

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 18 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 19 (2007) 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. 遺伝子発現プロファイリングに基づく孤発性 ALS モデルの作成	祖父江 元.....9
2. ALS ラットモデル脊髄における再生阻害因子の解析	糸山 泰人.....13
3. 胚性幹細胞、神経幹細胞を用いた神経再生	岡野 栄之.....18
4. RNA 編集異常による孤発性 ALS モデルマウスの開発に関する研究	郭 伸.....21
5. MnSOD の運動ニューロン特異的ノックアウトマウスにおける 酸化ストレスの運動神経変性への関与についての検討	高橋 良輔.....23
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.....25
7. ALS 遺伝子治療のための発現制御 AAV ベクターの開発	中野 今治.....31
8. ALS に対する HGF の治療解析 ーHGF の安全な投与方法確立へ向けての基盤研究ー	船越 洋.....32

III. 研究報告（研究協力者）

9. EGF+FGF2 髄腔内投与による ALS モデルマウス脊髄での 内在性未分化神経幹細胞増殖の試み	阿部 康二.....37
10. 筋萎縮性側索硬化症(ALS)トランスジェニックマウスの 肝臓・腎臓・心臓における一過性組織変性からの回復と HGF/活性型リン酸化 cMet(pcMet)システムの調整機構： 変性運動ニューロンに対する HGF 治療の戦略的拠点	加藤 信介.....40
11. Co-chaperone Mrj を遺伝子導入した線虫の作製の試み	小山 信吾.....45
12. ラット脊髄培養細胞を用いた運動ニューロン死の検討 ープロテアソーム障害と小胞体関連ストレスー	菊地 誠志.....48
13. 筋萎縮性側索硬化症における免疫補助分子 CD40 の解析	佐古田三郎.....51
14. ヒト Cu/Zn-SOD の Cys111 の酸化に関する研究	谷口 直之.....54
15. 神経細胞のポリオウイルス抵抗性	野本 明男.....57
16. ALS の shRNA を用いた遺伝子治療の問題点	水澤 英洋.....60

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	63
--------------------	----

V. ワークショップ・班会議プログラム	75
---------------------	----

VI. 研究者一	85
----------	----

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

本研究班では、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を克服するため、基礎系、臨床系研究者を結集し集約的な研究の推進体制を構築している。本研究の目標は病態に関連する新規標的分子の探索同定、新規治療の開発、治療手段の開発であり、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る。まず、新規治療法開発へ向けた ALS 病態解明の分野では、ALS 運動ニューロンの選択的障害への小胞体ストレスの関与、グリア細胞を基盤とした炎症機転への免疫補助分子 CD40 の関与、ミトコンドリアの活性酸素の除去機構として重要な MnSOD (SOD2)の病態への関与について新たな知見を得た。さらに、SOD1 の酸化機序に関連して Cys111 を中心とした検討を行い、治療に向けて Cys111 の SH 基を特異的に保護する薬剤の開発が治療に有望であることを示した。また co-chaperone である Mj1 を使った新規治療法開発に向けての基礎研究を推進した。ユビキチン陽性封入体の形成機序の解明を進め、p62 がオートファジーの欠損によるユビキチン化タンパク質の凝集体形成を引き起こす中心的な分子であることを明らかにした。肝細胞増殖因子 (HGF) による治療法開発の分野においては、HGF の安全な投与方法確立に向けて HGF/活性型リン酸化 cMet システムの評価を行い HGF の治療効果および安全性の根拠となる知見を得た。また、遺伝子治療に向けたデリバリーシステムの確立にも取り組んだ。その結果、誘導型 Cre recombinase の発現を doxycycline によって制御する AAV ベクターの開発、ポリオウイルスによる遺伝子デリバリーに向けての神経細胞毒性発現部位の同定、short hairpin RNA の安全な利用法の確立において重要な成果を挙げることができた。ALS 再生療法へ向けての基礎的研究の分野においては、EGF+FGF2 投与による内在性未分化神経幹細胞の増殖、ES 細胞からの効率的なニューロスフェア誘導およびコンドロイチン硫酸プロテオグリカンターゲットとした軸索再生許容環境の構築に成功した。さらに孤発性 ALS 疾患モデルの開発に取り組み、dynactin1 ノックダウン細胞培養システムおよび RNA 編集酵素 ADAR2 の運動ニューロン選択的ノックアウトマウスが孤発性 ALS の重要な病態を反映することを示した。

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 慶應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所長代行
中野 今治 自治医科大学内科学講座神経内科部門教授
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。

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。また、本研究班では ALS 疾患モデルとして現在利用可能な変異 SOD1 トランスジェニックマウスやラットに加えて孤発性 ALS の病態を反映する新たなモデルの開発も目的としている。

B. 研究方法

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い、研究組織としての有機的協力態勢を強化した。

【新規治療法開発へ向けての ALS 病態解明】

ALS では運動ニューロンが選択的に障害されることが大きな特徴であり、この機序を解明することは新規治療法開発へ向けての重要なステップとなる。そこで、この運動ニューロンの選択的障害に対する小胞体(ER)ストレスの関与をラット脊髄の培養系を用いて検討した。

また、ALS の病態には運動ニューロンのみならず非運動ニューロンも重要な役割を果たしている。そこでグリアを介する炎症機序の機序を免疫補助分子 CD40 を中心に解析した。

さらに、ALS においては酸化ストレスが SOD1 病態形成に大きく関わることが知られている。そこで、ミトコンドリアの活性酸素の除去機構として重要な MnSOD (SOD2)を運動ニューロン特異的に欠損するマウスを作製し解析を行った。また、SOD1 の酸化に Cys111 が果たす役割を検討した。

ALS をはじめとする神経変性疾患では異常な蛋白が凝集性、不溶性を獲得してユビキチン陽性封入体などを形成する。この凝集性を制御して治療への展開を計る目的で新たな co-chaperone である Mrj (mammalian relative of DnaJ) の不溶性 SOD1 の減少効果について検討を行った。また、オートファジー不能マウスにおけるユビキチン陽性封入体の形成に関わる新規分子の同定を試み、その解析を通じて封入体形成の分子機構解明に取り組んだ。

【肝細胞増殖因子 (HGF) による治療法開発】

HGF は ALS の治療に有望な神経栄養因子であることを明らかにしてきたが、今後の臨床応用へ向けて、その効果発現機序の解明および安全な投与法の確立が重要である。そこで、HGF のシグナル伝達についてその受容体である c-Met のチロシン残基の自己リン酸化の評価を変異 SOD1 マウス、および神経特異的に HGF を発現する変異 SOD1 マウスなどにおいて行った。

【遺伝子治療に向けたデリバリーシステムの確立】

多くの治療用遺伝子は過剰発現により有害となるため発現調整が重要となる。そこで、新たな発現制御 AAV ベクターの開発に取り組んだ。さらに運動ニューロンに感染するポリオウイルスを ALS 治療に応用するために、その細胞毒性に関わるウイルス遺伝子産物の同定、解析を行った。また、short hairpin RNA (shRNA)を使って変異 SOD1 などの遺伝子発現を抑制することも重要な治療ストラテジーとなりうるが、shRNA 自体の毒性をはじめとする問題点が存在する。そこでこれらの問題の解決に向けての研究を推進した。

【ALS 再生療法へ向けての基礎的研究】

再生治療における有効なストラテジーの1つである内在性未分化神経幹細胞の増殖を目的として、EGF+FGF2 投与による神経再生の活性化を試みた。また、ES 細胞由来の神経系前駆細胞を移植する治療法の確立のため、効率的にニューロスフェアを誘導する培養法について検討した。これらの細胞増殖、補充とともに重要な軸索再生許容環境の構築を目指して軸索再生阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンについての解析を推進した。

【孤発性 ALS 疾患モデルの開発】

孤発性 ALS 患者脊髄で観察される分子動態を反映するモデルを作成する目的で、運動ニューロン特異的な遺伝子発現プロファイルの結果を詳細に解析した上で、その遺伝子発現変化を培養細胞に展開し解析を行った。また、RNA 編集酵素 ADAR2 (adenosine deaminase acting on RNA type 2) を運動ニューロン選択的にノックアウトしたマウスを作製し、患者運動ニューロンでみられる GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率低下が生じるかを解析し孤発性 ALS モデルマウスとして機能しうるかを検討した。

(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。組み替え DNA 実験を行う際には、「遺伝子組み換え生物等の使用などの規制による生物の多様性の確保に関する法律」などに基づき、各研究者が所属する研究施設での組み替え DNA 実験規定に従った。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、各研究施設の動物実験指針に基づいた。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」として承認を受けている。

C. 研究結果と考察

【新規治療法開発へ向けての ALS 病態解明】

ALS における最大の特徴は運動ニューロンの選択的な障害である。この選択的障害に対する ER ストレスの関与を検討した。ラット脊髄培養系において、プロテアソーム阻害剤の暴露により運動ニューロン選択的に ER ストレスが誘導されることを見いだした。しかし、ER ストレス誘導薬剤による直接刺激では、一部の薬剤では運動ニューロン選択的な障害が認められなかったことから ER ストレスが運動ニューロンの選択的変性に関わる意義については今後も検討を要すると考えられた。

近年、ALS の病態には運動ニューロンのみならずグリア細胞を基盤とした炎症機転の関与が示唆されている。この経路として、病的状態ではグリア細胞に発現する Sema4D/CD100 がレセプターである Plexin-B を介して免疫補助分子 CD40 の高発現を惹起し、その下流で誘導される COX-2 や iNOS を介し神経細胞障害を起こすことを明らかにした。また、Sema4D/CD100 は ERK のリン酸化を通じて iNOS 産生を惹起することも明らかにした。これらの結果から G93A-Tg と CD40 KO マウスの交配による治療効果を探ったが、逆に症状の発症、進行がともに早くなった。生理的条件下では CD40 シグナルは神経細胞の維持に必要であり、完全なノックアウトではなく過剰な発現の制御が重要であると考えられた。

このように運動ニューロン変性にニューロン以外の細胞が寄与しているという非自律性神経細胞死の機序を支持する知見が別の研究からも明らかとなった。すなわち、ミトコンドリアの活性酸素の除去機構として重要な MnSOD (SOD2)を運動ニューロン特異的に欠損するマウスを作成したところ、運動ニューロンのミトコンドリアでの活性酸素ラジカルの顕著な産生増大を認め、軸索輸送障害やワーラー変性が生じやすいことが明らかとなった

が、運動ニューロン変性は生じなかった。

SOD1 は変異型、正常型に関わらず、酸化によって凝集が生ずる。この酸化機序の解明は有効な治療法開発のために重要である。本研究により、SOD1 の Cys111 は他のアミノ酸残基よりも速く酸化され、Cys111 の SH 基がスルフィン酸(SO₂H)またはスルホン酸(SO₃H)になることを明らかにした。さらにこの酸化型 SOD1 を特異的に認識する抗体を作製することに成功した。これらの結果から、変異 SOD1 の不安定性や酸化による凝集性を低減するために、変異 SOD1 の Cys111 の SH 基を特異的に保護する薬剤の開発が治療に有望であると考えられた。

また、変異 SOD1 の凝集性、不溶性を制御する別のストラテジーとして新たな co-chaperone である Mrj (mammalian relative of DnaJ) を使った新規治療法開発に向けての基礎研究を推進した。この結果、核に局在した Mrj (HSJ2a) は不溶性 SOD1 を減少させる効果は認めなかったが、細胞質に分布した Mrj (HSJ2b) により不溶性 SOD1 の減少を認めることが明らかとなった。この効果は Mrj 単独では Hsp70 とほぼ同程度であり、Mrj と Hsp70 の相乗効果は Hsp40 と Hsp70 の場合とほぼ同程度であった。Mrj の治療応用への展開として、pan-neuron に発現が期待できる unc-119 プロモーター下で Mrj を発現する線虫を作製し、個体レベルで変異型 SOD1 による神経細胞障害が改善するかどうかを検討していく予定である。

ユビキチン陽性封入体の形成は、ALS のみならず様々な神経変性疾患の発症と密接に関係している。中枢神経系特異的にオートファジーを欠損させた Atg7Flox/Flox:Nes マウスでは反射異常、協調運動障害などの神経変性疾患様症状を示し、神経細胞内にユビキチン陽性の封入体が蓄積することを明らかにしてきた。オートファジーの破綻が封入体を形成する機構を解明するために、オートファゴソーム膜の内外に局在する LC3 と相互作用する分子を超高感度プロテオミクス法により探索し

たところ、p62/Sqstm1 を同定した。さらに、p62/Sqstm1 ノックアウトマウスと Atg7Flox/Flox:Nes マウスの交配によりユビキチン陽性封入体形成はほぼ完全に抑制された。これにより、p62 がオートファジーの欠損によるユビキチン化タンパク質の凝集体形成を引き起こす中心的な分子であり、ユビキチン化したタンパク質を選択的にオートファゴソームに輸送させる可能性が明らかになった。

【肝細胞増殖因子 (HGF) による治療法開発】

新しい神経栄養因子として注目されている肝細胞増殖因子 (HGF) の遺伝子発現により、変異 SOD1 マウスの運動ニューロン死の抑制、運動機能の改善、寿命の延長がおこることを明らかにしてきた。今後の臨床応用を考えた場合、HGF の安全な投与方法確立が重要な課題となる。このため、HGF のシグナル伝達についてその受容体 c-Met のチロシン残基の自己リン酸化の評価を行った。変異 SOD1 マウスでは、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示すが、こ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 cMet(pcMet)システムの up-regulation 機構が寄与していることを明らかにした。一方、脊髄前角細胞は、HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を惹起し続けるが、最終的には、この機構を振り切るかたちで細胞死に至る。これらの結果は、脊髄前角細胞に対して、HGF 治療を行うことにより一般臓器同様の組織学的完全回復が得られる論拠となり得る。

一方、SOD1G93A ALS/神経特異的HGF-TgマウスにおいてHGF/活性型リン酸化cMet(pcMet)システムを検討した。このように神経系特異的にHGFを供給した場合、脳幹部運動ニューロンにおける効率的なc-Metのチロシンリン酸化を認めただのに対して、ALSに罹患していない神経組織でのc-Metの活性化は乏しいことが明らかとなった。HGFの神経組織への局所性供給は、ALSに罹患していない神経組織を活性化しないですむ観点から、安全な供給法と期待される。

【遺伝子治療に向けたデリバリーシステムの確立】

多くの治療用遺伝子は過剰発現により有害となるため発現調整が重要となる。導入した遺伝子の過剰発現を防ぐ安全機構として、誘導型 Cre recombinase (CreERT2) の発現を doxycycline(Dox)によって制御する AAV ベクターを開発した。このベクターでは tamoxifen (4-OHT)の存在下で Cre recombinase の活性を示すので安全性が高いが、さらに Dox で制御することにより、エストロゲン様の環境ホルモンなどの影響を受けない発現調節が可能である。実際に、loxP site に血液凝固 IX 因子 cDNA を挟み込んだ発現ベクターを使用してこのベクターによる遺伝子発現調整を確認したところ、Dox および 4-OHT の両者の存在下でのみ発現が減少することが明らかとなった。

また、ALS 治療には運動ニューロンに感染するポリオウイルスの利用も効果的な選択肢となり得る。しかし、ポリオウイルス自体が持つ神経細胞毒性を抑える必要があるため、細胞変性に関与するウイルス遺伝子産物を同定する必要がある。研究の結果、細胞変性効果に中心的な役割を演じていると考えられてきた 2A プロテアーゼを欠損させるのではなく、キャプシド蛋白質領域を欠損し 2A プロテアーゼを保持しているウイルス (DI 粒子) の方細胞変性を起こさないという点でより効果的であることを明らかにした。

病原遺伝子自体を small interfering RNA(siRNA)法で発現低下させることは理想的な治療法であり、変異 SOD1 トランスジェニックマウスに anti-SOD1 short hairpin RNA (shRNA) トランスジェニックマウスを交配することにより発症と病勢の進行を著明に遅らせることを報告してきた。しかし、この場合、内因性 SOD1 も抑制されるためメスに不妊の副作用が出現する。また、shRNA 過剰発現は肝細胞壊死を引き起こす。これらの問題点を解決していく目的で shRNA 抵抗性野生型 SOD1 を過剰発現したマウスと anti-SOD1 shRNA マウスを交配したところ、野生型 SOD1

の蛋白が補われることが明らかになった。また、shRNA 発現 AAV8 ベクターをマウスに経静脈的に全身性に投与した際、発現量を適切に調節することによって shRNA に起因する明らかな副作用なく長期間持続する SOD1 の発現抑制に成功した。

【ALS 再生療法へ向けての基礎的研究】

ALS において失われた運動ニューロンを新たに補い神経回路を再構築する再生治療においては、内在性未分化神経幹細胞を増殖させる方法、ES 細胞由来の神経系前駆細胞を移植する方法などがある。まず、前者においては、EGF+FGF2 髄腔内投与による、神経再生の活性化を試みた。その結果、発症時 SOD1 変異マウス脊髄では内在性未分化神経幹細胞がコントロールマウスに比べて増加しており、灰白質では前角により多く認められ、EGF+FGF2 投与により活性化されることが明らかとなった。

また、ES 細胞由来の神経系前駆細胞を移植するにあたっては、ES 細胞からの効率的なニューロスフェア誘導が重要な基礎的ステップとなる。胚様体(Embryoid Body: EB)形成時に Noggin、レチノイン酸、Sonic hedgehog、Wnt3a や BMP4 を添加することによってニューロスフェアの形成効率を上昇させるとともに前後軸、背腹軸に沿った領域特異性を付与し、in vivo の中枢神経の発生をよく模倣する時間的・空間的特異性を制御したニューロスフェアの誘導に成功した。このニューロスフェアは、変異 SOD1 ラット脊髄や脊髄損傷モデルマウスへの移植により生着し、in vivo でもニューロンに分化した。現在、ヒト ES 細胞や核移植 ES 細胞からもニューロスフェアを誘導する方法を構築している。

これらのような内在性神経前駆細胞の活性化や外来性細胞移植が成功したとしても、損傷神経回路内への機能的組込みこそが重要であり、軸索伸長促進、シナプス新生といった次なる再生ステップが不可欠となる。軸索再生阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の発現を ALS ラットモ

デル脊髄で解析すると、発症前より有意に CSPG の発現が亢進し進行性であった。そこで、コンドロイチナーゼ ABC を発症後の髄腔内に持続投与したところ、コンドロイチン硫酸の酵素的分解が確認され、その結果、脊髄前角の新生細胞増加が認められた。再生誘導戦略においては、軸索再生許容環境の構築をねらった治療法開発も細胞補充と同時に重要であると考えられる。

【孤発性 ALS 疾患モデルの開発】

ALS 研究においては変異 SOD1 トランスジェニックマウスやラットがその疾患モデルとして広く使われているが、これは必ずしも孤発性 ALS の病態をそのまま反映しているわけではない。この点において実際に孤発性 ALS 患者脊髄で観察される分子動態を反映するモデルを作成することは重要であると考えられる。そこで、孤発性 ALS 患者の運動ニューロン特異的な遺伝子発現プロファイル解析、およびそれに引き続く発現動態の解析を行ったところ、神経変性過程初期に発現低下を示す分子として逆行性軸索輸送のモーター蛋白 dynactin の主要なサブユニットである dynactin1 を同定した。培養細胞レベルで dynactin1 をノックダウンしたところ、autophagosome-lysosome の癒合障害による autophagosome 形成の促進、ポリユビキチン化蛋白の集積、細胞死が観察された。ALS 患者脊髄運動ニューロンでもオートファジーの障害を示唆する結果を得ており、このモデルは孤発性 ALS の重要な病態の少なくとも一部を反映したモデルであると考えられ、現在、線虫、マウスモデルの作成にも取り組んでいる。

また、同じく孤発性 ALS 患者脊髄運動ニューロンにおける観察より、グルタミン酸受容体サブタイプである GluR2 の Q/R 部位 RNA 編集が選択的に低下していることを報告してきた。RNA 編集酵素 ADAR2 (adenosine deaminase acting on RNA type 2) により、この GluR2 Q/R 部位は特異的に編集される。孤発性 ALS の原因が、ADAR2 欠乏により生じるという作業仮説を検証するため、運動ニューロン

選択的に conditional にノックアウトした変異マウスを作製したところ、脊髄前角における GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は低下し、生存期間もコントロール群に比べ有意に短縮していた。このマウスモデルは孤発性 ALS の重要な病態を反映する優れたモデルとして ALS 研究において重要な役割を果たすものと考えられる。

D. 結論

本研究が目的とする ALS 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。本研究によって新規治療法開発へ向けての ALS の病態解明がさらに進み、新たな分子標的が明らかになりつつある。さらに臨床応用が近いと考えられる肝細胞増殖因子による治療法についても安全性の根拠を示すことができた。また、将来、重要な治療法になりうる遺伝子治療、再生治療についてもより優れたデリバリーシステムを確立し、効率的な再生誘導システムを構築することができた。さらに孤発性 ALS の疾患モデルの開発も順調に進捗している。本研究班が目指す ALS という難治性疾患に対する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である。さらに、運動ニューロンの過酷な変性死の機序解明へ向けてのチャレンジは他の神経変性疾患研究に対しても重要なインパクトを与えると考えられる。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし

F. 研究発表

1. Yamada S, Niwa J, Ishigaki S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G. Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells. *J Biol Chem.* 281:23842-23851, 2006

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

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

他の出願・登録状況は研究報告（分担研究）
に別掲

Ⅱ. 研究報告（分担研究）

遺伝子発現プロファイリングに基づく孤発性ALSモデルの作成

分担研究者：祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学 教授
研究協力者：田中 章景、黄 哲、蔣 月梅、松尾 幸治
和座 雅浩、飯島 正博、山本 正彦、道勇 学

研究要旨

孤発性 ALS 患者の運動ニューロン特異的な遺伝子発現プロファイル解析、およびそれに引き続く発現動態の解析の結果、神経変性過程初期に発現低下を示す分子として *dynactin1* を同定した。そこで、この発現変化を培養細胞に再現することにより ALS の疾患モデル作成を試みた。siRNA 法により SH-SY5Y 細胞において *dynactin1* をノックダウン(KD)し、その影響を各種アッセイによりコントロールと比較検討した。*dynactin1*-KD により細胞死が引き起こされることが明らかとなり、その経路としてオートファジーについて検討したところ、autophagosome-lysosome の癒合障害による autophagosome 形成の促進を認めた。また、ポリユビキチン化蛋白の集積も示唆され、*dynactin1* KD 細胞ではオートファジーの障害によって、処理しきれない何らかのタンパクが細胞内に蓄積することで神経細胞死が生じているものと考えられた。また、ALS 患者脊髄運動ニューロンでもオートファジーの障害を示唆する結果を得ており、この細胞培養モデルは孤発性 ALS の重要な病態の少なくとも一部を反映したモデルであると考えられる。

A. 研究目的

ALS は、運動ニューロンが選択的に変性し細胞死に陥ることが最終病理像であるが、この病態形成機序は不明である。特に孤発性 ALS は遺伝性のものに比べはるかに有病率が高いにも関わらず、病態形成の出発点となる病因分子が不明なため、病態関連分子の発見は遅れている。そこで、孤発性 ALS の病態関連分子を包括的に見だし、病態の進行に係わる分子群を明らかにすることが、病態解明の重要な戦略となりうる。さらにこれらの分子群の変化を忠実に反映するモデルが作出されれば、それは孤発性 ALS の病態のある部分を反映するモデルとなり得る。

我々はレーザーマイクロダイセクション法を用いて脊髄運動ニューロンを単離し、抽出した RNA を増幅後、cDNA マイクロアレイ解析を行ってきた。孤発性 ALS におけるこのような運動ニューロン特異的な遺伝子発現プロファイリングは世界初のものであり、この結果、ALS 運動ニューロ

ンにおいては、解析を行った 4845 遺伝子中、コントロール例に比べ有意な発現上昇を示す 52 遺伝子(1%)、発現低下を示す 144 遺伝子(3%)を同定することに成功した(Ann Neurol 2005)。これらのうち、定量的 RT-PCR 法および *in situ hybridization* 法により運動ニューロン特異的な発現量変化を確認し得た遺伝子は孤発性 ALS の病態に深く関与する遺伝子と考えられる。

そこで、これらの遺伝子の発現変化を培養細胞および動物において再現することにより孤発性 ALS のモデルを開発することが本研究の目的である。ターゲットとする遺伝子は、運動ニューロン変性に関与する可能性が高いと想定されるもの、かつ神経変性過程の初期から発現変化をきたしているものが理想的と考えられる。そこで、様々な病期の多数例の孤発性 ALS 患者脊髄サンプルにおいてこれらの発現程度と各種の神経変性マーカーとの関連を詳細に検討することにより、神経変性過程初期から発現低下をきたしている遺伝子を

同定し、この遺伝子発現変化を培養細胞に再現することにより ALS の疾患モデル作成を試みた。

B. 研究方法

まず、我々が遺伝子発現プロファイルの結果見だし、運動ニューロン特異的な発現変化を確認した ALS 病態関連分子の発現動態を様々な病期の孤発性 ALS20 例および正常コントロール 7 例の腰髄を用いて検討した。解析対象は、転写因子の early growth response 3 (EGR3)、軸索輸送関連の dynactin1、細胞死抑制作用があるとされる acetyl-CoA transporter (ACATN)、細胞死促進にはたらく death receptor 5 (DR5)、および、細胞周期関連遺伝子であり、細胞死促進に働くとされる cyclin C(CCNC)、および現時点で機能不明な KIAA0231 の 6 遺伝子である。また、神経変性のマーカーとして、残存運動ニューロン数、リン酸化ニューロフィラメント H、ユビキチン化蛋白の 3 つを用い、神経変性に従って上記 ALS 病態関連遺伝子の発現がどのように変化していくかを検討した。発現程度は、in situ hybridization または免疫組織化学的に、信号強度を定量化することにより解析した。

この結果、特に神経変性過程初期から発現低下を来していることが明らかとなった dynactin1 について、siRNA 法により SH-SY5Y 細胞において遺伝子発現をノックダウン(KD)し、その影響を各種アッセイによりコントロールと比較検討した。細胞死の有無については、MTT assay, PI staining、アポトーシス関連では DNA ladder assay、caspase3 ウェスタンブロット、Tunel 法による検討を加えた。さらに、dynactin1 KD がオートファジーに及ぼす影響を autophagosome 形成のマーカーである LC3 に対する抗体を用いたウェスタンブロット、免疫染色、免疫電顕で検討し、さらに lysosome のマーカーである lgp85 についても LC3 発現との関連を調べた。また、dynactin1 KD によるユビキチン陽性蛋白凝集体形成の有無を明らかにするために抗ユビキチン抗体を用いた免疫染色、ウェスタンブロットを行った。

C. 研究結果

【ALS 病態関連分子の発現動態】

A. 残存運動ニューロン数との関連

遺伝子発現変化をきたした運動ニューロンの割合を ALS20 例において検討したところ、残存運動ニューロンの 80%以上で発現が変化している ALS 例数が DCTN1 では 20 例全例、EGR3、ACATN では 14 例であったのに対して、KIAA0231、DR5、CCNC では各々 9 例、5 例、0 例であった。また、残存ニューロンが減少するとともに遺伝子発現変化を生じる運動ニューロンの割合は増加するが、特に dynactin1 では運動ニューロン数が保たれている段階からすでにほとんどのニューロンで遺伝子発現が低下していた。

B. ニューロフィラメント H(NFH)蓄積との関連

ALS では神経変性に従い NFH の蓄積が生じることが知られている。遺伝子発現の定量化による検討を加えると、ACATN、KIAA0231、DR5、CCNC では NFH が蓄積するに従い次第に発現レベルが上昇するという相関を認めた。一方、DCTN1 や EGR3 では、コントロールと変わらないような NFH の density の細胞においてもすでに発現レベルが低下していた。

C. ユビキチン化蛋白出現との関連

また、dynactin1 の発現とユビキチン化蛋白出現の関係を検討したところ、ユビキチン化蛋白が出現している運動ニューロンのみならずユビキチン化蛋白が出現していない細胞においても dynactin1 の発現は低下していた。

以上のような検討の結果、運動ニューロン変性前からすでに発現低下をきたしている遺伝子群 (dynactin1、EGR3) と、運動ニューロン変性に従って発現変化をきたしてくる遺伝子群 (ACATN、KIAA0231、DR5、CCNC) とを区別することが可能であった。そこで、神経変性過程の上流に位置すると考えられる dynactin1 の遺伝子発現変化を培養細胞に展開することにより、ALS の疾患モデル作成を試みた。

【ALS 培養細胞モデルの作成と解析】

A. dynactin1 ノックダウン(KD)細胞の作製

SH-SY5Y cells における siRNA 法による dynactin1 KD の結果、72~96 時間後の dynactin1 発現レベルはコントロールの 30-40%と、ALS 患者脊髄運動ニューロンにおける発現低下レベルと同程度の理想的なシステムを構築することができ

た。

B. dynactin1 KDによる細胞死

MTT assay, PI staining の結果、dynactin1-KD により時間依存性に細胞死が生じることを確認したが、DNA ladder assay、caspase3 ウェスタンブロット、Tunel 法における検討では、これがアポトーシス性である証拠は現在のところ得られていない。

C. dynactin1 KDによるオートファジーの障害

次に、dynactin1 KD から細胞死に至る経路を明らかにする目的でオートファジー機能を検討した。dynactin1 KD 細胞では、ウェスタンブロット、蛍光免疫染色の結果、オートファジーの重要な過程である autophagosome 形成のマーカである LC3 の発現が上昇、特にウェスタンブロットでは、LC3-II の発現が上昇していることが明らかとなった。さらに、通常の電顕および抗 LC3 抗体を用いた免疫電顕の結果からも dynactin1 KD 細胞においては autophagosome 形成が亢進していることが明らかとなった。

次に、lysosome のマーカーとして lgp85 を用い、LC3 との共発現状態を調べたところ、コントロールでは両者がほぼ共局在し、autophagosome と lysosome が癒合し autolysosome が正常に形成されていると考えられた。一方 dynactin1 KD 細胞では両者の共局在エリアは定量的にも少なく、癒合障害が示唆された。すなわち、dynactin1 KD 細胞においては代償的に autophagosome の形成促進は見られるものの最終的にオートファジー機能は障害されているものと考えられた。

D. dynactin1 KDによるポリユビキチン化蛋白の集積

次に、オートファジーの障害による細胞内蛋白処理系の障害を確認するために抗ユビキチン抗体を使った免疫染色およびウェスタンブロットを行った。dynactin1 KD 細胞の免疫染色では光顕レベルで明らかな凝集形成は認められなかったが、ウェスタンブロットではポリユビキチン化蛋白の集積が示唆された。

E. ALS患者脊髄運動ニューロンにおけるオートファジーの障害

また、我々は ALS 患者脊髄運動ニューロンにおいても細胞培養モデルと同様の変化が生じているかどうかの確認を行ったところ、dynactin1 の

発現が低下するほど LC3 の発現が上昇するという相関を認めた。

D. 考察

ALS 研究においては変異 SOD1 トランスジェニックマウスがその疾患モデルとして広く使われているが、これは必ずしも孤発性 ALS の病態をそのまま反映しているわけではない。そこで、我々は、ALS 患者脊髄運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイリングからスタートし、その発現動態の解析により神経変性初期より発現変化を来している分子の 1 つとして dynactin1 を同定し、その発現変化を培養細胞や動物に展開することにより疾患モデルができないだろうか考えた。

dynein、dynactin は逆行性軸索輸送を制御するモーター蛋白であり、お互いに interact することにより効率的な輸送を実現している。dynactin は構造上、多くのサブユニットからなっているが、微小管結合部位を持つ部分が dynactin1(p150 glued)である。dynein 遺伝子変異によりマウスに、また dynactin1 遺伝子変異によりヒトに運動ニューロン障害をおこすことが知られており、孤発性 ALS 患者運動ニューロンにおいて dynactin1 の発現がその変性過程初期より低下していたことは非常に意義深い。

dynactin1 の発現低下を siRNA 法を用いて SH-SY5Y 細胞に再現したところ、ALS 患者脊髄運動ニューロンにおける発現低下レベルと同程度のノックダウン効率が得られ、細胞死が引き起こされた。この細胞死へのオートファジー経路の関与を検討したところ、dynactin1 KD 細胞ではコントロールに比較して autophagosome の形成が亢進していた。autophagosome 形成の促進は、オートファジーの亢進または、autophagosome の外膜が lysosome と微小管依存性に癒合し autolysosome を形成していく autophagosome の成熟過程の障害に基づく。dynactin1 KD 細胞では LC3 と lgp85 の共局在エリアが、コントロールに比して少ないことより autophagosome の成熟過程の障害が示唆された。

dynactin 同様に逆行性軸索輸送を制御するモーター蛋白である dynein の機能障害においても、autophagosome と lysosome の癒合障害が生じるこ

とが報告されている。この場合、易凝集性蛋白である変異ハンチンチンの存在下では、オートファジーによるクリアランスが低下するため変異ハンチンチンの凝集が促進される。また、最近では、オートファジー経路の重要な分子である Atg7 をニューロン特異的にノックアウトしたマウスでは、易凝集性の変異蛋白が存在しなくてもユビキチン陽性蛋白質凝集体が形成され、神経変性が生じることが報告されている。我々の研究でも、dynactin1 KD によるオートファジーの障害によるユビキチン陽性蛋白質凝集体の形成有無を確認したところ、免疫染色上は明らかな凝集形成を認めなかったものの、ウェスタンブロットではポリユビキチン化蛋白の集積が示唆された。この結果は、オートファジーの障害により、処理しきれない何らかのタンパクが細胞内に蓄積することにより神経細胞死が生じている可能性を示唆する。

また、ALS 患者脊髄運動ニューロンでもオートファジーの障害を示唆する結果を得つつあり、この細胞培養モデルは孤発性 ALS の重要な病態の少なくとも一部を反映したモデルとなりうると考えられる。

E. 結論

孤発性 ALS 患者の運動ニューロン特異的な遺伝子発現プロファイル解析、およびそれに引き続く発現動態の解析の結果、神経変性過程初期から発現低下を示す分子として dynactin1 を同定した。この発現変化を培養細胞に再現したところ、オートファジーの障害が生じ、ユビキチン化タンパクが細胞内に蓄積し神経細胞死が引き起こされた。ALS 患者脊髄運動ニューロンでもオートファジーの障害を示唆する結果を得ており、この細胞培養モデルは孤発性 ALS の重要な病態の少なくとも一部を反映していると考えられる。現在、作成および解析中の dynactin1 コンディショナルノックアウトマウス、dynactin1 KD 線虫と併せ、dynactin1 ノックダウンにより有用な孤発性 ALS モデルが開発されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G. Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol Dis.* 25:331-341, 2007
2. Tanaka F, Niwa J, Ishigaki S, Katsuno M, Waza M, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 1086:1-10, 2006
3. Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Banno H, Suzuki K, Onoda Y, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Reversible disruption of dynactin 1-mediated retrograde axonal transport in polyglutamine-induced motor neuron degeneration. *J Neurosci.* 26:12106-12117, 2006
4. Yamada S, Niwa J, Ishigaki S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G. Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells. *J Biol Chem.* 281:23842-23851, 2006

学会発表

1. Tanaka F, Jiang YM, Yamamoto M, Huang Z, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Sobue G. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *17th International Symposium on ALS/MND* Yokohama, Japan, Oct 2006

その他の論文発表や学会発表は別掲

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ALS ラットモデル脊髄における再生障害因子の解析

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, 水野秀紀, 青木正志 (東北大学神経内科)
岡野栄之 (慶応義塾大学生理学)

研究要旨 変性脊髄における再生誘導療法開発を念頭に、再生機転の障害となりうる軸索再生障害因子に注目した。その代表的因子、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の発現を ALS ラットモデル脊髄で解析すると、発症前より有意に CSPG の発現が亢進し進行性であった。これに対してコンドロイチナーゼ ABC を発症後の髄腔内に持続投与したところ、*in vivo* でコンドロイチン硫酸の酵素的分解が確認できた。さらにその結果、脊髄前角の新生細胞増加が認められた。再生誘導戦略においては、本研究のような軸索再生許容環境の構築をねらった治療法開発が細胞補充と同時に重要であると考えられる。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は致死的な変性疾患であり、系統的かつ進行性の運動ニューロン脱落を主徴とする。予後不良にもかかわらず有効な治療がまったくないため新規治療法開発が急務であり、その治療戦略として (1) 残存する運動ニューロンの細胞死抑制を主目的とする「運動ニューロン保護療法」と、(2) いったん失われた運動ニューロンを新たに補い神経回路を再構築する「再生誘導療法」の2つに大別できる。

昨年度、我々は自ら開発した ALS の新しい動物モデル、ヒト変異 *Cu/Zn SOD* トランスジェニックラットの優れた大きさを生かし、再生誘導因子を髄腔内持続投与した。そして、発症後の変性脊髄においてもなお内在性神経前駆細胞を活性化する「再生誘導療法」開発の可能性を示した。

しかし仮に脊髄前角における細胞補充が成功したとしても、損傷神経回路内への機能的組込みこそが重要であり、細胞体の存在する灰白質から白質を抜けて脊髄前根内に入り、遠く標的骨格筋までの投射が必要とされる。このためには軸索伸長促進、シナプス新生といった次なる再生ステップが不可欠と考えられる。

しかし、もともと成体中枢神経は軸索再生に対して非許容的な環境とされ、生理的条件下でも複数のミエリン関連蛋白が軸索再生障害因子として存在していることが知られる (図 1)。そこにひとたび損傷が生じた場合、局所的なグリア瘢痕や線維性瘢痕の形成に伴って、さまざまな軸索再生障害因子の発現が亢進する (図 1)。

その中で、細胞外基質の主要な構成成分であり軸索伸長障害活性をもつコンドロイチン

軸索再生障害因子

- 瘢痕由来

グリア瘢痕

Chondroitin Sulfate Proteoglycans (CSPG)

線維性瘢痕

Sema3A

- ミエリン関連蛋白

- Myelin-associated Glycoprotein (MAG)
- Nogo
- Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein (OMgp)
- Repulsive Guidance Molecule A (RGMa)

Division of Neurology, Tohoku Univ. Graduate School of Medicine

Tohoku University ALS Center

図 1. 多様な軸索再生障害因子の中で変性脊髄においてはコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) がもっとも重要な因子と想定される。

硫酸プロテオグリカン (chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG) はもっとも重要であり、実際、*in vivo* で CSPG を酵素的に分解することで軸索伸長促進と機能的回復を示した脊髄損傷モデルが複数報告され注目されている。

そこで今年度、我々は本モデル変性脊髄における CSPG 発現の変化を検討し、さらにコンドロイチン硫酸分解酵素を髄腔内に投与して軸索再生に許容的な環境の構築を試みた。

B. 研究方法

実験 1. CSPG 発現の検討

東北大学神経内科で系統維持している雌性 His46Arg 変異 *Cu/Zn SOD* 遺伝子導入 (Tg) ラットを対象とし、発症前 (24 週齢)、発症早期 (26 週齢)、発症後期 (28 週齢) のそれぞれについて 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液による腰髄灌流・浸漬固定後凍結切片を作成 (図 2A)。正常中枢神経にも発現する主要 CSPG である neurocan, phosphacan, versican (glycosaminoglycan 鎖) のコア蛋白に対する特異抗体を各々用いて蛍光免疫組織化学を行った。共焦点レーザー顕微鏡下に関心領域 (前角, 前索, 後角, 後索, 各 $1.24 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) の画像を取得して半定量的解析を行い、週齢一致正常同腹仔 (コントロール) と比較した (各群 $n=3\sim 4$)。解析には一頭あたり少なくとも $50 \mu\text{m}$ 以上離れた 5 切片以上を収集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コンピューターソフトウェアを使用した。

実験 2. *in vivo* における ChABC の効果の検討

発症中期で両後肢麻痺を呈する同 Tg ラット (27 週齢) を *Proteus vulgaris* 由来のコンドロイチン硫酸分解酵素 (chondroitinase ABC, EC 4.2.2.4) 投与群 (ChABC 群) と生理食塩水のみ投与するコントロール群 (各群 $n=5$) に分けた。ChABC は 1 匹のラットあたり 20U (100 U/mL) を生理食塩水に溶解して用いた。

7 日間にわたる持続的髄腔内投与のため、薬液を浸透圧ポンプ (流量 $1.0 \mu\text{L}/\text{時}$) 内に容れ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に固定した後、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',3'-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 $10 \mu\text{L}/\text{時}$) より $150 \text{ mg}/\text{kg}/\text{日}$ となるよう持続投与して、新生細胞を標識した (図 3A)。

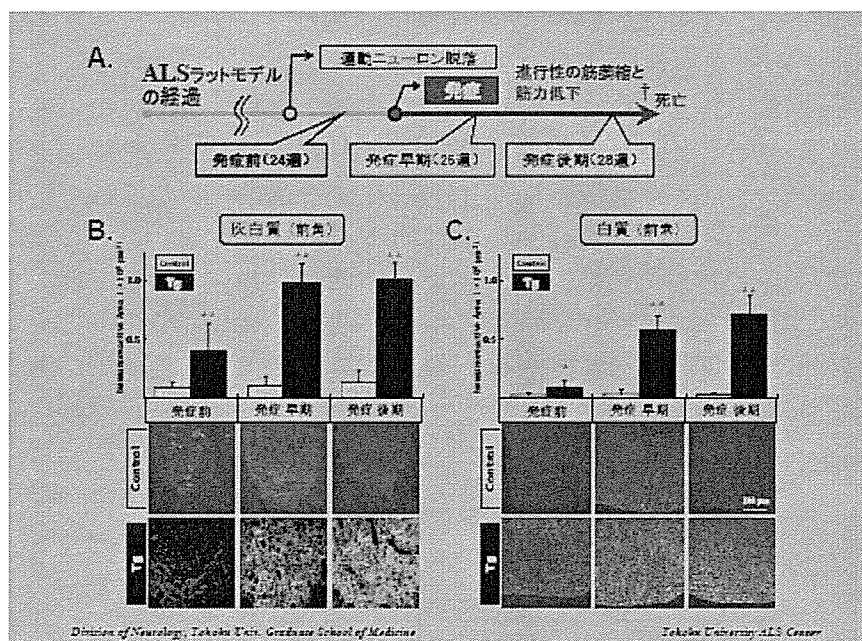


図 2. A. 実験 1. の対象となった ALS ラットモデルの経過と検討週齢を示す。発症前 (24 週齢)、発症早期 (26 週齢)、発症後期 (28 週齢) において、それぞれに週齢一致正常同腹仔をコントロールとして比較検討した。B. 腰髄前角における CSPG (neurocan) 免疫反応の変化。下段に代表的顕微鏡写真を上段にその半定量結果を示す。C. 腰髄前索における CSPG (neurocan) 免疫反応の変化を B. と同様に示す。B., C. とともに発症前から Tg ラットで有意に CSPG 免疫反応が亢進し、病期の進展に平行してさらなる増加が認められる。(scale bar: $100 \mu\text{m}$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, one-way ANOVA and Tukey-Kramer post-hoc test)

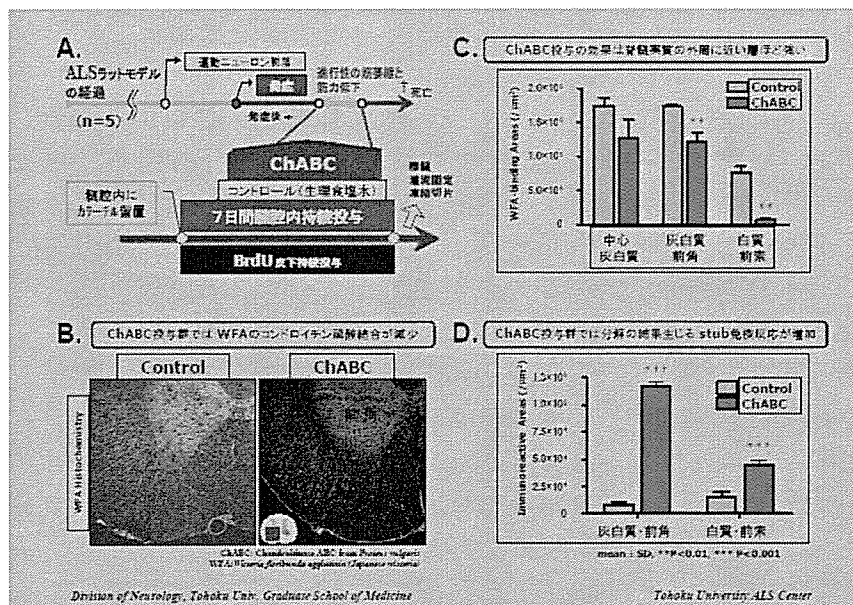


図3. A. 実験2の方法を示す。発症中期(27週齢)のTgラットに対してChABCもしくは生理食塩水(コントロール)を7日間、持続的に髄腔内投与してCSPGの酵素的分解を試みた。同時に、BrdUを皮下持続投与して新生細胞を標識した。B. 脊髄腹側におけるWFA蛍光組織化学。コントロール(左パネル)に比してChABC群(右)ではWFAが結合するコンドロイチン硫酸の減少が示され、ChABCの効果が白質から灰白質前角にまで及んでいることが分かる。C. WFA蛍光組織化学の半定量結果。コントロールに比してChABC群では前角、前索において有意なWFA結合の減少を認める。D. 抗stub抗体を用いた蛍光免疫組織化学の半定量結果。前角、前索においてChABC群で有意なstub免疫反応の増加が明らかで、Cの結果を支持する。(scale bar: 200 μm; **P<0.01, ***P<0.001)

投与終了翌日に、エーテル深麻酔下のラットより灌流固定・浸漬固定後の腰髄凍結切片を作成。intactなコンドロイチン硫酸(CS)に対して選択的に結合するビオチン化 *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA)を用いた蛍光組織化学、あるいはChABC処理によりCSが分解されて生じるstubに特異的な抗体を用いた蛍光免疫組織化学を施行し、ChABCの効果を評価した。さらに、BrdUと各種細胞選択的マーカーによる多重免疫組織化学を加え、ChABC投与脊髄における神経前駆細胞の挙動を検討した。得られた結果は共焦点レーザー顕微鏡下に実験1と同様な半定量的解析(各関心領域: $5.0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$)を行った。

【倫理面への配慮】

すべての遺伝子操作は東北大学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

実験1. CSPG発現の検討

総じてTgラット腰髄では、コントロールに比して各CSPGの有意な免疫反応亢進を認めた。腰髄横断切片での分布をみると、病変の主座である前角とその周囲の白質に優位であることが分かった。各CSPGの中でもneurocanは特に顕著な亢進を示し、その変化は発症前から有意であった(図2B, 2C)。phosphacan、versicanに関して同様な傾向が確認されたが、phosphacanは発症後期にその亢進の程度が小さくなっていった(data not shown)。

実験2. *in vivo*におけるChABCの効果の検討

WFA蛍光組織化学でChABCの効果を見ると、コントロールに比してChABC群では有意にCS沈着が減少していることが明らかとなった(図3B, 3C)。

その程度は、白質(前索)でもっとも強く、ついで灰白質では前角の腹側から外側にかけて優位であった。一方、中心灰白質では有意な減少を認めなかった(図3C)。以上の結果は、stub免疫反応がChABC群で有意に増強していることでさらに確認できた(図3D)。

脊髄前角においてBrdU陽性核をもつ新生細胞の密度を見ると、ChABC群では有意に増加していた(図4)。現在、多重免疫組織化学により新生細胞の内訳を解析中である。

D. 考察

実験1.では、ALSラットモデルの変性病態においても急性病態である脊髄損傷と同様に、脊髄運動ニューロン脱落に伴って進行性にCSPG発現が亢進することを明らかにした。また、それは病変の主座である前角とその周囲白質に優位であり、かつ発症前から発現亢進が認められることから、本モデルにおけるALS

様病態の進行と密接な関連が示唆される。

これら CSPG 変化は分子種による相違も認められたため、各 CSPG の意義についてはさらなる解析が必要である。また、CSPG 発現亢進に関与する細胞群の同定、発現亢進メカニズムについても検討が望まれる。

実験 2.では、CSPG の ALS 様病態への関与や神経前駆細胞との関連を明らかにする端緒として、ChABC を髄腔内という局所に持続投与して進行性に増加する CSPG の酵素的分解を試みた。その結果、ChABC の効果が *in vivo* で確認でき、とくに脊髄実質周辺部ほど効果が高いことが明らかとなった。したがって、CSPG 発現亢進に基づく局所での軸索伸長阻害活性を *in vivo* でも減弱できる可能性が示されたといえる。

さらに ChABC 群では BrdU 陽性の新生細胞増加が認められたことから、神経前駆細胞やグリア系細胞の増殖能が ChABC 投与によって変化した可能性がある。今後、新生細胞の内訳や未成熟細胞の出現等について詳細に検索するとともに、運動ニューロン脱落やグリア細胞増殖といった変性病態そのものの変化についても検討を要する。

正常中枢神経における CSPG の生理的機能は、発達期における神経軸索伸長のガイダンスとしての役割のほか、成体においてもシナプス可塑性、細胞接着や遊走、細胞間のシグナル伝達などに関与することが知られる。さらにその機能は CSPG の分子種によるだけで

なく、中枢神経内の発現部位によっても異なることが想定されている。

これに対し、病態下で発現増加する CSPG の機能については未解明な部分も残る。複数の成体脊髄損傷モデルを用いた研究からは軸索伸長という一面に限っていえば、損傷部位で増加する CSPG が少なくとも阻害にはたらく因子であることを示唆している。

最後に、本研究で“髄腔内” ChABC 投与による CSPG の酵素的分解を確認したことは、必要な時期・期間に必要とされる局所に病態への介入を行える利点を示したという点で重要な意義があると考えられる。本法では全身性副作用を軽減でき、いつでも投与中止できるだけでなく、中枢神経広汎にわたり投与が必要な系統的神経変性疾患の場合、なおさら臨床的には有用な投与方法である。

E. 結論

発症前から進行性の CSPG 発現亢進が本モデル脊髄に生じていることが明らかとなり、軸索再生に非許容的な環境の存在が示唆された。今後、細胞補充療法の開発だけでなく、細胞外微小環境を標的とした再生許容環境（再生の場）構築もまた再生誘導療法にとって重要と考えられた。

本研究で可能性を示した「CSPG 分解による軸索再生阻害因子の抑制」は、将来的な外来性細胞移植、内在性神経前駆細胞の活性化のどちらにとっても重要な組合せ療法のひとつとなりうると考えられ、新規治療法開発への寄与が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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

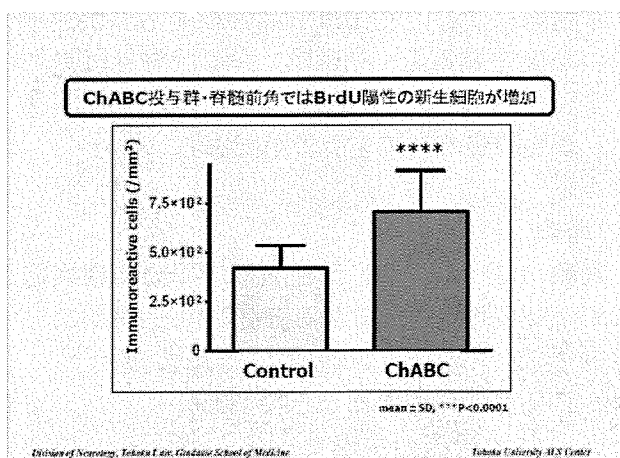


図 4. 腰髄前角における BrdU 陽性の新生細胞密度 (/mm²)。ChABC 群では有意に増加している。

amyotrophic lateral sclerosis. *Histol Histopathol* 2006; 21: 729-42.

なし

- 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.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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