

図1. G1H-G93A マウスの肝臓における組織学的経時変化。A. 同胞例における肝組織像。B. 生後90日齢の肝組織像。C. 生後100日齢の肝組織像。D. 生後120日齢の終末期における肝組織像。

図2. G1H-G93A マウスの腎臓における組織学的経時変化。A. 同胞例における腎組織像。B. 生後90日齢の腎組織像。C. 生後100日齢の腎組織像。D. 生後120日齢の腎組織像。

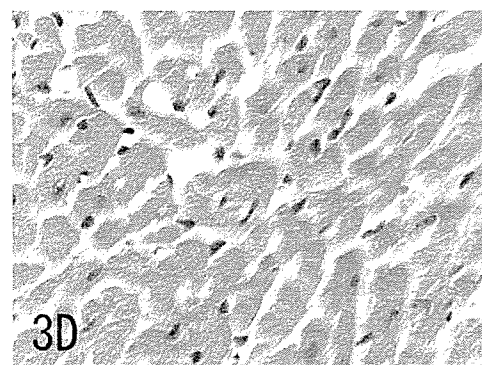
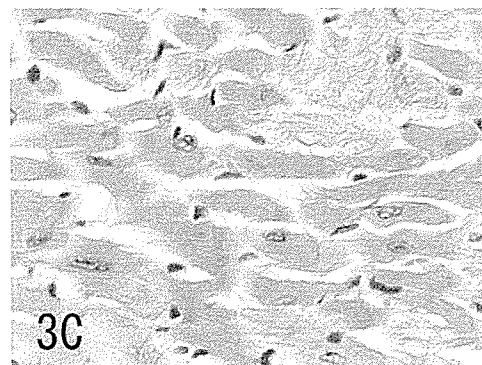
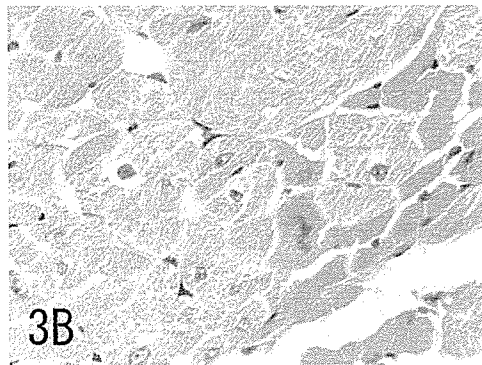
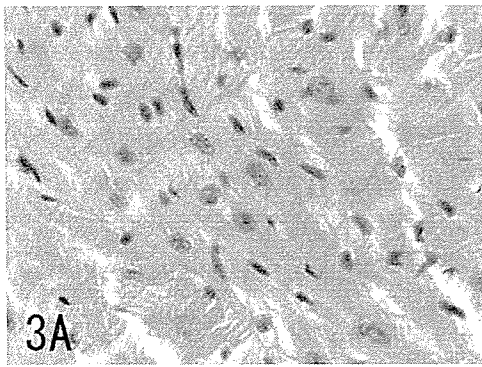


図3. G1H-G93A マウスの心臓における組織学的経時変化。A. 同胞例における心臓組織像。B. 生後90日齢の心臓組織像。C. 生後100日齢の心臓組織像。D. 生後120日齢の心臓組織像。

## 2. HGF/pcMet システムの調節機構の免疫組織化学的解析

1) 同胞における HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析: 脊髄組織における HGF の免疫組織化学的解析では、すべての日齢を通じて、ほとんどすべての脊髄前角細胞は HGF を発現し、その発現レベルは多少の variation を伴いながら、免疫組織化学的には HGF 発現は同定可能なレベルであった。HGF の受容体である活性型リン酸化 cMet (pcMet) の免疫組織化学的解析では、HGF とは対照的に、すべての日齢を通じて、すべての脊髄前角細胞は pcMet の発現を認めなかった。肝臓・腎臓・心臓の各臓器の HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析では、肝細胞、腎尿細管上皮、心筋細胞では、すべての日齢を通じて、HGF 及び pcMet の発現は認めなかった (図4)。

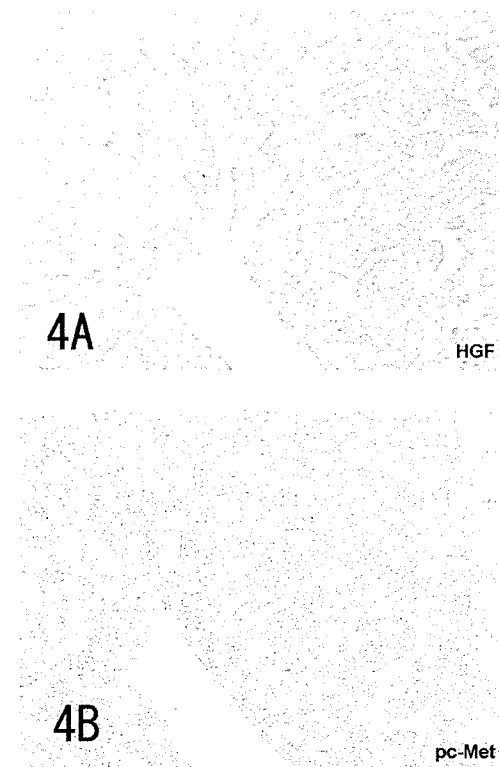


図4. G1H-G93A マウスの同胞の肝臓における HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析。

2) 神経症状発症前の生後90日齢の時点における HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析: HGF の免疫組織化学的解析では、ほとんどすべての脊髄前角細胞は、HGF を正常脊髄前角細胞と同一レベルで発現し、その発現様式、発現強度は同胞脊髄における正常脊髄前角細胞と同一であった。cMet 受容体の活性化の指標であるリン酸化 cMet (pcMet) の発現につ

いても、脊髄前角細胞では全く認められなく、同胞脊髄における正常脊髄前角細胞と同一所見であった。しかし、生後90日齢の肝臓のHGF発現については、発現強度のvariationを有しながら、一部のswollen hydropic hepatocyteおよびdark eosinophilic hepatocyteにHGF陽性所見が認められた。HGFの発現様式はHGF陽性細胞とHGF陰性細胞とが入り交じったモザイク染色様式を示した。HGFの活性型受容体であるpcMetの肝臓における発現についても、HGF発現様式と同一であった。即ち、生後90日齢の肝臓では、一部の肝細胞にHGF/pcMetシステムのup-regulation機構が認められた(図5)。腎臓では、一部の尿細管上皮にHGF及びpcMetの発現が認められ、肝臓と同様に、heterogeneityを示しながらも、HGF/pcMetシステムのup-regulation機構が認められた。心臓でも、肝臓・腎臓と同様に、heterogeneityを示しながらも、一部の心筋細胞にHGF/pcMetシステムのup-regulation機構が認められた。

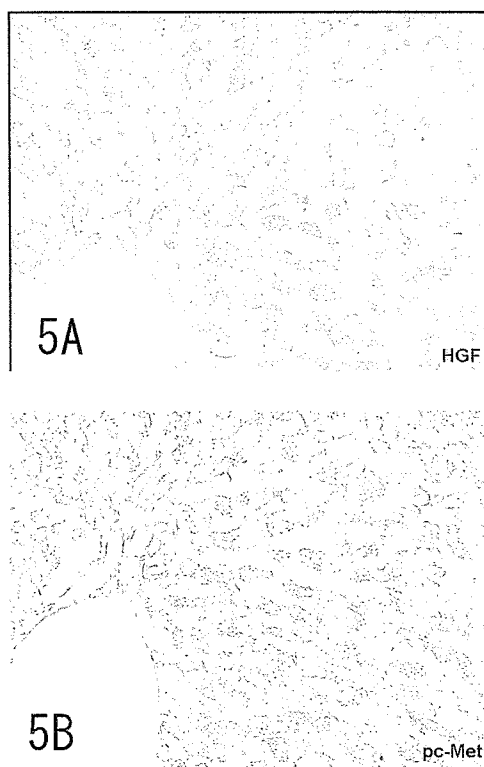


図5. 生後90日齢の肝臓におけるHGF/pcMetシステムの免疫組織化学的解析。

3) 神経症状発症時の生後100日時点におけるHGF/pcMetシステムの免疫組織化学的解析: 生後100日齢の時点では、ほとんど全ての脊髄前角細胞においてHGFとpcMetの強発現がみられ、高度の

HGF/pcMetシステムのup-regulation機構を認めた。この時期の肝臓では、dark eosinophilic hepatocyteとswollen hydropic hepatocyteとの両細胞の一部にHGFとpcMetとの強発現があり、強発現している細胞と発現していない細胞とが入り交じったモザイク様式の発現パターンが著しく強調された。即ち、生後100日齢の肝臓においては、heterogeneityを示しながら、HGF/pcMetシステムの高度のup-regulation機構が認められた(図6)。腎臓では、swollen hydropic changeとsmall-sized eosinophilic changeとを示す両タイプの尿細管上皮細胞と糸球体内のメザンギウムの一部の細胞群においては、HGF/pcMetシステムをup-regulateさせていた。心臓でも、肝臓・腎臓と同様に、生後90日齢の心筋細胞に比べ、一部の心筋細胞には、heterogeneityを示しながら、より高度のHGF/pcMetシステムのup-regulationが認められた。

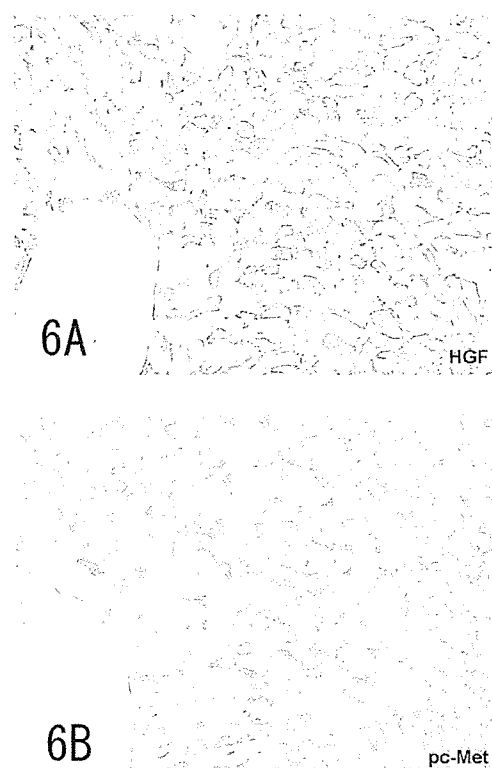


図6. 生後100日齢の肝臓におけるHGF/pcMetシステムの免疫組織化学的解析。

4) 生後120日齢の終末期におけるHGF/pcMetシステムの免疫組織化学的解析: 脊髄組織では、一部の脊髄前角細胞はHGF/pcMetシステムの破綻を示すものの、依然として多くの脊髄前角細胞はHGF/pcMetシステムをup-regulateさせつづけてい

た。注目すべき所見は、肝臓、腎臓、心臓の各臓器においては、正常組織所見に復するに従い、脊髄組織とは対照的に、HGF/pcMet システムの発現レベルは低下しはじめ、ほぼ正常状態である HGF/pcMet システムの発現停止状態を示した。即ち、生後 120 日齢では肝臓、腎臓、心臓は正常組織像を示し、HGF と pcMet との発現はほとんど認めなかった (図 7)。

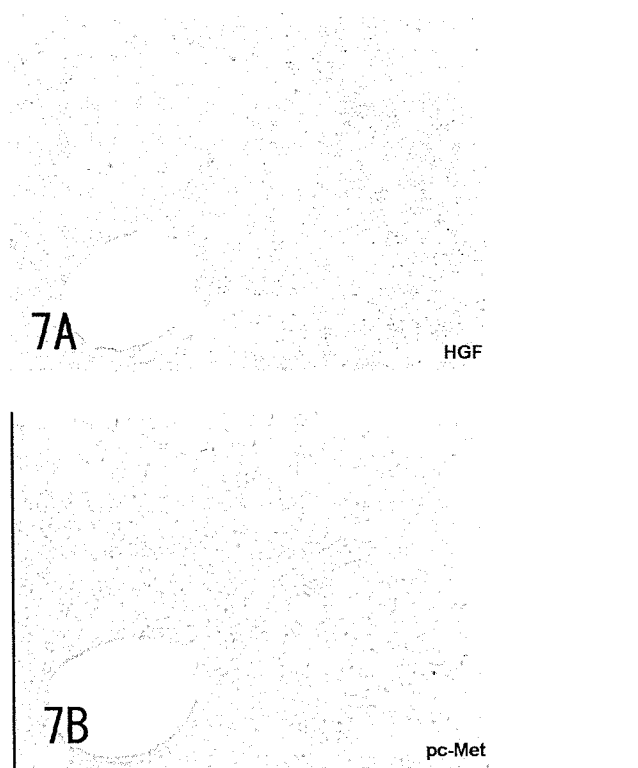


図 7. 生後 120 日齢の肝臓における HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析。

#### D. 考察

正常脊髄の HGF/活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムの免疫組織化学的解析により、正常状態においては、脊髄前角細胞は HGF を一定レベル発現しているが、脊髄前角細胞における HGF の受容体である cMet はチロシン残基のリン酸化は受けていなく、活性型 pcMet は発現していなかった。即ち、正常脊髄前角細胞では、HGF の cMet を介するシグナルを細胞内に伝達していない状態にあることが判明し、HGF/pcMet システムを賦活化していないことが明らかとなった。

G1H-G93A マウスの神経症状発症時の生後 100 日時点においては、ほとんど全ての脊髄前角細胞において高度の HGF/pcMet システムの up-regulation

機構を認め、生後 120 日齢の終末期においてさえ、一部の脊髄前角細胞は HGF/pcMet システムの破綻を示すものの、多くの脊髄前角細胞はまだ HGF/pcMet システムを up-regulate させていた。この脊髄前角細胞における HGF/pcMet システムの解析結果は、ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスに対して、細胞死回避のために内因性 HGF/pcMet システムを upregulate させていたことを意味する。しかし、最終的には脊髄前角細胞は HGF/pcMet システムの upregulation という内因性生存機構さえも振り切るかたちで、細胞死に至ってしまう。即ち、G1H-G93A マウスにおける脊髄前角細胞は、ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスにより、最終的には細胞死を生ずる。しかし、ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスに対して、脊髄前角細胞は無抵抗に細胞死を受け容れているのではないことが解明され、内因性生存機構の一つとしての HGF/pcMet システムの賦活化の存在を明らかにした。

G1H-G93A マウスにおける肝臓、腎臓、心臓の各臓器の経時的組織変化は、ほぼ画一的であり、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞は脊髄前角細胞より早期に一過性に変性像を示すものの、脊髄前角細胞が高度脱落した脊髄組織の荒廃を認める終末期にはほぼ正常組織像に復していた。この肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞における HGF/pcMet システムの経時的変化をみると、まだ脊髄前角細胞が HGF/pcMet システムを upregulate させていない生後 90 日齢において、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞は ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスに対して、HGF/pcMet システムを upregulate させていた。神経症状発症時の生後 100 日齢頃の肝臓、腎臓、心臓において、最も高度に HGF/pcMet システムを upregulate させていた。しかし、正常組織像に復するに従い HGF 及び pcMet の発現レベルが低下を認め、生後 120 日齢では、HGF/pcMet システムはほぼその発現を停止した正常状態に復していた。即ち、ALS-変異 SOD1 ストレスにより脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、最終的には細胞死に至るが、肝臓、腎臓、心臓においては、一度は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した。この組織学的完全回復機構の一つに内因性 HGF/pcMet システムの up-regulation 機構の存在を明らかにできた。一方、ALS-変異 SOD1 ストレスに対し、脊髄前角細胞は内因

性生存機構として、HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を惹起し続けるが、この機構を振り切るかたちで細胞死に至る。本研究の結果は、細胞死のプロセスを歩む変性運動ニューロンへの HGF 治療の正当性に対する、組織学的完全回復の病理組織的論拠たり得る。

## E. 結論

筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデル動物であるヒト変異 SOD1 トランスジェニックマウスにおいては、ALS-変異 SOD1 ストレスにより脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、最終的には細胞死に至るが、その過程において、ALS 脊髄前角細胞は内因性生存機構としての HGF/活性型リン酸化 cMet (pcMet) 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細胞死に陥る。一方、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一つに内因性生存機構としての HGF/pcMet システムの up-regulation 機構の存在を明らかにした。即ち、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正当性の論拠たり得る。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kato M, Kato S, Abe Y, Nishino T, Ohama E, Aoki M, Itoyama Y. 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 (7): 729-740.
- 2) Kato M, Kato S, Horiuchi S, Nagai R, Horie Y, Hayashi K. Mallory bodies in hepatocytes of alcoholic liver disease and primary biliary cirrhosis contain N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine-modified

cytokeratin, but not those in hepatic carcinoma cells.

*Yonago Acta medica* 2006; 49 (3): 83-92.

- 3) Sumi H, Nagano S, Fujimura H, Kato S, Sakoda S. Inverse correlation between the formation of mitochondria-derived vacuoles and Lewy-body-like hyaline inclusions in G93A superoxide dismutase transgenic mice. *Acta Neuropathol* 2006 112 (1): 52-63.
2. 学会発表
  - 1) Kato S, Kato M, Ohama E, Abe Y, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Hirano A. Immunohistochemical dynamics of the redox system in the motor neurons in ALS: Self-survival mechanism under ALS stress. XVIIth International Congress of Neuropathology, September 10-15, 2006, San Francisco, USA.
  - 2) Kato S, Kato M, Ohama E, Abe Y, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Hirano A. Redox System Up-Regulation in ALS Motor Neurons: A Survival Mechanism under Stress. 17th International Symposium on ALS/MND November 30 – December 2, 2006, Yokohama, Japan.
  - 3) 加藤信介、加藤雅子、篠沢隆雄、平野朝雄、大浜栄作. ALSにおける新しい神経成長因子ミッドカイン(MK)に関する研究:モノクローナル抗体作成とALSの免疫組織化学的解析. 第47回日本神経病理学会総会学術研究会(2006, 5月24-26日、岡山).
  - 4) 加藤雅子、加藤信介、青木正志、糸山泰人、阿部靖子、西野武士、大浜栄作. 変異SOD1を伴うALSモデル動物肝の終末期における正常肝細胞回復機構の解明:レドックスシステムからのアプローチ. 第47回日本神経病理学会総会学術研究会(2006, 5月24-26日、岡山).
  - 5) 隅 寿恵、長野清一、藤村晴俊、加藤信介、佐古田三郎. 変異SOD1(G93A)miceにおけるvacuoleとLBHI形成の関係. 第47回日本神経病理学会総会学術研究会(2006, 5月24-26日、岡山).
  - 6) 加藤雅子、加藤信介、堀江 靖、林 一彦. 家族性筋萎縮性側索硬化症のモデル動物を用いた肝と脊髄の経時的病理組織像の検討. 第95回日本病理学会総会(2006, 4月30日-5月2日、東京).

- 7) 隅 寿恵、長野清一、藤村晴俊、加藤信介、佐古田三郎. 変異 SOD1 (G93A) mice における vacuole と LBHI 形成の関係. 第 47 回日本神経学会総会 (2006, 5月11-13日、東京).
- 8) 村上哲郎、倉田智子、太田康之、奈良井恒、瓦林毅、武久 康、永井真理子、東海林幹夫、加藤信介、阿部康二. 抗ヒト SOD1 特異的抗体による ALS モデルマウスの検討. 第 47 回日本神経学会総会 (2006, 5月11-13日、東京)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 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

分担研究者 青木正志 東北大学病院神経内科

**研究要旨** 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、病態進行の促進を確認した。さらにはその作用機序の解析から内因性 HGF-c-Met 機構が ALS 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。

分担研究者：青木正志

東北大学病院神経内科院内講師

研究協力者：割田 仁<sup>1</sup>、水野秀紀<sup>1</sup>、石垣あや<sup>1</sup>、松本有史<sup>1</sup>、船越 洋<sup>2</sup>、中村敏一<sup>2</sup>、岡野栄之<sup>3</sup>、糸山泰人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東北大学大学院医学系研究科神経内科

<sup>2</sup>大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

<sup>3</sup>慶應義塾大学医学部生理学

交配実験（ダブルトランスジェニックマウスの作製）<sup>1</sup>、および (2) 変異 *Cu/Zn SOD* 遺伝子導入トランスジェニックラットに対する髄腔内 HGF 投与実験<sup>2</sup> 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、トランスジェニック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、さらにはその機序の検討を行った。

#### A. 研究目的

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

#### B. 研究方法

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*-トランスジェニックラット<sup>3</sup> 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 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。

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て、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。

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。

### C. 研究結果

トランスジェニック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)。

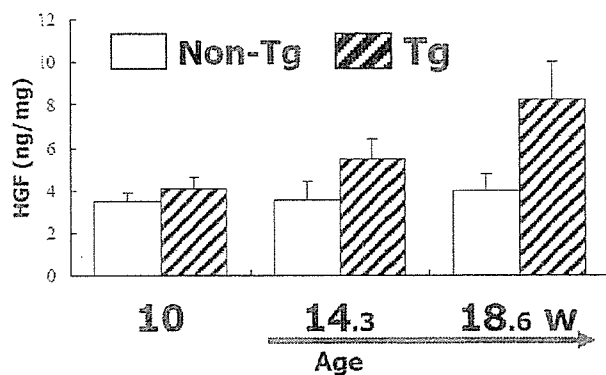


図 1. トランスジェニックラットでは発症前の運動ニューロン脱落開始時期 (約 14 週齢) より、内因性ラット HGF が脊髄に誘導されてくる (ELISA 法)。

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) を認めた。

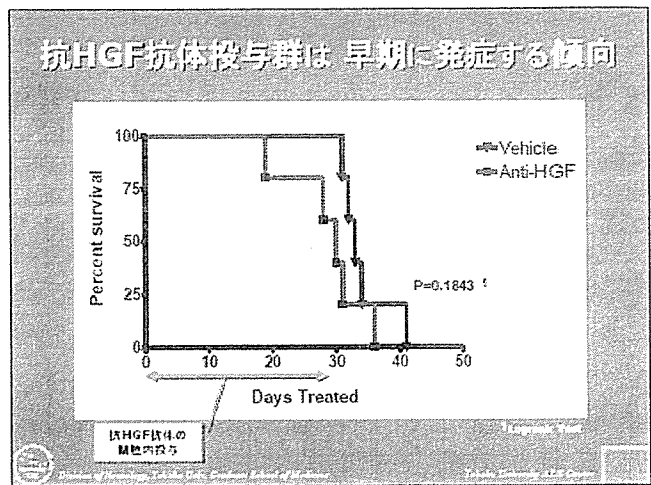


図 2. 抗 HGF 抗体投与群は、より早期に発症する傾向を認めた (P=0.1843)。

さらにはコントロール群に比して抗 HGF 抗体投与群では有意に速い進行を認めた (P=0.0299, 図 3)。

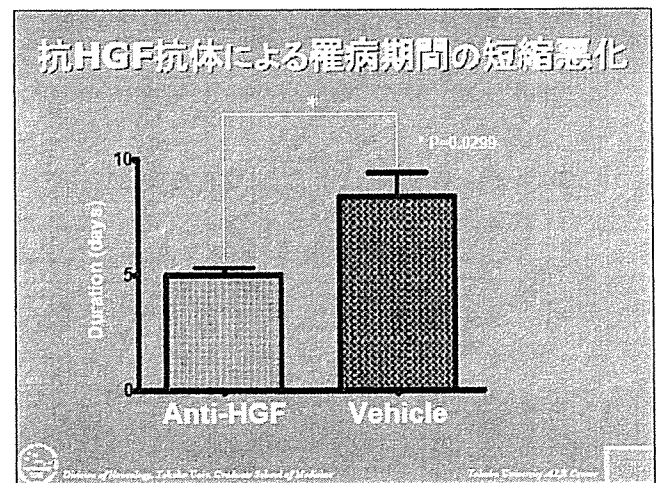


図 3. 罹病期間は抗 HGF 抗体投与群で有意に短縮悪化していた (P=0.0299)。

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。

投与 2 週間での検討では、コントロール群に比し、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。

#### D. 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。

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<sup>4</sup>。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。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<sup>1,2</sup>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。

#### E. 結論

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*,

3. Nagai M, et al.: J Neurosci, 9246-9256, 2001.

4. Kato S, et al.: Acta Neuropathol, 112-120, 2003.

#### 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) Mizuno T, Aoki M, Shimada Y, Inoue M, Nakaya K, Takahashi T, et al. Gender difference in association between polymorphism of serotonin transporter gene regulatory region and anxiety. *J Psychosom Res* 2006; 60: 91-7.
- 5) Onodera Y, Aoki M, Mizuno H, Warita H, Shiga Y, Itoyama Y. Clinical features of chromosome 16q22.1 linked autosomal dominant cerebellar ataxia in Japanese. *Neurology* 2006; 67: 1300-2.
- 6) Takahashi T, Aoki M, Imai T, Yoshioka M, Konno H, Higano S, et al. A case of dysferlinopathy presenting choreic movements. *Mov Disord* 2006; 21: 1513-5.
- 7) Hirano M, Yamamoto A, Mori T, Lan Li, Iwamoto T, Aoki M, Shimada K, Furiya Y, Kariya S, Asai H, Yasui A, Nishiwaki T,

Imoto K, Kobayashi N, Kiriyama T, Nagata T, Konishi N, Itoyama Y, Ueno S, DNA single strand break repair is impaired in aprataxin-related ataxia, Ann Neurol 2007; 61: 162-74

## 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) 割田 仁 ほか, 発症後の ALS モデルラットにおける再生誘導因子の髄腔内複合投与, 第 47 回日本神経学会総会 2006.5 東京
- 4) 水野秀紀 ほか, ALS モデルラット脊髄における再生阻害因子の発現, 第 47 回日本神経学会総会 2006.5 東京
- 5) 青木正志 ほか, 抗 HGF 抗体の髄腔内投与による ALS ラット病態進行の促進, 第 47 回日本神経学会総会 2006.5 東京

## 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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧

### 原著論文

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻頁		出版年
			巻	頁	
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	343	719-30	2006
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.	Nature Medicine	12	829-834	2006
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
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	12	1380-1389	2006
Tanaka M, Tachino K, Kawahara E, Tanaka J, Funakoshi H, Nakamura T	Hepatocyte growth factor in mouse soleus muscle increases with reloading after unloading.	J Phys Ther Sci	18	33-41	2006

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻頁		出版年
			巻	頁	
Nakamura K, Ohya W, Funakoshi H, Sakaguchi G, Kato A, Takeda M, Kudo T, Nakamura T	Possible role of scavenger receptor SRCL in the clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease.	J Neurosci Res	84	874-890	2006
Hayashi Y, Kawazoe Y, Sakamoto T, Ojima M, Wang W, Takazawa T, Miyazawa D, Ohya W, Funakoshi H, Nakamura T, Watabe K	Adenoviral gene transfer of hepatocyte growth factor prevents death of injured adult motoneurons after peripheral nerve avulsion.	Brain Res	1111	187-195	2006
Niimura M, Takagi N, Takagi K, Mizutani R, Ishihara N, Matsumoto K, Funakoshi H, Nakamura T, Takeo S	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	2006
Zhao MZ, Nonoguchi N, Ikeda N, Watanabe T, Furutama D, Miyazawa D, Funakoshi H, Kajimoto Y, Nakamura T, Dezawa M, Shibata MA, Otsuki Y, Coffin RS, Liu WD, Kuroiwa T, Miyatake S	Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector.	Cereb Blood Flow Metab	26	1176-1188	2006
Niimura M, Takagi N, Takagi K, Funakoshi H, Nakamura T, Takeo S	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	2006

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻		出版年
			頁		
Date I, Takagi N, Takagi K, Tanonaka K, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S	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		2006
Niimura M, Takagi N, Takagi K, Mizutani R, Tanonaka K, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S	The protective effect of hepatocyte growth factor against cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia is related to the improvement of apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 level and inhibition of NADPH oxidase activity.	Neurosci Lett	407 136-140		2006
船越 洋、角山圭一、大谷若菜、中村敏一	HGFの神経疾患治療効果	Clinical Neuroscience	25巻 5月号		2007
船越 洋、角山圭一、大谷若菜、中村敏一	HGFの神経保護作用機序	Clinical Neuroscience	25巻 6月号		2007
船越 洋、金井将昭、中村敏一	神経栄養因子の多様な機能と神経変性疾患への臨床適用の可能性	The Frontiers in Medical Sciences	in press		2007
Kato M, Kato S, Abe Y, Nishino T, Ohama E, Aoki M, Itoyama Y.	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 and Histopathol	21(7) 729-742		2006
Kato M, Kato S, Horiuchi S, Nagai R, Horie Y, Hayashi K.	Mallory bodies in hepatocytes of alcoholic liver disease and primary biliary cirrhosis contain Nε-(carboxymethyl)lysine-modified cytokeratin, but not those in hepatic carcinoma cells.	Yonago Acta medica	49 (3) 83-92		2006

著者	論文タイトル	掲載誌名	巻 頁	出版年
Sumi H, Nagano S, Fujimura H, Kato S, Sakoda S.	Inverse correlation between the formation of mitochondria-derived vacuoles and Lewy-body-like hyaline inclusions in G93A superoxide-dismutase-transgenic mice.	Acta Neuropathol	112(1) 52-63	2006

書籍

著者	論文タイトル	書籍全体の 編集者	書籍名	出版社	巻 頁	出版年
船越 洋、角山圭一、 大谷若菜、中村敏一	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	今村榮太郎	難病と在宅ケア	日本プランニング センター	13巻3号	2007
船越 洋、角山圭一、 大谷若菜、中村敏一	HGFの神経疾患治療効果		Clinical Neuroscience		25巻5月号	2007





## Alteration of familial ALS-linked mutant SOD1 solubility with disease progression: Its modulation by the proteasome and Hsp70

Shingo Koyama <sup>a</sup>, Shigeki Arawaka <sup>a,\*</sup>, Ren Chang-Hong <sup>a</sup>, Manabu Wada <sup>a</sup>,  
Toru Kawanami <sup>a</sup>, Keiji Kurita <sup>a</sup>, Masaaki Kato <sup>b</sup>, Makiko Nagai <sup>b</sup>, Masashi Aoki <sup>b</sup>,  
Yasuto Itoyama <sup>b</sup>, Gen Sobue <sup>c</sup>, Pak H. Chan <sup>d</sup>, Takeo Kato <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurology, Hematology, Metabolism, Endocrinology and Diabetology, Yamagata University School of Medicine, 2-2-2 Iida-nishi, Yamagata 990-9585, Japan

<sup>b</sup> Department of Neurology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

<sup>c</sup> Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

<sup>d</sup> Department of Neurosurgery, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

Received 9 February 2006

Available online 9 March 2006

### Abstract

Accumulation of misfolded Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) occurs in patients with a subgroup of familial amyotrophic lateral sclerosis (fALS). To identify the conversion of SOD1 from a normally soluble form to insoluble aggregates, we investigated the change of SOD1 solubility with aging in fALS-linked H46R SOD1 transgenic mice. Mutant SOD1 specifically altered to insoluble forms, which were sequentially separated into Triton X-100-insoluble/sodium dodecyl sulfate (SDS)-soluble and SDS-insoluble/formic acid-soluble species. In spinal cords, the levels of SDS-dissociable soluble SOD1 monomers and SDS-stable soluble dimers were significantly elevated before motor dysfunction onset. In COS-7 cells expressing H46R SOD1, treatment with proteasome inhibitors recapitulated the alteration of SOD1 solubility in transgenic mice. In contrast, overexpression of Hsp70 reduced accumulation of mutant-specific insoluble SOD1. SDS-soluble low molecular weight species of H46R SOD1 may appear as early misfolded intermediates when their concentration exceeds the capacity of the proteasome and molecular chaperones.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Amyotrophic lateral sclerosis; Cu/Zn superoxide dismutase; Heat shock protein; Proteasome; Oligomer

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder characterized by the degeneration of both upper and lower motor neurons, leading to progressive paralysis. Of all ALS cases, ~90% are sporadic and ~10% are familial; ~20% of familial ALS (fALS) cases are associated with dominantly inherited mutations in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) [1–3]. SOD1 is a major antioxidant enzyme located predominantly in the cytosol, nucleus, and mitochondrial intermembrane space of eukaryotic cells [4]. The biological active enzyme forms a 32-kDa homodimer and contains one

copper-binding site and one zinc-binding site, as well as a disulfide bond in each of its two subunits. SOD1-linked fALS was initially suspected to result from oxidative damage caused by diminished SOD1 activity, but SOD1-null mice show no motor neuron disease [5], and transgenic mice overexpressing human mutant SOD1 have a phenotype that is closely similar to patients with fALS, irrespective of their normal or elevated levels of SOD1 activity [6–9]. This evidence indicates that SOD1-linked fALS occurs due to a toxic gain-of-function of mutant SOD1 but not due to a lowering of its activity [6].

Deposition of proteinaceous inclusions of SOD1 in motor neurons is a characteristic hallmark of patients with fALS [10–12]. Cellular and animal models have shown that overexpression of mutant SOD1 can cause loss of motor

\* Corresponding author. Fax: +81 23 628 5318.

E-mail address: [arawaka@med.id.yamagata-u.ac.jp](mailto:arawaka@med.id.yamagata-u.ac.jp) (S. Arawaka).

neurons with the formation of SOD1-positive inclusions [12–15] and high-molecular-weight (HMW) SOD1 complexes [12,16–19], supporting the hypothesis that the abnormal accumulation of SOD1 aggregates may play a role in the pathogenesis of fALS. Concerning the formation of SOD1 aggregates, several reports have described a close association with the proteasome and heat shock proteins (Hsps). In cells overexpressing mutant SOD1, inhibition of the proteasome activity resulted in the accumulation of insoluble SOD1 protein and the formation of HMW insoluble complexes [16,17,19–22]. On the other hand, Bruening et al. [23] reported that overexpression of Hsp70 reduced aggregate formation and prolonged cellular viability in cells expressing mutant SOD1. These data imply that the conversion of SOD1 from an inherently soluble form to an aggregated species is promoted by insufficiency of the proteasome and/or molecular chaperones, which suppress the accumulation of misfolded proteins. However, the formation of protein aggregation is a complex process, which contains several kinds of misfolded intermediates to form amorphous aggregates and fibrils [24]. There is only a little basic information on how mutant SOD1 undergoes the complex process in relation to the system of proteasome and Hsps.

In the present study, we investigated the alteration of SOD1 solubility with aging in fALS-linked mutant H46R SOD1 transgenic mice. We also examined its change in mutant SOD1 expressed cells by treatment with proteasome inhibitors. Furthermore, using cells co-expressing mutant SOD1 and Hsp70, we characterized an insoluble SOD1 species influenced by Hsp70 as misfolded proteins. Here we show that SDS-dissociable soluble monomers and SDS-stable soluble dimers of H46R SOD1 appear as early misfolded intermediates in the formation of highly insoluble aggregates, and their levels are coordinately mediated by the proteasome activity and Hsp function.

## Materials and methods

**Materials.** We used the following antibodies: polyclonal human SOD1 antibody (SOD1-100, diluted 0.1 µg/ml, Victoria, BC, Canada); monoclonal antibody against GST-fused full-length human SOD1 protein that specifically binds to human SOD1 (diluted 0.2 µg/ml, MBL, Nagoya, Japan); polyclonal Hsp70 antibody (SPA-757, diluted 1:30,000 for Western blotting, diluted 1:1000 for immunohistochemistry, Stressgen); polyclonal Hsp40 antibody (SPA-400 diluted 1:10,000 for Western blotting, diluted 1:500 for immunohistochemistry, Stressgen). Wild-type SOD1 cDNA fused with an FLAG tag at C-terminus of SOD1 (SOD1-FLAG) was subcloned into either pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or pEF-BOS vector [20]. Mutant H46R and G93A SOD1 cDNAs were generated by site-directed mutagenesis, and their sequences were confirmed by DNA sequencing. pCMV-Hsp70 and pRC-Hsp40 were described previously [25,26].

**Cell culture and transfection.** COS-7 and SH-SY5Y cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) and a mixture of DMEM and Ham's F-12, respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum. SOD1 cDNAs were transfected into cells using Lipofectamine Plus reagents (Invitrogen), according to the manufacturer's protocols [27]. Cultured cells were harvested 48 h after transfection for experiments. For inhibition of the proteasome activity, either MG132 or

lactacystin (Sigma, St. Louis, MO, USA) in indicated concentrations was added to cells 24 h after transfection and then cells were further incubated for 24 h. In experiments using Hsp chaperones, either Hsp70 or Hsp40 cDNA was co-transfected with H46R SOD1-FLAG pEF-BOS to COS-7 cells (at a molar ratio of 4:1).

**Transgenic mice.** Transgenic mouse lines expressing fALS-linked H46R SOD1 under the control of inherent human SOD1 promoter were maintained as hemizygotes by mating with B6/SJF1 as previously described [28]. The transgenic mice expressing wild-type human SOD1 were also kindly supplied by Dr. PH. Chan (Stanford University, Stanford, CA, USA) and maintained as hemizygotes [29]. All of the mouse experiments followed the Guidelines for Animal Experiments of Yamagata University School of Medicine.

**Protein fractionation and Western blotting.** Protein fractionation of whole mouse spinal cords was performed according to published protocols [30,31] with a slight modification (see Fig. 1A). Whole mouse spinal cords were homogenized by 15 up-and-down strokes with a Teflon homogenizer in 1:3 (wt/vol) phosphate-buffered saline (PBS; 100 mM phosphate, pH 7.4, 150 mM NaCl, and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)). The homogenate was centrifuged at 100,000×g for 20 min at 4 °C, and the resultant supernatant was collected as the PBS-soluble fraction. The pellet was rinsed three times with PBS and was extracted by sonication in 1% Triton X-100 (TX)/PBS. After centrifugation at 100,000×g for 20 min at 4 °C, the supernatant was designated as the TX-soluble fraction. The pellet was washed three times with 1% TX/PBS and extracted by sonication in 5% SDS/PBS. The extract was incubated at room temperature for 30 min and centrifuged at 100,000×g for 20 min at 20 °C. The supernatant was designated as the SDS-soluble fraction. After rinsing and centrifugating three times in 5% SDS/PBS, the resultant pellet was extracted by sonication in 8 M urea/PBS. After centrifugation at 100,000×g for 20 min at 20 °C, the supernatant was designated as the urea-soluble fraction. The pellet was rinsed once with 8 M urea/PBS and extracted by sonication in 88% formic acid (FA). After centrifugation at 100,000×g for 20 min at 20 °C, the supernatant was designated as the FA-soluble fraction. FA was evaporated by SpeedVac (Savant, Farmingdale, NY, USA). After washing the dried pellet with distilled water and lyophilizing it again, the resulting pellet was resuspended by sonication in Laemmli's sample buffer containing 2% SDS and 100 mM dithiothreitol and then boiled for 5 min. The protein concentrations of the PBS-soluble, TX-soluble, SDS-soluble, and urea-soluble fractions were measured by a BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Cultured cell pellets were fractionated by the same protocol described above until the preparation of the SDS-soluble fraction. The SDS-insoluble pellet was resuspended by sonication in Laemmli's sample buffer and boiled for 5 min. The suspension was designated as the SDS-insoluble fraction.

We performed Western blotting as described previously [27]. All protein samples were boiled for 5 min in Laemmli's sample buffer containing 100 mM dithiothreitol. Ten micrograms of protein from each of the PBS-soluble, TX-soluble, SDS-soluble, and urea-soluble fractions, and equal aliquots of the FA-soluble fraction were loaded on 15% polyacrylamide gels. The relative intensities of detected bands were scanned and quantified with the Scion image program, version 4.02 (Scion Corp., Frederick, MD, USA). Statistical analysis for comparison of groups was performed by ANOVA with Fisher's probability of least significant difference (PLSD) post hoc test for significance using the Statview software version 5 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

**Immunohistochemistry.** The mice, anesthetized with diethyl ether, were sacrificed by transcardial perfusion with 0.9% sodium chloride followed by 4% paraformaldehyde in PBS. The spinal cord was quickly removed, post-fixed with the above solution, and then embedded in paraffin. After deparaffinizing, sections (4-µm thickness) of the lumbar spinal cord (L<sub>4-5</sub>) were incubated with 0.3% hydrogen peroxide for 10 min and then with 10% normal goat serum for 30 min. The sections were incubated with the primary antibodies, and they reacted with the appropriate biotinylated secondary antibodies, followed by an avidin-biotin-peroxidase complex (Vector, Burlingame, CA, USA). Color was developed with diaminobenzidine (Sigma).

**Results**

*Mutant-specific alteration of SOD1 solubility in fALS-linked H46R SOD1 transgenic mice*

In this study, we used fALS-linked H46R SOD1 transgenic mice as reported previously [28]. To examine the

fALS-linked mutation-dependent change of SOD1 solubility, we sequentially extracted spinal cords of mutant transgenic mice with severe motor impairment (~24 weeks of age) with PBS, 1% TX, 5% SDS, 8 M urea, and 88% FA (Fig. 1A), and then separated extracts by SDS-PAGE under the denaturing condition. In 24-week-old non-transgenic littermates and 38-week-old wild-type SOD1

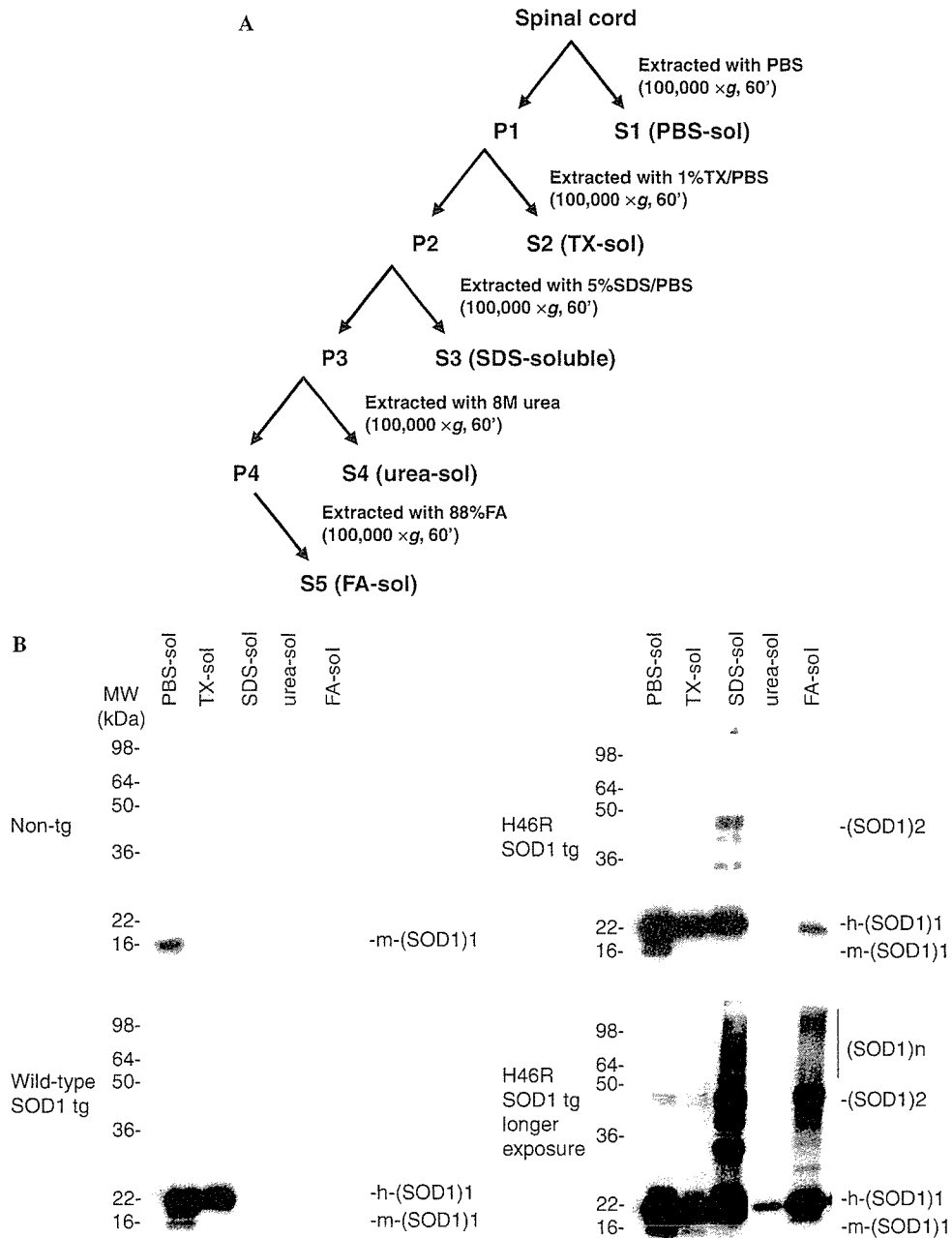


Fig. 1. Mutant-specific alteration of SOD1 solubility in spinal cords from fALS-linked H46R SOD1 transgenic mice. (A) Schematic representation of the sequential extraction steps. (B) Western blot analysis of spinal cords from 24-week-old non-transgenic mice (Non-tg) (upper left panel), 38-week-old wild-type SOD1 transgenic mice (Wild-type SOD1 tg) (lower left panel), and mutant H46R SOD1 transgenic mice at end stage (H46R SOD1 tg) (upper right panel). Ten micrograms of protein from each of the PBS-soluble fraction (PBS-sol), the TX-soluble fraction (TX-sol), the SDS-soluble fraction (SDS-sol), and the urea-soluble fraction (urea-sol) and equal aliquots of the FA-soluble fraction (FA-sol) were subjected to 15% polyacrylamide gels under reducing conditions. Western blots were probed with SOD1-100 antibody, which recognizes both human SOD1 (h-SOD1) and mouse endogenous SOD1 (m-SOD1). The lower right panel (identical to the upper right panel) was exposed to the film for a longer time.

transgenic mice, endogenous mouse SOD1, and wild-type human SOD1 were detected as monomers migrating at 16-kDa and 22-kDa, respectively, in the PBS- and 1% TX-soluble fractions (Fig. 1B). This finding may be explained by the fact that normal SOD1 is a soluble protein located predominantly in the cytosol and less within the membranous organelle such as mitochondrial intermembrane space [4]. In contrast to the control mouse SDS-soluble fraction that was virtually devoid of SOD1, intense bands of SOD1 were found in the SDS-soluble fraction of mutant transgenic mice (Fig. 1B). In the fraction, the anti-SOD1 antibody (SOD1-100) recognized 22-kDa bands ((SOD1)<sub>1</sub>; it represents SOD1 monomer), ~44-kDa bands ((SOD1)<sub>2</sub>; apparent molecular weight of (SOD1)<sub>2</sub> shows 2-fold to 22-kDa monomer, being consistent with SOD1 dimer as previously reported [19]), and multiple bands above 44-kDa ((SOD1)<sub>n</sub>; it represents high-molecular-weight (HMW) species). Also, ~28 and ~36-kDa bands were observed in the SDS-soluble fraction. These bands may represent proteolytic fragments from HMW species, but the exact origin was unknown in this study. SOD1 monomers, dimers, and HMW species were further recovered in the FA-soluble fraction, whereas a small amount of monomeric SOD1, but not HMW species, was detected in the urea-soluble fraction, indicating that FA-soluble SOD1 species were not simply carried over from the prior urea extracts (Fig. 1B). TX-insoluble/SDS-soluble (designated as SDS-soluble) species are characterized by an alteration of solubility to distinguish mutant H46R SOD1 from a wild-type one. Also, mutant H46R SOD1 contained SDS-stable oligomers with diverse solubility in detergents or denaturants.

#### *Age-dependent alteration of SOD1 solubility in H46R SOD1 transgenic mice*

As described in our previous report, the H46R SOD1 transgenic mice showed motor dysfunction with aging, and the stages of motor dysfunction could be classified into four time periods based on the Rotarod test: 13 weeks, 17 weeks, 21 weeks, and later 23 weeks of age were designated as the early presymptomatic stage (EP), late presymptomatic stage (LP), symptomatic stage (SS), and end stage (ES), respectively [28]. To clarify the alteration of SOD1 solubility with aging in mutant SOD1 transgenic mice, we compared the levels of SOD1 species, which were biochemically fractionated as described above, in the different stages (Figs. 2A and B). The levels of both PBS-soluble and TX-soluble SOD1 monomers showed no statistically significant difference between stages, although they had a tendency to decrease with aging (Figs. 2A and B). In the SDS-soluble fraction, mutant SOD1 monomers and dimers were clearly detected at EP. The ratios of SOD1 monomers at EP and LP versus ES were  $20.52 \pm 6.41\%$  (mean  $\pm$  SD) and  $45.88 \pm 2.30\%$ , respectively. In addition, the ratios of SOD1 dimers at EP and LP versus ES were  $29.38 \pm 21.20\%$  and  $68.47 \pm 10.27\%$ , respectively. On the other hand, the levels of SOD1 HMW

species showed the later elevation at the period between LP and SS. These findings indicate that the increase of SDS-dissociable soluble SOD1 monomers and SDS-stable soluble SOD1 dimers occurred between EP and LP before onset ( $n = 3$ ,  $p = 0.017$  and  $p = 0.005$ , respectively) (Fig. 2B). In the FA-soluble fraction, a small number of SOD1 monomers were also seen at EP, but there was no significant difference in the levels of monomers between EP and LP. The ratios of SOD1 monomers at LP and SS versus ES were  $32.31 \pm 12.99\%$  and  $68.30 \pm 17.03\%$ , respectively. The ratios of SOD1 dimers at LP and SS versus ES were  $12.73 \pm 6.27\%$  and  $41.42 \pm 4.50\%$ , respectively. The levels of FA-soluble SOD1 monomers and FA-soluble dimers significantly increased between LP and SS ( $p = 0.036$  and  $p < 0.001$ , respectively), while the levels of FA-soluble SOD1 HMW species elevated later in the period between SS and ES (Figs. 2A and B). The levels of SDS-dissociable soluble monomers and SDS-stable soluble dimers elevated earlier than the SDS-stable soluble HMW species and FA-soluble species.

To examine the relation between the alteration of SOD1 solubility and the formation of SOD1-inclusions with aging, we immunostained mouse spinal cords in four different stages with monoclonal anti-SOD1 antibody (Fig. 2C). At EP, we did not detect any kind of SOD1-inclusions. SOD1-inclusions in the neuropil appeared at SS, and the number of SOD1-inclusions increased between SS and ES (Fig. 2C). SOD1-inclusions increased after disease onset, indicating that the accumulation of SDS-dissociable soluble SOD1 monomers and SDS-stable soluble dimers precedes the appearance of SOD1-inclusions.

#### *The increase of Hsp70/40 in the SDS-soluble fraction with aging in H46R SOD1 transgenic mice*

To examine how the mutant-specific alteration of SDS solubility is associated with the molecular chaperone system, the fractionated samples prepared above were analyzed by Western blotting using antibodies to Hsp70 and Hsp40. Hsp70 and Hsp40 were found to be rich in the PBS-soluble and the TX-soluble fractions (Fig. 3A). PBS- and TX-soluble Hsp70 and Hsp40 showed constant levels in all stages of mutant transgenic mice and were not different from those in 24-week-old non-transgenic littermates and 38-week-old wild-type SOD1 transgenic mice (Fig. 3A). In the SDS-soluble fraction, the levels of Hsp70 and Hsp40 in mutant transgenic mice at LP were higher than those in the control mice at later 24 weeks of age. The levels of Hsp70 and Hsp40 in the SDS-soluble fractions elevated at the period between EP and LP in mutant transgenic mice (Fig. 3A). To clarify how the increase of Hsp70 and Hsp40 in the SDS-soluble fraction reflects in histopathological change with aging, we immunostained the lumbar spinal cords with antibodies to Hsp70 and Hsp40 (Fig. 3B). SOD1-positive inclusions were intensely stained with the antibody to Hsp70 as previously reported and faintly reacted with the antibody to Hsp40 in