

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

上位運動神経優位 ALS の分子病態解明と治療薬の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池田 穰衛

平成20（2008）年3月

目 次

研究者一覧	1
I. 総括研究報告	
上位運動神経優位 ALS の分子病態解明と治療薬の開発	
池田 穰衛	4
II. 分担研究報告	
1. ALS 新規疾患モデルの開発	
祖父江 元	12
2. 発生工学手法を用いた疾患モデルマウスの作製	
岩倉 洋一郎	15
3. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) ラットモデルにおける細胞外微小環境	
青木 正志	17
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	25

研究者一覧

	氏名	所属	職名
主任研究者	池田 穰衛	東海大学医学部基礎医学系 分子生命科学	教授
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
	岩倉 洋一郎	東京大学医科学研究所 ヒト疾患モデル研究センター 細胞機能研究分野	教授
	青木 正志	東北大学大学院医学系研究科 神経内科学	講師

I. 総括研究報告

上位運動神経優位 ALS の分子病態解明と治療薬の開発

主任研究者 池田 穰衛

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、選択的な上位・下位運動ニューロンの変性を病因とする難治性神経疾患である。本研究では、一群の上位運動ニューロン疾患の原因遺伝子である *ALS2* 遺伝子に注目し、個体レベルでの *ALS2* 遺伝子産物 (ALS2) の分子機能解析を軸に、ALS における選択的な運動ニューロン機能障害・変性の分子機序の解明と治療薬開発、ALS 治療法・治療薬開発の具体化につながる知見と素材を得ることを目的としている。平成 19 年度は、1) *ALS2* が神経細胞選択的にマクロピノサイトーシスを制御していることの発見、2) *ALS2* の細胞内挙動異常が *ALS2* の機能喪失と相関することの証明、3) 神経細胞死抑制因子 (NLR-family apoptosis inhibitory protein; NAIP) を選択的に発現誘導する低分子化合物 (L-745, 870) の変異 *SOD1-tg* (ALS モデル) マウスへの発症後投与での治療効果の確認、4) 当該低分子化合物が ALS モデルマウス脊髄におけるミクログリアの活性化を抑制することの発見、5) *dynactin1* を標的とした ALS 新規疾患モデル開発、6) *MC2R* 遺伝子を欠損した (*Mc2r^{-/-}*) マウスを遺伝子ターゲティング法による樹立と、マウス表現型の解析、7) ALS ラットモデル脊髄の病変の主座である前角とその周囲白質における CSPG の発症前からの沈着亢進の同定、等の研究成果が得られた。本研究により得られた新たな知見と素材を基に、今後のさらなる基礎研究及び臨床応用的研究により、ALS における選択的な運動ニューロン機能障害・変性の分子背景についての包括的理解が進み、*ALS2* 及び NAIP を含めた新たな分子を標的にした治療法開発への展開が具体化することが期待される。

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)

岩倉 洋一郎

(東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター教授)

青木 正志

(東北大学大学院医学系研究科神経内科学講師)

未だ ALS 発症の本態は不明である。近年の目覚ましい研究の進展により、ALS の発症・進行に係わると思われる幾つかの危険因子が同定されつつあるものの、ALS の分子病態・発症機序は依然不明な点が多く、従って分子レベルでの確定診断法並びに治療法も確立されていないのが現状である。ALS 患者の大多数は孤発例で、家族性の発症頻度は僅か 10%程度である。しかし、すべての ALS は運動ニューロンの機能障害・変性という点においては共通することから、家族性 ALS の原因遺伝子に注目した分子病態研究は、孤発性 ALS の分子発症機序の解明と ALS 並びに類縁の運動ニューロン疾患 (MND) の治療技術の開発に効果的な研究戦略の一つと考えられている。

近年、我々は上位運動ニューロンの機能障害・変性を主徴とする家族性若年発症型 ALS (ALS2 型) の

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は、上位及び下位運動ニューロンの選択的な変性と筋萎縮を伴う進行性の難治性神経疾患である。我が国における ALS 発症頻度は欧米諸国の例に等しく 10 万人当たり 1~2 人と決して低くない頻度である。長年にわたる研究にも関わらず、

原因遺伝子 (*ALS2*) を同定した。その後、欧米における一連の神経疾患遺伝子解析から、*ALS2* 型に加えて、*ALS2* 遺伝子は一群の上位運動ニューロン障害優位の MND (若年発症型原発性側索硬化症、小児性痙性対麻痺) の原因遺伝子であることが判明した。従って、*ALS2* 遺伝子はこれら ALS/MND に共通した神経細胞死をコントロールする因子として、その分子接点となり得ると考えられる。また、*ALS2* 遺伝子変異により引き起こされる家族性 ALS/MND はいずれも劣性遺伝形式を示すことから、その遺伝子産物 (*ALS2*) は神経細胞の生存・維持にかかわる必須因子の一つであることが示唆される。以上のことから、*ALS2* の分子機能研究は、特定の ALS/MND における発症分子機構の研究を進展させることに留まらず、神経細胞全般の生存・維持にかかわる分子カスケード及びその異常に起因する神経疾患発症の分子機構解明にも大きく貢献するものと考えられる。

一方、ALS/MND を初めとする多くの神経変性疾患見られる神経細胞死の分子背景としては、酸化ストレスや活性酸素種 (ROS)、ミトコンドリア機能傷害、カルシウム恒常性異常、異常タンパク質の蓄積、などが想定されている。我々は、これまでに下位運動ニューロンの変性・脱落を特徴とする難治性運動ニューロン変性疾患である脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy; SMA) の重篤度に関わる因子として神経細胞死抑制因子 (NLR-family apoptosis inhibitory protein; NAIP) を同定し、NAIP が酸化ストレス・ROS による神経細胞死に対する生体内防御因子として機能していることを示してきた。従って、何らかの方法により内因性 NAIP レベルを高めることができれば、脳神経系における神経細胞死が抑制され、その結果として疾患発症の遅延・治療に向けての効果が期待できると考えられる。

以上を踏まえ、本研究では一群の運動ニューロン疾患の原因遺伝子産物である *ALS2* 及び NAIP に注目し、個体・細胞レベルでの *ALS2* 分子機能解析を軸に、ALS における選択的な運動ニューロン変性の分子機序の解明を目指すとともに、内因性 NAIP を標的分子とする活性化化合物のスクリーニングによる新規 ALS 治療候補薬の同定を行なう。そして、ALS 治療法・治療薬開発の具体化につながる知見と素材を得ることを目指す。研究最終年度に当る平成 19 年度は、1) *ALS2* の神経細胞特異的分子機能の解析、2) *ALS2* の細胞内挙動と分子機能喪失と関連についての解析、

3) 神経細胞死抑制新規低分子化合物の ALS モデルマウスへの発症後投与での治療効果の解析、4) 新規モデル動物作出の試み、5) 細胞外微小環境の変動が ALS 発症・進行に及ぼす影響に関する検討、の 5 項目の研究を遂行した。

B. 研究方法

1. *ALS2* 分子機能及び病態メカニズムの解析 (池田)
これまでの解析結果から、*ALS2* は細胞内においては自身の有する Rab5 活性化作用を介して、エンドソーム動態並びにマクロピノサイトーシスの調節に関与していることが明らかとなってきた。本研究項目では、*ALS2* の神経細胞に選択的な分子機能を同定するため、*ALS2* 分子を持たない *Als2*-KO マウスに由来する初代培養大脳皮質神経細胞並びに繊維芽細胞におけるマクロピノサイトーシス活性の定量的解析を行なった。また、近年の分子遺伝学的解析により、*ALS2* 遺伝子のミスセンス変異を有す患者家系が見いだされた。本研究では、これら変異遺伝子に由来する変異 ALS 蛋白質の分子機能についても、生化学的・細胞生物学的手法により解析した。

2. ALS/MND 治療薬の開発 (池田、青木)

本研究項目では、NAIP を選択的に誘導する新規低分子化合物のスクリーニング、得られた候補化合物の ALS モデルマウスへの発症前並びに発症後継続投与実験を行った。特に、本研究では、安定した疾患表現型を示し、新規治療法開発のためのモデル系として適しているとされる変異 *SOD1^{H46R}* 発現マウスを用いた。そして、その薬効 (発症遅延、症候軽減、延命効果) についての詳細な観察と神経病理学的な解析を行なうことにより、新規低分子化合物のマウス個体での神経細胞死抑制及び疾患治療効果について検討した。

3. ALS 新規疾患モデルの開発 (祖父江)

Dynactin1 を標的とした ALS 新規疾患モデル開発を試みた (祖父江; 分担研究報告書参照)。

4. 発生工学手法を用いた疾患モデルマウスの作製 (岩倉)

ALS 患者では副腎の機能異常が認められ糖質コルチコイドの分泌が低下するなど、ストレス応答が低下していることが報告されている。我々は糖質コルチ

コイドの分泌を調節する ACTH の受容体と考えられているメラノコルチン2型受容体 (MC2R) に注目し、MC2R 遺伝子を欠損した (*Mc2r*^{-/-}) マウスを遺伝子ターゲットング法により樹立し、その表現型を解析した (岩倉 ; 分担研究報告書参照)。

5. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) ラットモデルにおける細胞外微小環境 (青木)

ALS における神経再生療法開発を念頭に、細胞外基質の主要構成成分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 ラットモデルで検討した (青木 ; 分担研究報告書参照)。

(倫理面への配慮)

本研究で計画している全ての遺伝子解析、遺伝子改変実験、動物実験、遺伝子改変マウスの交配と系統樹立については、各研究機関における倫理委員会、遺伝子組換え生物に関する実験安全委員会、並びに動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

1. 神経細胞選択的な ALS2 の分子機能

本項目では、ALS2 がマクロピノサイトーシスに及ぼす影響について解析するため、内因性 ALS2 分子を完全に喪失している *Als2*-KO マウス及び正常マウス由来の初代培養大脳皮質神経細胞及び繊維芽細胞を用いて、血清刺激依存性の Horseradish peroxidase (HRP) 取込み活性の定量的解析を行なった。その結果、ALS2 の欠損により大脳皮質神経細胞での HRP 取込み活性が有意に低下することが判明した。しかし、繊維芽細胞においては、ALS2 存在の有無による HRP 取込み活性の変動はみられなかった。従って、ALS2 分子は、神経細胞に選択的なマクロピノサイトーシス調節活性を有するものと推定された。

2. 変異 ALS2 細胞内挙動異常と機能喪失機構の解析

これまでの研究により、ALS2は低分子量G蛋白質 Rac1により活性化され、細胞膜上へと局在化するとともに、Rac1の活性化により誘起される細胞でのマクロピノサイトーシスに伴って細胞膜からマクロピノソームへと移行することが明らかにされている。さらに、ALS2は自身が存在しているマクロピノソームとクラスリン依存性エンドサイトーシスにより生じた初期エンドゾームとの異種性エンドゾーム融合、

自身が存在しているマクロピノソームの同種性エンドゾームの融合、並びにエンドゾーム成熟にも寄与していると推定されている。これらの知見から、ALS2が正常な機能を発揮する上で、ALS2の細胞内局在動態が重要であると考えられる。本項目では、近年発見されたALS2ミスセンス変異により発症する疾患の分子基盤を解明するため、2種類の変異ALS2のRac1への応答性並びに細胞内局在について解析した。その結果、何れの変異体ALS2蛋白質もRac1依存性の細胞膜への局在化能をほぼ消失していることが判明した。これら変異体は、Rab5に対する活性化領域である正常なVPS9ドメインを保持しており、また生化学的にもRab5活性可能を保持している。従って、これらのALS2遺伝子変異によるALS/MNDの発症には、ALS2の細胞内での局在変調が起因していることが示唆された。

3. 低分子化合物による神経変性疾患治療法開発

本項目では、NAIP を選択的に発現誘導する新規低分子化合物を用いた ALS 治療法の開発を試みた。昨年度までに、NAIP double-antibody sandwich ELISA (NAIP-ELISA) 法と *in vitro* での細胞死抑制活測定を併用した化合物スクリーニングにより、ヒット化合物 L-745, 870 を同定した。さらに、当該化合物が虚血性の神経細胞死に対して保護的に作用すること、H46R 変異 SOD1-tg (ALS モデル) マウスへの発症前経口投与により有意な治療効果が得られることを明らかにした。本年度は、治療効果機序解明のための分子病態解析、並びに同モデルマウスへの発症後投与の効果について解析・検討した。その結果、当該化合物の ALS モデルマウスへの継続的投与 (発症前投与) により疾患症状の軽減と平行して、運動ニューロン脱落の抑制、並びにミクログリア活性化の抑制効果が得られた。さらに、当該化合物の同モデルへの発症後投与においても有意な運動機能改善及び延命効果が得られた。従って、化合物 L-745, 870 は ALS/MND に対する有望な新規治療候補薬であると考えられた。

4. ALS 新規疾患モデルの開発

ALS 患者脊髄運動ニューロンの遺伝子プロファイリングにて同定した選択的な dynactin1 遺伝子発現レベルの低下は、*in vitro* 及び *in vivo* 双方のモデルにおいて、神経細胞の機能障害及び変性を誘発する

十分条件であった。また dynactin1 遺伝子ノックダウンモデルは、孤発性 ALS の重要な病態を反映する疾患モデルとなりうることを期待される（祖父江；分担研究報告書参照）。

5. 発生工学手法を用いた疾患モデルマウスの作製

Mc2r^{-/-}マウスは、出生直後に大部分が死亡する点はヒトと異なるが、生存した場合は副腎低形成を示す糖質コルチコイド欠乏症の病態をよく反映しており、疾患モデルとして有用であることがわかった（岩倉；分担研究報告書参照）。

6. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) ラットモデルにおける細胞外微小環境

コントロールに比し ALS ラットモデル脊髄では、病変の主座である前角とその周囲白質を中心に CSPG が発症前から有意に沈着亢進していた。CSPG の分子種によって発現変動には相違がみられた中で neurocan は胎生期に出現して成体では検出されにくい全長型アイソフォーム発現が確認され、再生に対して非許容的な環境が形成されている可能性が明らかとなった（青木；分担研究報告書参照）。

D. 考察

ALS2 遺伝子は、当初家族性 ALS 2 型の原因遺伝子として発見されたが、その後の解析によりあるタイプの家族性原発性側索硬化症及び痙性対麻痺の原因であることが明らかとなってきた。これまでの *ALS2* 遺伝子変異に関する研究から、現時点で合計 12 家系から 12 種類の遺伝子変異が発見され、いずれの遺伝子変異も正常な遺伝子産物 *ALS2* の翻訳を喪失させるものであることが示唆されている。従って、患者においては、正常な *ALS2* 翻訳並びに *ALS2* の本来発揮すべき機能が損なわれ、それにより運動ニューロン機能障害及び細胞死が引き起こされていると考えられる。特に、*ALS2* 遺伝子変異と臨床症状との関連から、*ALS2* 遺伝子の機能喪失は主に上位運動ニューロンの機能障害及び変性に関与しているものと想定される。

我々は、これまで *ALS2* の生化学・分子生物学的解析と *Als2* 遺伝子欠損 (KO) マウスの作出並びに当該個体レベルでの生体内機能の解析を行ってきた。その結果、*ALS2* が低分子量 G タンパク質 Rab5 に特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine

nucleotide exchange factor; GEF) であることを発見した。また、*ALS2* は自らの Rab5GEF 活性を背景にエンドゾーム動態調節に関わっていること、これら生化学的活性と細胞内局在には *ALS2* 分子同士の複合体形成が必須であることを明らかにした。さらに、我々は、低分子量 G 蛋白質である Rac1 が *ALS2* の制御上流因子であることを明らかにするとともに、*ALS2* 並びにその調節因子 (Rac1 など) が、細胞内においてエンドゾーム、膜小胞等の移送及び融合等に深く関わること、*ALS2* が神経細胞においては軸索伸長及びマクロピノサイトーシス (エンドサイトーシスの一種) の調節に関与していることなどを明らかにした。一方、作出した *Als2*-KO マウスは、発育、生殖機能、並びに行動学的には顕著な異常表現型を示さないことが判明した。マウスにおいて、*ALS2* の機能的喪失がヒトにおいてみられる様な重篤な疾患症状を呈しない理由に関しては現時点では明確でないが、*ALS2* と機能的に類似した Rab5GEF 分子 (RIN1 などの VPS9 ファミリー分子) の作用の種差が関連している可能性が考えられる。何れにせよ、*ALS2* 遺伝子変異に起因した ALS/MND は劣性遺伝形式を示すことから、ヒトにおいては *ALS2* の機能喪失 (loss of function) は上位運動ニューロン変性の分子背景となっており、正常な *ALS2* とその分子機能環境が上位運動ニューロンの機能と生存に必須であると考えられる。今後、サルを含めた霊長類とマウス等の齧歯類における *ALS2* 並びにその類縁分子の生理的機能の類似点及び相違点の解明が必要であると考えられる。

近年、*SOD1* 遺伝子変異により引き起こされる家族性 ALS 1 型のモデル細胞において、*ALS2* が変異 *SOD1* と結合することにより変異 *SOD1* の毒性を減弱させ、それにより細胞死を抑制するとの報告がある。このことは、*ALS2* 遺伝子産物が ALS/MND の発症過程における調節因子である可能性を示唆するものである。本研究では、H46R 変異 *SOD1*-tg マウスとコンジュニック系 *Als2*-KO マウスとの交配による *Als2* 遺伝子欠損変異 *SOD1*-tg マウスを作出し、*ALS2* 機能障害と病変型 *SOD1* による運動ニューロン変性との相関についての解析に着手し、それらマウスの作出に成功している。現在当該マウスの行動・生理学的解析を実施・継続しており、既に *ALS2* 機能喪失が変異 *SOD1* 発現により引き起こされる運動ニューロン疾患症候を悪化させるとの予備的結果を得ている。このような解析をさらに進めることにより、個体レベルでの *ALS2*

の新たな生理機能が明らかにされるとともに、ALS/MND 発症に関連した異なった遺伝子の相互作用及び神経細胞死との関連についての新たな側面での分子基盤が明らかにされることが期待される。

一方、ALS/MND を初めとする多くの神経変性疾患見られる神経細胞死の分子背景としては、酸化ストレスや活性酸素種 (ROS)、ミトコンドリア機能傷害、カルシウム恒常性異常、異常タンパク質の蓄積、などが想定されている。我々は、これまでに下位運動ニューロンの変性・脱落を特徴とする難治性運動神経変性疾患である脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy; SMA) の重篤度に関わる因子として神経細胞死抑制因子 (NLR-family apoptosis inhibitory protein; NAIP) を同定し、NAIP が酸化ストレス・ROS による神経細胞死に対する生体内防御因子として機能していることを示してきた。本研究では、この NAIP の分子機能に着目し、内因性 NAIP を標的分子とする活性化化合物のスクリーニング系及び *in vitro* 酸化ストレス性細胞死抑制活性測定法の併用することにより、神経向性化合物群の中から複数の細胞死抑制活性を有するヒット化合物を選抜した。これらの化合物の中の 1 つであるドーパミン D4 受容体拮抗剤 (L-745, 870) は、最も強い *in vitro* 酸化ストレス性細胞死抑制活性を示し、さらに当該化合物を経口投与した砂ネズミにおいては、脳虚血時に観察される海馬 CA1 ニューロンの細胞死が効果的に抑制されることを明らかにした。これらの結果は、NAIP が酸化ストレスや ROS に起因する細胞死の選択的な抑制効果を介して脳細胞の傷害・神経変性を軽減していることを示しており、よって NAIP は神経細胞死を伴う疾患の治療や予防に有効であると考えられる。そこで、本研究では当該化合物を用いた ALS/MND の治療薬としての可能性について検証するため、安定した疾患表現型を示し、新規治療法開発のためのモデル系として適しているとされる変異 SOD1^{H46R} 発現マウス (ALS モデルマウス) への発症前並びに発症後経口投与を行なった。そして、その薬効 (発症遅延、症候軽減、延命効果) についての詳細な観察と神経病理学的な解析を行なうことにより、新規低分子化合物のマウス個体での神経細胞死抑制及び疾患治療効果について検討した。その結果、L-745, 870 化合物の ALS モデルマウスへの継続的経口投与 (発症前投与) により疾患症状の軽減並びに延命効果が得られ、さらに同モデルへの発症後投与においても有意な延命

効果が得られることが判明した。神経病理学的な解析により、当該化合物がミクログリアの活性化を抑制するとともに、運動ニューロンの変性・脱落を遅延させる効果を有することも明らかとなった。当該化合物の薬効分子機序の詳細は今後の解析を待たねばならないが、L-745, 870 は ALS/MND に対する有望な新規治療候補薬であると考えられた。L-745, 870 化合物は、当初抗精神病に対する治療薬として開発され、ヒトでの安全性試験 (Phase I) を終え臨床研究 (Phase IIa) で薬効が認められず開発は中断されている。L-745, 870 については、このような開発経過からヒトへの生理的影響等については既に詳細に検討されている。今後、ALS/MND 患者を対象とした臨床試験への展開が待たれる。また、併せて L-745, 870 をヒット化合物としてその類縁化合物に関しても検討し、神経疾患治療薬開発に向けて研究を進展させる計画である。このような神経細胞死抑制低分子化合物を初めとする ALS 治療薬・治療法に関する研究の遂行は、未だ有効な治療法の存在しない ALS/MND の治療法確立・実現に向けての着実な一歩になるものと期待される。

E. 結論

本年度は、1) ALS2 が神経細胞選択的にマクロピノサイトーシスを制御していることの発見、2) ALS2 の細胞内挙動異常が ALS2 の機能喪失と相関することの証明、3) 神経細胞死抑制因子 (NLR-family apoptosis inhibitory protein; NAIP) を選択的に発現誘導する低分子化合物 (L-745, 870) の変異 SOD1-tg (ALS モデル) マウスへの発症後投与での治療効果の確認、4) 当該低分子化合物が ALS モデルマウス脊髄におけるミクログリアの活性化を抑制することの発見、5) dynactin1 を標的とした ALS 新規疾患モデル開発、6) MC2R 遺伝子を欠損した (*Mc2r*^{-/-}) マウスを遺伝子ターゲティング法による樹立と、マウス表現型の解析、7) ALS ラットモデル脊髄の病変の主座である前角とその周囲白質における CSPG の発症前からの沈着亢進の同定、等の成果が得られた。本研究により、ALS2 遺伝子変異による運動ニューロンの機能障害・細胞死は、ALS2 が担う細胞内物質輸送系あるいはシグナル伝達系の異常により引き起こされている可能性が示唆された。さらに、ALS の新たな治療法開発の試みに関しては、大きな進展がみられた。今後の研究により、ALS2 の個体レベルでの機

能が明らかにされ、ALS/MNDの臨床症候の分子的理解が深まると考えられる。また、細胞死抑制低分子化合物、異常蛋白質分解、及び神経栄養因子を標的とした治療法開発をさらに推進することにより、ALS治療法開発への道が開かれるものと期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE: The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated endocytosis. *J Biol Chem* **282** (22): 16599-16611, 2007.
- 2) Hadano S, Kunita R, Otomo A, Suzuki-Utsunomiya K, Ikeda JE: Molecular and cellular function of ALS2/alsin: Implication of membrane dynamics in neuronal development and degeneration. *Neurochem Int* **51** (2-4): 74-84, 2007.
- 3) Tanaka K, Okada Y, Kanno T, Otomo A, Yanagisawa Y, Shouguchi-Miyata J, Suga E, Kohiki E, Onoe K, Osuga H, Aoki M, Hadano S, Itoyama Y, Ikeda JE: A dopamine receptor antagonist L-745,870 suppresses microglia activation in spinal cord and mitigates the progression in ALS model mice. *Exp Neurol*, in press.
- 4) Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Onoe K, Osuga H, Hadano S, Ikeda JE: ALS2/alsin deficiency in neurons leads to mild defects in macropinocytosis and axonal growth. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.

2. 学会発表

- 1) Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE: The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated macropinocytosis. Human Genome Meeting 2007, Programme and Abstract book, p23 (workshop no: 41)/p87 (poster no:157), Montreal/Quebec, Canada (May 21-24, 2007).
- 2) Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K,

Mizumura H, Onoe K, Osuga H, Hadano S, Ikeda JE: ALS2/alsin is localized to endosomes in primary cultured hippocampal neurons and implicated in axon elongation. Human Genome Meeting 2007, Programme and Abstract book, p88 (poster no: 160), Montreal/Quebec, Canada (May 21-24, 2007).

- 3) Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Osuga H, Ikeda JE: ALS2CL, a novel ALS2-interactor, modulates ALS2-mediated endosome dynamics. Human Genome Meeting 2007, Programme and Abstract book, p90 (poster no: 167), Montreal/Quebec, Canada (May 21-24, 2007).
- 4) Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE: The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector via Rac1-activated macropinocytosis. *神経化学* **46** (2-3)、399 (O1P-J03)、第50回日本神経化学会(横浜)大会抄録号、横浜 (September 10-12, 2007) .
- 5) Tanaka K, Kanno T, Shouguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Suga E, Okada Y, Aoki M, Osuga H, Ikeda JE: Slowing the progression of neuronal degeneration in ALS mouse model using NAIP-upregulating compounds that selectively inhibit oxidative stress-induced cell death. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **8** (suppl 1): 154 (P146) (18th International Symposium on ALS/MND, Toronto/Ontario, Canada, December 1-3, 2007).
- 6) Hadano S, Otomo A, Suzuki-Utsunomiya K, Kunita R, Aoki M, Itoyama Y, Ikeda JE: Loss of ALS2/alsin exacerbates motor dysfunction in a mutant SOD1-expressing mouse ALS model. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **8** (suppl 1), 159-160 (P155) (18th International Symposium on ALS/MND, Toronto/Ontario, Canada, December 1-3, 2007).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分 担 研 究 報 告

ALS 新規疾患モデルの開発

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

研究要旨

孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、病態関連分子に関する情報が乏しく、病態を正確に反映する独自の疾患モデルが存在しない。我々はレーザーマイクロダイセクション法を用い、孤発性 ALS 患者の運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成し、さらにその遺伝子発現動態を詳細に検討した。この結果、運動ニューロンにおける *dynactin1* の遺伝子発現レベルの低下が、早期かつユニバーサルに認められる現象であることが分かった。そこで、この遺伝子変化を培養細胞および線虫に展開したところ、培養細胞、線虫ともに神経変性が誘発された。*dynactin1* 遺伝子発現レベルの低下は、ALS 発症の上流に位置するイベントであると考えられるため、これらは孤発性 ALS の重要な病態を反映するモデルになると期待される。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、上位および下位運動ニューロンが選択的に障害される神経変性疾患であり、その重篤な臨床経過から一日も早い克服が望まれている。ALS のうち家族性のものは *SOD1* 遺伝子変異に基づく ALS1、ALS2 遺伝子変異に基づく ALS2 などが知られているが、90%以上は孤発性である。家族性、孤発性を問わず、ALS の病態を解明し治療法を開発するためには、優れた疾患モデルの開発が重要である。疾患モデル開発では、病態形成の出発点である遺伝子変異が同定されている家族性 ALS が先行し、大きな成果を挙げてきている。我々は、ALS1、ALS2 など家族性も含めた ALS 全般の病態解明を目指し、孤発性 ALS の立場から疾患モデル作成を試みた。

我々は孤発性 ALS 運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイリングと、その結果得られた ALS 病態関連遺伝子の発現動態を神経変性マーカーとの関係で詳細な検討を加えることにより、*dynactin1* の遺伝子発現低下が、神経変性過程の初期より生じていることを明らかにしてきた。そこで、この発現変化を培養細胞および線虫において再現することにより孤発性 ALS の疾患モデルを開発することを目的とした。

B. 研究方法

培養細胞モデルとしては、neuroblastoma cell 由来の SH-SY5Y 細胞において siRNA による *dynactin1* ノックダウンを行い、神経細胞の形態変化、MTT アッセイおよび PI staining を行った。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。

線虫モデルにおいては、コリン作動性運動ニューロン特異的なプロモーターである *acr-2* 支配下に、ヒト *dynactin1* の相同体である *dnc-1* を標的とした shRNA を発現可能なベクターを作成し、野生型線虫にマイクロインジェクションし変異体を作成した。運動機能の解析は、一定時間内の首振り回数、累積生存率、水中でのむち打ち回数をパラメーターとした。内因性の *dnc-1* の mRNA レベルは whole mount in situ hybridization 法にて評価した。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守した。

C. 研究結果

SH-SY5Y cells における siRNA 法による dynactin1 ノックダウンの結果、72~96 時間後の dynactin1 発現レベルを、タンパク質レベルにおいてコントロール群の 30-40%にまで抑制できるシステムを構築することができた。MTT assay, PI staining の結果、dynactin1 ノックダウンにより神経細胞の突起の退縮化と、時間依存性に細胞死が生じることを確認した。DNA ladder assay、caspase 3 ウェスタンブロット、Tunel 法における検討では、dynactin1 ノックダウンによる細胞死がアポトーシス性である証拠は現在のところ得られておらず、引き続き dynactin1 ノックダウンによる細胞死のメカニズムを検証中である。

線虫モデルにおいては、dnc-1 ノックダウン群はコントロール群 (LacZ 遺伝子ノックダウン) に比して、生存率の短縮、首振り回数の低下、水中でのむち打ち回数の低下が認められた。さらにノックダウン群においては、より運動機能障害が重篤な個体において Coiler uncoordinated の表現型が認められた。この表現型は、コリン作動性運動ニューロンの VA ニューロンの正常なシナプス形成に必須である *unc-4* 遺伝子の種々の変異体で出現する表現型であり、運動ニューロンの機能障害と変性を示唆する所見である。またノックダウン群においては、ventral cord の形態異常が認められ、運動ニューロンの変性を示唆する所見と考えられた。

D. 考察

Dynactin1 のホモログである線虫 *dnc-1* 遺伝子については、feeding RNAi 法によるノックダウンにより胚性致死の表現型を示すことが既に報告されている。そこで、神経特異的なプロモーター支配下に shRNA を発現させる Neuro-specific Transgenic RNAi 法を採用した。マイクロインジェクション法による Transgenic 線虫作成においては、transgene の転写は初期発生や生殖系列では強い抑制を受けることが知られており、後天的な遺伝子発現抑制効果を検証することが重要な神経変性疾患研究にはとっては好都合である。

この手法により作成した線虫モデルでは、運動ニューロン障害に一致する表現型を示し、運動ニューロン変性を示唆する形態異常も確認することができた。

これらの培養細胞モデル、線虫モデルを今後さらに詳細に解析することにより ALS の病態解明および治療法開発を目指している。

E. 結論

ALS 患者脊髄運動ニューロンの遺伝子プロファイリングにて同定した選択的な dynactin1 遺伝子発現レベルの低下は、in vitro および in vivo 双方のモデルにおいて、神経細胞の機能障害及び変性を誘発する十分条件であった。また dynactin1 遺伝子ノックダウンモデルは、孤発性 ALS の重要な病態を反映する疾患モデルとなりうることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G: CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain* 131: 229-239, 2008.
- 2) Niwa J, Yamada S, Ishigaki S, Sone J, Takahashi M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G: Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. *J Biol Chem* 282: 28087-28095, 2007.
- 3) Jiang YM, Yamamoto M, Tanaka F, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G: Gene expressions specifically detected in motor neurons (dynactin 1, early growth response 3, acetyl-CoA transporter, death receptor 5, and cyclin C) differentially correlate to pathologic markers in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 617-627, 2007.
- 4) Adachi H, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G: CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy

- transgenic mouse model. *J Neurosci* **27**(19): 5115-5126, 2007.
- 5) Yang Z, Chang YJ, Yu IC, Yeh S, Wu CC, Miyamoto H, Merry DE, Sobue G, Chen LM, Chang SS, Chang C: ASC-J9 ameliorates spinal and bulbar muscular atrophy phenotype via degradation of androgen receptor. *Nat Med* **13**: 348-353, 2007.
- 6) Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G: Dorsfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol Dis* **25**: 331-341, 2007.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

発生工学手法を用いた疾患モデルマウスの作製

分担研究者 岩倉 洋一郎

東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター細胞機能研究分野教授・センター長

研究要旨

ALS 患者では副腎の機能異常が認められ糖質コルチコイドの分泌が低下するなど、ストレス応答が低下していることが報告されている。我々は糖質コルチコイドの分泌を調節する ACTH の受容体と考えられているメラノコルチン2型受容体 (MC2R) に注目し、*Mc2r*^{-/-}マウスの作出を行なった。*Mc2r*^{-/-}マウスは出生直後に大部分が低血糖で死亡したが、わずかに生存した *Mc2r*^{-/-}マウスは、体長・体重ともに野生型マウスと同様であった。しかしながら、副腎皮質の束状層の萎縮が認められ、血中の糖質コルチコイドは著しく低下していた。*Mc2r*^{-/-}マウスは副腎低形成を示すヒトの糖質コルチコイド欠乏症の病態をよく反映しており、疾患モデルとして有用であることがわかった。ALS のモデル動物として先に樹立した *Als2*^{-/-}マウスにおけるストレス応答について今後解析する予定である

A. 研究目的

ALS 患者では副腎の機能異常が認められ糖質コルチコイドの分泌が低下するなど、ストレス応答が低下していることが報告されている。我々は糖質コルチコイドの分泌を調節する ACTH の受容体と考えられているメラノコルチン2型受容体 (MC2R) に注目した。マウス個体における MC2R の生理機能を詳細に検討し、最終的には ALS 病態と副腎機能異常との関係を明らかにする。

B. 研究方法

MC2R 遺伝子を欠損した (*Mc2r*^{-/-}) マウスを遺伝子ターゲティング法により樹立し、その表現型を解析する。

C. 研究結果

Mc2r^{-/-}マウスは糖新生の障害から出生直後に大部分が低血糖で死亡することがわかった。生存した *Mc2r*^{-/-}マウスは、体長・体重ともに野生型マウスと同様であったが、副腎皮質の束状層の萎縮が認められ、また血中の糖質コルチコイドやエピネフリン、アルドステロンは低値を示した。

D. 考察

Mc2r^{-/-}マウスは、出生直後に大部分が死亡する点はヒトと異なるが、生存した場合は副腎低形成を示す糖質コルチコイド欠乏症の病態をよく反映しており、疾患モデルとして有用であることがわかった。

E. 結論

Mc2r^{-/-}マウスは副腎低形成などストレス応答低下が認められ、MC2R を介したシグナルが副腎機能の調節に極めて重要であることが明らかになった。ALS のモデル動物として先に樹立した *Als2*^{-/-}マウスにおけるストレス応答に異常が見られるかどうかを明らかにすることが今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kayasuga Y, Chiba S, Suzuki M, Kikusui T, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Kotaki H, Horai R, Iwakura Y, Nishihara M: Alteration of behavioural phenotype in mice by targeted

- disruption of the progranulin gene. *Behav Brain Res* **185**: 110-118, 2007.
- 2) Kina S, Tezuka T, Kusakawa S, Kishimoto Y, Kakizawa S, Hashimoto K, Ohsugi M, Kiyama Y, Horai R, Sudo K, Kakuta S, Iwakura Y, Iino M, Kano M, Manabe T, Yamamoto T: Involvement of protein-tyrosine phosphatase PTPMEG in motor learning and cerebellar long-term depression. *Eur J Neurosci* **26**: 2269-2278, 2007.
- 3) Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y: Melanocortin receptor 2 is required for adrenal gland development, steroidogenesis and neonatal gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 18205-18210, 2007.
- 4) Tamagawa A, Kolosova I, Endo Y, Gerlinskaya L, Iwakura Y, Moshikin M: Interleukin-1 deficiency and aggressiveness in male mice. In

“*Psychoneuroendocrinology Research Trends*”, M. T. Czerbnska ed., Nova Science Publishers, Inc., pp1-16, 2007.

2. 学会発表

- 1) 若林千里、岩倉洋一郎：IL-1 受容体アンタゴニストノックアウトマウスにおいて誘導される不安様行動の解析、Neuro2007 第 30 回日本神経科学大会（横浜）、2007 年 9 月 10 日～12 日。
- 2) 千田大、中川真一、相良 洋、久保光正、岩倉洋一郎：メラノコルチン 2 型受容体は、副腎皮質の発生、ステロイド合成、糖新生に必要である、第 30 回日本分子生物学会年会（横浜）、2007 年 12 月 11 日～15 日。

H. 知的財産権の出願・登録情報
なし

筋萎縮性側索硬化症（ALS）ラットモデルにおける細胞外微小環境

分担研究者 青木 正志

東北大学大学院医学系研究科神経内科学講師

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）における神経再生療法開発を念頭に、細胞外基質の主要構成成分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ラットモデルで検討した。コントロールに比しALSラットモデル脊髄では、病変の主座である前角とその周囲白質を中心にCSPGが発症前から有意に沈着亢進していた。CSPGの分子種によって発現変動には相違がみられた中でneurocanは胎生期に出現して成体では検出されにくい全長型アイソフォーム発現が確認され、再生に対して非許容的な環境が形成されている可能性が明らかとなった。再生誘導療法開発においては細胞補充のみならず細胞外微小環境をも標的とした再生許容環境構築もまた重要かつ有効な戦略と考えられる。

研究協力者

割田 仁、水野秀紀、糸山泰人
（東北大学大学院医学系研究科）

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（以下 ALS）は主として中年期以降に上肢または下肢の脱力、あるいは球麻痺症状で発症し、数年の経過で四肢の脱力、筋萎縮が進行し、呼吸筋の麻痺により死に至る神経変性疾患である。ALS発症者の大半は孤発性だが、5-10%が家族性を示し、家族性ALSの多くは常染色体優性遺伝形式をとることが知られている。1991年に一部の家族性ALS家系の病因遺伝子が第21染色体上に連鎖することが明らかとなり、さらに1993年にその原因遺伝子がSOD1遺伝子であることが同定された。2001年には家族性ALS（常染色体劣性遺伝形式）における第2の原因遺伝子ALS2が東海大学の秦野・池田らによって同定され、その機能およびSOD1との関連が注目されている。

現在までに家族性ALSの約20%でSOD1遺伝子の変異が認められ、100種類以上の変異が報告されている。変異の大部分は点突然変異であり、変異の種類によって臨床経過が異なることが報告されている。

ヒト変異SOD1遺伝子導入マウス（トランスジェニックマウス）が作製されており、脊髄前角の運動神経

脱落を伴うALS様の症状発現を示すことが知られている。このモデル動物では脊髄においてヒトALS患者病理像にも認められるLewy-body like hyaline inclusionの出現を認める。

さらに私たちはALSの新しい動物モデルとしてヒト変異SOD1トランスジェニックラット（Tgラット）を確立した。従来のマウスモデルではなく、このラットモデルを用いることで髄腔内投与や細胞移植などの実験的治療を行うことがきわめて容易となった。このTgラットを用いて脊髄における再生阻害因子のひとつ、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（chondroitin sulfate proteoglycan, CS-PG）の発現を検討した。成体中枢神経、とくに脊髄は元来再生に対して非許容的であるといわれ、その主たる要因は再生阻害因子の存在である。CS-PGは細胞外基質の主たる構成成分であるとともに軸索伸長阻害や細胞遊走阻害といった再生阻害活性をもち、中枢神経病態においてはグリア増生とともに発現亢進することが知られている。

B. 研究方法

東北大学神経内科で系統維持している雌性H46R変異Tgラット、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、正常中枢神経に発現する代表的CS-PG: neurocan, versican (中枢神経系に特異的なV2アイソフォーム), phosphacan (RPTP β)の各コア蛋白に対する特異抗体を用いて常法に則り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(おもな病変部位である前角およびその周囲白質(前索))の画像を取得し免疫反応陽性面積を定量、週齢一致正常同腹仔(Non-Tg)と比較した(各群n=3~4)。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。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

Non-Tgに比し腰髄前角細胞は発症前よりTgラットで減少傾向がみられ、発症早期から後期にかけて有意かつ進行性に減少していた。これに伴いUb陽性凝集体も有意かつ進行性に増加し、pNF陽性の胞体をもつ前角細胞が認められた。このような病態進行のもとTgラットでは各CS-PGコア蛋白がNon-Tgに比較して全体的に発現亢進を示していることが明らかとなった。Non-Tgラットでは週齢にかかわらずいずれのCS-PGも前角細胞周囲のneuropilおよび白質(とくに外周層)に軽度の陽性反応を認めたのに対して、Tg

ラットでは病変主座である前角とその周囲の白質、すなわち脊髄腹側に優位な発現亢進を示した。とりわけneurocanは顕著な亢進を示し、発症前から有意かつ一貫して進行性であった(図)。

免疫ブロッティングで発症後期に沈着するneurocanのアイソフォームを確認すると、胎生期に出現するものの成体では生理的に検出されない全長型アイソフォーム(245 kDa)が認められ(コントロールの約40倍)、断片型(約150 kDa)とともに有意に発現亢進していた。

一方でphosphacan、versicanについてもTgラットでNon-Tgに比して発現亢進が認められたが、neurocanと異なりその亢進のピークは発症早期にあつて発症後期には亢進の程度が減弱していた。免疫ブロッティングによっても発症早期においてversican V2、phosphacan (RPTP β)の発現亢進が確認された。

二重免疫組織化学と共焦点レーザー顕微鏡によりneurocan、phosphacanとGFAPの脊髄前角およびその周囲白質における共局在が部分的に認められ、これらCS-PG発現亢進における活性化アストロサイトの関与が示唆された。これに対して、Iba-1陽性のマクログリアとの明らかな共局在は観察されなかった。

D. 考察

損傷や虚血のみならずALSラットモデルのような変性病態においても脊髄運動ニューロン脱落に伴ってCS-PG発現が亢進することが明らかとなった。そのCS-PG発現亢進は、病変の主座である前角とその周囲白質に優位であり、有意な前角細胞脱落のない発症前

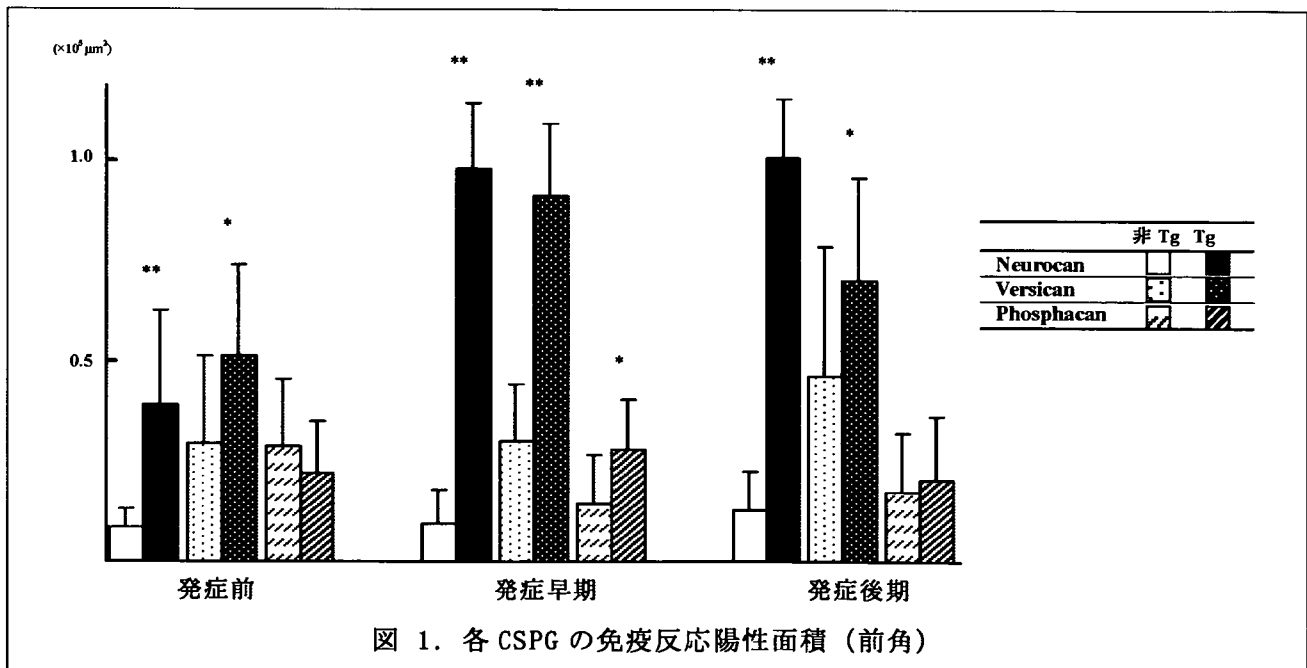


図 1. 各 CSPG の免疫反応陽性面積 (前角)

から認められることから、運動ニューロン変性とそれに伴うグリア増生といった ALS 病態の進行と密接な関連が示唆される。

CS-PG は分子種によって病態進行に伴う挙動が異なり、一貫して進行性である neurocan に対して versican と phosphacan は発症早期にその発現亢進ピークがみられることが明らかとなった。これまで脊髄損傷モデルにおいても同様な CS-PG 分子種による時間的発現変動の相違が複数報告されており、病態下における CS-PG の意義や変動要因 (調節メカニズム) がそれぞれ異なることが想定されている。

成体脊髄における生理的条件下の CS-PG は細胞外基質の主たる構成成分として神経可塑性の制限やシグナル伝達に与っているとされるが、いまだ不明な点も多い。これに対して病態下において発現亢進する CS-PG の意義については、まずグリア増生とともに病変部位を最小限に制限し、炎症性液性因子などの神経毒性拡大を抑制するといった神経保護的な側面も想定されている。しかしながら、脊髄損傷モデルにおける複数の ChABC 投与では病態悪化や機能悪化の報告がないことから、現在のところ過度かつ局所的な CS-PG 蓄積に神経保護的な意義を示す証左は得られていない。

その一方で神経再生の観点からは、これら病態下における CS-PG の過度な蓄積はグリア増生とともに軸索再生、神経突起伸展、細胞遊走などを抑制する分子的障壁となると考えられる。実際、本研究においても成体でほとんど検出されず胎生期に発現して軸索再生阻害能を発揮する全長型 neurocan 発現が確認され、再生に対して非許容的な環境形成につながっている可能性を示唆している。

E. 結論

ALS ラットモデル脊髄の運動ニューロン変性に伴う CS-PG 沈着は、少なくとも発症後に過度の沈着をみせる CS(-PG)を抑制することで変性病態の悪化なく、再生誘導を許容しやすい細胞外微小環境を構築できる可能性がある。細胞補充療法に対する重要な組合せ戦略となり得る。今後、CS-PG 以外の細胞外微小環境構成因子についても研究を進展させることで、ALS における画期的治療法の一翼を担うべき再生誘導療法開発の発展に寄与することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, Warita H, Kato S, Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, Itoyama Y: Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor from amyotrophic lateral sclerosis onset suppresses disease progression in rat amyotrophic lateral sclerosis model. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**(11): 1037-1044, 2007.
- 2) Yamagishi S, Koyama Y, Katayama T, Taniguchi M, Hitomi J, Kato M, Aoki M, Itoyama Y, Kato S, Tohyama M: An *in vitro* model for Lewy body-like hyaline inclusion/astrocytic hyaline inclusion: induction by ER stress with an ALS-linked SOD1 Mutation. *PLoS ONE* **2**(10): e1030, 2007.
- 3) Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama Y: Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironment of spinal motor neurons in ALS transgenic rats. *J Neurosci Res*, *in press*.

2. 学会発表

- 1) 割田 仁 ほか、ALS モデルラット髄腔内へのコンドロイチン分解酵素持続投与、第 48 回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋.
- 2) 水野秀紀 ほか、ALS モデルラット脊髄におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの変化、第 48 回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋.
- 3) 青木正志 ほか、ALS モデルラット脊髄変性における内因性 HGF/c-Met 機構の意義、第 48 回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋.
- 4) 割田 仁 ほか、髄腔内成長因子投与による変異 SOD1 遺伝子導入ラット NG2 陽性神経前駆細胞の活性化、Neuro2007 [第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同学会] 2007. 9 横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況：

なし

III. 研 究 成 果 一 覽