

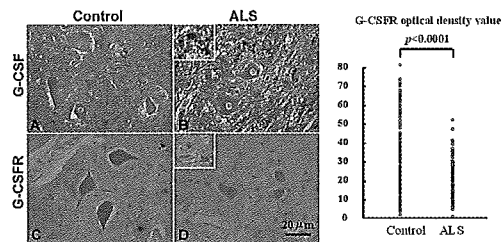
その条件下で human recombinant G-CSF (rG-CSF) (中外製薬より供与) をが 0 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1.0 μ g/ml, 2.0 μ g/ml の濃度で投与しその生物学的効果を検討した。

- ③ 変異 SOD1^{G93A} 遺伝子導入マウスの第5腰椎標本を用い、G-CSF と G-CSF 受容体 (G-CSFR) の発現を免疫組織化学的に解析。さらに、変異 SOD1^{G93A} 遺伝子導入マウスに、rG-CSF を 100 μ g/kg の濃度で生後 10 週目より 5 日連続、2 日休薬で死亡するまで皮下投与し、対照投与 (生理食塩水) との生存効果を比較検討した。

結果

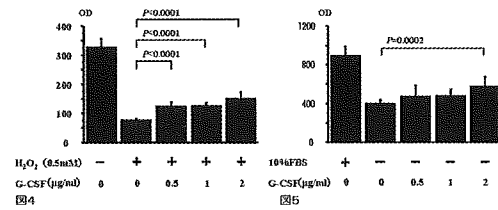
- ① G-CSF および G-CSF 受容体 (G-CSFR) は脊髄運動ニューロンに存在し、G-CSF は ALS 病変部の反応性アストロサイトの細胞体で強く発現していた。G-CSFR は神経細胞および一部の反応性アストロサイトで発現。ALS の運動ニューロンでは、G-CSFR の発現が低下していた。(図1)

(図1)



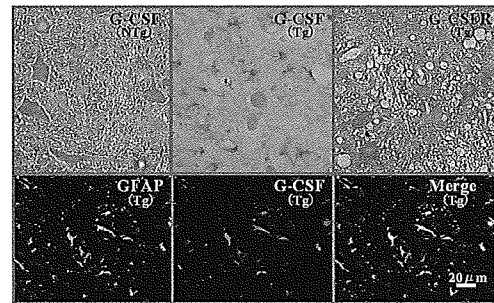
- ② H₂O₂ 負荷による酸化ストレス条件下では神経細胞死が誘導され、一方、rG-CSF 投与により濃度依存性に細胞死が抑制されることを見出した。また無血清培地条件下においても同様に rG-CSF による細胞死抑制効果を認めた (図2)。

(図2)

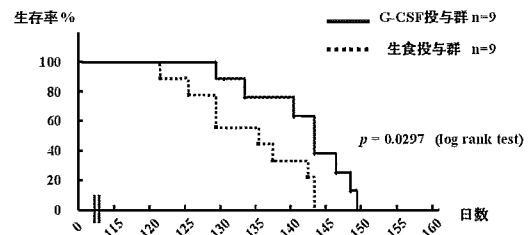


- ③ 変異 SOD1^{G93A} 遺伝子導入マウスにおいても ALS 剖検材料と同様にニューロンにおいて G-CSF と G-CSFR は発現しており、特に増殖した反応性アストロサイトにおいて G-CSF が強く発現していることを発見した(図3)。

(図3)



rG-CSF 投与実験では、100 μ g/kg 投与群で平均生存日数 141.3 \pm 7.1 と生理食塩水投与群 (133.7 \pm 8.1) に比し有意な ($p=0.0297$) 延命効果を認めた (図3)。



考察

ALS の運動ニューロンでは G-CSF 受容体の発現が低下しており、ALS 患者髄液中の G-CSF の増加はその影響と考えられた。G-CSF の生物学的作用としては、培養細胞実験より G-CSF の運動ニューロンに対する神経保護作用が明らかとなり、さらに ALS モデルマウスへの投与において延命効果が示された。

G-CSF は、19.6kd の糖蛋白質で単球、中皮細胞、線維芽細胞、内皮細胞を由来とする造血性サイトカインの一つである。G-CSF は骨髄好中球前駆細胞以降の好中球系細胞の分化誘導や分化制御並びにアポトーシスの抑制作用を有する。近年、G-CSFR の神経幹細胞での発現や G-CSF の神経細胞での発現、神経細胞への分化誘導作用、神経細胞死の防御機転などが注目されている。G-CSF の抗アポトーシス作用として、BAX 系アポトーシスやミトコンドリア由来のチトクローム C の抑制、さらに bcl-2 の促進などが考えられている。ALS モデルの運動ニューロンにおいてもこれらの G-CSF のアポトーシス抑制作用が働いたことが考えられる。

結論

ALS の病態形成において G-CSF は重要な防御因子と考えられる。G-CSF は血液脳関門を通過するので、末梢からの G-CSF 補充療法による ALS の治療的アプローチが期待される。

文献

1. Ishizu et al. Brain 128:988-1002, 2005
2. Tehranchi et al. Blood 101:1080-86, 2003
3. Schneider A et al. J Clin Invest 115:2083-98. 2005
4. Meeuwssen S et al. Glia 43:243-53, 2003
5. Hollenstein U et al. Endotoxin down-modulates granulocyte colony-stimulating factor receptor (CD114) on human neutrophils. J Infect Dis 182:343-6, 2000
6. Ren J al. Growth factor treatment of stroke. Curr Drug Targets CNS

運動ニューロン障害モデルに対する Tacrolimus の効果：

in vitro と in vivo 実験系を用いた比較検討

岩崎泰雄¹⁾，池田 憲^{1),2)}，馬場繁二¹⁾

1) 東邦大学医療センター大森病院 神経内科

2) PL 東京健康管理センター 神経内科

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する有効な治療薬を見出すために、3種類の運動ニューロン障害モデルに対する Tacrolimus の神経保護効果を比較検討した。本剤はグルタミン酸による培養運動ニューロン死と新生ラット坐骨神経切除による運動ニューロン死を有意に抑制した。一方、Wobbler マウスの臨床病理所見には無効であった。運動ニューロン障害に対する Tacrolimus の神経保護効果は、実験モデルによって結果が異なることが確認された。種類の異なる運動ニューロン障害モデルに対する同一薬剤の効果を比較した実験研究は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する治療薬の迅速な開発に有用な資料を提供できると考えられた。

はじめに

ALS 患者に対する新薬を開発するために、運動神経細胞の培養系、坐骨神経や顔面神経の外傷モデル、ALS モデル動物など多く運動ニューロン障害実験系が治療研究に用いられている。今回、末梢神経障害を中心に神経保護効果が報告されている Tacrolimus が異なる3種類の運動ニューロン障害モデルに対して、それぞれ有用であるかを検討した。

方法

実験1：生後10日目のSD系ラット腰髄を摘出し、whole spinal cord culture を作成し、2週間、培養した。対照群、グルタミン酸投与群、グルタミン酸+Tacrolimus 投与群(10^{-7} ~ 10^{-6} M)において大型運動ニューロン数(25 μ m 以上)とChAT 活性を測定した。

実験2：生後24時間以内のSD系ラットの右坐骨神経を切断し、Tacrolimus (0.1, 1, 5 mg/kg)、Cyclosporin A (1, 5, 10 mg/kg) を2週間、連日、腹腔内投与した。薬物投与終了後に脊髄を摘出し、cresyl-violet 染色で脊髄L4大型運動ニューロン数(25 μ m 以上)の算出から生存率を求め、各薬剤投与群と対照群を比較した。

実験3：Wobbler マウスの発病直後(生後3-4週齢)から、対照液、Tacrolimus (1, 5 mg/kg)、Cyclosporin A (10 mg/kg) を4週間、連日、腹腔内投与した。運動機能の評価は薬剤投与の開始から4週間(毎週、前肢の拘縮の程度(grade 1 から grade 4 の4段階評価)と特殊な dynamometer を用いて前肢の筋力を定量的に評価し、両前肢の運動機能を観察した。神経病理学的検討は4週間の薬物投与終了後(生後7-8週齢)に上腕二頭筋の湿重量とATPase 染色による筋線維平均直径を求めた。経心的灌流固定後に脊髄を摘出し、cresyl-violet 染色による脊髄C5-6大型運動ニューロンの残存数を算出した。

結果

実験1：対照群に比して、グルタミン酸投与群の運動ニューロン数とChAT 活性はともに約60~80%ほど低下していた。グルタミン酸に 10^{-7} M以上のTacrolimus を同時投与することにより、運動ニューロン死とChAT 活性の低下が有意に抑制された。

図1 大型運動ニューロン数とChAT 活性

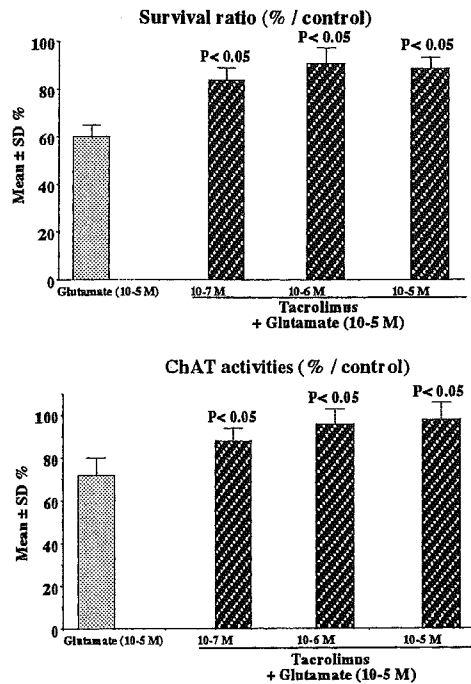
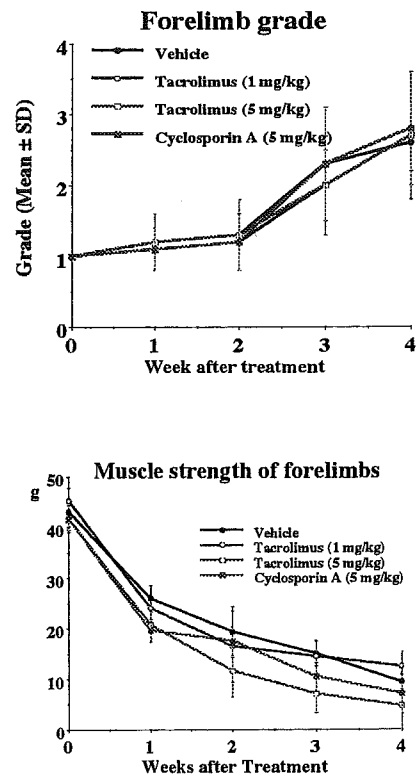


図3 前肢の筋拘縮と筋力低下



実験2 : Tacrolimus (5 mg/kg), Cyclosporin A (10 mg/kg) の高用量投与群において、axotomy後の運動ニューロン死が有意に抑制 (約 20%) された。

図2 大型運動ニューロンの生存率

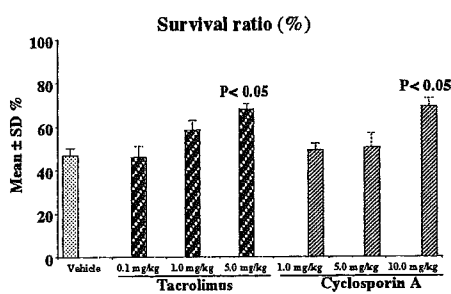
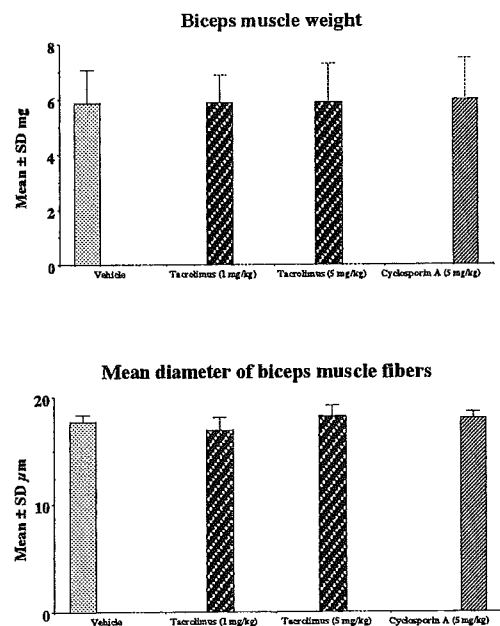
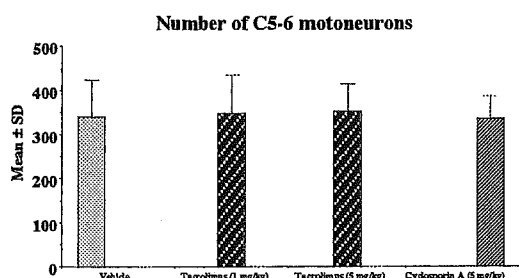


図4 上腕二頭筋の筋重量と筋線維平均直径



実験3 : Tacrolimus, Cyclosporin A 投与はwobblerマウスの運動機能, 病理学的所見のいずれも改善しなかった。

図5 脊髄運動ニューロンの残存数



考察

Tacrolimus の神経保護効果を検討した in vivo 動物実験を要約すると外傷¹⁾, acrylamide 中毒²⁾, 脱髄³⁾による末梢神経障害, 脊髄の損傷⁴⁾や虚血⁵⁾, 脳虚血モデル⁶⁾に有用性が報告されている。神経変性疾患ではパーキンソン病モデルである MIPT マウスに, 黒質のドパミンニューロンに保護的に働くことが報告された。⁷⁾しかし, 最近では 6-OHDA による黒質障害を作成したパーキンソン病ラットには無効であると報告されている。⁸⁾現在, パーキンソン病に関しては, Tacrolimus よりも低分子量の構造を有する neuroimmunophilin である GPI-1042⁹⁾の臨床試験が進行中である。

ALS モデル動物に関しては, G93A mSOD-tg マウスの発症直後から, 本薬剤 (1mg/kg, 5 mg/kg) の連日, 腹腔内投与を開始したが, 無効であったと報告されている。¹⁰⁾われわれが用いた3種類の運動ニューロン障害モデルにおける Tacrolimus 療法は, 急性実験モデルであるグルタミン酸による培養運動ニューロン死と新生ラット坐骨神経切除による運動ニューロン死には有効であった。一方, 慢性疾患モデルである Wobbler マウスには無効であった。運動ニューロン障害モデルによる本薬剤効果の差異は, 病型モデルや動物種族の相違が関与している。また, G93A mSOD-tg マウスでは Tacrolimus の受容体である FKBP-52 の異常が報告されている。¹¹⁾よって, 同様な受容体異常が Wobbler マウスにも存在する可能性も考えられる。今後は, 本剤の作用機序である運動ニューロ

ンの mitochondria cytochrome C や microglia, astrocyte の病理学的変化を各実験系で検討すると共に, Wobbler マウスの培養運動ニューロン系を用いた Tacrolimus の直接的作用を検討していきたい。

まとめ

Tacrolimus の神経保護効果の有無は, 実験モデルによって結果が異なることが確認された。多種類のモデルで一薬剤の効果を同時比較することは, ALS に対する治療薬の迅速な開発に有用と考えられた。

文献

- 1) Sulaiman OAR, et al. *Exp Neurol* 175: 127-137, 2002
- 2) Gold BG, et al. *Exp Neurol* 187: 160-170, 2004
- 3) Adachi A, et al. *Intern Med* 31: 6-10, 1992
- 4) Madsen JR, et al. *Exp Neurol* 154: 673-683, 1998
- 5) Akgun S, et al. *Eur J Cardiothorac* 25: 105-110, 2004
- 6) Noto T, et al. *Brain Res Mol Res* 128: 30-38, 2004
- 7) Kitamura Y, et al. *J Neuroimmunol* 50: 221-224, 1994
- 8) Manakova, et al. *Brain Res* 1038: 83-91, 2005
- 9) Steiner JP, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2019-2024, 1997
- 10) Ameser JM, et al. *NeuroReport* 12: 2663-2665, 2001
- 11) Manabe Y, et al. *Brain Res* 935: 124-128, 2002

孤発性 ALS 運動ニューロン特異的病態関連分子： 単一運動ニューロンの検討

分担研究者：祖父江元¹⁾

山本正彦^{1) 2)}、蔣月梅¹⁾、黄哲¹⁾、丹羽淳一¹⁾、
田中章景¹⁾、道勇学¹⁾、

1) 名古屋大学神経内科

2) 愛知学院大学心身科学部

孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイル解析で見いだした病態関連分子の発現動態を神経変性との関連において解析した。様々な病期を含む孤発性ALS20例、対照10例において、病態関連分子の運動ニューロン(MN)での発現程度をISH,IHC上で定量化し、変性マーカーとの関連を検討した。マーカーとして残存MN数、リン酸化NFを用いたところ、DCTN1,EGR3は神経変性初期から多くのMNで高度の発現低下を認めた。一方、ACAT, DR5, KIAA0231, CCNCの発現上昇は一部のMNから徐々に始まり、神経変性に従い多くのMNでより強い発現上昇を認めた。細胞骨格・転写因子関連遺伝子の発現減少から細胞周期・細胞死関連遺伝子の発現増加へといった病態関連分子の発現動態が明らかになり、特に早期から変化するものは治療上の標的分子候補となりうる点で重要と考えられた。

はじめに

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は家族性のものに比較し、その研究方法の困難さから、病態解析が遅れている。さらに、神経細胞変性とその周囲のグリア反応を区別して分子病態解析を実行することは、組織化学的方法以外には不可能であった。脊髄全体をサンプルとしたマイクロアレイ解析は報告されているが、グリア細胞の増生による変化と残存神経細胞の変化とを鑑別することはできない¹⁾。レーザーマイクロダイセクションを応用することによって、運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイル解析を行い、得られた病態関連分子について、神経変性・細胞死に果たす役割を

検討した。

対象および方法

孤発性 ALS 20 例および対照 10 例において、運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイル解析により発現変化のみられた病態関連分子について、ISH および IHC を用いて発現動態を解析し、神経変性マーカーとの関連を検討した。ISH および IHC における遺伝子発現量は CCD image 上で ROI を設定して定量化した²⁾。神経変性マーカーとして、残存神経細胞数、リン酸化 NF-H を用い、症例間あるいは症例内で様々なステージを観察することが可能である。

結果

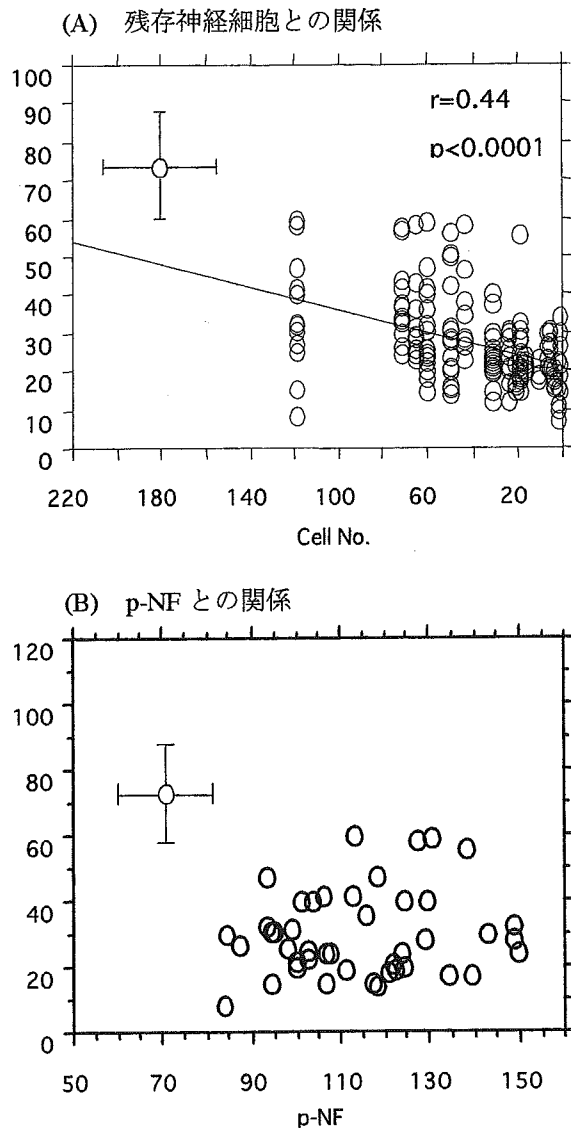
運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイル解析では遺伝子の1%が増加と3%が減少を示し、クラスター解析により運動ニューロンにおいて特徴的に変動する遺伝子群を抽出した。従来の発現変化量のみからは抽出できないカテゴリーの遺伝子群もリスト化が可能であった(表1)。DCTN1 および EGR3 の発現減少は残存運動ニューロンに高頻度に見られ、変性早期の変化と考えられた。DCTN1 および EGR3 の発現減少は、残存神経細胞数とは正の相関を示したが、リン酸化 NF との関係は明らかではなかった(図1)。一方、DR5 および CCNC は、より少数の運動ニューロンにおいて上昇を示し後期の変化と考えられ、核への移行も観察された。DR5 および CCNC の発現増加は、残存神経細胞数およびリン酸化 NF と負の相関を呈した(図1)。また、新規関連分子である ACAT、KIAA0231 の発現が増加し、他の増加遺伝子群と類似の相関関係を有していた。さらに、連続切片を用いて、これらの遺伝子発現を同一細胞において相互的に確認することによって、DCTN1 から CCNC にいたる遺伝子発現シークエンスを得ることができた。

表1 運動ニューロン特異的減少遺伝子
(一部) 3)

polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E)
retinoic acid receptor gamma 1 (RAR-gamma 1)
microtubule-associated protein 4
aquaporin 5
synapsin II
vasoactive intestinal peptide receptor 1
calbindin 2, (29kD, calretinin)
G1/S-specific cyclin E (CCNE)
transcription factor 21
dynactin 1 (p150)
TRK-C; NT-3 growth factor receptor precursor

contactin associated protein 1
microtubule-associated protein tau
microtubule-associated protein 1A
Musashi (Drosophila) homolog 1

図1 DCTN1 の遺伝子発現量



考察

残存運動ニューロン数、リン酸化 NF を神経変性のマーカーとすると、ALS 20 例のそれぞれ異なる変性ステージにある神経細胞と各遺伝子発現量において興味深い関係が得られ、変性過程・細胞死の遺伝子カスケードが想定された。DCTN1 は全ての症例において、残存神経細胞の 80%以上が明らかな発現減少を示したのに対して、CCNC は数十%

発現増加を認めたにすぎない。DCTN1 および EGR3 の遺伝子発現量は、対照群 (図 1 左上部) とはほとんどオーバーラップしておらず、剖検時ではすでにある一定の発現変化が長く続いていたことを示唆している。遺伝子発現増加群 (ACAT, KIAA0231, DR5, CCNC) は NF のリン酸化と関連し、その程度は細胞数との関係よりも強いものであった。しかし、遺伝子発現減少群 (DCTN1, EGR3) は NF のリン酸化の程度とは有意な関係なく、残存細胞数と相関を示した。代表的な神経変性マーカーである NF-H のリン酸化については、それ以前に、DCTN1 や EGR3 の遺伝子発現の減少が起こり、NF-H のリン酸化に伴い ACAT, KIAA0231, DR5, CCNC の発現増加がもたらされた。さらには、DCTN1⁴⁾ や EGR3 の減少は細胞変性のみならず、細胞死をも惹起すると考えることができる。一連の組織化学的な定量解析によって、神経変性から神経細胞死への遺伝子群の変化を捉えることができた。

まとめ

運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイル解析から得られた分子について、運動ニューロン変性およびニューロン死の病態への深い関与が示唆された。細胞骨格・転写因子関連遺伝子の発現減少から細胞周期・細胞死関連遺伝子の発現増加へといたる病態関連分子の変化を確認した。遺伝子発現プロファイル解析から得られた病態関連分子の解析は神経変性・細胞死の理解に重要である。

文献

- 1) Dangold F, et al.: *Physiol Genomics*, 16: 229-239, 2004
- 2) Mitsuma N, et al.: *Neuroscience*, 129: 109-117, 2004
- 3) Jiang Y, et al.: *Ann Neurol*, 57: 236-251,

変異 SOD1 (126TTdel) を有する家族性 ALS およびモデルマウス 皮膚線維芽細胞における SOD1 発現の検討

中島健二¹⁾、安井建一¹⁾、中野俊也¹⁾、渡邊保裕¹⁾
中曾一裕¹⁾、北山通朗¹⁾、土井浩二¹⁾、深田育代¹⁾

1) 鳥取大学医学部脳神経内科

研究趣旨

われわれは、変異 SOD1 (126TTdel) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (TgM) を作製し、昨年報告した。これまで ALS 病態におけるユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) の関与が多数報告されている。今回、TgM および同遺伝子異常を持つ FALS 患者皮膚線維芽細胞において、プロテアソーム阻害による SOD1 蛋白発現変化を検討し、UPS と FALS 病態との関連を検討した。【方法】ヒト野生型 (W)、FLAGtag 付野生型 (WF)、変異型 (D)、FLAGtag 付変異型 (DF) 合計 4 ラインの皮膚線維芽細胞を培養し、MG132 などを培養細胞に暴露し、SOD1 発現を蛋白、および mRNA にて評価した。同様の実験を FALS 患者から採取した皮膚線維芽細胞でも行った。【結果】〔1〕プロテアソーム阻害により変異 SOD1 蛋白が増加することを確認した。また、変異 SOD1 のみに SOD1 蛋白の増加が認められる理由として、その蛋白分解機構が UPS 依存性であるか否かの差によることであることを免疫沈降法 (IP:SOD, IB:Ub) により確認した。〔2〕認められた変異 SOD1 蛋白増加は ActD 前投与で抑制された。また、MG132 により SOD1 mRNA の増加が認められ、これらのごとより、MG132 は変異 SOD1 蛋白分解抑制だけでなく、SOD1 を転写活性化することも確認した。〔3〕変異 SOD1 蛋白増加の転写活性化経路には p38-MAPK が関与している。〔4〕MG132 による変異 SOD1 蛋白増加と、SOD1 mRNA 増加は FALS 患者皮膚線維芽細胞でも認められた。【結論】FALS 病態において重要とされる変異 SOD1 の蓄積には、プロテアソーム障害による UPS 分解抑制の他、プロテアソーム障害下での SOD1 転写活性化も関与している可能性がある。

はじめに

一部の家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の原因遺伝子として Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) の遺伝子異常が報告され、約 100 種類近くが確認されている (<http://www.alsod.org>)。当施設が報告した FALS の大家系¹⁾においても SOD1 遺伝子の exon 5 において 2 塩基の欠失が確認された^{2,3)}。大多数の FALS にみられる 1 塩基置換 (point mutation) とは異なり、本変異は 2 塩基欠失によりフレームシフトを生じる変異であった⁴⁾。本家系患者は後索型の ALS に分類され、残存運動神経細胞に Lewy body like hyaline inclusion (LBHI) を認める^{4,5)}。Truncated protein を生じる本遺伝子異常を持つトランス

ジェニックマウス (TgM) を作製することは本疾患の病態解明に極めて有用な情報をもたらすと考えられ、TgM の作製を試み、運動ニューロン疾患を発症し、病理所見もよく反映したモデルとなり、昨年の本会で報告した⁶⁾。これまで、変異 SOD1 分解のユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) への依存、病変部位での不溶性変異 SOD1 蓄積、ユビキチンが LBHI 構成成分であることなどから ALS 病態における UPS の重要性が報告されている。今回、TgM および同遺伝子異常を持つ FALS 患者皮膚線維芽細胞において、プロテアソーム阻害による SOD1 蛋白発現変化を検討し、UPS と FALS 病態との関連を検討した。

対象と方法

マウス皮膚線維芽細胞

作製した4ライン(野生型(W)、FLAG-tag付野生型(WF)、2塩基欠失型(D)、FLAG-tag付2塩基欠失型(DF))それぞれのヘテロ接合体生後0-1日マウス皮膚を採取し、DMEM/10%FCSで培養、継代し、実験に用いた。

ヒト皮膚線維芽細胞

健常成人およびFALS患者より皮膚を採取し、DMEM/10%FCSで培養、継代し、凍結保存したものを解凍、培養し、実験に用いた。

ウエスタンブロット

それぞれのサンプルをSDS-Bufferを加えhomogenateし、蛋白量10ugあたりをSDS-PAGEに供し、PVDF膜に転写し、各抗体と反応後、ECLシステム(Amersham)によって検出した。

抗ヒトSOD1モノクローナル抗体(MBL)、抗ヒトSOD1ポリクローナル抗体(Stressgen)、抗Ub抗体(Santa-Cruz)、抗Actin抗体(Santa-Cruz)

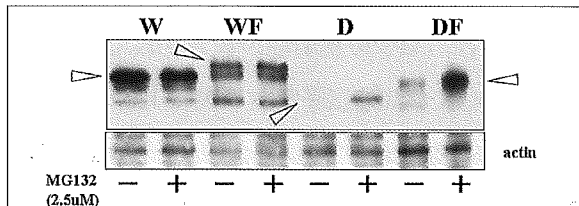
ノザンブロット

ヒトSOD1mRNAを検出するため、ヒトSOD1cDNAの本変異を含まない前半360塩基配列をプローブ配列とした。RNAサンプルは培養皮膚線維芽細胞よりIsogen(Nippon Gene)を用い抽出し、10ug当たりのRNAをサンプルとした。NonRI-DIGsystem(Roche)を用い検出した。

一部の半定量結果にはNIH Imageを用いた。

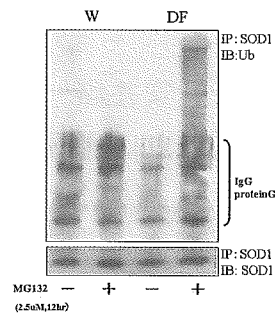
結果

【1】変異SOD1蛋白はプロテアソーム阻害により増加し、変異SOD1の分解はUPSに依存する。



【図1】各ラインの皮膚線維芽細胞に2.5uM/12hrのMG132を暴露後、SOD1の蛋白量変化を検討した。W, WFラインではSOD1蛋白量に変化を認めず、

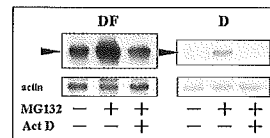
DFラインでは明らかに増加した。MG132処理前には可視化出来なかったDラインでは可視化し、増加が確認された。



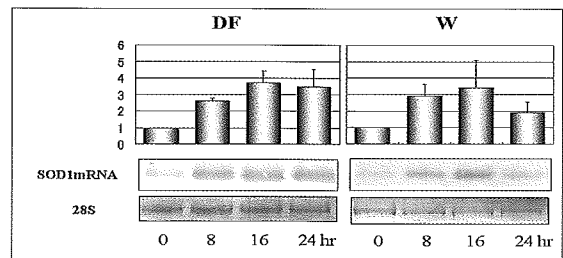
【図2】W, DFラインの細胞に同様の負荷を与えたのちに、抗SOD1抗体で免疫沈降し、抗Ub抗体でblotした。MG132負荷を与えたDFのみにSOD1のエビキチンスマアが認められ、変異SOD1(DF)は野生型と異なり蛋白分解を

UPSに依存している。

【2】プロテアソーム阻害はSOD1転写を活性化させる。

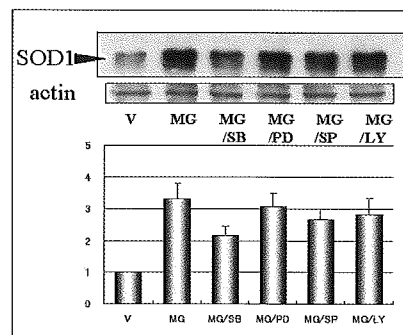


【図3】MG132による変異SOD1の増加はActinomycinDの前投与により抑制される。



【図4】MG132負荷後、経時的SOD1mRNA量の変化を検討。変異SOD1(DF)では、MG132投与16時間後をpeakにmRNAの増加が認められ、MG132によるSOD1の転写活性化が確認された。同様の変化は野生型SOD1(W)でも認められた。

【3】プロテアソーム阻害におけるSOD1増加に関与するp38MAPK。

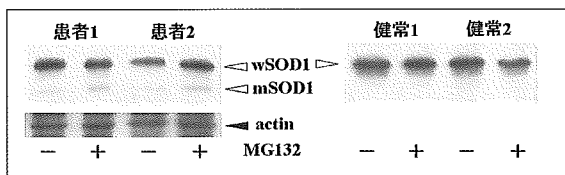


【図5】MG132によるSOD1の転写活性化に関わるシグナルの検討。MG132投与1時間前に各シグナルの阻害

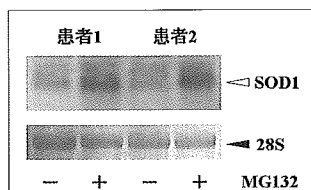
剤を投与した。p38-MAPK阻害剤であるSB203580でSOD1蛋白増加は最も抑制され、MG132によるSOD1転写活性化へのp38-MAPKの関与が示唆された。

〔4〕 FALS 患者皮膚線維芽細胞での検討。

MG132 による変異 SOD1 増加を蛋白量および mRNA 量で検討した。マウスにおける変異 SOD1 の動向と同様の現象が、ヒト皮膚線維芽細胞における変異 SOD1 でも確認された。



【図6】MG132 負荷なしでは本家系の FALS 患者では変異 SOD1 を Westernblot では検出困難であるが、MG132 負荷により検出可能となり、変異 SOD1 が増加したものと考えられた。健常者皮膚線維芽細胞では MG132 負荷による明らかな変化を認めない。(wSOD1:ヒト野生型 SOD1 蛋白、mSOD1:ヒト変異 SOD1)



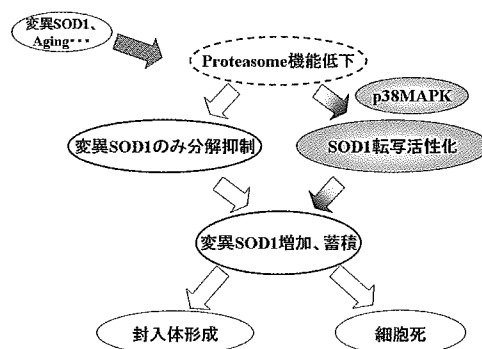
【図7】FALS 患者皮膚線維芽細胞における MG132 負荷による SOD1mRNA の変化。患者皮膚線維芽細胞に MG132 (5uM/24hr) を

負荷。MG132 負荷により SOD1mRNA の明らかな増加が確認される。

考察

本研究では皮膚線維芽細胞における SOD1 蛋白発現をプロテアソーム阻害との関連を中心に検討した。これまで、変異 SOD1-TgM 脊髄では早期よりプロテアソーム活性が低下する⁷。変異 SOD1 は野生型 SOD1 と異なり、UPS で分解される⁸。プロテアソーム阻害下では SOD1 蛋白は増加し、不溶化する⁹、など多くの ALS と UPS の関連が報告されている。本研究では、新規 TgM の皮膚線維芽細胞において同様にプロテアソーム阻害による SOD1 蛋白の増加が認められるか検討した。結果、明らかな増加が確認される(図1)と共に、変異 SOD1 のみに認められる理由が分解機構の違いによることも確認できた(図2)。さらに本検討では、MG132 負荷による変異 SOD1 増加は単なる分解抑制のみによるものではなく、p38-MAPK が関与する転写活性化が強く関わっていることを明らか

にした。(図8)



【図8】変異 SOD1 増加・蓄積に関わる SOD1 転写活性化

リン酸化 p38 も封入体の構成成分と報告されており¹⁰、病態に関与するシグナルの一つと考えられる。

変異 SOD1 の導入が genome 導入でなければ ALS 様の病態を発症しない¹¹など、変異 SOD1 は単に存在するだけでなく、その発現機構が重要とされている。本研究で明らかとなった転写活性化機構が、発症機構、病態に関連した重要な知見と考えられ、今後も更なる検討を進めていきたい。

まとめ

プロテアソーム阻害下を中心に、マウスおよびヒト皮膚線維芽細胞の SOD1 蛋白発現を検討した。プロテアソーム阻害/障害は、分解抑制により変異 SOD1 蛋白を蓄積するだけでなく、SOD1 転写を活性化し、変異蛋白の蓄積をより促すことが確認され、病態に関与する重要な知見と考えられた。

文献

1. Takahashi K, et al: *Arch Neurol*, 292-9, 1972
2. Pramatarova A, et al: *Hum Mol Genet*, 2061-2, 1994
3. Nakashima K, et al: *Neurology*, 1019-20, 1995
4. Watanabe Y, et al: *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 251-8, 2000
5. Kato S, et al: *J Neuropathol Exp Neurol*, 1089-101, 1996
6. Watanabe Y, et al: *Brain Res Mol Brain Res*, 12-20, 2005
7. Kabashi E, et al.: *J Neurochem*, 1325-35, 2004
8. Urushitani M, et al: *J Neurochem*, 1030-42, 2002
9. Hyun DH, et al.: *J Neurochem*, 363-373, 2003
10. Holasek SS, et al.: *Brain Res*, 185-198, 2005
11. Pramatarova A, et al: *J Neurosci*, 3369-74, 2001

Dorfin キメラタンパク質による SOD1 変異に伴う ALS 治療の試み

分担研究者 祖父江 元¹⁾

研究協力者 丹羽 淳一¹⁾、石垣 診祐¹⁾、山田 新一¹⁾、伊藤 隆¹⁾、曾根 淳¹⁾
高橋 美穂¹⁾、道勇 学¹⁾

¹⁾ 名古屋大学大学院医学研究科神経内科

研究趣旨 我々が同定した新規ユビキチンリガーゼ(E3)である Dorfin は、*in vitro* において変異 SOD1 を特異的に認識し、神経細胞保護活性を有している。Dorfin トランスジェニック(Tg)マウスとの交配により変異 SOD1-Tg マウスの生存期間が延長したが、Dorfin の *in vivo* における半減期が極めて短いことからその治療効果は十分でない。本研究において、Dorfin の変異 SOD1 特異的結合能を保存しつつ、より安定して高発現する人工 E3 を作成するために、CHIP(Carboxyl Terminus of Hsc70-Interacting Protein)と Dorfin の基質結合部位を融合したキメラタンパク質を開発した。Dorfin キメラタンパク質は、より高い変異 SOD1 特異的 E3 活性と神経毒性軽減作用を有しており、変異 SOD1 に伴う ALS の治療に有望と思われる。

はじめに

SOD1 変異を伴う家族性 ALS において、運動ニューロンが選択的に障害される機序の詳細はいまだ不明であるが、SOD1 の活性低下によるものではなく、変異 SOD1 が運動ニューロンに対する毒性機能を発揮する(gain of toxic function)ことが原因と考えられている。ALS モデル動物である変異 SOD1-Tg マウスにおいても、変異 SOD1 が進行性に病変部位に蓄積することが知られている。従って、変異 SOD1 タンパク質を減少させることが ALS 治療のために重要であり、近年 RNA 干渉を用いた SOD1 タンパク質のノックダウンなど新たな治療法が開発されてきている。SOD1 は欠損しても、個体の正常な発育および成長に問題は生じないが、SOD1 ノックアウトマウスでは軸索切断に対する運動ニューロンの脆弱性が増強することが知られており、変異 SOD1 のみを特異的に減少させることが治療法確立のためには必要である。

Dorfin はヒト脊髄より我々がクローニングした

RING-finger / IBR ドメインを有する新規 E3 であり、培養細胞を用いた実験では、変異 SOD1 を特異的にユビキチン化してプロテアソームによる分解を促進し、神経細胞死を抑制する活性を有している。この Dorfin を導入した Tg マウスと交配することで、変異 SOD1-Tg マウスの生存期間を延長させることを我々は確認したが、Dorfin の *in vivo* における半減期が極めて短いことからその効果は十分でない(図 1)。

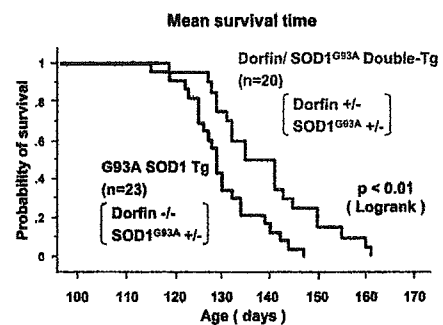


図 1 Dorfin-Tg マウスによる ALS 治療効果

そこで本研究においては、Dorfin の変異 SOD1 特異的結合能を保存しながら、より安定して高発現する人工 E3 を CHIP (Carboxyl Terminus of Hsc70-Interacting Protein) と Dorfin の基質結合部位を融合することにより開発し、変異 SOD1 の半減期や毒性に及ぼす影響を検討した。

方法

(1) Dorfin-CHIP キメラタンパク質発現コンストラクトの作成および培養細胞における発現解析

Dorfin の一部分のみを発現するベクター (Dorfin mutants) を作成し、Dorfin mutants を種々の変異 SOD1 発現ベクターと培養神経細胞に共発現させ、免疫沈降法を用いて変異 SOD1 と結合する Dorfin のドメインを同定した。同定した Dorfin の変異 SOD1 認識部位である C 末側部分と、強力なタンパク質品質管理活性を有する CHIP の E3 活性を有する U-Box 部位を様々な組み合わせで融合した種々の Dorfin キメラタンパク質を発現するコンストラクトを作成した (図 2)。

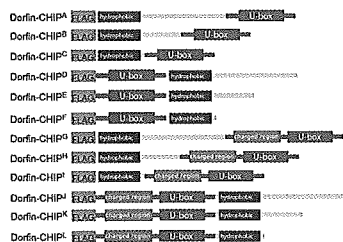


図 2 Dorfin-CHIP (Carboxyl Terminus of Hsc70-Interacting Protein) 融合タンパク質 (キメラタンパク質) 発現コンストラクト

作成した Dorfin キメラタンパク質を、培養神経細胞株 Neuro2a に導入し、各キメラタンパク質の発現レベルや安定性をウェスタンブロット、cycloheximide chase 法、pulse chase 法などを用いて解析した。

(2) Dorfin キメラタンパク質が変異 SOD1 の発現量、ユビキチン化、毒性などに及ぼす影響の解析

各 Dorfin キメラタンパク質を、変異 SOD1 とともに Neuro2a に共発現し、各キメラタンパク質と変異

SOD1 の結合の強さや変異 SOD1 のユビキチン化の程度を検討した。さらに、Dorfin キメラタンパク質が変異 SOD1 の半減期に及ぼす影響を、cycloheximide chase 法および pulse chase 法を用いて解析した。Dorfin キメラタンパク質を変異 SOD1 と共発現させた時の神経細胞 viability の改善効果を、MTT アッセイにより解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は商業ベースの培養細胞株を用いた *in vitro* 研究であり、特に倫理的問題はない。

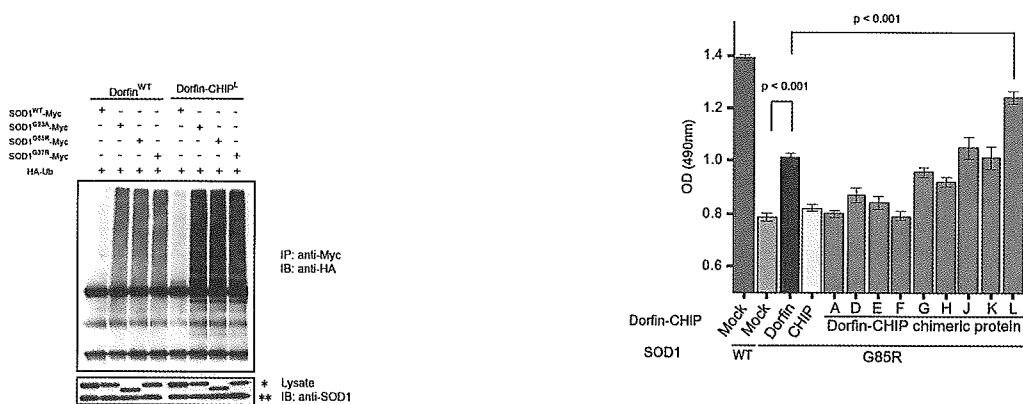
結果

作成した各種 Dorfin キメラタンパク質はいずれも野生型 Dorfin に比較して培養細胞において高発現した。Dorfin キメラタンパク質と変異 SOD1 の結合を検討した結果、CHIP の U-Box 部位を N 末に持ち、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を C 末側に有するキメラタンパク質 (D, E, F, J, K, L) において、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を N 末側に持つキメラタンパク質よりも強い変異 SOD1 結合能を有していた。いずれのキメラタンパク質も、野生型 Dorfin に比べて培養細胞内での半減期は長く、安定した高発現が得られた。

Dorfin キメラタンパク質、変異 SOD1、ユビキチンを培養細胞に導入し、*in vivo* ユビキチン化アッセイを行い検討した結果、いずれのキメラタンパク質においても E3 活性を認めたが、CHIP の U-Box 部位を N 末に持ち、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を C 末側に有するキメラタンパク質の場合に、より強い変異 SOD1 ユビキチン化活性を認めた。さらに、CHIP の U-Box 部位に隣接した charged region を含む (J, K, L) キメラタンパク質で、変異 SOD1 のユビキチン化活性が増強した。Dorfin キメラタンパク質による変異 SOD1 のユビキチン化の強さは、キメラタンパク質と変異 SOD1 の結合の強さに比例していた。

Dorfin キメラタンパク質の中では、キメラタンパク質 L で、野生型 Dorfin よりも強いユビキチン化活性が観察された (図 3A)。さらに、変異 SOD1 の半減期に対するキメラタンパク質共発現の効果を検討したところ、キメラタンパク質 L は野生型 Dorfin に比べ、変異 SOD1 の分解をより促進した (図 3B)。

A



B

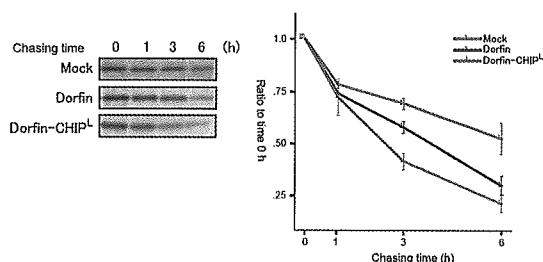


図 3 A. Dorfin-CHIP^Lは、野生型 Dorfin よりも強く様々な変異 SOD1 をユビキチン化する B. Dorfin-CHIP^Lは、野生型 Dorfin に比較して変異 SOD1 の分解をより促進する

MTT アッセイにより、Dorfin キメラタンパク質の Neuro2a 培養神経細胞に対する変異 SOD1 の毒性抑制効果を解析した結果、野生型 Dorfin に比較して強い変異 SOD1 ユビキチン化活性を有するキメラタンパク質 L においてのみ、野生型 Dorfin よりも優れた毒性抑制効果が認められた (図 4)。

考察

野生型 Dorfin の導入により ALS モデル動物である変異 SOD1-Tg マウスの生存期間を延長しようが、その効果は十分でない。その理由として、野生型 Dorfin は *in vivo* において半減期が極めて短く、Tg マウスにおいて十分な高発現を長期間維持することが難しいことが考えられる。従って、本研究に

図 4 Dorfin-CHIP^Lは、Dorfin よりも効果的に変異 SOD1 の細胞毒性を軽減させる

において我々は、Dorfin のこの欠点を克服し、変異 SOD1 による ALS 治療効果を高めるために、Dorfin の変異 SOD1 特異的結合能を保持しつつ、より安定して発現する人工 E3 の開発を試みた。Dorfin の C 末側にある hydrophobic cluster が変異 SOD1 結合ドメインであることを同定し、強力な E3 活性を有するタンパク質品質管理 E3 である CHIP のユビキチン化活性部位と融合した。変異 SOD1 に対する結合力が強く、十分な E3 活性を保持するためには、CHIP の U-Box 部位を N 末に持ち、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を C 末側に有する必要があった。野生型 Dorfin もユビキチン化部位である RING-finger/IBR ドメインを N 末に有するため、N 末側に E3 活性部位、C 末側に基質結合部位を有する構造が、変異 SOD1 特異的 E3 として機能するコンフォメーションをとるために重要であることが示唆された。

本研究により野生型 Dorfin に比べ、より強力な変異 SOD1 ユビキチン化・分解促進活性を有し、安定して発現するキメラタンパク質 L が得られた。キメラタンパク質 L は、Neuro2a に対する変異 SOD1 の毒性軽減効果も野生型 Dorfin に比較して強く、このキメラタンパク質を導入することで、変異 SOD1-Tg マウスの治療効果が野生型 Dorfin を導入した場合よりも高まることが期待できる。遺伝子工学的手法を用いて、神経変性疾患の原因となる異常タンパク質をより強力に分解する人工タンパク質を開発する手法は、ALS のみならず、パーキンソン病やアルツハイマー病などの異常タンパク質蓄積

により生ずる神経変性疾患の治療戦略として今後有望であると思われる。

まとめ

1. Dorfin の強制発現により、変異 SOD1-Tg マウスの生存期間を延長させえたが、その効果は十分でなかった。Dorfin は生体内で半減期が短く、Tg マウスでの高レベルの発現が難しいことが考えられた。

2. Dorfin の欠点を克服するために、Dorfin の変異 SOD1 結合部位と CHIP の U-Box を融させたキメラ E3 タンパク質の作成を試みた。Dorfin に比較して安定で、E3 活性の強いキメラタンパク質が得られ、変異 SOD1 による細胞毒性も改善しえた。

3. 今後、Dorfin キメラ E3 を高発現する Tg マウスを作成し、変異 SOD1-Tg マウスの治療効果を検討したい。

文献

- (1) Jiang YM et al. *Ann Neurol.* 57, 236-51 (2005)
- (2) Ishigaki S, et al. *J Biol Chem.* 279, 51376-85 (2004)
- (3) Takeuchi H, et al. *J Neurochem.* 89, 64-72 (2004)
- (4) Hishikawa N, et al. *Am J Pathol.* 163, 609-19 (2003)
- (5) Ito T, et al. *J Biol Chem.* 278, 29106-14 (2003)
- (6) Ishigaki S, et al. *FEBS Lett.* 531, 354-8 (2002)
- (7) Niwa J, et al. *J Biol Chem.* 277, 36793-8 (2002)
- (8) Niwa J, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 281, 706-13 (2001)

ラット脊髄器官培養系における脊髄神経細胞に対する

小胞体ストレス誘導薬剤の影響

田代 淳¹⁾，菊地誠志¹⁾，新保和賢²⁾，岸本利一郎¹⁾，辻 幸子¹⁾，佐々木秀直¹⁾

¹⁾ 北海道大学神経内科

²⁾ 西田山病院神経内科

研究趣旨

小胞体（ER）ストレスは様々な神経疾患の発症において重要な要素の一つと考えられている。筋萎縮性側索硬化症や脊髄虚血モデルでは ER ストレスと運動神経細胞死との関連が報告されている。今回われわれはラット脊髄器官培養系にて ER ストレス誘導薬剤の脊髄神経細胞に与える影響について検討した。

はじめに

以前われわれは脊髄運動神経細胞の分散培養系にて ER ストレス誘導薬剤である Brefeldin A (BFA) の脊髄運動神経細胞に対する選択的毒性を証明した¹⁾。また、最近われわれは、ラット脊髄器官培養系を用いてプロテアソーム阻害剤の脊髄神経細胞に対する毒性について検討し報告した²⁾。

これらの実績をふまえ、今回は ER ストレス誘導薬剤として Tunicamycin (Tm) を用いて、ラット脊髄器官培養系の神経細胞に対する影響について検討した。

（対象および）方法

生後 7 日目の Sprague-Dawley ラットをケタミンによる深麻酔下に断頭し脊髄を摘出した。摘出した脊髄から結合織や神経根を取り除いて 400 μ m 厚のスライスを作成した。スライスを膜上に置き 1ml の培地を入れた 6 穴培養皿に挿入し 37°C、5%CO₂ の条件で培養した。

培養 10 日目に Tm を単独または他の薬剤とともに添加し、72 時間曝露した後にパラホルムアルデヒドにて固定した。一次抗体

として、SMI-32 と抗 Calretinin 抗体をそれぞれ単独または同時に使用した。単独で使用した場合は抗 mouse または rabbit-HRP 抗体を二次抗体とし diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) にて染色しプレパラートを作成した。同時に使用した場合は蛍光抗体を二次抗体として二重染色を行った。

観察は光学顕微鏡または蛍光顕微鏡にて行い、脊髄前角に存在する直径 30 μ m 以上の SMI-32 陽性細胞を脊髄運動神経細胞と判定し、脊髄後角に存在する抗 Calretinin 抗体陽性細胞を後角神経細胞と判定した。

それぞれのスライス毎に脊髄運動神経細胞数および脊髄後角神経細胞数を数えて条件毎にスライス一枚あたりの平均を算出し、それぞれの実験毎の対照群に対する生存率として計算し統計処理を行った。

なお、Tm とともに添加した薬剤は Boc-D-FMK (Pan-caspase inhibitor)、Z-DEVD-FMK (Caspase inhibitor)、Calpeptin (Calpain inhibitor)、Pifithrin- α (p53 inhibitor)、sp600125 (JNK inhibitor) のいずれかであった。

また、Tm による神経細胞障害の機序を検討するため、一部のスライスは SMI-32 または抗 Calretinin 抗体と抗 p53 抗体を一次抗体とする蛍光二重染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察を行った。

結果

Tm の添加により、対照群と比較して脊髄運動神経細胞および脊髄後角神経細胞ともに生存率の低下がみられた (図 1, 2)。

細胞種ごとに検討すると、脊髄運動神経細胞生存率は低濃度の Tm では対照群と有意差がみられなかったが、高濃度になると対照群に対して有意に低下していた (図 1)。それに対して、脊髄後角神経細胞生存率は低濃度の Tm から有意な低下がみられた (図 2)。

また、同時に添加した薬剤の中では、p53 阻害剤である Pifithrin- α (PFT) が最も Tm による神経細胞毒性に対して保護的に働いている可能性が考えられたため、より詳細に検討した。その結果、脊髄運動神経細胞生存率では Tm 1, 2, 10, 20 μ g/ml いずれの濃度でも PFT 有無で有意差がなかった (図 3) のに対し、脊髄後角神経細胞では Tm 20 μ g/ml を除いてすべての濃度で PFT 添加により生存率が有意に上昇していた (図 4)。

さらにこれらの結果をふまえて施行した SMI-32 または抗 Calretinin 抗体と抗 p53 抗体による二重染色では、対照群においては脊髄運動神経細胞および脊髄後角神経細胞のいずれも抗 p53 抗体は陰性であった。一方、Tm 添加群では、脊髄運動神経細胞については胞体内に淡く抗 p53 抗体による染色が認められたのみであったが、後角神経細胞については後角の部位に抗 p53 抗体陽性の核と思われる染色を明瞭に認めた。

考察

今回の検討では、脊髄運動神経細胞よりもむしろ脊髄後角神経細胞の方が低濃度の Tm からより強く障害されていた。

PFT は p53 の核内への移行を阻害すること

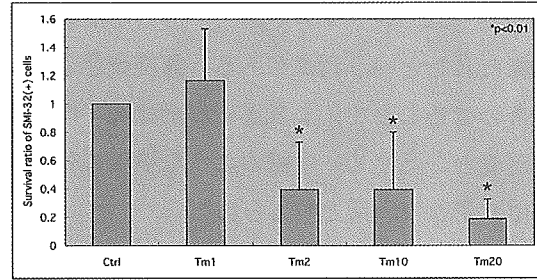


図 1 脊髄運動神経細胞生存率

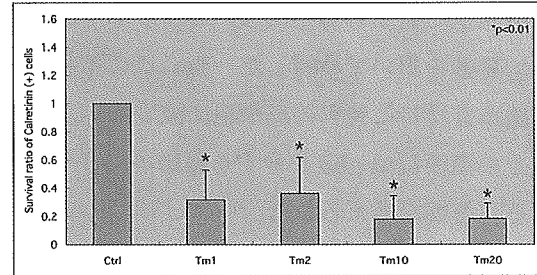


図 2 脊髄後角神経細胞生存率

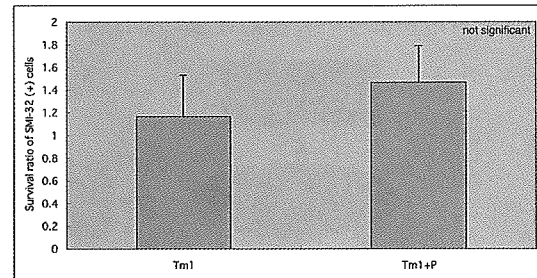


図 3 脊髄運動神経細胞に対する Tm (1 μ g/ml) および PFT の効果

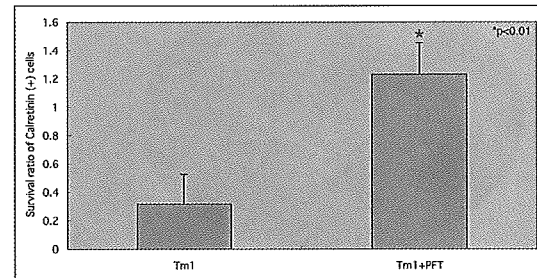


図 4 脊髄後角神経細胞に対する Tm (1 μ g/ml) および PFT の効果

で抗アポトーシス作用を発現するとされる p53 阻害剤である 3)。今回の結果では、Tm による脊髄後角神経細胞毒性に対して PFT が最も保護的に働いた。このことと Tm 添加群の後角に抗 p53 抗体陽性を認めたこととあわせて、Tm による神経細胞毒性は、特に脊髄後角神経細胞においては p53 を介する経路が関与している可能性が考えられた (図 5)。

また、今回の検討に用いたラット脊髄器官

培養系は、スライス平面内の解剖学的構造が保たれるという利点がある。免疫染色と組み合わせることで、より正確な細胞種の同定が可能となるため、今回のような検討には非常に有用な実験系と考えられた。

まとめ

ER ストレス誘導薬剤である Tm の脊髄神経細胞に対する毒性についてラット脊髄器官培養系を用いて検討した。Tm による神経細胞障害は特に後角神経細胞に強い傾向があり、その機序には p53 を介する経路が関与している可能性が考えられた。

今後は ER ストレスと神経細胞障害の関連を明らかにするため、p53 も含む経路の全体像を明らかにすべく検討を進める予定である。

文献

- 1) Kikuchi S, et al. : J Neurosci Res, 591-599, 2003
- 2) Tsuji S, et al. : J Neurosci Res, 443-451, 2005
- 3) Culmsee C, et al. : Biochem Biophys Res Commun, 761-777, 2005

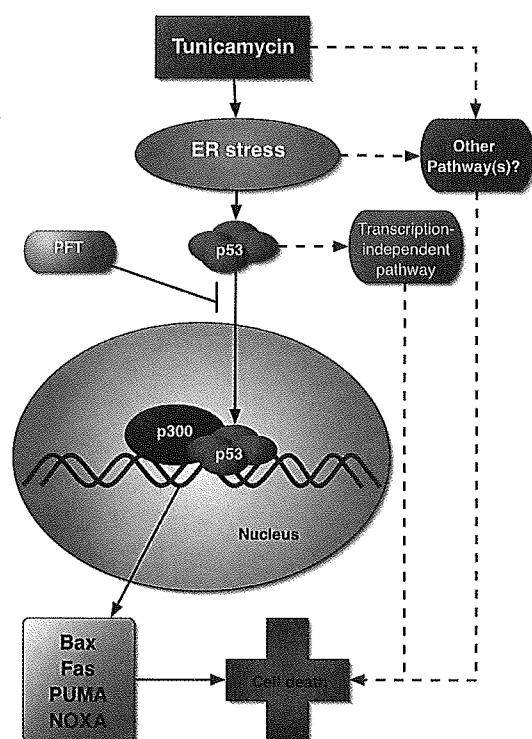


図5 Tm および ER ストレスから細胞障害に至る経路

抗 HGF 抗体の髄腔内投与による ALS ラット病態進行の促進

青木正志¹⁾，割田 仁¹⁾，石垣あや¹⁾，松本有史¹⁾，水野秀紀¹⁾，永井真貴子¹⁾，
船越 洋²⁾，中村敏一²⁾，糸山泰人¹⁾

1) 東北大学神経内科，2) 大阪大学分子再生医学

研究趣旨 肝細胞増殖因子（HGF）が筋萎縮性側索硬化症（ALS）のモデルマウス・ラットの両方で運動ニューロン保護、生存延長効果をもつことは既に報告されている。この HGF が ALS 様病態進行を抑制する重要な生理的因子であるか否かを明らかにするため、抗 HGF 抗体を用いて内因性 HGF の中和を試み、病態悪化の有無を検討した。

はじめに

肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor, HGF）は細胞分裂・形態形成・細胞遊走促進、細胞死抑制、そしてアポトーシス抑制といった多様な作用をもつ生体内物質である。この HGF を外来性に筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデル動物に供給することで運動ニューロン死を抑制し生存期間を延長できることが、(1) 変異 *Cu/Zn SOD* 遺伝子導入マウスと中枢神経系内に HGF を過剰発現する *HGF* 遺伝子導入マウスの交配実験¹⁾、および (2) 変異 *Cu/Zn SOD* 遺伝子導入（Tg）ラットに対する髄腔内 HGF 投与実験²⁾ という二つの方法によって既に示されている。

本研究では、Tg ラットにおける内因性肝細胞増殖因子（HGF）の ALS 様病態進行に対する生理的意義を明らかにするため、抗 HGF 抗体を髄腔内投与して中和すると病態が悪化するか否かを検討した。

対象および方法

東北大学神経内科で確立・系統維持している Gly93Ala 変異 *Cu/Zn SOD*-Tg ラット³⁾ と正常同腹仔

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

なお、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。

結果

Tg ラット腰髄では正常同腹仔に比して内因性 HGF の誘導が発症前（約 14 週齢）より認められた（図 1）。

コントロール群に比して抗 HGF 抗体投与群では、より早期に発症する傾向（ $P=0.1843$ ，図 2）、

有意に速い進行 ($P=0.0299$, 図 3)、より早期の死亡が認められた ($P=0.0463$, 図 4)。

抗 HGF 抗体投与群の死亡時病理学的所見では、脊髄前角ニューロンの著明な脱落と著しいミクログリア、アストロサイト増生を認め、コントロール群と同様であった (図 5)。

考察

本 ALS モデルラットにおいて運動ニューロン脱落とともに誘導されてくる内因性のラット HGF を抗 HGF 抗体の髄腔内投与によって中和すると、病態が悪化することが明らかとなった。すなわち、抗 HGF 抗体投与は ALS 様病態の進行を促進したと考えられた。このことから、HGF が ALS 様病態の進行を遅らせている重要な生理的抑制因子であることが示唆される。

内因性 HGF の意義 (作用点) をさらに明らかにするためには、本研究で示された抗 HGF 抗体投与による病態加速メカニズムの解明が有用と考えられる。

Kato らは、変異 *Cu/Zn SOD* 関連家族性 ALS だけでなくヒト孤発性 ALS においても剖検脊髄の残存運動ニューロンに HGF とその受容体 *c-Met* の発現を報告しており、ヒト ALS における HGF の重要性を示唆している⁴。

以上より、外来性 HGF の供給は生理的な HGF の病態進行抑制作用を強化するという点でヒト ALS に対する理論的かつ有力な新規治療法になり得ると考えられる。HGF による新規治療法開発の次なる段階としては上述の既報^{1,2}をふまえ、齧歯類よりヒトに近い霊長類における HGF 投与の安全性試験が必要であり、ヒトの前臨床試験に向けて今後の研究進展が期待される。

まとめ

HGF は ALS 様病態の進行抑制因子として重要な生理的意義をもっている可能性が示唆された。外来性 HGF の供給は ALS の新しい治療法を開発する上で

理論的かつ有力な戦略として期待できる。

文献

1. Sun W and Funakoshi H, et al.: 6537-6548, 2002.
2. Ishigaki A, et al.: *in submission*, 2005.
3. Nagai M, et al.: *J Neurosci*, 9246-9256, 2001.
4. Kato S, et al.: *Acta Neuropathol*, 112-120, 2003.

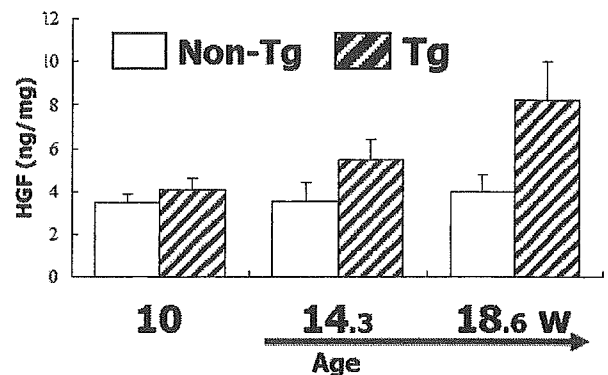


図 1. Tg ラットでは発症前の運動ニューロン脱落開始時期 (約 14 週齢) より、内因性ラット HGF が脊髄に誘導されてくる (ELISA 法)。

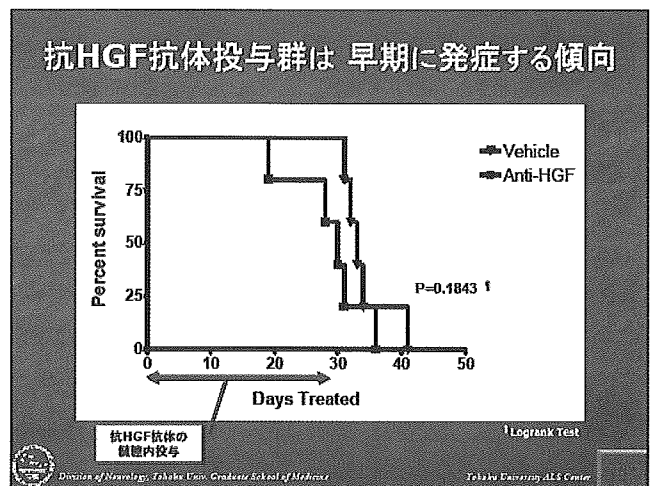


図 2. 抗 HGF 抗体投与群は、より早期に発症する傾向を認めた ($P=0.1843$)。