

200730047A

厚生労働科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症に対する
肝細胞増殖因子を用いた
画期的治療法の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 糸山泰人 / 東北大学大学院医学系研究科神経内科
平成20年3月 印刷

目 次

I. 研究者一覧

II. 総括研究報告書

東北大学大学院医学系研究科神経内科

糸山泰人

III. 分担研究報告書

1. ラットおよびコモンマーモセット脊髄損傷モデルを用いたrecombinant human HGFの安全性および臨床用量の検討

慶応義塾大学医学部生理学

岡野英之

2. HGFはALSにおける発症末期のグリオシスを抑制し、脊髄に加えて脳幹部の運動ニューロン変性を抑制する

大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

船越 洋

3. 超微形態学的解析法を用いた肝細胞増殖因子 (HGF)/活性型リン酸化(pcMet) システムに基づく筋萎縮性側索硬化症 (ALS) -変異SOD-1ストレスに対する神経系及び神経外臓器における経時的組織変化の解明：
ALSに対するHGFを用いた画期的治療法の超微形態学的病理組織学的論拠

鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門

加藤信介

4. ラット・サル損傷脊髄に対する肝細胞増殖因子の検討

慶応義塾大学医学部整形外科

中村雅也

5. ヒトリコンビナントHGF蛋白の髄腔内投与によるALS治療法の開発

東北大学病院神経内科

青木正志

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 研究成果に関する刊行物

研究者一覽

筋萎縮性側索硬化症に対する
肝細胞増殖因子を用いた画期的治療法の開発

研 究 者 一 覧

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

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
研究報告書

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子を用いた画期的治療法の開発

主任研究者 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学講座神経内科学分野 教授

研究要旨：本研究の目的は神経難病でも最も苛酷な筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対して肝細胞増殖因子（HGF）を用いた画期的治療法を開発することとそれに関わる基盤研究を進めることにある。ALSの病因研究および治療研究には変異Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）遺伝子導入ALSラットが重要な役割を果している。私共はこのALSラットを用いて運動ニューロンに対し神経栄養因子作用を有するrecombinant human HGF（rhHGF）の髄腔内持続投与でALSに対する有効性を示してきた。多くの神経栄養因子のなかでもこの様に変異SOD1トランスジェニック動物によるALSモデルに対して明確な治療効果を示したものは少なく、この有効性をALS患者に臨床応用する意義と必要性がある。しかも、臨床応用の最も可能性の高いルートとしての髄腔内投与での効果がALSラットで確認されたので、霊長類（マーモセット）に対する髄腔内投与での安全試験および容量設定を開始した。マーモセットによるALSモデルは確立されていないので、rhHGFの安全試験および臨床用量決定には慶応大学の岡野らが確立したマーモセットによる脊髄損傷モデルを用いる。ALSラットおよび脊髄損傷ラットで効果が確認された容量（400 μ g/4weeks）のrhHGFをマーモセット頸髄圧挫損傷モデルに対して損傷後よりくも膜下腔に持続投与したところ、著明な損傷範囲の縮小および良好な運動機能回復が得られた。霊長類脊髄損傷に対してもrhHGFを用いた治療法が有効であることが確認され、同時に安全性も確認中である。

分担研究者

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

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動ニューロンの選択的な細胞死が惹起されて、全身の筋萎縮と脱力が進行する原因不明の難治性神経筋疾患である。しかも2～3年の経過で呼吸筋の麻痺をきたす極めて予後不良な疾患であるが、現状では有効な治療法がない。ALSの病因と病態の解明を行ない、それを基盤にした新規治療法の開発が世界的に切望されている。

A. 研究目的

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

今年度はげっ歯類脊髄損傷モデルに対する HGF の有効性およびその作用メカニズムを検証した上で、霊長類サル脊髄損傷モデルに対する recombinant human HGF (rhHGF) を用いた治療法の有効性・安全性を証明し、その結果を用いてヒト ALS 患者に対する画期的治療法を確立することが本研究の目的である。

B. 研究方法

1) 成体ラットの脊髄損傷モデルに対する HGF の投与

我々は成体ラットの胸髄損傷後急性期には、HGF 受容体である c-Met の発現上昇に比べ HGF の発現上昇が脊髄内で不足していることを発見した。そこで herpes simplex virus 1 (HSV-1) vector を損傷3日前に直接脊髄に注入することで、exogenous HGF が脊髄に供給された理想的な状態をつくり (対照群; LacZ 発現)、同部に圧挫損傷を作成し HGF の有効性を検討した。損傷後急性期にはニューロンおよびオリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制し、血管新生を促進することで損傷範囲を縮小し、慢

性期にかけてセロトニン線維の再生を促進することで良好な後肢運動機能回復が得られることを報告した。

そこで rhHGF を用いた臨床応用へ向け、ラットモデルにおける容量設定を行うために、既に ALS ラットで有効性が確認され容量にて下記の rhHGF の投与を行った。まず、成体 SD ラットの第 10 胸髄レベルに圧挫損傷を作成し、直後に第 12 胸髄レベルからも膜下腔に髄腔内カテーテルを挿入する。先端を損傷直上部へ誘導し浸透圧ミニポンプを用いて rhHGF を 2 週間持続投与 (200 μ g/2weeks) する。この容量は ALS ラットで有効であった容量である。対照群には PBS を投与する。損傷後 6 週目まで BBB scoring を用いて運動機能回復を評価し、組織学的検討を加えることで rhHGF の有効性を評価する。

2) コモンマーモセットの脊髄損傷モデルに対する rhHGF の髄腔内投与

次に、霊長類コモンマーモセットの第 5 頸髄レベルに圧挫損傷を作成し、直後より第 7 頸髄レベルから同様に髄腔内カテーテルを挿入する。rhHGF (対照群; PBS) をくも膜下腔に 4 週間持続投与 (400 μ g/4weeks) し、損傷後 12 週目まで Bar grip test および open field scoring を用いてマーモセットの運動機能回復の評価および異常行動の有無を確認する。また、損傷後 1 週目・3 週目・12 週目に頸髄 MRI を撮影し経時的な損傷範囲の評価および腫瘍形成の有無を確認する。組織学的検討を加えることで、rhHGF を用いた本治療法の霊長類脊髄損傷に対する有効性および安全性を確立する。

3) 治験に関するプロトコールの作成

ALS患者を対象として臨床試験としては医師主導治験を計画しており、東北大学トランスレーショナルリサーチセンターと共にプロトコールの検討を行う。

(倫理面への配慮)

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

C 及び D. 研究結果及び考察

1) 成体ラットの脊髄損傷モデルに対する HGF の投与

成体SDラットの第10胸髄圧座損傷モデルに損傷直後より ALS ラット で有効性が確認され容量にて rhHGF を 2 週間にわたり持続投与したところ、human HGF の脊髄損傷部への高率な導入および内在性 rat HGF の発現上昇が ELISA 法にて確認され、有意に良好な下肢運動機能回復を認めた。また rhHGF 群では損傷中心部においても白質有髄線維が著明に保たれており、H.E. 染色より空洞形成も著明に抑制されていることが明らかとなった。即ち、損傷後より rhHGF をくも膜下腔に持続投与することによっても、これまでの HSV-1 vector を用いた脊髄内への HGF 導入法と同様の効果が得られることが明らかとなった。

2) コモンマーモセットの脊髄損傷モデルに対する rhHGF の髄腔内投与

コモンマーモセット第5頸髄レベルに圧挫損傷を作製し、直後より同様に ALS およ

び脊髄損傷ラットモデルでの有効容量から換算した rhHGF を 4 週間持続投与したところ、Bar grip test および open field scoring 共に有意に良好な運動機能回復を認めた。さらには損傷後 12 週目の MRI 像 (T2WI) より、空洞形成ならびに異常高信号領域が左右および頭尾側、腹側背側いずれの方向にも rhHGF 群で著明に縮小していることが明らかとなった。また損傷後 12 週までの間、異常行動ならびに MRI 像における腫瘍形成は一切認められなかった。これらの結果より、rhHGF を損傷後にくも膜下腔に持続投与する治療法が、霊長類脊髄損傷に対しても有効であることが明らかとなった。

3) 治験に関するプロトコールの作成

東北大学トランスレーショナルリサーチセンターと共にプロトコールの検討に入っている。シーズ開発戦略会議などを通じて、現在の問題点としては以下が指摘されている。

- ・ポンプを利用した薬剤の連続投与という形態が、安全性の確保に対する障害として懸念される。
- ・ポンプメーカー(メドトロニクス社)との共同研究という形がとれるかの交渉が大切である。
- ・髄腔内投与の場合はまず薬剤の動態を要求されるので、これにどのように対応するか。
- ・企業治験に持ち込むのが良策であるが企業の体力に依存するため、フェーズ1・フェーズ2Aを探索的臨床試験として実施する方向性も検討すべきか。

E. 結論

本研究の目的は神経難病でも最も苛酷な筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対して肝細胞増殖因子（HGF）を用いた画期的治療法を開発することとそれに関わる基盤研究を進めることにある。臨床応用の最も可能性の高いルートとしての髄腔内投与での効果がALSラットで確認されたので、霊長類（マーモセット）に対する髄腔内投与での安全試験および容量設定を開始した。マーモセットによるALSモデルは確立されていないので、HGFの安全試験および臨床用量決定には慶応大学の岡野らが確立したマーモセットによる脊髄損傷モデルを用いた。

マーモセット脊髄損傷モデルに対して損傷後より rhHGF をくも膜下腔に持続投与し、損傷範囲の著明な縮小ならびに有意に良好な運動機能の回復を認めた。霊長類脊髄損傷に対してもラットと同じ体重比の容量で有効性が確認され、また腫瘍形成や異常行動が認められなかったことから、本治療法がヒトALSに対し有効かつ安全な治療法となり得る可能性が大きく示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 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** 2007; 66(11): 1037-44.
- 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** 2007; 2(10): e1030.
- 3) Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada S, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. NO production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS. **J Clin Invest** 2007; 117(9): 2468-76.
- 4) Sasaki S, Nagai M, Aoki M, Komori T, Itoyama Y, Iwata M. Motor neuron disease in transgenic mice with an H46R mutant SOD1 gene. **J Neuropathol Exp Neurol** 2007; 66(6): 517-24.
- 5) Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H, Miyatake S, Coffin RS, Nakamura T, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte Growth Factor Promotes Endogenous Repair and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. **J. Neurosci. Res.** 2007; 85(11): 2332-42
- 6) Kadoyama K, Funakoshi, Ohya W, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) attenuates gliosis and motoneuronal degeneration in the brainstem motor nuclei of a transgenic mouse model of ALS, **Neurosci Res** 2007; 59: 446-456.
- 7) Ohya W, Funakoshi H, Kurosawa K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during postnatal development in the rat, **Brain Res** 2007;

1147: 51-65.

- 7) 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*

ほか

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
- 5) Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H, Nakamura T, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury; a trial from rodents to primates. 37th Annual Meeting of the Society For Neurosciences. San Diego, CA, USA. 2007, 11

ほか

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録 (申請中)

発明の名称: 脊髄損傷治療薬剤

発明者: 岡野栄之 戸山芳昭 中村雅也 岩波明生 北村和也 中村敏一 船越洋

整理番号: P10001205

申請日: 2007.2.28

PCT 出願: PCT/JP2007/053804

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分 担 研 究 報 告 書

研究要旨 ヘルペスウイルスベクターを成体ラット胸髄内に注入し肝細胞増殖因子（HGF）を過剰発現させた後に同部に圧挫損傷を作成すると、損傷後急性期にはニューロンおよびオリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制、血管新生を促進することで損傷範囲を縮小し、慢性期にかけてセロトニン線維の再生を促進することで有意に良好な後肢運動機能回復が得られた。さらには臨床応用へ向けて、ラット胸髄圧挫損傷モデルおよびコモンマーモセット頸髄圧挫損傷モデルに対し recombinant human HGF（rhHGF）を損傷後よりも膜下腔に持続投与したところ、同様に著明な損傷範囲の縮小および良好な運動機能回復が得られた。霊長類脊髄損傷に対しても rhHGF を用いた治療法が有効であることが確認された。

A. 研究目的

げっ歯類脊髄損傷モデルに対する肝細胞増殖因子（HGF）の有効性およびその作用メカニズムを検証した上で、霊長類サル脊髄損傷モデルに対する recombinant human HGF（rhHGF）を用いた治療法の有効性・安全性を証明し、ヒト脊髄損傷に対する画期的治療法を確立することが本研究の目的である。

B. 研究方法

我々は成体 SD ラットの胸髄損傷後急性期には、HGF 受容体である c-Met の発現上昇に比べ HGF の発現上昇が脊髄内で不足していることを発見した。そこで herpes simplex virus 1 (HSV-1) vector を損傷 3 日前に直接脊髄に注入することで、exogenous HGF が脊髄に供給された理想的な状態をつくり（対照群； LacZ 発現）、同部に圧挫損傷を作成し HGF の有効性を検討した。損傷後急性期にはニューロンおよびオリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制し、血管新生を促進することで損傷範囲を縮小し、慢性期にかけてセロトニン線維の再生を促進することで良好

な後肢運動機能回復が得られることを報告した。

そこで臨床応用へ向け、rhHGF を用いた下記研究を行った。まず、成体 SD ラットの第 10 胸髄レベルに圧挫損傷を作成し、直後に第 12 胸髄レベルからくも膜下腔に髄腔内カテーテルを挿入する。先端を損傷直上部へ誘導し浸透圧ミニポンプを用いて rhHGF を 2 週間持続投与（200 μ g/2weeks）する。対照群には PBS を投与する。損傷後 6 週目まで BBB scoring を用いて運動機能回復を評価し、組織学的検討を加えることで rhHGF の有効性を評価する。

次に、霊長類コモンマーモセットの第 5 頸髄レベルに圧挫損傷を作成し、直後より第 7 頸髄レベルから同様に髄腔内カテーテルを挿入する。rhHGF（対照群；PBS）をくも膜下腔に 4 週間持続投与（400 μ g/4weeks）し、損傷後 12 週目まで Bar grip test および我々独自に開発した open field scoring を用いてマーモセットの運動機能回復の評価および異常行動の有無を確認する。また、損傷後 1 週目・3 週目・12 週目に頸髄 MRI を撮影し

経時的な損傷範囲の評価および腫瘍形成の有無を確認する。組織学的検討を加えることで、rhHGF を用いた本治療法の霊長類脊髄損傷に対する有効性および安全性を確立する。(倫理面への配慮)

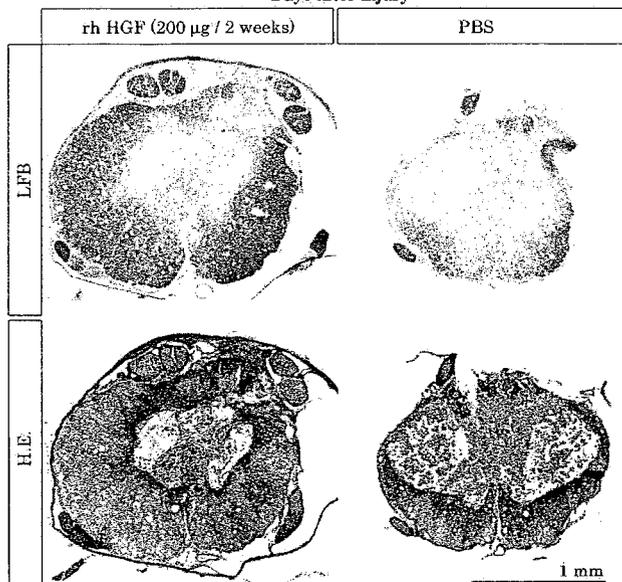
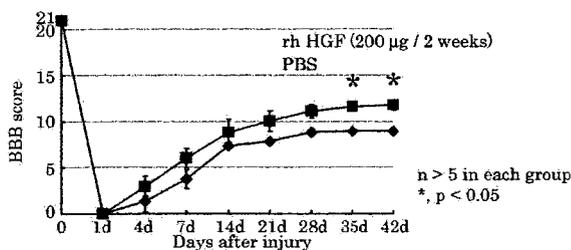
コモンマーモセットを用いた研究はすべて実験動物中央研究所で行っている。動物の手術・飼育管理は慶應義塾大学医学部および実験動物中央研究所動物実験ガイドラインを遵守して行っている。

C. 研究結果

成体 SD ラットの第 10 胸髄圧座損傷モデルに損傷直後より rhHGF を 2 週間にわたり持続投与したところ、human HGF の脊髄損傷部への高率な導入および内在性 rat HGF の発現上昇が ELISA 法にて確認され、下図に示す通り有意に良好な下肢運動機能回復を認めた。また髄鞘特異的な染色法である LFB 染色より、rhHGF 群では損傷中心部においても白質有髄線維が著明に保たれており、H.E.染色より空洞形成も著明に抑制されていることが明らかとなった。

即ち、損傷後より rhHGF をくも膜下腔に

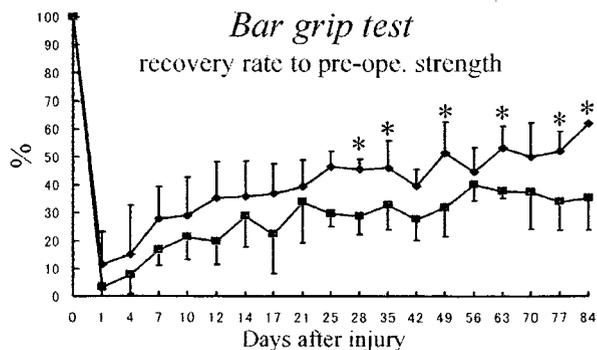
BBB scores after spinal cord injury (200 kdyn, T10 level)



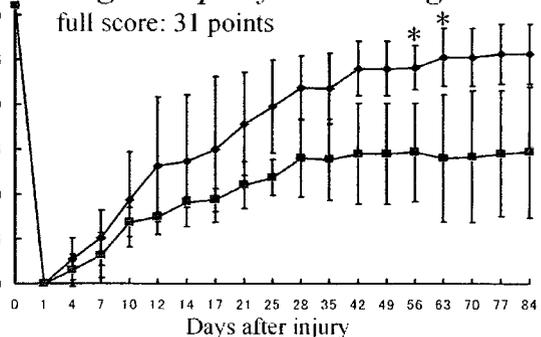
持続投与することによっても、これまでの HSV-1 vector を用いた脊髄内への HGF 導入法と同様の効果が得られることが明らかとなった。

Common marmoset SCI model at C5 level

◆ rhHGF n = 4 (400µg/4weeks)
■ PBS n=3



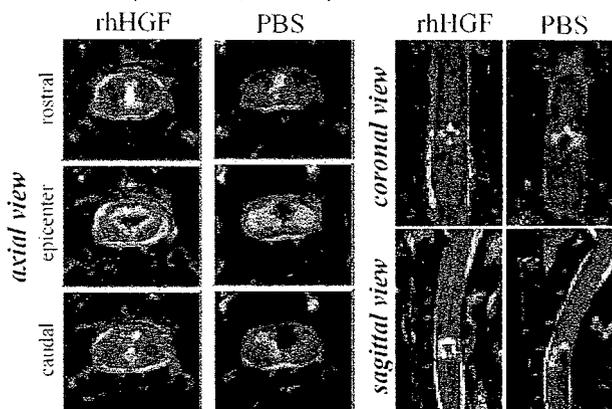
original open field scoring
full score: 31 points



All data are reported as a mean ± SD. * P < 0.05 by Mann-Whitney test

次にコモンマーモセット第 5 頸髄レベルに圧挫損傷を作製し直後より同様に rhHGF を 4 週間持続投与したところ、上図に示す通り Bar grip test および open field scoring 共に有意に良好な運動機能回復を認めた。さらには損傷後 12 週目の MRI 像 (T2WI) より、空洞形成ならびに異常高信号領域が左右および頭尾側、腹側背側いずれの方向にも rhHGF

MRI (7.0 tesla; T2WI) at 12 weeks after SCI



群で著明に縮小していることが明らかとなった。特筆すべきことに、背側から脊髄を圧挫した損傷であるにも関わらず、rhHGF 群では脊髄背側の白質が正常信号領域として描出されていた。また損傷後 12 週までの間、異常行動ならびに MRI 像における腫瘍形成は一切認められなかった。これらの結果より、rhHGF を損傷後にくも膜下腔に持続投与する治療法が、霊長類脊髄損傷に対しても有効であることが明らかとなった。

D. 考察

薬剤や神経栄養因子を用いた脊髄損傷治療には drug delivery system の確立が重要であるが、これまで我々は HSV-1 vector を損傷前に脊髄に注入することで HGF を脊髄内に導入してきた。しかしこの技術をヒト脊髄損傷に応用することは不可能であることから、我々は rhHGF を損傷後よりくも膜下腔に持続投与する方法を検討したところ、ラット脊髄損傷に対し有効な治療効果を得た。また、神経解剖学的・生理学的にげっ歯類と霊長類に明らかな隔たりがあることから、コモンマーモセットを用いた治療効果・安全性の評価を行った。げっ歯類に比べコモンマーモセットでは個体間の性格・気性の差が大きいため、脊髄損傷モデルを高い再現性をもって作製し、客観的に運動機能評価を行うことが不可欠となるが、この技術を有するのは世界中で当研究室のみである。少ない個体数でありながらも有意に運動機能回復が促進され、MRI を用いて同一固体を経時的に評価し、明らかな損傷範囲の縮小が認められた事実は、本治療法のヒト脊髄損傷に対する有効性を大きく示唆するものと考えられる。今後個体数を増やし治療効果の再現性を確認すると共に、組織学的により詳細に治療効果を解析する予定である。

また、臨床応用を目指す実験と並行し、損傷範囲縮小効果のメカニズムの解析を進めている。我々は既に HGF のニューロンおよびオリゴデンドロサイトに対するアポトーシス抑制作用、血管新生促進作用を報告したが、アストロサイトに対する作用は明らかと

していなかった。そこで、STAT3 シグナルを介したアストロサイトの遊走に着目し、これを rhHGF 投与により促進することで、損傷後急性期の炎症細胞浸潤を食い止め、より早期に炎症細胞を収束化する効果を検討している。

E. 結論

ラットおよび霊長類コモンマーモセット脊髄損傷モデルに対して損傷後より rhHGF をくも膜下腔に持続投与し、損傷範囲の著大な縮小ならびに有意に良好な運動機能の回復を認めた。霊長類脊髄損傷に対しても有効性が確認され、また腫瘍形成や異常行動が認められなかったことから、本治療法がヒト脊髄損傷に対し有効かつ安全な治療法となり得る可能性が大きく示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H, Miyatake S, Coffin RS, Nakamura T, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte Growth Factor Promotes Endogenous Repair and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci. Res.* 15;85(11):2332-42, 2007

2. 学会発表

北村和也、中村雅也、岩波明生、船越洋、岡野栄之、戸山芳昭、脊髄損傷に対する Hepatocyte Growth Factor の有効性の検討、第 3 回 CHIBA NEURORESEARCH MEETING、千葉、2007 年 5 月

北村和也、中村雅也、岩波明生、山根淳一、渡辺航太、芝田晋介、船越洋、戸山芳昭、岡野栄之、Hepatocyte Growth Factor は損傷脊髄の内在性修復および運動機能回復を促進する、第 28 回日本炎症・再生医学会、東京

2007年8月

Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J, Fujiyoshi K, Watanabe K, Shibata S, Funakoshi H, Toshikazu N, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte Growth Factor (HGF) Promotes Endogenous Repair and Functional Recovery after Spinal Cord Injury; Preclinical Trial Using Recombinant Human HGF from Rodents to Primates. KEIO International Symposium on Photonics and Molecular Therapy. Tokyo. 2007, 8

北村和也、中村雅也、岩波明生、山根淳一、岡野栄之、戸山芳昭、Hepatocyte Growth Factorは損傷脊髄の内在性修復および運動機能回復を促進する、第22回日本整形外科学会基礎学術集会、静岡、2007年10月

Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H, Nakamura T, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury; a trial from rodents to primates. 37th Annual Meeting of the Society For Neurosciences. San Diego, CA, USA. 2007, 11

Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J, Fujiyoshi K, Funakoshi H, Okano H, Toyama Y. Hepatocyte Growth Factor (HGF) Promotes Endogenous Repair and Functional Recovery after Spinal Cord Injury; Preclinical Trial Using Recombinant Human HGF from Rodents to Primates. Cervical Spine Research Society (CSRS) 35th Annual Meeting. San Francisco, CA, USA. 2007, 11

Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J, Fujiyoshi K, Funakoshi H, Okano H, Toyama Y. Hepatocyte Growth Factor (HGF) Promotes Endogenous Repair and Functional Recovery after Spinal Cord Injury; Preclinical Trial Using Recombinant Human HGF from Rodents to Primates. 54th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. San Francisco, CA, USA. 2008, 3

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：脊髄損傷治療薬剤

発明者：岡野栄之 戸山芳昭 中村雅也 岩波明生 北村和也 中村敏一 船越洋

整理番号：P10001205

申請日：2007.2.28

PCT出願：PCT/JP2007/053804

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HGF は ALS における発症末期のグリオシスを抑制し、脊髄に加え

脳幹部の運動ニューロン変性を抑制する

(分担研究者) 船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症: ALS は家族性 (FALS)・孤発性 (ALS) 共に運動神経が選択的に変性・脱落する致死性疾患で、両者の ALS の治療には運動神経細胞の変性・脱落を阻止することが有効と考えられてきた。一方で、FALS, SALS で共通におこる病態としては運動神経細胞死に加えてグリオシスが知られる。最近、活性化ミクログリアの増加を伴うグリオシスが ALS の発症後進行に重要である事が明らかとされた。私達はこれまで HGF が運動神経細胞に対する神経栄養活性を持ち ALS トランスジェニックマウスの脊髄運動神経細胞死を抑制する事を明らかとしてきたが、脳幹部の運動ニューロンへの効果やグリオシス、中でもミクログリオシスに対する作用は不明であった。本研究で、肝細胞増殖因子 (HGF) が脊髄運動ニューロンに加えて脳幹部の運動ニューロンの変性を抑制することを明らかにした。また、ALS の病態末期に於けるミクログリオシスを大幅に抑制することが明らかになった。このことから、HGF は広範囲の運動ニューロン変性を阻止すること、さらには発症後の ALS の進行抑制にも有効である可能性を示唆した。東北大学糸山泰人教授、青木正志准教授らの研究室との共同研究により、実用性の高いリコンビナント HGF 蛋白質の発症時期に於ける髄腔内投与が ALS モデル Tg-rat の脊髄神経細胞死を抑制し、寿命延長効果を持つことが示されたことから、HGF の臨床適用の可能性が具体性を帯びてきた。今後日本から ALS の新しい治療法を発信できるよう研究をさらに発展させていきたい。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral

sclerosis: ALS) は家族性 (FALS)・孤発性 (ALS) 共に運動神経が選択的に変性・脱落する致死性疾患で、両者の ALS の治療には運動神経細胞の変性・脱落を阻止することが有効と考えられる。我々はこれまで肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) が運動ニューロンを含む多くの神経細胞に対し神経生存促進・神経突起伸

て ALS モデルマウス (ALS-Tg) と神経特異的 HGF 発現マウスを交配することで ALS-Tg の神経細胞に HGF を供給した効果を解析し、HGF は脊髄運動神経に対して神経保護作用を示す神経栄養因子であることを報告した。一方で、ALS は脊髄に加えて脳幹部運動ニューロンも広く変性することが知られるが、HGF の脳幹部

運動ニューロンに対する効果は不明である。多くの神経栄養因子が脊髄と脳患部の運動ニューロンの両方に作用することが少ないだけに、HGF についてどうか明らかにすることは重要な課題である。もし、HGF が脳幹部の運動ニューロン変性も抑制できたら大きな advantage となるからである。一方、神経細胞自身の直接変性による ALS の進行に加えて、グリア細胞（ミクログリアとアストロサイト）の発症後の ALS 進行における重要性が注目されている。言い換えるとミクログリオシスの改善により発症後の ALS の進行が就職できる可能性がある。しかし、現時点で HGF が ALS におけるミクログリオシスを就職できるかは不明である。この観点から、今回発症前後の ALS 臨床適用に向けて最適な HGF 治療法確立のため HGF の ALS 依存的なグリオシス制御とその分子機構についても解析を行った。

B. 研究方法

ヒト変異 SOD1 遺伝子を過剰発現する ALS-Tg マウスに HGF 遺伝子を神経特異的に発現するマウス (HGF-Tg) を交配して double-Tg マウス (ALS/HGF) を作製した。これらにより作成した 4 郡のマウス (Wild-type littermate, -Tg, ALS-Tg, および ALS/HGF) を比較検討することで、脳幹部運動ニューロンの変性に対する効果について解析した。また、ALS 依存的なグリオシスの HGF による制御とその分子機構を組織学的、生化学的および免疫化学的に解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験及び動物実験については、それぞれ大阪大学遺伝子組換え実験計画の承認のもと安全尾確保に留意するとともに、動物実験に関しても大阪大学医学部医学科動物実験委員会の承認のもと、倫理面および動物愛護に配慮し実験を実施する。

C & D. 研究結果および考察

(1) 脳幹部運動ニューロン変性に対する

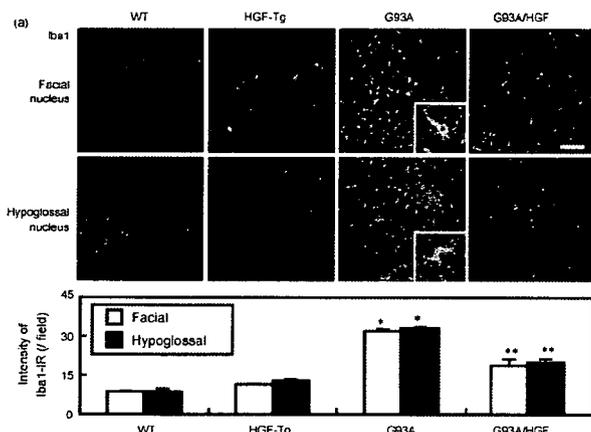
HGF お効果 : ヘテロ ALS-Tg とヘテロ HGF-Tg の交配実験から、ALS-Tg におこる脳幹部運動ニューロン変性が、ALS/HGF-Tg では大幅に抑制されることが明らかとなった。この効果は、脳幹部の中今回解析した舌下運動ニューロンと顔面運動ニューロンで同様に認められた。すなわち、HGF が ALS-Tg の広範囲の脳幹部運動神経変性をよく抑制することを示している。

(2) ミクログリオシスに対する HGF の効果

果 : Boillee と Yamanaka らは ALS-Tg マウスのミクログリアから変異 SOD1G93A を Cre-loxP システムを用いて減少させると、ALS の発症後の進行が遅くなることを報告しており (Boillee et al, Science, 2006)、病態末期のミクログリアが発症後の疾患進行に重要であることを明らかにしている。本研究において、ALS-Tg の自然経過では疾患の病期が進行するとともに活性化型ミクログリアと反応性アストロサイトが著明に増加することが確認された。一方で ALS/HGF (ALS-Tg に HGF を供給した動物) では病態末期に於ける活性化型ミクログリアと反応性アストロサイト数が減少していた。このことは、HGF が病態末期の活性化型ミクログリアの増加、すなわち病態末期の発症後の疾患進行の責任機構の 1 つを抑制する機序をもつことを意味する。Nagai らは、変異 SOD1 発現アストロサイトが神経細胞に傷害性の因子を放出することを報告している (Nagai et al, Nat Neurosci, 2007) ことから、HGF は神経細胞への直接作用や活性化型ミクログリア修飾作用に加えて反応性アストロサイトの面からも発症後の ALS 進行抑制に寄与する機序が明らかとなった。このことは、HGF 治療がトランスジェニックマウ

スのアプローチに加えて (Sun et al, J. Neurosci, 2002; Kadoyama et al, Neurosci Res, 2007)、発症後のリコンビナント HGF 蛋白質治療が有効である (Ishigaki et al, J. Neuropathol Exp Neurol, 2007) 根拠として重要な意味をもつと考えられる。

<脳幹運動神経核である顔面および舌下神経核におけるミクログリアの集積に対する HGF の抑制効果>



*緑：ミクログリアのマーカーである Iba1 陽性細胞 (Kadoyama, Funakoshi et al., Neurosci Res, 59, 446-456, 2007)

E. 結論

HGF は ALS-Tg の脊髄運動神経細胞死を抑制することに加えて、今回新たに脳幹部 (舌下・顔面) 運動神経細胞死を抑制することが明らかとなった。加えて病態末期の ALS-Tg の活性化型ミクログリアと反応性アストロサイト数を減少させることが明らかとなった。この結果は、HGF が発症後 ALS の病態進行抑制剤として機能する作用機序として重要である。一方で HGF は病態中期においてはアストロサイトのグリア細胞特異的グルタミン酸トランスポーター (EAAT2/GLT-1) の発現レベルを維持・増加さ

せることで間接的に運動ニューロンへのグルタミン毒性を緩和する機能をもつことが示唆されている。このように HGF は神経細胞への直接的作用に加えて、病態時期に依存してグリア細胞へ多彩な機能を示すことで広い病期にわたって ALS への治療効果を発揮するものと考えられた。今後東北大学神経内科および慶応義塾大学生理学、同整形外科と共同で研究を進展させ、最終的には ALS への臨床適用の基盤を築きたい。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

- [1] H. Akita, *et al.*, Hepatocyte growth factor improves synaptic localization of the NMDA receptor and intracellular signaling after excitotoxic injury in cultured hippocampal neurons, *Exp Neurol* 210 (2008) 83-91.
- [2] Y. Suzuki, *et al.*, Regulation of cell migration and cytokine production by HGF-like protein (HLP)/macrophage stimulating protein (MSP) in primary microglia, *Biomed Res* 29 (2008).
- [3] K. Kadoyama, *et al.*, Hepatocyte growth factor (HGF) attenuates gliosis and motoneuronal degeneration in the brainstem motor nuclei of a transgenic mouse model of ALS, *Neurosci Res* 59 (2007) 446-456.
- [4] A. Ishigaki, *et al.*, 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 (2007) 1037-1044.

- [5] W. Ohya, *et al.*, Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during postnatal development in the rat, *Brain Res* 1147 (2007) 51-65.
- [6] M. Nakano, *et al.*, Hepatocyte growth factor promotes the number of PSD-95 clusters in young hippocampal neurons, *Exp Neurol* 207 (2007) 195-202.
- [7] K. Kitamura, *et al.*, Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury, *J Neurosci Res* 85 (2007) 2332-2342.
- [8] 船越 洋 他、HGFの神経疾患治療効果。
Clinical Neurosci, 25: 500-501, 2007.
- [9] 船越 洋 他、HGFの神経保護作用機序。
Clinical Neurosci, 25, 620-621, 2007.
- [10] 船越 洋 他、ALSと神経栄養因子-新規神経栄養因子・神経再生因子としてのHGF。
Brain and Nerve (旧称: **神経研究の進歩**) 59, 59(10): 1195-1202, 2007.
- [11] 船越 洋 他、ALSに対する新しい治療薬としての幹細胞増殖因子 (HGF) の研究. **難病と在宅ケア**、13(7): 54-55, 2007.
- [12] 船越 洋 他、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. **神経変性疾患のサイエンス**、高橋良輔編、南光堂, 217-226, 2007.

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- 1.特許取得
特記なし
- 2.実用新案登録
特記なし

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

超微形態学的解析法を用いた肝細胞増殖因子(HGF) /活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムに基づく筋萎縮性側索硬化症(ALS)-変異 SOD1 ストレスに対する神経系及び神経外臓器における経時的組織変化の解明：
ALS に対する HGF を用いた画期的治療法の超微形態学的病理組織学的論拠

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

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS) SOD1 トランスジェニックマウス：G1H-G93A マウスにおいては、G93A-SOD1 ストレスにより、脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、細胞死に至る。しかし、脊髄前角細胞は G93A-SOD1 ストレスによる細胞死を無条件に受け入れているのではなく、脊髄前角細胞には G93A-SOD1 ストレスに対する内因性生存機構の一つとして、肝細胞増殖因子(HGF) /活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムが存在していたことを光顕的解析法と免疫組織学的解析法及び超微形態学的解析法の各解析法を駆使して、解明した。脊髄前角細胞は、G93A-SOD1 ストレスに対し、内因性生存機構としての HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を惹起させ続け、生存の可能性を探るが、最終的には、この機構が破綻することにより細胞死を向える。一方、神経外臓器である肝臓、腎臓、心臓においては、G93A-SOD1 ストレスによる脊髄前角細胞と同様な変性組織像を一時期は呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈した。肝臓については、詳細な超微形態学的解析法を用いて検討したところ、肝細胞においては、一時的には超微構造学的異常を示すもの、最終的にはほぼ正常な超微形態像に回復していることを解明した。即ち、神経外臓器である肝臓、腎臓、心臓における組織学的回復機構には、内因性生存機構としての HGF/pcMet システムの up-regulation 機構が寄与していることが判明した。本研究の結果は、細胞死のプロセスを歩む ALS 脊髄前角細胞に対して、HGF 治療による、超微形態学的解析を含めた組織学的完全回復の病理組織学的論拠たり得る。

研究協力者：加藤雅子¹、船越 洋²、大谷若菜²、
中村敏一²、青木正志³、糸山泰人³

¹鳥取大学医学部分子病理学分野、²大阪大学大学院
医学系研究科分子組織再生分野、³東北大学大学院
医学系研究科神経内科分野

A. 研究目的

SOD1 遺伝子異常を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症では、脊髄前角細胞死をきたす。変異 SOD1 遺伝子導入 ALS モデル動物においても、ヒトと同様に、脊髄前角細胞の変性・細胞死をきたす。このモデル動物の臨床症状の変化に対応した経時的な組織変化の探索より、変異 SOD1 を伴った生体系においては、ALS-変異 SOD1 ストレスは神経系である脊髄前角細胞だけでなく、神経外臓器である肝臓、腎臓、心臓の各組織細胞にも影響を及ぼしていることが判明した。

SOD1 ストレスにより脊髄前角細胞は細胞死を起こすが、肝臓、腎臓、心臓の各組織細胞では、一時的な組織変性所見を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈し、細胞死に至らない。前回までに我々は、細胞死を惹起する脊髄前角細胞は ALS-変異 SOD1 ストレスに対して無条件に細胞死を受け入れているのではなく、内因性生存機構としての肝細胞増殖因子(HGF) /活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムにより ALS-変異 SOD1 ストレスが引き起こす細胞死に抵抗する機序が存在していることを解明した。さらに、この HGF/pcMet システムの観点から、神経外臓器である肝臓・腎臓・心臓の各組織の経時的組織変化に着目し、これらの神経外各臓器の細胞が、ALS-変異 SOD1 ストレスに対して、自らを守って生存している内因性生存機構としての HGF/pcMet システムの経時的変遷について解析した。