

## 胚性幹細胞、神経幹細胞を用いた神経再生

分担研究者 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室 教授

研究要旨 マウス ES 細胞から神経系前駆細胞/幹細胞(NS/PCs)を含むニューロスフェアを誘導する培養法を確立した。このニューロスフェアは、成体脊髄に移植すると生着し、*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(ntES 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。

### A. 研究目的

マウス胚性幹細胞（ES 細胞）から神経系前駆細胞/幹細胞（ニューロスフェア）を誘導する培養法を確立する。また誘導したニューロスフェアを ALS モデルや脊髄損傷モデル動物に移植して神経の再生を行う。さらに、ヒト ES 細胞や核移植 ES 細胞からのニューロスフェアの誘導を行う。

### B. 研究方法

我々はマウス ES 細胞から胚様体(Embryoid Body: EB)を経て、多能性神経幹細胞を含む未分化神経系前駆細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法を確立してきた。この方法を用いて神経幹細胞/前駆細胞(NS/PCs)を培養する過程で様々な因子(Noggin, RA, Shh, Wnt3a, BMP4 など)を作用させることで、NS/PCs の時間的・空間的特異性を制御し、様々な領域で生み出されるニューロンやグリア細胞の誘導を行う。

次に誘導した ES 細胞由来ニューロスフェアを野生型および ALS モデル動物である変異型 SOD1 (G93A) トランスジェニックラット:mSOD1 ラット)の腰髄に移植し、その *in vivo* における生着および分化能を免疫染色法にて解析する。また、脊髄損傷モデルマウス(C57/BL6)を作成し、損傷による炎症が収まり、グリア瘢痕を形成する前の損傷後 9 日目に ES 細胞由来ニューロスフェアを移植し、細胞の生着について *in vivo*

imaging system (IVIS)、分化および動物の運動機能の改善について BBB スコアを用いて評価を行う。

また、将来的な再生医療への応用を念頭に置き、同様の手法を用いて、ヒト ES 細胞からの EB を介したヒト NS/PCs (ニューロスフェア) の誘導を、また免疫学的拒絶反応を回避するために、核移植 ES 細胞からも同様に NS/PCs (ニューロスフェア) の誘導を行う。

(倫理面への配慮)

動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。また、当研究室におけるヒト ES 細胞の使用については、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成 14 年 11 月 7 日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認され、また平成 17 年 7 月 19 日に使用細胞株、研究者の追加について

も承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。

### C. 研究結果

我々はマウス ES 細胞から胚様体(Embryoid Body: EB)を経て、多能性神経幹細胞を含む未分化神経系前駆細胞の集合であるニューロスフェアを誘導する培養法を確立してきた。この培養法では、最初に形

成した一次ニューロスフェアからはニューロンのみが生み出され、一方で継代して得られる二次、三次ニューロスフェアからはニューロンのみならずグリア細胞が生み出された。また、EB 形成時に前脳形成に重要な *Noggin* または後方化因子であるレチノイン酸(RA)を様々な濃度で作用させることにより、ニューロスフェアの形成効率を上昇させ、ES 細胞由来 NS/PCs の前後軸に沿った領域特異性を制御することができた。またニューロスフェア形成時に腹側化因子である *Sonic hedgehog* (Shh)や背側化因子である *Wnt3a* や *BMP4* を添加することで、背腹軸に沿った領域特異性を付与することができた。このような時間的・空間的特異性を制御したニューロスフェアからは、神経管前方腹側の前脳型コリン作動性ニューロンや、脊髄腹側より発生する運動ニューロンなど、様々な領域で生み出されるニューロンが誘導された。

そこで、これらの ES 細胞由来ニューロスフェアの *in vivo* における分化能を検討するため、EGFP で標識した ES 細胞から低濃度 RA を用いてニューロスフェアを誘導し、野生型、および発症前(約 90 日)の ALS モデルラット(mSOD1 トランスジェニックラット)の腰髄に移植を行った。移植後それぞれ 2 週間、4 週間で還流固定し、免疫染色法により解析したところ、ES 細胞由来の細胞は脊髄内に生着し、*NeuN* 陽性のニューロンに分化し、また、その一部は *Choline acetyltransferase* (ChAT)陽性のコリン作動性ニューロンに分化していた。しかし、移植後の生存期間が短いため運動機能の改善を観察することはできなかった。

そこで、もうひとつの疾患モデルである脊髄損傷モデルマウスへの移植を行った。まず、生きてままで移植細胞を可視化するための *in vivo imaging system* (IVIS)を利用するために、改変型の *luciferase*(CBR)と蛍光タンパク質の *Venus* を定常発現する ES 細胞株を樹立した (CAG-CBR-IRES-Venus)。この細胞から低濃度 RA を用いてニューロスフェアを誘導し、脊髄損傷後 9 日目のモデルマウスに移植を行い、手術後 6 週間まで IVIS

による解析、および運動機能評価(BBB スコア)を行った。その結果、ES 細胞由来ニューロスフェアを移植した群では、PBS 注入群に比べて運動機能の改善傾向がみられ、ES 細胞由来 NS/PCs が脊髄損傷の機能的な改善に対し何らかの *positive* な役割を果たしていると考えられた。

また、京都大学より分与されたヒト ES 細胞を用いて、マウス ES 細胞と同様に胚様体を介したニューロスフェア(神経系前駆細胞)の誘導系を作成している。このヒト ES 細胞由来ニューロスフェアは、継代して二次、三次ニューロスフェアを形成することができ、接着細胞で分化させるとニューロンおよびグリア細胞を生み出した。

さらに、細胞移植治療における免疫学的拒絶反応を回避するために、理化学研究所の小倉博士より核移植 ES 細胞(ntES 細胞)の供与を受け使用を検討している。ntES 細胞からも通常の ES 細胞とほぼ同様の条件でニューロスフェアの形成を行うことができ、やはり接着培養でニューロンおよびグリア細胞が生み出された。

#### D. 考察

マウス ES 細胞から高率にニューロスフェアを誘導する培養法を作成した。この培養法では、種々の因子を培養中に添加することにより、時間的・空間的特異性を制御することができ、*in vivo* の中枢神経の発生をよく模倣していることから、中枢神経発生の *in vitro* モデルとして有用であると考えられた。さらに、これらの細胞を野生型及び ALS モデルラットの腰髄に移植したところ、*NeuN* 陽性、*ChAT* 陽性のニューロンに分化し、*in vivo* における分化能も示された。さらに脊髄損傷マウスに移植するとコントロール群と比して運動機能の改善が見られた。これは、神経系疾患において、何らかの機能改善に寄与できる可能性を示唆する結果であった。

また、ヒト ES 細胞、ntES 細胞から *in vitro* におけるニューロスフェアの誘導も行っている。これらは、ヒト細胞を用いたり、さらに免疫学的拒絶反応に対応したりするた

めの重要なツールになると考えられる。

今後は、脊髄損傷マウスにおける機能改善のメカニズムを明らかにすると同時に、ヒト ES 細胞、ntES 細胞からのニューロスフェアの培養法をさらに確立し、またそれらを用いた *in vivo* における実験も進めていく予定である。

#### E. 結論

マウス ES 細胞から NS/PCs を作成し、時間的・空間的特異性を制御できることを示した。この ES 細胞由来 NS/PCs は *in vivo* でもコリン作動性ニューロンを含むニューロンに分化することができた。また、この細胞を脊髄損傷マウスに移植したところ機能改善を促進した。さらにヒト ES 細胞からも NS/PCs を誘導する培養法を作成している。このような *in vitro* 培養系は様々な疾患の病態解析、および薬剤スクリーニングなどを *in vitro* で行うためのモデルとして有用であるのみならず、再生医療における移植細胞のドナー細胞として期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

**Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H.** Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 275(1):124-142, 2004

**Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S.-i, Shimazaki T, Chino N, Okano H, and Okamoto H.** Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Developmental Biology* 278(2): 587-606. 2005

**Matsumoto, A., Okada, Y., Nakamichi, M., Nakamura, M., Toyama, Y., Sobue, G., Nagai, M., Aoki, M., Itoyama, Y., and**

**Okano, H.** Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 83(1): 119-133. 2006

**Tada H., Ishii S., Kimura H., Hattori H., Okada Y., Suzuki N., Okano HJ.** Identification and evaluation of high-titer anti-Sox Group B antibody in limbic encephalitis *Inflammation and Regeneration* 27 (1): 37-44. 2007

##### 2. 学会発表

岡田洋平、仲勇人、島崎琢也、岡野栄之、ヒト ES 細胞を用いた研究体験談、第 1 回ヒト ES 細胞研究交流会、京都、2006 年 3 月

石井聖二、岡田洋平、島崎琢也、岡野栄之、ストローマ細胞の分泌因子が ES 細胞由来神経系前駆細胞に及ぼす効果、第 29 回日本神経科学大会、京都、2006 年 7 月

#### H. 知的財産の出願・登録状況

##### 1. 特許取得 (申請中)

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

発明者： 岡野栄之 島崎琢也

特許第 3660601 号

申請日： 2001.3.30 (2005.3.25 登録)

PCT 出願： PCT/JP01/08703

(2)発明の名称： 記憶障害治療剤

発明者： 岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人

出願番号： 特願 2002-002433

申請日： 2002.1.11

PCT 出願： 無し

(3)発明の名称： 記憶障害治療剤スクリーニング法

発明者： 岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人

出願番号： 特願 2003-6298

申請日： 2003.1.14

PCT 出願： 無し

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 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

分担研究者 郭 伸

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻 神経内科学助教授

郭 伸<sup>1</sup>, 日出山拓人<sup>1</sup>, 西本祥仁<sup>1,2</sup>, 伊藤杏子<sup>1</sup>, 山下雄也<sup>1</sup>, 辻省次<sup>1</sup>,  
高橋良輔<sup>3</sup>, 三澤日出巳<sup>4</sup>, 鈴木岳之<sup>5</sup>

1) 東京大学大学院医学系研究科神経内科学 2) 慶應大学神経内科大学院  
3) 京都大学神経内科 4) 共立薬科大学薬理学 5) 共立薬科大学基礎生物学

### [研究趣旨]

我々はグルタミン酸受容体サブタイプである GluR2 の Q/R 部位 RNA 編集が孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の脊髄運動ニューロンで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孤発性 ALS との異同を、運動解析としてロータロッド、grip power、体重、生存期間、GluR2 Q/R 部位の編集率を検討した。その結果、ADAR2 conditional ノックアウトマウスはコントロールと比較し脊髄前角における GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は低下しており、ロータロッドスコア、上肢握力、体重は週齢と共に低下した。また生存期間もコントロール群に比べ有意に短縮していた。以上の結果は孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンにみられる GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の低下は ADAR2 活性の低下によりもたらされるという我々の仮説を支持する。

### [研究目的]

我々は孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンにおいてグルタミン酸受容体である AMPA 受容体の GluR2 サブユニットの RNA 編集が低下していること、これが ALS 運動ニューロンに疾患特異的かつ細胞選択的な変化であることを報告した

(1). 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 (2). 今回、我々は運動ニューロン選択的に ADAR2 を conditional にノックアウトした変異マウスを作製したので、その表現型を報告する。

### [研究方法]

ヒト ADAR2 遺伝子 に相同なマウス adarb1 遺伝子の一部を 2 個の loxP で挟んだ変異 adarb1 遺伝子に置換した変異マウス (ADAR2<sup>flox+/+</sup>) と小胞性アセチルコリントラ

ンスポーター/アセチルコリン転換酵素のプロモータにより Cre recombinase を発現する変異マウス (VChT-Cre/slow and /fast) (3) との交配により、ADAR2<sup>flox+/+</sup>/VChT-Cre/slow (以下 slow 系) (N=33) and /fast (以下 fast 系) (N=28) を作製した。脊髄前角における GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率により ADAR2 活性が運動ニューロンで低下していることを確認すると共に、運動機能をロータロッド (10rpm, 最大 180 秒)、上肢握力により判定した。対照として、VChT-Cre および ADAR2<sup>flox+/+</sup> マウスを用いた (N=25)。

(倫理面への配慮)

全ての遺伝子操作は本学 DNA 組換え実験指診に従い、また動物実験についても同動物実験指針に従い動物愛護面に十分配慮した。

## [研究結果結果及び考察]

ADAR2<sup>flox+/+</sup>/VACht-Cre マウス脊髄前角における GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は何れの個体も 100%未満であり、ADAR2 活性低下を示した。ロータロッドスコアは、control 群は生後約 1 年以上にわたり 180 秒可能であったが、fast 系マウス、slow 系マウスとも、週齢と共に徐々に低下していった。上肢握力は control 群と比較し、fast 系、slow 系とも、進行性の低下が認められた。体重は control 群と比較し fast 系、slow 系共に、30 週以降で低下し始めた。特に fast 系、slow 系でロータロッドスコアが低下し始める時期は Misawa らの報告による Cre の発現時期にそれぞれ合致していた (3)。このことは、ADAR2 活性の低下は GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率を低下させ、脊髄運動ニューロン死を引き起こすこと、この神経細胞死は緩徐進行性であることを示している。

## [結論]

孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンにみられる GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の低下は緩徐な神経細胞死の原因であり、ALS 運動ニューロンの神経細胞死の病因であることを示唆している。また、孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンにみられる GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の低下は ADAR2 活性の低下によりもたらされることを示唆する。

## [文献]

1. Kawahara Y et al. *Nature* **427**, 801 (2004).
2. Higuchi M et al. *Nature* **406**, 78-81 (2000).
3. Misawa H et al, *Genesis* **37**, 44 (2003).

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kwak S, Weiss JH: Calcium permeable AMPA channel in neurodegenerative disease and ischemia. *Current Opinion Neurobiology* 16:281-287, 2006

Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M,

Sobue G, Tsuji S, Kwak S: Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death-causing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in SBMA patients or SOD1 transgenic rats. *Neurosci Res* 54:11-15, 2006

Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, Kwak S: Slow and selective death of spinal motor neurons in vivo by intrathecal infusion of kainic acid: implications for AMPA receptor-mediated excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 98:782-791, 2006.

Hideyama T, Momose T, Shimizu J, Tsuji S, Kwak S: A PET study on the role of nigral lesions in parkinsonism in patients with ALS. *Arch Neurol* 63:1719-1722, 2006.

他 2 編

### 2. 学会発表

Hideyama T, Kawahara Y, Ito K, Nishimoto Y, Tsuji S, Kwak S: RNA editing in sporadic ALS and other motor neuron diseases. *The 17<sup>th</sup> International Symposium on MND/ALS*. Yokohama, 30 Nov-2 Dec, 2006

Kwak S: ADAR2 underediting and death of motor neurons in ALS. *the Gordon Research Conference on RNA Editing*, Ventura, California, Jan 15-19, 2007

他 5 編

### 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

## 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

分担研究者 高橋 良輔 京都大学医学部神経内科・教授

研究要旨： Cre-loxP システムを用いて、筋萎縮性側索硬化症（ALS）で選択的に障害される運動ニューロン特異的に、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)を欠損するマウスを作製した。SOD2 の欠損自体で、軸索輸送障害、ワーラー変性を生じやすくても、運動ニューロン変性は生じなかった。その結果は、変異 SOD1 マウスの解析からこれまで明らかになりつつある、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が大きく関与することを支持するものである。

### A. 研究目的

ミトコンドリアの機能障害や形態異常は ALS を含む多くの神経変性疾患で指摘されている。我々は生後の運動ニューロン特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス（VChT-Cre マウス）を作出し、運動ニューロンにターゲットを絞った病態モデルマウスの作製を試みている。この VChT-Cre マウスと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) floxed マウスを掛け合わせて、運動ニューロン特異的に同酵素を欠損するマウスを作製した。MnSOD を全身で欠失するマウスは胎生期または出生直後に拡張性心筋症にて死亡するため、成体での解析は困難であった。生後の運動ニューロンの約半分で遺伝子の組み換えを誘導する VChT-Cre マウスとの掛け合わせにより、成熟した運動ニューロンにおけるミトコンドリア由来の活性酸素の影響を解析することが可能となった。

### B. 研究方法

生後の運動ニューロン特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス（VChT-Cre マウス）と SOD2 floxed マウスを掛け合わせて、運動ニューロン特異的に同酵素を欠損

するマウスを作製した。生後 1 年令までのマウスを解析に供した。

運動機能の評価に、rotarod テスト、Grip strength 測定を行った。組織学的検討としては、SOD2、SOD1、ChAT、CHT、SMI32 に対する抗体を用いた免疫染色を行った。活性酸素ラジカル(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)の産生の評価に、oxidized hydroethidine の静注を行った。さらに、舌下神経軸索切断術後を施行し、残存ニューロン数を計測し、軸索切断後の神経細胞の脆弱性、ワーラー変性の評価を行った。

H & E、Gomori-trichrome、Nissl、toluidine blue 染色、ウエスタンブロット、電子顕微鏡による観察は常法により行った。

なお、動物倫理面では動物の苦痛を軽減するよう、所定の「動物実験実施要領」に基づき配慮した。

### C. 研究結果

出生マウスの遺伝子型の解析では、予想される数の Conditional KO マウスが得られた。これらの Conditional KO マウスでは出生時から生後 1 年までの間に顕著な異常（運動失調や麻痺）は観察されなかった。Conditional KO マウスでは、hydroethidine を静注したと

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( $O_2^{\cdot-}$ )の顕著な産生増大が観察された。しかし、各種抗体による組織化学的な解析では細胞レベルでのいかなる神経変性の兆候も観察されなかった。

舌下神経軸索切断術後の残存ニューロン数に有意差は認められなかったが、軸索輸送の障害とのワーラー変性は、Conditional KOで促進していた。

#### E. 結論

ALS 剖検例の病理組織学的な解析から、ALS の病態形成に活性酸素障害が関与するとの報告が散見されるが、今回の実験からは、少なくとも、運動ニューロンはミトコンドリア由来の活性酸素ラジカル( $O_2^{\cdot-}$ )には高い抵抗性を有することが明らかとなった。よって、活性酸素ラジカル( $O_2^{\cdot-}$ )は、運動ニューロン変性においては、initiator ではなく、modifier の可能性が高いと考えられた。他の活性酸素分子種( $OH^{\cdot}$ や  $ONOO^-$ など)については今後の検討課題である。

また、SOD2 の欠損自体で、軸索輸送障害、ワーラー変性を生じやすくても、運動ニューロン変性は生じないということは、変異SOD1 による運動ニューロン変性に、ワーラー変性阻害因子による治療実験で有効性が乏しかったことと矛盾しないし、SOD1 による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が大きく関与することを支持するものである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Misawa, H., Nakata, K., Matuura, J., Moriwaki, Y., Kawashima, K., Shimizu, T., Shirasawa, T., and Takahashi, R. (2006) Conditional knockout of Mn superoxide dismutase in postnatal motor neurons reveals resistance to mitochondrial generated superoxide radicals. *Neurobiol. Dis.*, 23,169-77.

Kim, Y.J. and Takahashi, R. (2006) Role of Polyunsaturated Fatty Acids for Misfolding Protein Aggregations; Implication for Neurodegenerative Diseases. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 1086:11-20

#### 学会発表

Takahashi, R.

SOD1 aggregates generated within motoneuronal dendrites/cell bodies move into axons before disease onset in a G93ASOD1 transgenic mouse model, 第17回 国際ALS/MNDシンポジウム、2006、横浜

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

とくに予定はない。

## 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

分担研究者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所・所長代行

**研究要旨** オートファジー（自食作用）は、ダイナミックな膜形成（オートファゴソーム形成）によって細胞質成分を飲み込んだ後、リソソームと融合することによって内容を消化する真核生物に保存された蛋白質分解システムである。昨年、我々は条件的にオートファジーが不能となるマウス（Atg7<sup>Flox/Flox</sup>）を作製、この変異マウスと Nestin-Cre のトランスジェニックマウスを交配し、中枢神経系特異的にオートファジーを欠損させた Atg7<sup>Flox/Flox</sup>:Nes マウスを作製したところ、このニューロン特異的オートファジー不能マウスは反射異常、協調運動障害などの神経変性疾患様症状を示した。興味深いことにその神経細胞内には加齢と共にユビキチン陽性の蛋白質凝集体（封入体）が蓄積すること、大脳皮質、海馬、小脳顆粒層において神経細胞死が起こることを見いだした。この封入体の形成は、筋萎縮性側索硬化症を含む様々な神経変性疾患の発症と密接に関係していることが知られているが、その形成機構は長い間謎であった。本年、我々は封入体の形成に関係する新規分子として同定し、封入体形成の分子機構解明に取り組んだ。

### A. 研究目的

近年、筋萎縮性側索硬化症（ALS: amyotrophic lateral sclerosis）を含む多くの神経変性疾患の患者の脳／脊髄の病理所見から疾患選択的に脱落するニューロン内においてユビキチン陽性の異常な蛋白質凝集体（封入体）の蓄積することが数多く報告されている。即ち、封入体もしくはその前駆体ともいべきβシート構造をもったプロトフィブリルが有害性を発揮し神経細胞死を誘発することが明らかとなりつつある。したがってこのような蛋白質凝集体あるいは封入体の形成機構を解明することは、神経変性疾患の発症機構を解明するために、非常に重要である。しかし、凝集体の蓄積に関する報告は数多くあるものの凝集体形成の分子機構は、今日に至るも全くの謎であった。

これまで我々は、蛋白質の品質管理に関与するユビキチン連結酵素（リガーゼ）として Parkin, CHIP, Dofin, SCF<sup>Fbs</sup> 等の研究を進めてきた（1-8）。これらの研究から我々は、細胞内での蛋白質の品質管理の主役を果たしているユビキチン・プロテアソ

ームの破綻が神経細胞死引いては神経変性を誘導する可能性を示唆してきた。

他方最近、我々は細胞内の不良品を処理（分解除去）するもう一つの蛋白質分解システムとしてオートファジー（自食作用）・リソソーム系も重要な役割を担っていることを示唆してきた。これらの報告は、オートファゴソームの異常形態を示す病理組織学的知見が神経変性疾患の患者の脳において多数報告されていることに起因した。そして一昨年、我々は発生工学的手法を用いて条件的にオートファジーが不能にすることができるマウス（Atg7<sup>Flox/Flox</sup>）を作製し、肝臓におけるオートファジー不能マウスが栄養飢餓時の蛋白質分解阻害のみならず定常（富栄養）状態においてもユビキチン陽性封入体や異常オルガネラの蓄積を引き起こすことを明らかにした（9）。昨年はさらに、この Atg7<sup>Flox/Flox</sup> マウスを Nestin-Cre（ニューロンの幹細胞で発現している Nestin のプロモーターに Cre-recombinase を連結・導入した）トランスジェニックマウスと交配し、中枢神経系でオートファジーが不能



となるマウス (Atg7<sup>Flox/Flox</sup>;Nes) を作製することに成功した (10)。このマウスを用いて中枢神経系におけるオートファジーの役割について蛋白質の品質管理に注目して解析した結果、オートファジーの破綻が神経変性疾患を引き起こすことを見出した (10, 11)。しかも驚いたことにオートファジー不能ニューロンにもユビキチン陽性蛋白質凝集体 (封入体) が観察された。即ち、ユビキチン化蛋白質がプロテアソームとオートファジーの二つの分解系で処理されることが判明したのである (10, 12)。しかしオートファジーの破綻が封入体を形成する機構は、全く不明であった。本年度、我々はその中枢を担う分子が p62/Sqstm1 という蛋白質であることを突き止めた。

## B. 研究方法

「条件付きオートファジー不能マウス (Atg7<sup>Flox/Flox</sup>) の作製」

ターゲティングベクターの作製と ES 細胞のスクリーニングは、文献 9 を参照されたい。ノックアウト ES 細胞をマウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションし、仮親の子宮に移植、得られたヘテロウマスがジャームラインに入っていることを PCR およびサザンブロットングにより確認した。最終的にヘテロウマスを交配して条件的 Atg7 欠損ホモマウス (Atg7<sup>Flox/Flox</sup>) を作製した。

「中枢神経系特異的オートファジー不能マウス (Atg7<sup>Flox/Flox</sup>;Nes) の作製」

Atg7<sup>Flox/Flox</sup> マウスと Nestin-Cre トランスジェニックマウス (ニューロンで特異的に発現している Nestin のプロモーターに Cre リコンビナーゼを連結して作製した Tg マウス) を交配し、中枢神経 (CNS: central nervous system) でオートファジーが不能となるマウス (Atg7<sup>Flox/Flox</sup>;Nes) を作製した。

「p62 のノックアウトマウスの作製」  
p62/Sqstm1 ノックアウトマウス (p62<sup>-/-</sup>マウス) は、筑波大学大学院人間総合科学研究科の石井哲郎博士から供与された。

「Atg7・p62 のダブルノックアウトマウス」  
上記の中枢神経系オートファジー不能マウス (Atg7<sup>Flox/Flox</sup>;Nes マウス) と p62<sup>-/-</sup>マウスを交配して作製した。

「組織化学的及び免疫組織化学染色解析」  
Atg7<sup>Flox/Flox</sup>;Nes と 野性型マウスの脳を 4% paraformaldehyde-4% sucrose を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液で還流固定した。さらに標準光学顕微鏡による組織化学的解析には、2% paraformaldehyde-2% glutaraldehyde を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液、免疫組織化学染色解析には 4% paraformaldehyde-0.1% glutaraldehyde を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液で固定した。

光学顕微鏡解析は、脳の 10- $\mu$ m cryosections (凍結切片) を Meyer's hematoxylin and eosin (H&E) で染色した。免疫組織化学染色解析は、anti-human neuronal nuclei (NeuN: Abcam, Cambridge, UK), anti-gial fibrillary acid protein (GFAP: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), anti-calbindin (Sigma), anti-myelin basic protein (MBP MCA409S: Serotec, Oxford, UK) and anti-ubiquitin (Dakocytomation) 抗体を用いて行った。

TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) アッセイによる細胞死の検定は定法に従って行った。

「電子顕微鏡及び免疫電子顕微鏡」  
マウス脳を 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液で還流固定した。さらに 1% OsO<sub>4</sub> で固定し、Epon812 で包埋した後、超薄層切片を作製した。anti-ubiquitin (1B3) と colloidal gold conjugated secondary antibody による免疫金染色は、定法に従って行った。

(倫理面への配慮)

本年度の研究は、主としてマウスを用いたインビトロの実験系で行ったので、倫理面への配慮は不要であった。

### C. 研究結果

〔結果1〕 LC3 と p62 の相互作用

我々はオートファジーによる蛋白質分解の作動機構、とくにオートファゴソーム形成の分子機構を詳細に解析するためにオートファゴソームのマーカー分子と考えられている LC3 (酵母の Atg8 ホモログでオートファジーに必至な遺伝子産物) 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 (夏目徹・家村俊一郎博士: 産業技術総合研究所生物情報解析研究センター・タンパク質ネットワーク解析チームらとの共同研究)。その結果、p62/Sqstm1 を同定することに成功した。この分子は C 末端 ubiquitin-associated domain (UBA) を介してユビキチン鎖と結合することができる。興味深いことに、この p62 蛋白質はアルコール性肝炎やパーキンソン病、ALS などの神経変性疾患の細胞内において検出される封入体の主要構成分子の一つである。

この LC3 と p62 の相互作用はインビボ (細胞内) およびリコンビナントタンパク質を用いたインビトロでの Immunoprecipitation/Western 分析でも確認された。

〔結果2〕 p62 の代謝経路

LC3 はオートファゴソーム膜の内外に局在するので、p62 がどのように代謝されるかを検討した。光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いた免疫組織化学解析から両分子は同局在を示した。また p62 は LC3 と共にカテプシン (リソソーム・プロテアーゼ) の阻害剤 (E64d やペプスタチン) の処理で大量に蓄積したが、プロテアソームの阻害剤 (MG132, ラクタシスチン) では全く無効果であった。さらに肝臓特異的オートファジー不能マウスおよび神経特異的オートファジー不能マ

ウスの肝細胞やニューロンにおいて p62 の異常蓄積が観察された。これらの結果から p62 がオートファジー・リソソーム系で代謝 (分解) されていることが明確になった。これまでオートファジーは細胞質をランダムに飲み込む非選択的な分解経路と考えられてきたが、今回、p62 がオートファジー・リソソーム系で選択的に分解される基質であることが初めて判明した。

〔結果3〕 p62 のノックアウトマウスの解析  
p62<sup>-/-</sup>マウスは、正常に誕生し、当初は顕著な異常は観察されなかったが、1年以上長期に飼育すると、ERK の活性化に伴って、脂肪合成の増加による肥満・糖尿病を発症した。さらに RANL-L 依存性 (TRAF6 を介した IKK 活性化 NF- $\kappa$ B シグナリングの障害) の osteoclastogenesis の障害が観察された、これらの結果は、Moscat's group の結果 (Dev Cell 6, 303-309, 2004) と同じであった。

一方、オートファジーの形成は p62 の有無にかかわらず正常であった。また飢餓応答によるオートファジーの誘導にも異常は観察されなかった。

〔結果4〕 Atg7・p62 のダブルノックアウトマウスの解析

オートファジー不能細胞において、p62 は異常蓄積し p62・ユビキチン陽性の封入体を形成した。しかし驚いたことに、Atg7/p62 ダブルノックアウトマウスにおいて封入体形成はほぼ完全に抑制された。このことはユビキチン化蛋白質の恒常的オートファジーによる p62 を介した選択的な分解の破綻が封入体の形成を引き起こしていることを強く示唆していると考えられた (小松ら、投稿中)。

### D. 考察

過去十年程度以前から、蛋白質の品質管理とニューロン死の関係が注目を浴びてきた。しかし、そのほとんどは、ユビキチン・プロテアソーム系に関する研究であった。我々

は初めて、オートファジーの欠失で神経変性疾患になることを証明した (10)。神経変性疾患との関連で考えると、これまで家族性疾患で、責任遺伝子産物の異常凝集がニューロン死の引き金になることが多くの場合に報告されてきた。例えば、アルツハイマー病における tau 蛋白質、パーキンソン病における  $\alpha$  シヌクレイン、ハンチントン舞踏病におけるハンチンチン、そして ALS における SOD1 等である。しかし、これらの蛋白質の変異による異常構造、ひいては凝集体の形成がなくても、オートファジーという蛋白質分解系の機能喪失のみによって神経変性が誘導されることは、画期的な発見であり、今後の神経変性疾患の予防・治療法の開発において新戦略が期待できる (12)。

しかし、最大の問題はオートファジーの欠損でなぜユビキチン化蛋白質が大量に蓄積するかということである。今回我々は、超高感度プロテオミクス法により、LC3 と相互作用する分子として p62 を同定した。p62 は Phox and Bem1p (PB1) ドメイン、ジンクフィンガードメイン、ubiquitin-associated domain (UBA) を介してユビキチン鎖を含む多様な分子群と相互作用することができる。興味深いことに、このタンパク質はアルコール性肝炎やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の細胞内において検出される封入体の主要構成分子の一つである。興味深いことに p62 は PB1 ドメインを介して自発的にオリゴマーを形成する性質を有し、その結果、細胞内で量が増加すれば不溶性の凝集を引き起こすタンパク質である。実際、オートファジー不能肝細胞やオートファジー不能神経細胞において、p62 は異常蓄積し p62-ユビキチン陽性の封入体を形成した。

我々は遺伝学的解析から、p62 の封入体形成に関する役割を検討し、p62 が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を示唆した。さらに Atg7・p62 のダブルノックアウトマ

ウスの解析から、我々は 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可能性を示唆した (小松ら、投稿中)。一方、p62 は、TNF $\alpha$  や IL-1/RANK シグナル伝達を RIP1 や TRAF6 などと相互作用することで調節すると考えられる。実際、p62 ノックアウトマウスは、RANK 刺激による破骨に異常を示すこと、ERK シグナル異常による過剰脂肪分化により遅発性の肥満・糖尿病を引き起こす。これらの多様な表現型は、p62 が自身の異なったドメインを介して多くのタンパク質と相互作用することができることを反映していると思われる。このように p62 は多機能タンパク質として多面的な生理機能を担うことができると思われるが、その詳細な分子機構は依然として不明である。

一方 p62 が選択的オートファジーに貢献する特異な分子であるとしても、p62 依存的な選択的オートファジーとランダムにおこる非選択的オートファジーの度合いや各々の逸脱が神経変性疾患の発症における貢献度などについては、今後のさらなる検証が必要である。

## E. 結論

- 1) 中枢神経系でオートファジーを欠損させると非分裂細胞であるニューロンの変性が誘発され神経変性疾患を発症する。
- 2) オートファジーの欠損ニューロンでは、ユビキチン化蛋白質が異常に蓄積する。
- 3) オートファゴソームの形成に関わる LC3 と相互作用する分子として p62 を同定した。
- 4) p62 はユビキチン化蛋白質と相互作用できる UBA ドメインを C-末端に持っている。
- 5) p62 は、オートファジー経路で分解されることから、ユビキチン化蛋白質をオートファゴソームに運搬するシャトリング機能を有すると推定された。
- 6) p62 欠損マウスニューロンでは、オートファジーの欠損で観察されるユビキチン化

蛋白質（封入体）の形成が完全に抑制された。この結果は、p62 が封入体形成のキープレイヤーであることを示唆している。

#### F. 健康危険情報

無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. (2006) Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. **J. Biol. Chem.** 281, 3204-3209.
- (2) Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N, and Tanaka, K., (2006) 14-3-3h is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. **EMBO J.** 25, 211-221.
- (3) Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Kotliarova S, Murata S, Tanaka K, and Nukina N. (2005) Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. **J. Biol. Chem.** 280, 11635-11640.
- (4) Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, and Takashima A. (2005) In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. **J. Neurochem.** 2005; 94:1254-1263.
- (5) Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Hattori, N. (2006) Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography. **J. Neurosci. Res.** 84,1350-1357.
- (6) Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., and Sobue, G. (2004) Physical and functional interaction between Dornin and VCP that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. **J. Biol. Chem.**, 279, 51376-51385.
- (7) Yoshida, Y., Fukiya, K., Adachi, E., Iwai, K., Tanaka, K. (2005) Glycoprotein-specific ubiquitin-ligases recognize N-glycans in unfolded. **EMBO Rep.** 6. 239-244.
- (8) Yoshida, Y., Murakami, A., Iwai, K., and Tanaka, K. A Neural-specific F-box protein Fbs1 functions as a chaperone suppressing glycoprotein aggregation. **J. Biol. Chem.** in press.
- (9) Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, E., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and Chiba, T. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in *Atg7*-deficient mice. **J. Cell Biol.** 169, 425-434.
- (10) Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. **Nature** 441, 880-884.
- (11) Komatsu, M., Kominami, E., and Tanaka K. (2006) Autophagy and neurodegeneration. **Autophagy**, 2, 315-317.
- (12) Komatsu, M., Ueno, T., Waguri, S., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2007) Constitutive autophagy: Vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. **Cell Death and Differentiation** in press.

## 2. 学会発表

Keiji Tanaka Molecular Mechanism of the Assembly of Mammalian Proteasomes. The 21 era COE Program of Osaka University. Symposium [Dynamics of Biological Systems] (January 12-13 2006) Osaka, Japan.

Keiji Tanaka Ablation of autophagy causes neurodegeneration . The Movement Disorder Society's (MDS) 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (November 1, 2006), Kyoto, Japan.

Keiji Tanaka, Yuko Hirano, and Shigeo Murata Multiple Chaperones Assist the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes . The Fourth NIBB-EMBL Symposium "Biology of Protein Conjugation: Structure and Function". Okazaki Conference Center, Aichi, Japan (October 3-5, 2006), Okazaki, Japan.

Shigeo Murata, Yuko Hirano, Klavs B. Hendil, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Keiji Tanaka Molecular assembly of mammalian 20S proteasomes 20th IUBMB (June 23, 2006) Kyoto, Japan.

## H. 知的財産権の取得状況

### 1. 特許取得

無し

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

無し

## ALS 遺伝子治療のための発現制御 AAV ベクターの開発

自治医科大学内科学講座神経内科部門：中野今治

共同研究者：村松慎一<sup>1</sup>，西田絃子<sup>1</sup>，古寺美加<sup>1</sup>，滝野直美<sup>1</sup>，小澤敬也<sup>2</sup>，新村真則<sup>3</sup>，三室淳<sup>3</sup>，坂田洋一<sup>3</sup>  
1) 自治医科大学神経内科，2) 同 遺伝子治療部門，3) 同 分子病態部門

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する遺伝子治療として、中枢神経と骨格筋に治療用遺伝子を導入した場合に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 (CreER<sup>T2</sup>)の発現を doxycycline によって制御する AAV ベクターを開発した。血液凝固第 IX 因子発現ベクターを使用して、このベクターによる発現制御が有効であることを確認した。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する遺伝子治療として、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを利用して骨格筋に神経栄養因子 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)の遺伝子を導入し、軸策を通して運ばれた GDNF により脊髄の運動神経細胞の脱落を抑制する方法を開発してきた。臨床応用のためには、導入した遺伝子の過剰発現を防止する安全機構の組み込みが必要である。これまでに、誘導型 Cre/loxP system を応用した AAV ベクター(AAV-CreER<sup>T2</sup>)を開発したが、さらに安全性を高めるために改良したベクターの応用について検討する。

### B. 研究方法

Cre recombinase とエストロゲン受容体の変異型リガンド結合部位との融合蛋白 CreERT<sup>2</sup> を、doxycycline (Dox)の存在下でのみ発現する AAV ベクター (AAV-tet-CreER<sup>T2</sup>)を作製した。また、緑色蛍光蛋白質 EGFP または血液凝固 IX 因子のいずれかの cDNA を loxP site の間に挟み、IRES 下流に赤色蛍光蛋白質 DsRed2 の cDNA を組み込んだ AAV ベクターを作製した。これらの AAV ベクターを種々の組み合わせで 293 細胞に感染させ、tamoxifen (4-OHT)により遺伝子発現が調整可能かどうか検討した。

### C. 研究結果

AAV-CreERT<sup>2</sup> を感染させた細胞では、Dox および 4-OHT の両者の存在下でのみ、EGFP の緑色蛍光の代わりに DsRed2 の赤色蛍光を発する細胞が大多数を占めるようになった。また、血液凝固 IX 因子の発現量は、Dox および 4-OHT の両者の存在下でのみ減少した。CreERT<sup>2</sup> 自体の発現を、Dox により制御することにより CreER<sup>T2</sup> が 4-OHT 非存在下に核内に移行し recombinase 活性を発揮す

ることを防止できる。

### D. 考察

遺伝子治療の臨床応用に際して、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である。ALS に対する骨格筋への GDNF 遺伝子導入についても、これまでのマウスの実験においては GDNF の過剰産生による副作用は認められていないが、万一過剰となった際に確実に遺伝子発現を抑制できる安全機構を組み入れる必要がある。本研究では、蛍光蛋白質の他に米国において AAV ベクターを応用した臨床試験が既に開始されている血液凝固 IX 因子をモデルとして、Dox および 4-OHT という臨床的に経口投与可能な二種類の薬剤を応用した遺伝子発現機構を搭載した AAV ベクターを開発した。これらの AAV ベクターを応用することにより、ALS における臨床試験の早期開始が期待される。

### E. 結論

CreER<sup>T2</sup> は、エストロゲンの誘導体である 4-OHT の存在下で Cre recombinase の活性を示すので安全性が高いが、さらにその発現を 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、より安全な発現調整遺伝子治療用ベクターを開発した。

## ALS に対する HGF の治療解析 —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

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動ニューロンが特異的に変性し、運動機能が障害される致死性の難病である。現時点では著効な治療剤はなく、一日も早い治療薬開発が望まれている。肝細胞増殖因子（HGF）ははじめ肝細胞の増殖活性を基に精製・クローニングされた。近年 HGF が新しい神経栄養因子として注目され、実際 HGF の遺伝子発現によりヒト SOD1G93A を高発現する ALS モデルトランスジェニックマウス（ALS-Tg マウス）の運動神経細胞死を抑え、運動機能を改善し、寿命を延長する事を明らかにしてきた。しかし、ヒトへの有効な治療法開発には、HGF の安全な投与方法確立が重要である。私達は、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、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により評価した。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 のチロシンリン酸化はほとんど認めなかった。特に HGF-Tg においては、HGF が有意に多く存在するにもかかわらず、c-Met のチロシンリン酸化がほとんど検出されなかった事は、ALS-Tg への HGF 治療を考える上で有利と考えられた。

#### A. 研究目的

**【研究背景】** 筋萎縮性側索硬化症（ALS）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中の難病である。罹患患者の意識が最後まで鮮明であることから、患者は自己の麻痺が進行していく事をよく理解しながらこれを享受していかねばならない点で、意識や記憶能力が障害される他の神

経変性疾患と比べて、より精神的にも **sever** な疾患と言える。これまで ALS の治療法開発は世界的に注目され、したがって、多くの研究者が研究を続けてきた。その結果、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有望な標的になると期待されている。一方で、ALS の大部分（90%以上）の

症例は原因の明らかでない孤発性 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の、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ている。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, Funakoshi and Nakamura, J. Neurosci, 2002)。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。

**[研究目的]** 本研究では、HGF の神経系への local な投与が、正常マ (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、すなわち (1) HGF の神経系への local な供給による正常マウス神経組織と FALS 神経組織で HGF による c-Met の活性化に相違があるか否かを解析すること、(2) ALS 依存的な c-Met 活性化の調節機構の解析を目的とする。

## B. 研究方法

(1) 神経系特異的な HGF の供給方法：神経系へ特異的に rat HGF を供給する方法として神経特異的 HGF-Tg マウスを用いた。この方法では、全身循環血液中の HGF 量を変化させずに HGF を神経系に特異的に供給している事を確認している。

- (2) 野生型 (WT) マウスと ALS-Tg それぞれに神経特異的に HGF を供給した動物と、HGF を供給しない動物の作成：ヘテロ ALS-Tg と神経特異的 HGF-Tg を交配する事で、① WT ② HGF-Tg ③ ALS-Tg ④ ALS/HGF-Tg の 4 群を作成する。
- (3) c-Met のチロシン残基リン酸化の評価：上記 4 群のマウスの脳幹部運動神経核 (舌下神経核と顔面神経核) の c-Met のチロシン残基リン酸化を c-Met の自己リン酸化特異的抗体で評価した。
- (4) c-Met juxtamembrane 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 juxtamembrane のある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。
- (5) セリン/スレオニン脱リン酸化酵素群の発現調節解析：juxtamembrane 領域のある特異的セリン残基について、その脱リン酸化をする可能性のある酵素について、上記 4 群の脳幹神経核における免疫染色を施行した。
- (6) 神経特異的とグリア細胞特異的マーカーを用いて、上記の解析の責任細胞を確認した。
- (7) 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

本研究において、HGF の神経系への local 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。

- (1) 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。

- (2) **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。
- (3) 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 local 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。

#### E. 結論

HGF の神経組織への局所性供給は、**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、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た。本研究ではさらにその分子機構についても解析を行なった。

#### F. 研究発表

##### 原著論文

1. Tanaka M, et al. (2006) Hepatocyte growth factor in mouse soleus muscle increases with reloading after unloading. *J Phys Ther Sci* 18:33-41.
2. 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.
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. 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.
5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. 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/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 level and inhibition of NADPH oxidase activity. *Neurosci Lett* 407:136-140.

#### シンポジウム・ワークショップ発表

1. 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.
2. Funakoshi H & Nakamura T, Hepatocyte growth factor (HGF) as a novel neurotrophic factor for amyotrophic lateral sclerosis (ALS), 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, 2006.
3. 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

#### G. 知的財産権

本研究に関する知的財産権の取得はしていない。

### Ⅲ. 研究報告（研究協力者）

## 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

研究協力者 阿部 康二 岡山大学医学部神経内科 教授

研究要旨 ALS モデルマウスである SOD1 (G93A) Tg マウス脊髄における神経幹細胞の増殖、移動、分化を検討し、増殖効果の高い EGF+FGF2 投与による、神経再生の活性化を試みた。その結果、発症時 ALS 脊髄では内在性未分化神経幹細胞増殖を認め、灰白質では後角よりも前角により多く認め、それは EGF+FGF2 投与により活性化された。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症は運動ニューロンが選択的に変性し、このため筋萎縮・脱力を来し数年の経過で死に至る神経変性疾患である。しかし病態の解明は十分でなく、いまだ有効な治療法はなく、新規治療法の開発が強く求められる。

最近の神経再生に関する研究により、脊髄では、内在性神経幹細胞は中心管の上皮細胞周囲に存在し、外傷で神経幹細胞の増殖は活性化するが、それらは主にグリアに分化し、ニューロンにはほとんど分化しないことがわかっている。しかし ALS 脊髄での神経幹細胞の増殖、移動、分化については十分わかっていない。

そこで本研究では、ALS モデルマウスである、SOD1 (G93A) Tg マウスの脊髄と正常マウスの脊髄に、増殖効果の高い上皮細胞成長因子 (EGF) と塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2) の髄腔内投与を行い、ALS 脊髄での神経幹細胞の増殖、移動、分化を検討し、神経再生の活性化を試みた。

### B. 研究方法

今回用いた SOD1 (G93A) Tg マウスは約 100

日齢で ALS を発症し、約 120-130 日齢で死亡した。SOD1 Tg マウスと Non-Tg マウスに、100 日齢より 7 日間 osmotic minipump を用いて vehicle または EGF (4<sub>g</sub>) + FGF2 (4<sub>g</sub>) を髄腔レベルに持続髄腔内投与を行い、またこの 7 日間 bromodeoxyuridine (BrdU) を毎日 4 回 (1 回あたり 50mg/kg 投与) 腹腔内投与し、この間に増殖した細胞を BrdU でラベルした。121 日齢で L4 髄腔を灌流固定し、切片にした。Nissl 染色にて L4 髄腔前角の運動ニューロン数を計測した。BrdU 陽性細胞に対して抗 BrdU 抗体による免疫染色を行い、BrdU 陽性細胞の phenotype の検討のために、抗 BrdU 抗体と未分化神経幹細胞に対する抗 nestin 抗体、成熟ニューロンに対する抗 neuron-specific nuclear protein (NeuN) 抗体、アストロサイトに対する抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体による二重免疫染色、および抗 BrdU 抗体、抗 nestin 抗体、抗 GFAP 抗体による三重免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

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