされる。我々はこれまでに、ALS ラットモデル脊髄では発症期以前から新生細胞が進行性に増加してグリア細胞新生(gliogenesis)の亢進が認められるとともに、運動ニューロン脱落が顕著となった末期に至っては未分化神経前駆細胞も増殖していることを報告してきた。

本研究では、EGFとFGF-2を同時に髄腔内持続投与することによって発症後のALSラットモデル脊髄の新生細胞をさらに増加させられることが示された。中でも未分化神経前駆細胞やグリア前駆細胞のマーカーを発現する新生細胞が有意に増加していたことは、分化誘導しうる細胞の由来(ソース)

を移植によってではなく、活性化した内在性神経前駆細胞からも誘導できる可能性を示唆している。今後、より効果的な内在性神経前駆細胞活性化のために至適投与時期(病期)、投与量の検討が必要と考えられる。

未分化神経前駆細胞に対する増殖・分化誘導活性が知られる因子の中で、EGF、FGF-2 はもっとも基本的で重要なものとされている。とりわけ FGF-2 には他にも神経細胞保護効果、神経細胞の突起伸展作用など多様な活性も併せ持つことが知られている。したがって、EGF、FGF-2 が増殖促進した細胞群についての増殖・分化誘導活性だけでなく、運動神経細胞そのものへの効果、細胞外環境(niche)への効果についても検討課題となりうる。

EGFR、FGFR1 蛋白の局在をみるといずれも神経細胞に陽性像を認めたが、EGF+FGF-2 持続投与群において前角細胞脱落の程度に差がないことから、今回の神経前駆細胞活性化が神経細胞死抑制に伴う二次的な効果である可能性は低く、神経前駆細胞への直接効果が主である可能性が高い。今回 FGFR1 陽性像を認めた中心管上衣層や実質の細胞群の性質をより詳細に明らかにするとともに、本病態下の EGF、FGF-2 作用メカニズムを検討することが重要と考えられる。

本研究で“髄腔内投与”による再生誘導因子の効果を明らかにしたことは、将来的な臨床応用の観点からまた重要と考えられる。すなわち、脳血液関門を通過しにくい因子を効率よく、全身性副作用を軽減して中枢神経広汎に投与したいといった系統的神経変性疾患の場合、有用な投与方法であることをあらためて示したと考えられる。

E. 結論

EGF・FGF-2 の複合投与によって、発症後の病態下においても未分化神経前駆細胞やグリア前駆細胞をも含めた神経前駆細胞の増殖促進が可能であることが示唆された。今後、他の再生誘導因子や分化調節因子との複合/漸次投与、さらには再生阻害因子の抑制、治療的遺伝子導入など

との組み合わせを検討することで、内在性神経前駆細胞を利用した新規治療法開発へとつながることが期待される。

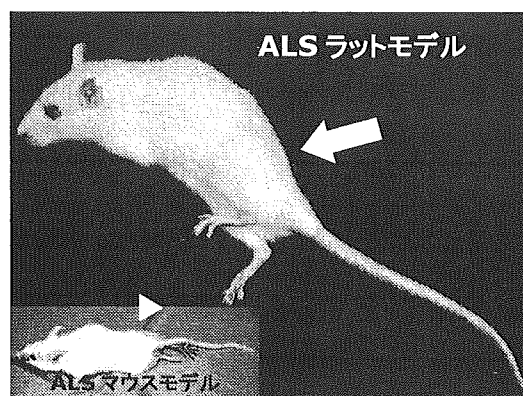


図 1. 末期の ALS モデルラット(矢印、His46Arg 変異 *Cu/Zn SOD1* 遺伝子導入ラット、メス、25 週齢)。約 20 週齢より一側の後肢から始まる進行性の骨格筋萎縮と筋力低下を示す。従来のマウスモデル(矢頭、inset)に比べ十分な大きさがある。

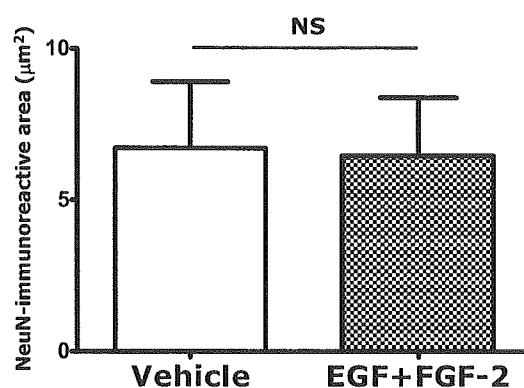


図 2. 腰髄前角における NeuN 陽性面積。両群間に有意差はなかった($P=0.4302$)。

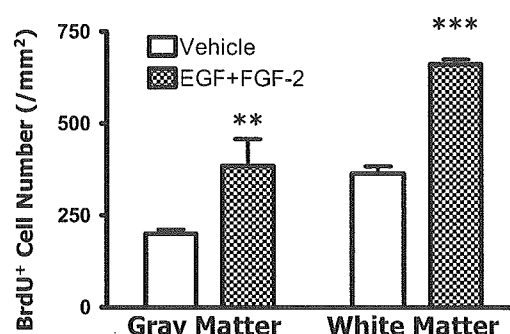


図 3. BrdU 陽性細胞密度。灰白質・白質ともに EGF+FGF-2 群で有意な増加を認める(** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

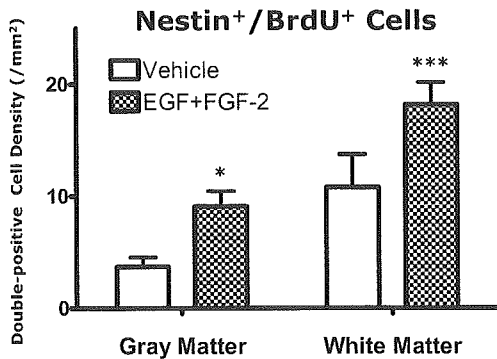


図 4. Nestin/BrdU 二重陽性細胞密度。灰白質・白質ともに EGF+FGF-2 群で有意に高値である (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)。

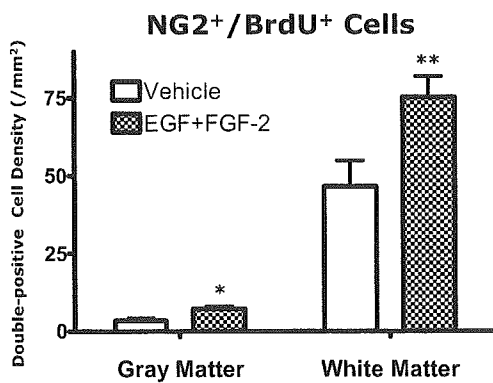


図 5. NG2/BrdU 二重陽性細胞密度。灰白質・白質ともに EGF+FGF-2 群で有意に高値である (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$)。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H: Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. J Neurosci Res 83: 119-133, 2006
- 2) Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y: Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. Neuropathology 25: 365-370, 2005
- 3) 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 82: 63-70, 2005

- 4) 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 110: 101-112, 2005
- 5) Chang-Hong R, Wada M, Koyama S, Kimura H, Arawaka S, Kawanami T, Kurita K, Kadoya T, Aoki M, Itoyama Y, Kato T: Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Exp Neurol 194: 203-211, 2005
- 6) Suzuki N, Aoki M, Hinuma Y, Takahashi T, Onodera Y, Ishigaki A, Kato M, Warita H, Tateyama M, Itoyama Y: Expression profiling with progression of dystrophic change in dysferlin-deficient mice (SJL). Neurosci Res 52: 47-60, 2005

2. 学会発表

割田 仁 ほか, 外来性再生誘導因子投与による ALS モデルラット脊髄神経前駆細胞賦活の試み, 第 46 回日本神経学会総会 2005.5 鹿児島

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録

ラットを用いた ALS モデル(出願済)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ES 細胞を用いた運動ニューロンの再生

分担研究者 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室 教授

研究要旨 マウス ES 細胞を用い、筋萎縮性側索硬化症(ALS)で選択的に障害される運動ニューロンとその前駆細胞を誘導する培養法を確立し、ALS モデルラット脊髄への移植により、その *in vivo* における性質を解析した。また、ヒト ES 細胞から運動ニューロンおよびその前駆細胞の誘導に着手している。

A. 研究目的

マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) から運動ニューロンとその前駆細胞を誘導する培養法を確立し、誘導した運動ニューロンを ALS の病態解析や薬剤スクリーニングに利用する。さらに、ALS モデルラットである変異型 SOD1 (G93A) トランスジェニックラットの脊髄に移植し、運動ニューロンの再生を試みる。また、ヒト ES 細胞から運動ニューロンおよびその前駆細胞の誘導方法を確立する。

B. 研究方法

我々はマウス ES 細胞から胚様体 (Embryoid Body: EB) を経て、多能性神経幹細胞を含む未分化神経系前駆細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法を確立してきた。本研究では、EB 形成時に後方化因子であるレチノイン酸 (RA) を作用させることにより、ES 細胞由来の神経系前駆細胞に後方の領域特異性を付与し、神経管後方より発生する運動ニューロンとその前駆細胞を生み出すニューロスフェアの誘導法を確立する。

まず、様々な濃度の RA 存在下で形成させた EB を分散し、無血清培地で線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の存在下で浮遊培養し、ニューロスフェアの形成効率を検討する。次に、特に運動ニューロンは神経管の腹側から誘導されることから、高効率にニューロスフェアを形成できる条件下において、ニューロスフ

ェア形成時に腹側化因子である Sonic hedgehog (Shh)、または背側化因子である BMP4/Wnt3a を添加し、背腹軸の制御を検討する。また、これらのニューロスフェアを接着培養で分化させ、生み出されるニューロンの性質を解析する。これらの *in vitro* の解析は、RT-PCR 法や免疫染色法による部位特異的なマーカー遺伝子や、運動ニューロン特異的なマーカー (Hb9 や Isl-1 など) の発現の解析により行う。さらに誘導した細胞の *in vitro* での性質を、筋細胞株との共培養や電気生理学的手法を用いて明らかにする。

また、誘導した ES 細胞由来神経系前駆細胞を野生型ラットおよびの ALS モデル動物である変異型 SOD1 (G93A) トランスジェニックラット (mSOD1 ラット) の腰髄に移植し、その *in vivo* における分化能を免疫染色法により解析する。さらに我々がこれまでに独自に開発した評価法を用いて運動機能の改善についても解析する。

次に、ヒト ES 細胞を用いて運動ニューロンおよびその前駆細胞を誘導する手法を開発する。

(倫理面への配慮)

モデル動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。また、当研究室におけるヒト ES 細胞の使用については、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づ

き、平成14年11月7日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認され、また平成17年7月19日に使用細胞株、研究者の追加についても承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。

C. 研究結果

まず、様々な濃度のRA存在下でEBを培養、これを分散し、bFGF存在下で浮遊培養したところ、低濃度RAを用いたときに高率にニューロスフェアを形成させることに成功した。この一次ニューロスフェアは接着培養で分化させるとニューロンを多く生み出し、一方で一度継代した二次、三次ニューロスフェアからはニューロンおよびグリアを生み出すことが明らかとなった。この結果は*in vivo*の中枢神経の発生をよく模倣していることから、中枢神経発生モデルとしても有用であると考えられた。さらに、EB形成時に様々な濃度のRAを用いてニューロスフェアを誘導し、その前後軸にそった領域特異的マーカーの発現をRT-PCR法を用いて解析したところ、RA濃度依存的に後方のマーカーを発現していることが明らかになった。次に、低濃度RA存在下で培養したEBを用いたニューロスフェア形成時に、腹側化因子であるShh、または背側化因子であるBMP4、Wnt3aを添加し、背腹軸に沿ったマーカー遺伝子の発現をRT-PCR法を用いて解析したところ、Shhを用いると腹側の遺伝子の発現が増強し、一方で、BMP4およびWnt3aを用いると、背側化した。これらの結果から、*in vitro*で神ニューロスフェアの前後軸、背腹軸を制御し、RA、Shhを用いることで神経管後方、腹側の神経系前駆細胞（運動ニューロンを生み出す）を誘導できることが示唆された。そこで、低濃度RAを用いて誘導したニューロスフェアを接着培養で分化させたところ、運動ニューロンやその前駆細胞のマーカーであるHB9陽性の細胞が誘導され、さらにニューロスフェア形成時にShhを加えるとHB9陽性細胞が増加した。また、このようにして誘導したニューロンは、電気生理学的手法（パッチクランプ法）を用

いて解析すると活動電位が記録され、さらに筋芽細胞株由来のmyotubeと共培養すると*in vitro*でa-BTXにより標識されるneuromuscular junctionを形成した。

次にこれらのES細胞由来ニューロスフェアの*in vivo*における分化能を検討するため、EGFPで標識したES細胞由来のニューロスフェアを、野生型、および発症前（約90日）のmSOD1トランスジェニックラットの腰髄に移植を行った。移植後それぞれ2週間、4週間で還流固定し、免疫染色法により解析したところ、ES細胞由来の細胞は脊髄内に生着し、NeuN陽性のニューロンに分化した。また、その一部はCholine acetyltransferase (ChAT)陽性のコリン作動性ニューロンに分化していた。これらの結果から、ES細胞由来の前駆細胞が*in vivo*で機能的な運動ニューロンに分化できる可能性が示唆された。

また、京都大学より分与されたヒトES細胞を用いて、運動ニューロンの分化誘導系の確立を始めている。現在のところ、少数ではあるが、HB9陽性、Isl-1陽性の運動ニューロンの誘導が観察されている。

D. 考察

マウスES細胞から低濃度レチノイン酸を用いて高率にニューロスフェアを誘導することができた。誘導したニューロスフェアからは、運動ニューロンとその前駆細胞のマーカーであるHB9を高率に発現し、電気生理学的に活動電位を発するニューロンが誘導された。さらにこれらのニューロンとmyotubeとのコンタクトも認められたことから、機能的な運動ニューロンとその前駆細胞を、*in vitro*で誘導できる培養法を確立できたと考えられた。さらに、これらの細胞を野生型及びALSモデルラットの腰髄に移植したところ、NeuN陽性、ChAT陽性のニューロンが観察されたことから、生体内においても、運動ニューロンを含むコリン作動性ニューロンに分化し得ると考えられた。今後、さらに移植方法を改良するとともに、細胞を移植したALSモデルラットの運動機能の改善についても

解析していく予定である。また、ヒト ES 細胞からの運動ニューロンの誘導にも着手し、現段階においては少数ではあるが運動ニューロンの誘導が観察されている。今後は、ヒト ES 細胞を用いた *in vitro* ヒト運動ニューロンの培養法の確立、また ES 細胞由来ヒト運動ニューロンを用いた病態解析、薬剤開発などへの応用を、ひいては ALS における運動ニューロンの再生および、細胞治療法を開発していく予定である。

E. 結論

マウス ES 細胞から運動ニューロンとその前駆細胞を誘導する方法を確立した。また、これらの細胞は *in vivo* でもコリン作動性ニューロンを含むニューロンに効率に分化できることが示された。また、ヒト ES 細胞からも少数ではあるが運動ニューロンが誘導された。このような ES 細胞由来の運動ニューロンは、運動ニューロンの機能解析、ALS の病態解析、および薬剤スクリーニングなどを *in vitro* で行うためのモデルとして有用であると考えられる。また、ALS における再生医学への応用が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 275(1):124-142, 2004
- Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S.-i, Shimazaki T, Chino N, Okano H, and Okamoto H. Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific

expression. *Developmental Biology* 278(2): 587-606. 2005

- Matsumoto, A., Okada, Y., Nakamichi, M., Nakamura, M., Toyama, Y., Sobue, G., Nagai, M., Aoki, M., Itoyama, Y., and Okano, H. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 83(1): 119-133. 2006

2. 学会発表

- 岡田洋平、松本有史、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、ES 細胞由来神経系前駆細胞の時間的・空間的特異性制御：マウス ES 細胞から運動ニューロンへの分化誘導、幹細胞シンポジウム、淡路島、2005 年 4 月
- 岡田洋平、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、ES 細胞由来神経幹細胞の時間的・空間的特異性制御機構の解析、第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月
- 松本有史、岡田洋平、中村雅也、糸山泰人、岡野栄之、ALS モデルラットに対するマウス ES 細胞由来神経系前駆細胞移植の試み、第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月
- Yohei Okada, Arifumi Matsumoto, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Regeneration of Motor Neurons with embryonic stem cells、第 28 回日本神経科学大会、横浜、2005 年 7 月
- 松本有史、岡田洋平、中村雅也、糸山泰人、岡野栄之、ALS モデルラットに対する ES 細胞由来神経系前駆細胞移植、第 28 回日本神経科学大会、横浜、2005 年 7 月
- 岡田洋平、松本有史、石井聖二、島崎琢也、岡野栄之、ES 細胞由来神経幹細胞の時間的・空間的特異性制御、「科学技術振興事業団 (JST) 戦略的基礎研究推進事業 (CREST) 研究領域」「生物の発生・分化・再生」第 4 回公開シンポジウム、東京、2005 年 10 月
- Yohei Okada, Arifumi Matsumoto, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Regulation of spatio-temporal identities in ES cell-derived neural stem/progenitor cells, Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington DC, November

2005

岡田洋平、松本有史、石井聖二、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、ES 細胞由来神経幹細胞の時間的・空間的特異性制御、第 28 回日本分子生物学会、福岡 2005 年 12 月

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得（申請中）

(1) 発明の名称：胚性幹細胞からの神経幹細胞、運動ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンの製造法

発明者：岡野栄之 島崎琢也

特許第 3660601 号

申請日：2001. 3. 30（2005. 3. 25 登録）

PCT 出願：PCT/JP01/08703

(2) 発明の名称：記憶障害治療剤

発明者：岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人

出願番号：特願 2002-002433

申請日：2002. 1. 11

PCT 出願：無し

(3) 発明の名称：記憶障害治療剤スクリーニング法

発明者：岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人

出願番号：特願 2003-6298

申請日：2003. 1. 14

PCT 出願：無し

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし