

厚生労働科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症に対する
肝細胞増殖因子を用いた
画期的治療法の開発

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 糸山泰人 / 東北大学大学院医学系研究科神経内科
平成 19 年 3 月 印刷

目 次

I. 研究者一覧

II. 総括研究報告書

東北大学大学院医学系研究科神経内科

糸山泰人

III. 分担研究報告書

1. MRIによるサルの脊髄投射路の可視化の試み

—脊髄損傷モデルにおける薬剤評価系の確立—

慶応義塾大学医学部生理学
慶応義塾大学医学部整形外科

岡野英之
中村雅也

2. ALSモデル動物における cMet/ HGF 受容体のリン酸化制御

—HGFの安全な投与方法確立へ向けての基盤研究—

大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

船越 洋

3. 肝細胞増殖因子 (HGF) /活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムに基づいた筋萎縮性側索硬化症 (ALS) —変異SOD1ストレスによる肝臓・腎臓・心臓における一過性組織変性からの回復機構の解明：ALSに対するHGFを用いた画期的治療法の病理組織学的論拠

鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門

加藤信介

5. 抗HGF抗体の髄腔内投与によるALSラット病態進行の促進およびその機序の解明

東北大学病院神経内科

青木正志

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 研究成果に関する刊行物

研究者一覽

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子を用いた画期的治療法の開発

研究者一覧

主任研究者	糸山泰人	東北大学大学院医学系研究科神経内科	教授
分担研究者	岡野栄之	慶応義塾大学医学部生理学	教授
	船越 洋	大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学	助教授
	加藤信介	鳥取大学医学部附属脳研究施設神経病理	助教授
	中村雅也	慶応義塾大学医学部整形外科	専任講師
	青木正志	東北大学病院神経内科	助手（院内講師）

總 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を用いた画期的治療法の開発

主任研究者 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学講座神経内科学分野 教授

研究要旨：本研究の目的は神経難病でも最も苛酷な筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対して肝細胞増殖因子（HGF）を用いた画期的治療法を開発することとそれに関わる基盤研究を進めることにある。ALS の病因研究および治療研究には変異 Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）遺伝子導入 ALS ラットが重要な役割を果たしている。私共はこの ALS ラットを用いて運動ニューロンに対し神経栄養因子作用を有するヒトリコンビナント Hepatocyte Growth Factor（HGF）の髄腔内持続投与で ALS に対する有効性を示してきた。一方、抗 HGF 抗体を ALS ラットの髄腔内へ投与し HGF を中和させると病態を悪化させることを確認し、内因性 HGF-c-Met 機構が ALS 病態の進行を抑制する重要な因子である可能性が明らかになった。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。この事実は今後の ALS への 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。新規治療法開発の次なる段階としては、齧歯類に比較してヒトにより近い霊長類における HGF 投与の安全試験が必要であり、現在進行中である。

分担研究者

船越 洋（大阪大学大学院医学系研究科
分子再生医学）
岡野栄之（慶応義塾大学医学部生理学）
中村雅也（慶応義塾大学医学部整形外科）
加藤信介（鳥取大学医学部神経病理）
青木正志（東北大学病院神経内科）

な疾患であるが、現状では有効な治療法がない。ALS の病因と病態の解明を行ない、それを基盤にした新規治療法の開発が世界的に切望されている。

わが国で発見された神経栄養因子である肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor、以下 HGF）は、運動ニューロンに対する強力な保護作用が知られており、私たちは遺伝子工学的に ALS マウスにおける HGF の運動ニューロン死に対する抑制効果を確認している。さらには ALS の臨床応用を目指し、私たちが開発した大型 ALS 動物モデルである変異 Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）導入 ALS ラットに対

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な細胞死が惹起されて、全身の筋萎縮と脱力が進行する原因不明の難治性神経筋疾患である。しかも 2～3 年の経過で呼吸筋の麻痺をきたす極めて予後不良

して HGF 蛋白の髄腔内投与実験を行い、その有効性も確認している。今回は内因性 HGF の ALS 病態における役割およびその投与の安全性に関する検討を中心に行った。

B. 研究方法

ALS の新規治療法の開発を目指し ALS 病態における内因性 HGF の役割およびその投与の安全性に関する検討するために、以下の研究を行う。

1) 抗 HGF 抗体の髄腔内投与による ALS ラット病態進行の促進およびその機序の解明

東北大学神経内科で確立した G93A 変異 SOD1 トランスジェニックラットと正常同腹仔ラット腰髄の内因性ラット HGF レベルを酵素免疫測定法で明らかにした。その結果をもとに同トランスジェニック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 μ g/体重(g) 髄腔内に持続投与した。コントロールとしては同量の正常ウサギ IgG を投与した。ラットは注意深く連日観察し発症日、死亡日を特定した。死亡時の腰髄灌流固定凍結切片にて病理的な検討も行った。

さらには同抗ラット HGF 特異抗体 2 週間投与で、腰髄灌流固定凍結切片を作製し、前角細胞数および病理像の確認を行った。また蛍光免疫組織化学にて、リン酸化 Akt、リン酸化 c-Met の発現とグリア細胞、ユビキチン (Ub) 陽性像について半定量的に解析した。

2) HGF の安全な投与方法確立に向けて、ALS モデル動物における c-Met/HGF 受容

体のリン酸化の検討

G93A 変異 SOD1 トランスジェニック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 (ダブルトランスジェニックマウスの作製) により、c-Met 活性化の評価、c-Met 膜近傍領域にあるセリン残基特異的抗体を用いた解析および脱リン酸化酵素群の発現調節についての検討を行った。

3) HGF/活性型リン酸化 c-Met システムに基づいた ALS 病態における一過性組織変性からの回復機構の解明

G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスにおける脊髄、肝臓、腎臓、心臓の各臓器における経時的解析を行と共に、HGF およびリン酸化 c-Met の発現の免疫組織化学的検討を行う。

(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務めた。

C 及び D. 研究結果及び考察

1) 抗 HGF 抗体の髄腔内投与による ALS ラット病態進行の促進およびその機序の解明

トランスジェニックラット腰髄では正常同腹仔の野生型群に比して内因性 HGF の誘導が発症前 (約 14 週齢) より認められた。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より早期の死亡が認められた。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。

一方、抗体投与 2 週間での検討では、抗 HGF 抗体投与群の腰髄前角では前角細胞脱落の促進傾向に加え、リン酸化 Akt 陽性細胞の有意な減少とミクログリア、アストログリア、Ub 陽性凝集体の有意な増加を認めた。リン酸化 c-Met は残存前角細胞と活性化アストログリアの一部に共陽性像を認めた。

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。

Kato らは、変異 SOD1 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。本研究からも内因性 HGF-c-Met 機構が ALS 様病態の進行を抑止する重要な因子である可能性が示唆された。

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。

2) HGF の安全な投与方法確立に向けて、ALS モデル動物における c-Met/HGF 受容体のリン酸化の検討

ALS トランスジェニックマウスおよび

ALS/HGF トランスジェニックマウスにおいて c-Met は共にチロシン残基のリン酸化を受けていた。その一方でコントロール(野生型)マウスではチロシン残基のリン酸化はほとんど認めなかった。

c-Met 膜近傍領域にあるセリン残基特異的抗体およびフォスファターゼ抗体による検討では神経細胞が ALS に罹患しているか否かでその発現が調整されていることが明らかになった。このことは HGF を供給した際に ALS に罹患していない(不必要な)細胞にシグナルを入れなくてすむ意味で安全な投与に有利であると考えられた。

3) HGF/活性型リン酸化 c-Met システムに基づいた ALS 病態における一過性組織変性からの回復機構の解明

SOD1 トランスジェニックマウスにおいては変異 SOD1 ストレスにより脊髄前角細胞は変性し、最終的には死にいたる。その過程において内因性生存機構として HGF/活性型リン酸化 c-Met システムの up-regulation 機構を惹起させ自らを守って生存し続けようとするが、この機構を振り切るかたちで死にいたる。その一方で、肝臓、腎臓、心臓においては、一度は脊髄前角細胞と同様な変性組織像を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈する。この組織学的完全回復機構のひとつに内因性生存機構としての HGF/活性型リン酸化 c-Met システムの up-regulation 機構が明らかになった。

E. 結論

本研究の目的は神経難病でも最も苛酷な筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対して肝細胞増殖因子(HGF)を用いた画期的治療法

を開発すること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 導入による ALS トランスジェニックラットは病因・治療研究に極めて有用なモデルである。

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。

また他の臓器における SOD1 ストレスに対する反応の解析からも内因性 HGF-c-Met 機構が ALS 様病態の進行を抑制する重要な因子である可能性が示唆された。

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、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、ヒトの臨床試験に向けて今後の研究進展が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) Kato M, Kato S, Abe Y, Nishino T, Ohama E, Aoki M, et al. Histological recovery of the hepatocytes is based on the redox system upregulation in the animal models of mutant superoxide dismutase (SOD)1-linked amyotrophic lateral sclerosis. *Histol Histopathol* 2006; 21: 729-42.
- 2) Koyama S, Arawaka S, Chang-Hong R, Wada M, Kawanami T, Kurita K, et al. Alteration of familial ALS-linked mutant SOD1 solubility with disease progression: its modulation by the proteasome and Hsp70. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 719-30.
- 3) Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, et al. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 2006; 83: 119-33.
- 4) Okada S, Nakamura M, Katho H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H. Conditional ablation of Stat3/Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med* 2006; 12: 829-834
- 5) Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Okano JH, Kishino A, Konishi O, Kikuchi K, Kimura T, Kumagai K, Goshima Y, Toyama Y, Okano H. Axonal Regeneration and Functional Recovery by Administration of Strong and Selective Semaphorin3A Inhibitor into the Injured Spinal Cord. *Nat Med* 2006; 12:1380-1389

2. 学会発表

- 1) Aoki M, Ishigaki A, Nagai M, Warita H, kato S, Kato M, Nakamura T,

Funakoshi H, Itoyama Y. Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor at the onset of paralysis slows disease progression in a rat of ALS. 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, Japan, 30 November - 2 December, 2006

2) Warita H, Aoki M, Nagai M, Ishizaki A, Mizuno H, Funakoshi H, Itoyama Y. Intrathecal infusion of antihepatocyte growth factor antibody exacerbates disease progression in a rat model of ALS. 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, Japan, 30 November - 2 December, 2006

3) Fujiyoshi K, Nakamura M, Yamada M, Yamane J, Katoh H, Kitamura K, Y. Tanioka Y, Toyama Y, Okano H. Diffusion tensor tractography of the intact and injured spinal cord in non-human primates. 36th Annual meeting of Neuroscience, Atlanta, USA, November 2006

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

分 担 研 究 報 告 書

分担研究報告書

MRI によるサル脊髄投射路の可視化の試み -脊髄損傷モデルにおける薬剤評価系の確立-

分担研究者 岡野栄之 慶應義塾大学生理学教授

戸山芳昭 慶應義塾大学整形外科教授

中村雅也 慶應義塾大学整形外科専任講師

研究要旨：本研究では、コモンマーモセットを用いた脊髄損傷モデルにおける薬剤評価系の確立のために、MRI による先端画像解析法の1つである拡散テンソル法を用いたコモンマーモセットの脊髄投射路の tractography を試みた。正常および損傷脊髄内の投射路を詳細に描出することに成功し、さらにこれらが病理組織所見と一致することを確認できた。今回の結果より、コモンマーモセットを用いた脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子の効果を評価する方法を確立することができた。

A. 研究目的

われわれは、前臨床試験としてコモンマーモセットを用いた脊髄損傷モデルを確立し、さらにヒト神経幹細胞移植による機能回復を報告してきた。移植後の機能回復には脊髄投射路の軸索再生が重要であることは言うまでもないが、従来の方法ではトレーサーを大脳皮質運動野に直接注入して投射路を標識するため、臨床応用は不可能であった。そこで、本研究の目的は、コモンマーモセットを用いた脊髄損傷モデルにおける薬剤評価系の確立のために、MRI による先端画像解析法の1つである拡散テンソル法を用いたコモンマーモセットの脊髄投射路の tractography を確立することである。

B. 研究方法

成体雌コモンマーモセット6匹を使用し、第6頸髄レベルに脊髄半切損傷モデルを作製した(損傷群)。損傷9日目に灌流固定を施行し、拡散テンソルMRIにて固定動物の頸髄部を撮影した。MRI装置は小動物用7T-MRI(Bruker Biospin社製、PharmaScan70/16)に、内径6cm

の送受信ボリュームコイルを組み合わせ、拡散テンソル撮影シーケンスには拡散強調SE法($TR=15000ms$ 、 $TE=40ms$ 、 $NEX=1$ 、MPG軸=12、 $b\text{-factor}=1000s/mm^2$ 、 $slice\ thickness=0.85mm$ (gap less)、 $FOV=5.5\times 5.5cm$ 、 $matrix\ size=256\times 256$)を使用した。拡散テンソル画像解析ソフトは東京大学医学部附属病院放射線科にて開発されたVolumeOneとdTVII SRを使用し、Fractional anisotropy (FA) mapによる定量とTractographyによる定性評価を施行した。その後、組織学的検討を行い得られたtractographyと比較した。非損傷モデルをコントロール群として使用し、損傷群と比較検討した。

C. 研究結果

非損傷モデルにおいて、拡散テンソル撮像後に画像処理したFA mapとcolor mapにより、コモンマーモセットの正常脊髄白質内の脊髄投射路における異方性や方向性が鮮明に描出された。また、これらDTTにより描出された白質繊維の局在と髄鞘染色(LFB染色)は一致していた(Fig. 1)。

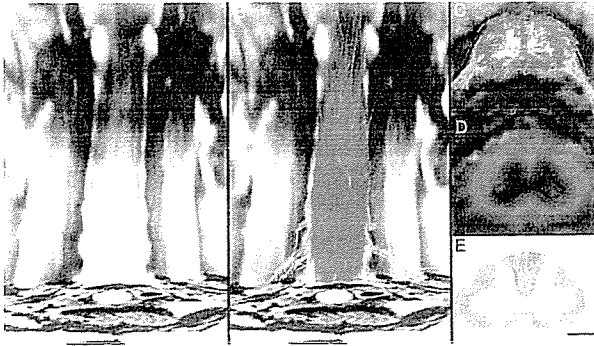


Fig. 1

また、脊髄半切モデルにおいても脊髄白質の軸索の切断部が詳細に描出された (Fig. 2)。dTV IISR を使用した FA map による定量分析では、損傷群における損傷部頭尾側部の脊髄投射路の描出が有意に低下しており、軸索損傷後の Waller 変性による影響と考えられた。これらの拡散テンソルで得られた画像所見は、同一動物における LFB による髄鞘染色、CaMKII による皮質脊髄路の免疫染色の組織所見と一致していた (Fig. 3)。

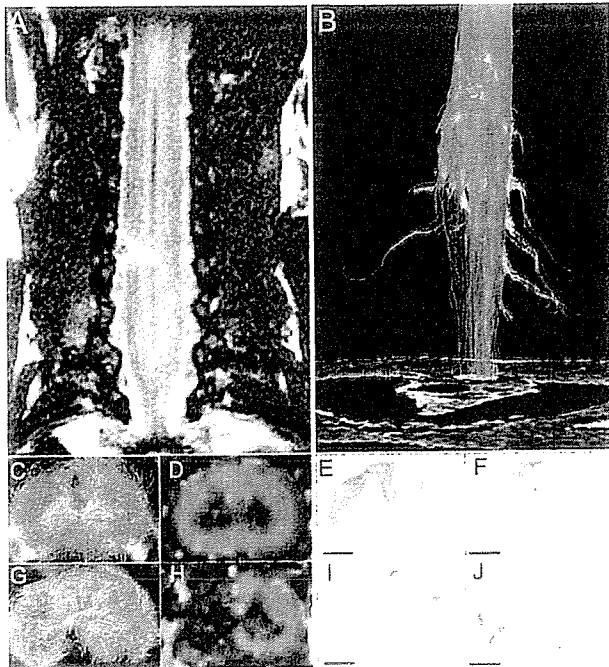


Fig. 2

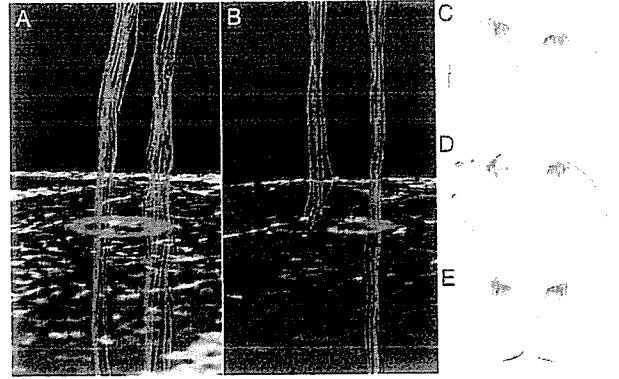


Fig. 3

D. 考察

拡散テンソル tractography は、拡散強調 MRI の画像データから神経線維の方向性や走行を視覚化する画期的な画像解析手法である。本法は、従来の神経トレーシングなど病理組織学的解析に比して、非破壊的で効率的な手法であり、近年、特に脳神経領域における有用性が報告されている。

今回われわれは、脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子の有効性を評価する方法を確立するために、コモンマーモセットの正常および損傷脊髄白質内の脊髄投射路の可視化を試みた。脊髄内神経線維は鮮明に描出され、組織所見を明確に反映していたことにより神経損傷範囲や軸索再生評価法の画像診断法の 1 つとして有用であると考えられた。

既に、コモンマーモセット脊髄損傷モデルに対する肝細胞増殖因子の髄腔内持続投与を行っており、今後 MRI DTT による軸索の評価を行う予定である。

E. 結論

コモンマーモセットを用いた脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子の効果を評価する方法をMRI tensor tractographyを用いて確立することができた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- K.Fujiyoshi, M. Nakamura, M.Yamada, J. Yamane, H. Katoh, K.Kitamura, Y. Tanioka, Y. Toyama, H. Okano: Diffusion tensor tractography of the intact and injured spinal cord in non-human primates. 36th Annual meeting of Neuroscience. (Atlanta, USA, 2006,11)
- 藤吉兼浩、中村雅也、山田雅之、山根淳一、岡野栄之、戸山芳昭：コモンマーモセット損傷脊髄における拡散テンソル tractography 第21回日本整形外科学会基礎学術集会(長崎、2006,10)

厚生労働科学研究費助成金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

ALS モデル動物における c-Met/HGF 受容体のリン酸化制御

—HGF の安全な投与方法確立へ向けての基盤研究—

分担研究者 船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科 助教授

中村 敏一 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

私達は、HGF が筋萎縮性側索硬化症（ALS）トランスジェニックモデルマウスの広範囲（脊髄・脳幹部）な運動神経細胞に対して強力に細胞保護作用を示し、運動機能の改善や寿命の延長効果を示すことを報告した。HGF の作用機序としては、神経細胞に対する直接作用と、グリア細胞（アストロサイト）への作用を介する間接作用の2つの機序があることを明らかとしてきた。これらの結果から、HGF が実際の臨床治療薬として効果を示す可能性が強く期待される。一方で、ヒト ALS 患者に適した供給方法の検討、投与時の安全性の確保は、HGF の臨床適用を考えていく上で重要な課題である。本研究では、HGF の神経系への局所性供給により ALS 神経細胞に加えて正常細胞でのシグナル伝達がおこるか否かを解析することを目的とし解析を施行した。ALS-Tg マウスと神経特異的 HGF 発現 Tg マウス（HGF-Tg）の交配実験から、ALS への罹患の有無で HGF が神経細胞にシグナル伝達する効率を c-Met/HGF 受容体のチロシン残基の自己リン酸化を指標に評価した。その結果、ALS/HGF-Tg では脳幹部運動神経細胞に於ける効率よい c-Met のチロシンリン酸化を認めたのに対して、コントロールマウスでは c-Met のチロシン残基のリン酸化を認めなかった。また、HGF-Tg においては HGF が有意に多く供給されているにもかかわらず c-Met のチロシンリン酸化がほとんど検出されなかった。このことは、HGF を供給した際、ALS に罹患していない（不必要な）細胞にシグナルを入れなくてすむ意味で HGF の安全な投与に有利と考えられた。なぜ ALS の罹患の有無で HGF による c-Met 活性化効率に相違を示すかについては、c-Met の一部領域のリン酸化とフォスファターゼの誘導の観点から ALS の罹患の有無で比較・解析し、その分子機構について考察した。

A. 研究目的

【背景】 筋萎縮性側索硬化症（ALS：別

名ゲーリック病）は、運動神経細胞が特異的に変性することにより進行性の運動麻痺をきたし最終的に死にいたる難病である。

近年 ALS 患者の遺伝解析により、家族性 ALS (FALS) の原因遺伝子として SOD1 の 100 種類以上の変異が明らかとされ、今後この遺伝子変異に対応する治療法開発が標的になると考えられる。また、SOD1 とは別に ALS2 の変異が報告された。しかしながら、ALS の大部分 (90%以上) の症例は家族歴や原因が明らかとされていない孤発性 ALS (SALS) に分類される。SALS の症例は、様々な原因に依存して発症してくるものと想定されるが、運動神経細胞の変性・脱落を主病態としている点では共通している。そこで運動神経細胞の変性・細胞死阻止が FALS と SALS 共通の治療アプローチとして注目される。私達は、新規神経栄養因子としての HGF に注目し、ALS 治療効果の解析を進めてきた。具体的には、ヒト変異 SOD1G93A を過剰発現するトランスジェニックマウス (ALS-Tg) と神経特異的 HGF-Tg を交配する事で、ALS-Tg の神経に特異的に HGF を供給した効果を解析した。その結果、HGF は ALS-Tg における運動神経細胞死を抑制し、運動機能を改善し、寿命延長効果をもつことが明らかとなった (Sun, et al., J. Neurosci, 2002)。この HGF 供給法では、HGF の副作用は認めていない。しかしながら、臨床適用を考える上でトランスジェニック動物にかわる HGF の安全な投与方法の開発およびその基盤研究が必要である。

【目的】本研究では、HGF の神経系への局所性投与により、(a) 正常マウス (野生

型) マウスと ALS-Tg とで c-Met/HGF 受容体の活性化に相違があるかどうか、(b) ALS 依存的な c-Met 活性化の分子機構の解析を目的とした。

B. 研究方法

- (a) 神経系特異的に rat HGF を発現する HGF-Tg と SOD1G93A 高発現 ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) を交配することで、① WT ② HGF-Tg ③ ALS-Tg ④ ALS/HGF-Tg の 4 群を作成した。
- (b) c-Met の活性化の評価：c-Met の活性化を c-Met の自己リン酸化特異的抗体を用い、上記 4 群のマウスの脊髄と脳幹部運動神経核 (舌下神経核と顔面神経核) について評価した。
- (c) c-Met 膜近傍領域のあるセリン残基特異的抗体を用いた解析：研究室で作成した膜近傍領域のセリン残基特異的な抗体を用い、上記 4 群のマウスの脳幹神経核における免疫染色を施行した。
- (d) 脱リン酸化酵素群の発現調節解析：膜近傍領域のある特異的セリン残基について、その脱リン酸化を担う可能性のある酵素 (PP2A 他) について、上記 4 群の脳幹神経核における免疫染色を施行した。
- (e) 神経特異的とグリア細胞特異的のマーカーを用いて、上記の解析の責任細胞を確認した。
- (f) HGF 蛋白質の脳幹神経核への供給量は、ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

- (a) 脳幹神経核における c-Met のチロシン残基リン酸化—WT, HGF-Tg, ALS-Tg, ALS/HGF-Tg の比較—: ALS-Tg および ALS/HGF-Tg マウスの脳幹運動神経核 (舌下神経核および顔面神経核) においては、c-Met は共にチロシン残基のリン酸化を受けていた。その程度は、ALS/HGF-Tg で強い傾向を認めた。脳幹神経核においてチロシン残基のリン酸化を認めたのは神経細胞であった。一方、野生型マウスでは c-Met のチロシン残基のリン酸化をほとんど認めなかったことに加え、HGF-Tg マウスにおいても脳幹神経核における c-Met のチロシン残基のリン酸化をほとんど検出できなかった。
- (b) c-Met セリン残基のリン酸化抗体およびフォスファターゼ抗体を用いた免疫染色結果: 4 群の比較解析から、c-Met のセリン残基のリン酸化とフォスファターゼの発現レベルが ALS に罹患しているか否かで調節されていることが明らかとなった。
- (c) HGF-Tg の脳幹では、WT マウスに比較して高レベルの HGF 蛋白質が検出され、HGF が確実に供給できている事が確認された。

D. 考察

本研究において、HGF の神経系への局所性な供給は、解析した HGF 供給量では野生型マウスの神経組織の c-Met を活性化せず

にすむことが明らかとなった。その分子機構としては、ALS 依存的なフォスファターゼの発現調節を介した c-Met の分子内セリン残基のリン酸化調節を介している可能性が示唆される。本研究結果は、HGF の ALS 臨床適用に向けての投与の安全性について有望な基礎研究結果と考えられる。

以上本研究において、HGF の神経系への局所性な供給では、ALS に罹患していない神経組織での c-Met の活性化は乏しく、一方 ALS に罹患した神経組織に於ける c-Met の活性化が HGF の濃度依存的に促進されることが明らかとなった。

E. 結論

c-Met のチロシン残基のリン酸化で活性化状態を評価すると、HGF が ALS に罹患していない神経組織を活性化しない観点から、安全性がと確認された。その分子機構については、c-Met の膜近傍領域のリン酸化調節が関与していることが示唆された。この調節は、ALS によるプロテインフォスファターゼの発現調節に依存している事が示唆された。

F. 研究協力者

大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学 角山圭一、大谷若菜; 鳥取大学 加藤信介 助教授; 金沢大学大学院医学系研究科 田中正二、立野勝彦教授; 東京都立神経研究所 渡部和彦; 大阪医科大学 宮武伸一助教授の諸先生。

G. 研究発表

原著論文

1. Hayashi Y, et al., (2006) Adenoviral gene transfer of hepatocyte growth factor prevents death of injured adult motoneurons after peripheral nerve avulsion. *Brain Res* 1111:187-195.
 2. Tanaka M, et al. (2006) Hepatocyte growth factor in mouse soleus muscle increases with reloading after unloading. *J Phys Ther Sci* 18:33-41.
 3. Nakamura K, et al., (2006) Possible role of scavenger receptor SRCL in the clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 84:874-890.
 4. Ohya W et al., Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during development in the rat. *Brain Res.* 2007, In press.
 5. Niimura M, et al., (2006) Prevention of apoptosis-inducing factor translocation is a possible mechanism for protective effects of hepatocyte growth factor against neuronal cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1354-1365.
 6. Zhao MZ, et al., (2006) Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1176-1188.
 7. Niimura M, et al., (2006) Effects of hepatocyte growth factor on phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and hippocampal cell death in rats with transient forebrain ischemia. *Eur J Pharmacol* 535:114-124.
 8. Date I, et al., (2006) Hepatocyte growth factor attenuates cerebral ischemia-induced increase in permeability of the blood-brain barrier and decreases in expression of tight junctional proteins in cerebral vessels. *Neurosci Lett* 407:141-145.
 9. Niimura M, et al., (2006) The protective effect of hepatocyte growth factor against cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia is related to the improvement of apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox factor-1 level and inhibition of NADPH oxidase activity. *Neurosci Lett* 407:136-140.
 10. 船越洋他. ALSに対する新しい治療薬としての肝細胞増殖因子 (HGF) の研究 難病と在宅ケア Vo.13(3), 2007, In press.
- ### シンポジウム・ワークショップ発表
1. 船越 洋他、ALSワークショップ-ALSの克服に向けて・ワークショップ、東京、2006
 2. Funakoshi H. and Nakamura T., HGF as a novel neurotrophic factor for neurodegenerative diseases. 第29回日本神経科学大会シンポジウム, Kyoto, 2006.
 3. Funakoshi H & Nakamura T, Hepatocyte growth factor (HGF) as a novel neurotrophic factor for amyotrophic latera sclerosis (ALS), 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, 2006.
- ### H. 知的財産権
- 特記事項はない。

厚生労働省科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子を用いた画期的治療法の開発
分担研究報告書

肝細胞増殖因子(HGF) /活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムに基づいた筋萎縮性側索硬化症(ALS)-変異 SOD1
ストレスによる肝臓・腎臓・心臓における一過性組織変性からの回復機構の解明：
ALS に対する HGF を用いた画期的治療法の病理組織学的論拠

分担研究者 加藤信介 鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門 助教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS) SOD1 トランスジェニックマウス：G1H-G93A マウスにおいては、G93A-SOD1 ストレスにより、脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、細胞死に至る。しかし、脊髄前角細胞は G93A-SOD1 ストレスによる細胞死を無条件に受け入れているのではなく、脊髄前角細胞には G93A-SOD1 ストレスに対する内因性生存機構の一つとして、肝細胞増殖因子(HGF) /活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムが存在していたことを解明した。脊髄前角細胞は、G93A-SOD1 ストレスに対し、内因性生存機構としての HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を惹起させ続け、生存の可能性を探るが、最終的には、この機構を振り切るかたちで細胞死に至る。一方、肝臓、腎臓、心臓においては、G93A-SOD1 ストレスによる脊髄前角細胞と同様な変性組織像を一時期は呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈した。肝臓、腎臓、心臓における組織学的回復機構には、内因性生存機構としての HGF/pcMet システムの up-regulation 機構が寄与していた。本研究の結果は、細胞死のプロセスを歩む ALS 脊髄前角細胞に対して、HGF 治療による組織学的完全回復の病理組織学的論拠たり得る。

研究協力者：加藤雅子¹、船越 洋²、角山圭一²、
中村敏一²、青木正志³、糸山泰人³
¹鳥取大学医学部附属病院病理部門、²大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野、³東北大学大学院医学系研究科神経内科分野

A. 研究目的

変異 SOD1 を伴った生体系においては、ALS-変異 SOD1 ストレスは神経系である脊髄前角細胞だけでなく、肝臓、腎臓、心臓の各組織細胞にも影響を及ぼす。脊髄前角細胞は細胞死を起こすが、肝臓、腎臓、心臓の各組織細胞では、一時的な組織変性所見を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈し、細胞死に至らない。今回我々は、細胞死を惹起する脊髄前角細胞は ALS-変異 SOD1 ストレスに対して無反応にてこれを受け入れ、細胞死を単純に無条件で入れているのではなく、内因性生存機構としての肝細胞増殖因子(HGF) /活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムが存在していたことを解明した。さ

らに、この HGF/pcMet システムの観点から、肝臓・腎臓・心臓の各組織の経時的組織変化に着目し、これらの各臓器の細胞が、ALS-変異 SOD1 ストレスに対して、自らを守って生存している内因性生存機構としての HGF/pcMet システムの経時的変遷について詳細に解析した。本研究の目的は、細胞死のプロセスを歩む ALS 脊髄前角細胞に対して、HGF 治療による組織学的完全回復の病理組織学的正当性の確立にある。

B. 研究方法

脊髄、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の経時的病理組織学的解析には、ALS SOD1 トランスジェニックマウス：G1H-G93A マウスを使用し、対照には同時期の同胞を用いた。G1H-G93A マウスにおいて、神経症状発症前の生後 90 日齢、神経症状発症時の生後 100 日齢、神経症状進展期の生後 110 日齢、終末期に相当する生後 120 日齢の 4 時点で臨床症状を解析した後、マウス体重 1 Kg 当たり 1 ml のペントバルビタール

ナトリウムの腹腔内注射にて、麻酔を施行した。完全に麻酔下にあることを確認した後、開腹・開胸を行い、左心室・大動脈経由にて、37 °C の生理的食塩水の灌流にて全身臓器の血液を完全に除去する。全身臓器血液の完全除去後、直ちに、4%パラホルムアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液 (pH7.3) にて灌流固定した後、脊髄、肝臓、腎臓、心臓の各臓器を取り出した。取り出された各臓器組織はそれぞれパラフィン包埋し、パラフィンブロックを作製した後、ミクロトームにてパラフィン切片とする。

パラフィン切片は、HE 染色法を施すと同時に、HGF/pcMet システムの検索として免疫組織化学的解析を施行した。即ち、rabbit polyclonal anti-rat HGF antibody と rabbit polyclonal anti-c-Met phosphospecific antibody の精製ポリクローナル抗体を使用し、ABC 法との組み合わせで、DAB 発色にて可視化した。

C. 研究結果

1. 病理組織的所見

1) 同胞における組織像：すべての日齢を通じて、脊髄組織は正常脊髄組織所見そのものであった。肝臓・腎臓・心臓の各臓器の組織所見においても、すべての日齢を通じて、全く異常なく正常組織所見であった (図 1A, 2A, 3A)。

2) 神経症状発症前の生後 90 日齢の時点における病理組織変化：脊髄組織では、脊髄前角細胞数には変化がみられないが、軽度ながら脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに空胞病理所見 (vacuolation pathology) を認めた。肝臓組織では、空胞形成を伴う水腫状変性肝細胞 (swollen hydropic hepatocyte) と好酸性暗肝細胞 (dark eosinophilic hepatocyte) とが混在した変性像を示した。この日齢では、swollen hydropic hepatocyte の数のほうが dark eosinophilic hepatocyte の数に比べ多数認められた (図 1B)。腎臓組織では、極く軽度ではあるが、尿細管上皮に肝細胞と同様な空胞形成を伴う swollen hydropic change がみられた (図 2B)。心臓では、swollen hydropic change を呈する心筋細胞を認め、肝臓と腎臓と同質の病理変性所見を呈した (図 3B)。

3) 神経症状発症時の生後 100 日時点における病理組織変化：脊髄組織では、著明な vacuolation pathology を認め、脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに多数の空胞が見られた。残存した脊髄前角細胞はやや小型化を示し、脊髄前角細胞数自体はわずかながら減少傾向を示した。肝臓組織では、依然として、swollen hydropic hepatocyte と dark eosinophilic hepatocyte とが混在した変性所見を示したが、生後 90 日齢の肝臓組織に比べ、両タイプの変性細胞の占める割合が変化していた。即ち、swollen hydropic hepatocyte の数の占める割合が減少し、dark eosinophilic hepatocyte 数の割合が増加した。また、swollen hydropic hepatocyte および dark eosinophilic hepatocyte のいずれにも空胞形成が認められたが、その空胞の大きさは、90 日齢時点の空胞と比較すると、大きさが減少し、小型化していた (図 1C)。腎臓組織では、空胞を伴う swollen hydropic change を示す尿細管上皮細胞の数が増加し、一部には、好酸性が強調され、細胞丈が減少し、小型化を示した腎尿細管上皮 (小型好酸性腎尿細管上皮: small-sized eosinophilic cell) も認めた。そのため、尿細管腔は拡大していた (図 2C)。心臓では、生後 90 日齢の心臓に比べ、swollen hydropic change を呈する心筋細胞数は減少したものの、依然、swollen hydropic change を呈する心筋細胞を認めた (図 3C)。

4) 生後 120 日齢の終末期における病理組織変化：脊髄組織では、脊髄前角細胞は高度に変性・脱落・消失し、反応性アストロサイトの増生と高度のグリオーシスを認めた。同時に、封入体病理所見 (inclusion pathology) としては、Lewy body-like hyaline inclusion と astrocytic hyaline inclusion との両封入体を多数認めた。また vacuolation pathology としては、脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに多くの空胞を依然認めた。注目すべき所見は、肝臓、腎臓、心臓の各臓器組織においては、脊髄組織とは対照的に、swollen hydropic change や eosinophilic change 等の変性所見はほとんど認められず、肝細胞、腎尿細管上皮、心筋線維はほぼ正常組織所見に復していた (図 1D, 2D, 3D)。