

97. Watanabe Y, Yasui K, Nakano T, Doi K, Fukada Y, Kitayama M, Ishimoto M, Kurihara S, Kawashima M, Fukuda H, Adachi Y, Inoue T, Nakashima K (2005) Mouse motor neuron disease caused by truncated SOD1 with or without C-terminal modification. *Mol Brain Res* 135:12–20
98. Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14:1105–1116
99. Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland DW (1993) Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73:23–33
100. Yamagishi S, Koyama Y, Katayama T, Taniguchi M, Hitomi J, Kato M, Aoki M, Itoyama Y, Kato S, Tohyama M (2007) 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:e1030
101. Yamanaka K, Miller TM, McAlonis-Downes M, Chun SJ, Cleveland DW (2006) Progressive spinal axonal degeneration and slowness in ALS2-deficient mice. *Ann Neurol* 60:95–104
102. Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T (2001) The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 29:160–165
103. Zang DW, Cheema SS (2002) Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1^{G93A G11H} transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 332:99–102

筋萎縮性側索硬化症の新規治療法開発への挑戦*

糸山 泰人**

Key Words : amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), hepatocyte growth factor (HGF), ALS transgenic rat, neural stem cell transplantation, translational research

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は神経難病の中でも最も苛酷な疾患と考えられており、上位および下位運動ニューロンが選択的にかつ進行性に傷害される神経変性疾患である。多くは中年以降に発症し、一側の上肢ないしは下肢の筋脱力や萎縮から始まり、次々とその程度と範囲が広がり、その間に言語障害、嚥下困難などの球麻痺症状および呼吸筋麻痺が加わる経過をとることが多い。人工呼吸器による呼吸管理を行わないと、発症後2~5年で呼吸不全のために死にいたることがほとんどであり、極めて予後不良の疾患である。しかし、呼吸筋を含めた全身の筋萎縮および脱力にもかかわらず、知能などの高次機能や感覚は保たれることが通常である。ALSの原因・病態は不明であり、その治療法も確立されたものではなく、riluzole以外には治療薬として認められたものはない。しかし、そのriluzoleにおいてもその有用性は極めて限られたものであり、世界中の患者・家族にとって新たな治療薬や治療法の開発が切望されている。

本稿では「ALSに対する新規治療法開発への挑戦」が主題であるが、本題に移る前に私共神経内

科医がALS患者に一体何が出来るかを考えてみたい。それらは身体的ケア、精神的ケア、社会的ケアなどの日々の診療は勿論のこと、医療ネットワークの形成などによる難病患者に対する医療体制の整備や在宅療養のサポートも重要である。

I. ALS患者に対する医療体制の整備と在宅医療への支援

多くの神経内科医は神経難病の象徴としてのALSの治療とケアについて長年さまざまな形で努力を重ねてきた。しかし、これらを個々の神経内科医の手だけで補うにはあまりにも問題が多いので、いくつかの地域では医療ネットワークをはじめとして神経難病患者に対する医療体制の整備が行われてきた。

宮城県においては1994年に東北大学医学部神経内科を中心に宮城県神経難病ネットワークを形成し、ALS患者の医療の確保に向けて努力してきた。このネットワークには1996年に宮城県の保健福祉部が参加し、また1997年にはALS協会などの患者団体の参加が続き、1999年には宮城県神経難病医療連絡協議会が県の事業として設立された。この協議会はALS患者の医療の確保に加

* Challenge to Develop a New Therapeutic Approach for Amyotrophic Lateral Sclerosis.

** 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 Yasuto ITOYAMA : Department of Neurology Tohoku University School of Medicine

えて、患者の在宅医療の支援、および家庭内介助の支援を主なテーマに掲げて（宮城システム）進めてきている。現在では拠点病院として4病院、協力病院として17病院、協力医院として15医院があり、宮城県を隈なくネットワークでカバーすべく努力している。2006年9月の時点では、宮城県下のALSの患者は153名で、呼吸器装着患者は在宅で48名、病院で15名の患者がいる。協議会活動を続ける過程で確実に在宅での呼吸器装着のALS患者数が増加してきているのは、地域の神経難病患者に対する医療体制の充実が少しずつはかられているのではないかと考えられる。これらの在宅医療の支援体制は行政の理解のもとに医師、看護師、神経難病専門員、保健師、保健福祉員、介護保健関係者などで支えられている。これらの地域医療体制の構築と充実に関しては、厚生労働省も力を入れており、現在は厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「重症難病患者の地域医療体制の構築に関する研究」（平成17～19年主任研究者 糸山泰人）班にて、支援ネットワークの整備と入院確保、それに在宅療養環境の整備や大規模災害時の難病患者に対する対応にも力を入れている。もちろんこれらの医療体制や在宅医療の充実は神経難病患者・家族には大変重要なことではあるが、しかし患者・家族が真に求めているのは新規のALS治療薬や治療法の開発である。

II. 新規治療法開発の基盤になるALSの病因研究 —SOD1病因論と トランスジェニックラットの作製—

ALSの病因に関する研究は、すでに100年以上の歴史があり、実に無数の病因論が報告されてきている。なかでも重金属による毒性説、グルタミン酸の毒性説、神経栄養因子の変調説、またウイルス感染説などが有力視されてきた。現在最もALSの病因研究で重要視されているのは、銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ（Cu/Zn superoxide dismutase, SOD1）変異説である¹⁻³⁾。1993年にALS患者の約5～10%を占める家族性ALSの家系での遺伝学的解析研究からSOD1の遺伝子変異が原因遺伝子の1つであることが明らかにされた。この遺伝子異常は発症を規定すること

にとどまらず臨床経過を修飾する可能性が示されている⁴⁾。また家族性ALSの変異SOD1遺伝子をマウスの受精卵に導入することにより、臨床的および病的にALSに極めて類似した動物モデルが作製された⁵⁾。これらの事実はSOD1遺伝子異常がマウスの運動ニューロン死を引き起こす鍵を握っていることを示唆している。

このALSマウスにおける運動ニューロン死のメカニズムはまだ十分には解明されていないが、変異によるSOD1活性の低下、すなわち細胞毒である活性酸素の集積をきたすのが原因でなく、変異SOD1蛋白が新たに獲得した毒性（gain of toxic function）によるものと考えられている。それらの神経細胞死の機序に関しては様々な可能性が考えられている。すなわち、運動ニューロン内にてSOD1の異常凝集が主体となって引き起こす酸化ストレス、軸索輸送障害、ミトコンドリア傷害、プロテアソームストレス、ERストレス、Golgi傷害が原因となり細胞が傷害されるいわゆるcell autonomous theoryと運動ニューロン以外のアストロサイトやミクログリアが細胞死に積極的に関与するnon-cell autonomous theoryが考えられている。

いずれにしるSOD1病因論に立つもう一つの重要な点は、世界の多くの研究施設で再現性をもって共通のALS動物モデルである変異SOD1トランスジェニックマウスが作製され、実験に利用可能なことである。しかし、従来からマウスによる動物モデルは、その個体の大きさによる研究上のさまざまな制約があった。しかし、東北大学の永井真貴子らは2001年に世界に先駆けて変異SOD1導入トランスジェニックラットによるALSのラットモデルの作製に成功した（Fig. 1）。このラットモデルは、マウスの約20倍の大きさがあるので、現在ALSの治療実験で最も注目されている。トランスジェニックラットの病理所見では、脊髄前角の運動ニューロンの選択的な変性・消失がみられ、ヒト家族性ALS患者に特徴的に認められるLewy小体様硝子様封入体も確認されている。また、トランスジェニックラットは、脳脊髄液の採取が可能であり、また薬剤や遺伝子治療用のベクターの髄腔内投与も容易に行なえる特性を持っている。したがって将来的な遺伝子治療

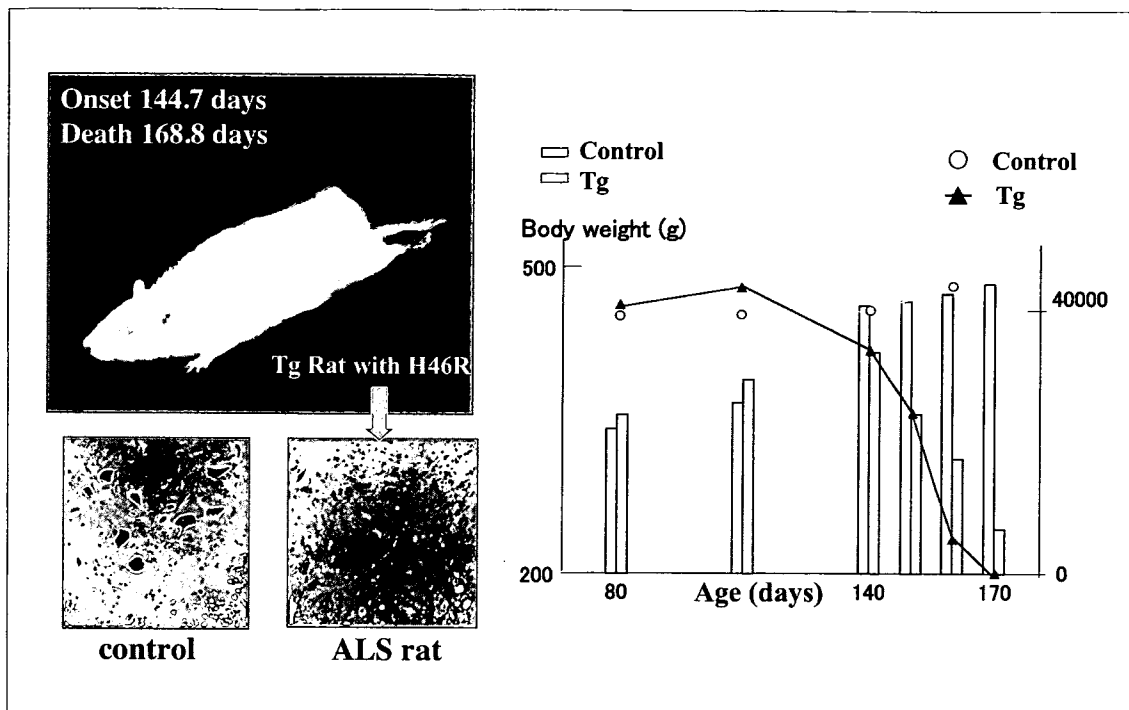


Fig. 1 Successful Establishment of ALS Rat Model (Nagai M et al : J Neurosci, 2001)

や外来の神経幹細胞の髄腔内投与や、脊髄への直接移植などの治療法開発に有用なモデルになるものと考えられる。

III. ALSの新規治療法開発の戦略

ALSの新規治療薬の開発は、まずALSの病因・病態を明らかにし、次のステップとしてその原因・病態に対しての治療法を考えるのが理想である。しかし、ALSの病因論がまだ明確でないため、新しい治療法の開発は様々な考えのもとに進めていかなければならない。その一つの立場としては、既に他の病気に対して使用されている薬剤の中から、運動ニューロン死を防ぐ可能性のある薬剤を見つける方法がある。これらの候補薬はすでに安全性は確かめられているので、有効性があればすぐにもALS患者に用いることが出来る利点があり、現在世界で行われているALSの治療薬治験の中心をなしているといってもよい(Fig. 2)。二つ目としては、いくつかのALSの病因論から可能性のある薬剤を培養系の実験で神経保護効果を確認した後、ALS動物モデルにて有効

性を確認して、患者への治療実験にもってゆく考えである。三つ目としては、今すぐには患者に対して治療応用は出来ないが、将来的に有用な治療法となりうるもの、すなわち遺伝子治療、あるいは神経幹細胞移植治療が挙げられる。

これらの治療戦略のなかで私共が興味と期待を持って研究を進めているのは神経栄養因子のグループであり、残存運動ニューロンの細胞死を抑制し保護する作用を持っている。なかでも日本で発見された肝細胞増殖因子に着目し、そしてその有用性を証明するために私共の開発した大型のALS動物モデルである変異SOD1トランスジェニックラットを用いて研究中である。

1. 肝細胞増殖因子を用いたALSの治療開発研究

ALSの病因は明確ではないが、運動ニューロン死を遅らせ、回復機能を与える候補因子としては、神経栄養因子が長い間期待されてきた。しかし、この10~15年の間にCNTF, BDNF, GDNF, IGF-1などの神経栄養因子の臨床試験が行なわれたが、有効性を示せない結果に終わっている。

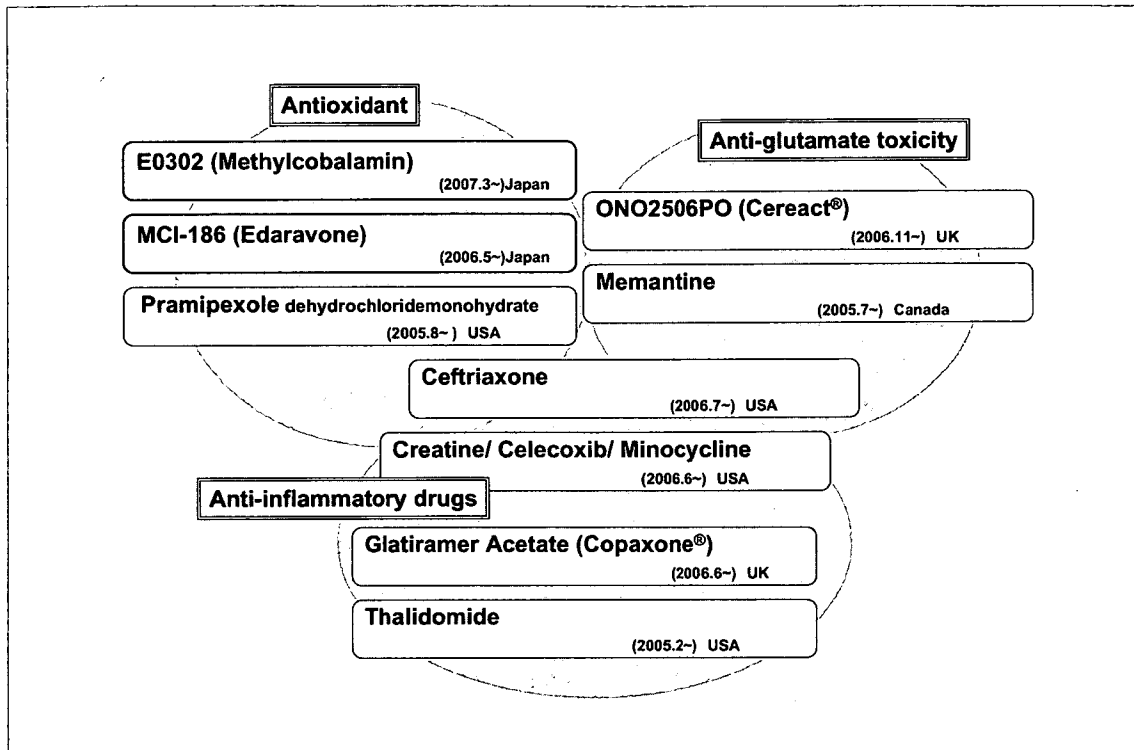


Fig. 2 Clinical Trials for ALS in the World

その神経栄養因子の中で次世代のALSの治療薬の可能性として現在注目されているのが肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) で、大阪大学の中村敏一らによってクローニングされた⁷⁾。HGFは4つのクリングル構造を持つ α 鎖とセリンプロテアーゼ様構造を持つ β 鎖からなるヘテロ2量体で、1本鎖の不活性型 pro HGFとして産生され、その後プロセッシングを受けて2本鎖活性型 HGFとなる。活性型 HGFはチロシンキナーゼ受容体 (c-Met) に結合することにより細胞内シグナル伝達を行う。HGFは当初、培養肝細胞の増殖活性を指標に同定されたが、その後の研究の結果、実は神経細胞、なかでも運動ニューロンに対する神経栄養効果が強いことが注目されてきた。また、船越と中村らはダブルトランスジェニックマウスを作製して遺伝子工学的にHGFがALSに有効であることを示した⁸⁾。正にこの結果が、現在進行中の「HGFをALS患者への治療薬として開発する」私共の治療研究の基盤となっている。

2. ALSラットへのHGF髄腔内投与実験

薬物の投与ルートとしてALSの病態の主座である脊髄の運動ニューロンに対して効率良く作用し、しかも全身に対する副作用を回避するために髄腔内投与が重要と考えられている。ALSトランスジェニックラットはマウスモデルに比べてこのルートによる薬剤供給が可能であるので、私共はALSラットに対してFig. 3に示すように浸透圧ポンプを用いて髄腔内に遺伝子組み換え型ヒトHGFタンパクの投与実験を行ってきた。HGFを発症前から1ヵ月にわたり投与し、腰髄1切片当たりの運動ニューロン数を定量した結果では、HGF投与群においては用量依存的に腰髄運動ニューロン数が保たれていることが示され、HGFの髄腔内投与はALSモデル動物の運動ニューロン傷害に対して保護効果があることが明瞭となった。

HGFのALSへの臨床応用を目指すには、動物モデルにおいてHGFの投与量、投与タイミングおよび投与期間の検討が重要である。それらの検

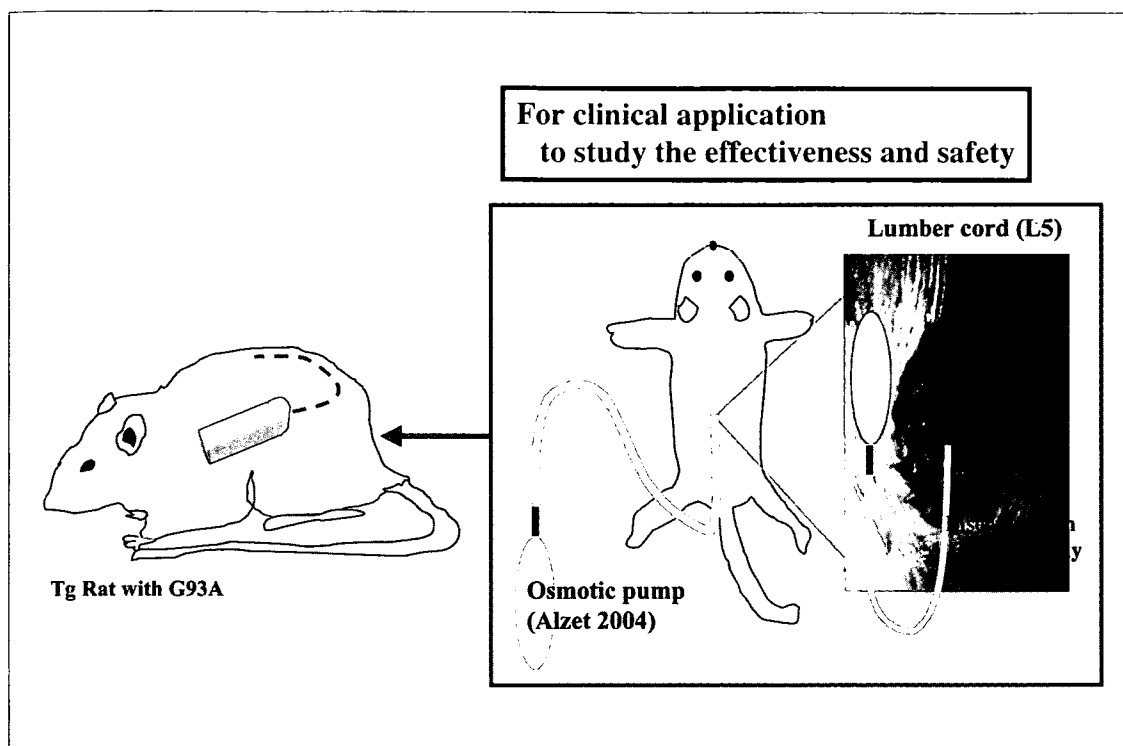


Fig. 3 Challenge for Development of ALS Medicine —Intrathecal Administration of HGF in ALS Rats— (Nagai M et al : J Neurosci, 2001)

討のなかで200 μ gのHGFをALSラットの症状が発症した時期から投与を始めても明らかに寿命を延長させる結果が得られた。その効果は、HGFを投与しなかったALSラットモデルの罹病期間と比較すると約1.6倍も延長させるものであった (Fig. 4)⁹⁾。単純にラットの寿命とヒトの寿命を比較することは出来ないが、1.6倍の延命効果はヒトに換算するとALS患者の呼吸不全にいたる平均を3年とすると、それを5年にまで延ばす治療効果があることを意味しており、今後のALSに対する治療薬の開発にとって大変期待できる結果と考えられる。

現在のところ、ALSラットに対するHGFの有効性の機序としては以下のことを考えている。前述した遺伝子工学的にHGFがALSに有用であり運動ニューロン死を抑制する機序を解明した結果、運動ニューロン保護にはHGF/c-Metシステムが重要な役割を果たしていることが明らかにされた。ALSラットにおいては症状が発現する以前から、脊髄での内因性のHGFの発現量は正常対

照に比べて増加し、末期においては対照に比べ約2倍の増加をすることが明らかにされている。加えて神経細胞においてはHGF受容体であるc-Metの発現も増加していることが確かめられており、ALSの個体では運動ニューロン死に対してHGF/c-Metシステムが作用して疾患防御的機序が働いているものと考えられた。そこで治療実験とは逆に内因性HGFの作用を抑制する目的で、ALSラットの髄腔内に抗HGF中和抗体 (IgG) を発症前から投与する実験を行うとALSの発症時期は非投与のALSラットに比べて早まり、かつ症状の経過は急速に進行して死亡することが明らかになった。これらの結果を総合すると、ALSラットにおいては運動ニューロン傷害には内因性HGFはc-Metを介して抑制的に作用しており、外因性HGFの更なる投与はその作用を増強しALSの症状進行に治療的效果を示すことが強く示唆された。この結果を基にALS患者へのHGF髄腔内投与の臨床応用実験を可能にするためには、副作用の問題などを十分検討する必要が厳密に求

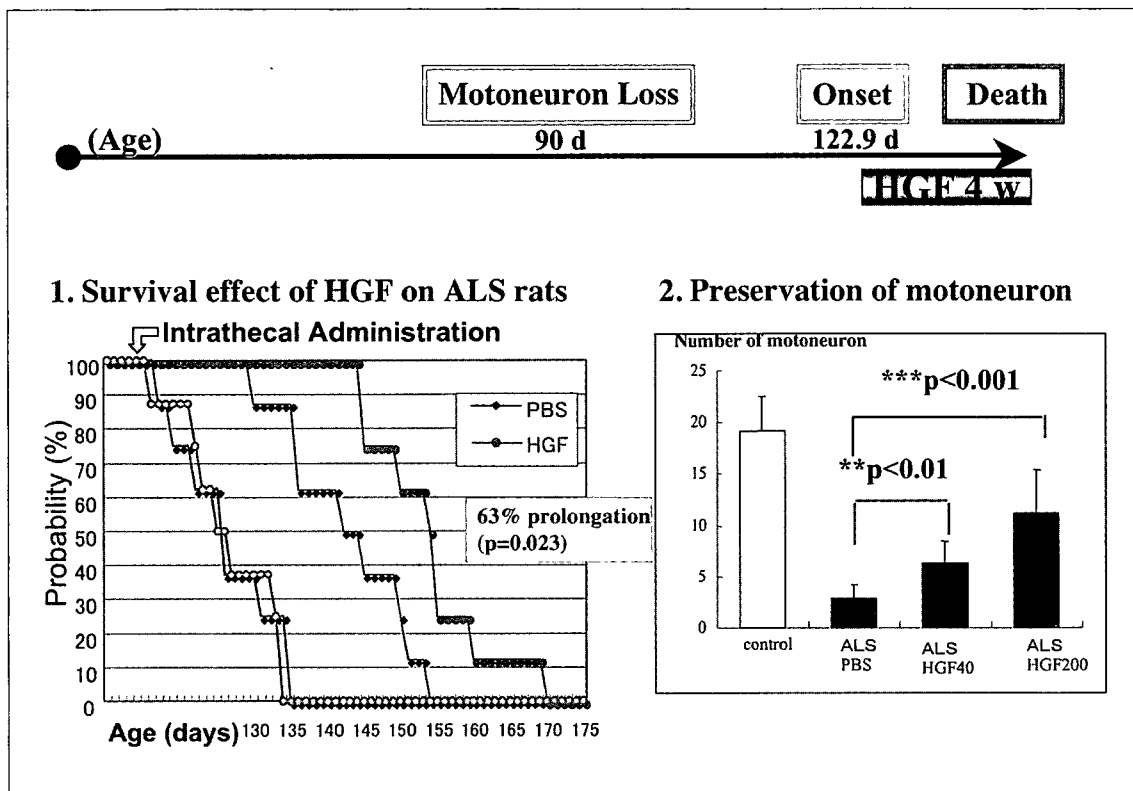


Fig. 4 Intrathecal Administration of HGF in ALS Rats (Ishigaki A et al : J Neuropathol Exp Neurol, in press)

められており、現在は霊長類（マーマセツト）を用いた安全試験を行っている。

IV. 神経幹細胞賦活などの将来的治療に向けて

将来的にALSの治療法として遺伝子治療や神経幹細胞移植治療が注目されている。本稿では遺伝子治療に関しては割愛させていただき、当分野で行なわれている神経幹細胞移植に関係する研究の一端を紹介したい。

運動ニューロンのように神経細胞として高度に分化した神経細胞は、いったん傷害されると再生されることはないと考えられてきたが、近年の研究によると、成人においても神経幹細胞が神経細胞やグリア細胞に分化する可能性が示されている。神経再生治療としては神経幹細胞を培養条件下にてあらかじめ多数の神経細胞にまで分化させて、傷害された患者脊髄などに投与し機能補充を計る方法と患者の脳や脊髄に内在している神経幹細胞を賦活して運動ニューロンまで分化させて治

療しようとする方法がある。私共は後者でのALS治療の可能性を求めての研究を行っている。ALSラットの脊髄を観察すると、脊髄の実質広く神経前駆細胞が新たに増殖分化しており、状況によっては神経細胞、さらには運動ニューロンにまで分化する可能性を示している。この神経前駆細胞の増殖分化は、ALSという病気に対して生体防御の反応の一つではないかとも考えられる。いずれにしてもALSの病気の過程でそのような神経前駆細胞が出現しているので、それらの細胞を効率よく神経幹細胞に分化させる方法や条件を研究するのは重要である。

その一方でALSの病変の主座である脊髄では再生がおこりにくい環境であることが知られている。その原因としていくつかの再生阻害因子が病変部に存在することがあげられる。脊髄損傷などの疾患モデルの病変部位ではこうした再生阻害因子の発現が亢進してくることが明らかにされている。そこで、将来的に再生療法をより効果的に進

めることを念頭におき、ALSモデルラットで病変部位での再生阻害因子の発現を検討した。ALS発症前、発症後早期、発症後後期の3期について代表的な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) の発現を解析すると、ALSモデルラット腰髄ではコントロールに比してCSPGの免疫反応が有意に亢進しており、中でも運動ニューロンが脱落してゆく前角およびその周囲の白質において顕著であった。このことから、ALS病態下の運動ニューロン周囲の細胞外微小環境は、軸索再生については非許容の状態であることが示唆された。したがって、このような細胞外微小環境を改善することは将来の再生医療において大変重要なことである。現在、さらにCSPGの分解作用を持つコンドロイチンナーゼABCをALSラットの髄腔内に投与することによってコンドロイチン硫酸を酵素的に分解できる結果を得ている。これらの処置をすることによりALSの将来的治療である再生医療をより効果的に推進することが期待される。

おわりに

本稿ではALSの新規治療薬の開発に向けてHGFの髄腔内持続療法が大いに期待されることをALSラットの実験系で示した。また、現在この療法をALS患者さんに臨床応用すべく幾つかの準備を行なっている。まずその一つとしてHGF製剤のGMP基準を充たした産生はすでに大阪大学にて可能になっている。次に、このHGF製剤を用いて臨床応用に向け安全性試験は現在慶應大学でマーモセットを用いたヒト型HGF髄腔内持続投与を行ない、安全用量と至適期間を確認しつつある。今後は更にGLP基準をクリアするための安全性試験を行なわねばならず、高額な資金と労力が求められており、臨床応用に向けて大きな難題が山積しているというのが現状である。

最近、アメリカで「命の番人 (His brother's keeper)」という書籍が出版された。これはALSに罹患した弟に対して新規治療法を急ぎ応用させるために、遺伝子治療から神経幹細胞治療に至るまでの適用をさせるべく努力した兄弟の物語である。アメリカにおいてですらALSの新規治療薬の開発が極めて難しいことを知らされた。俗に基

礎研究の成功から臨床応用への橋渡し研究 (トランスレーショナルリサーチ) の開発や研究は「死の谷」と表現されることがある。この時期の研究評価が乏しく資金供給が乏しい「死の谷」を越えるべくトランスレーショナルリサーチ支援推進事業というものが現在の日本では大いに求められている。そこに対して神経治療学会が将来的に大きな役割を果たすことが切望される。

謝辞：本稿で述べた研究内容に関しては以下の諸先生方の研究結果によるものであり、心から感謝致します。

東北大学神経内科の青木正志先生・割田 仁先生・石垣あや先生・水野秀紀先生・永井真貴子先生 (現・岡山大学神経内科)・加藤昌昭先生・松本有史先生、大阪大学組織再生医学の船越 洋先生・中村敏一先生、慶應義塾大学生理学の岡野栄之先生、同大学整形外科の中村雅也先生。また本研究は厚生労働科学研究費補助金の援助を得ている。

[註]

(一般名)	(商品名)
riluzole	リルテック

文 献

- 1) Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y et al : Mild ALS in Japan associated with novel SOD mutation. (published erratum appears in Nat Genet 6 : 225, 1994) Nat Genet 5 : 323-324, 1993
- 2) Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al : Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362 : 59-62, 1993
- 3) Deng HX, Heutati A, Tainer JA et al : Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. Science 261 : 1047-1051, 1993
- 4) Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y et al : Familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Japan associated with H46R mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene : a possible new subtype of familial ALS. J Neurol Sci 126 : 77-83, 1994
- 5) Gurney ME, Pu H, Chiu AY et al : Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science 264 : 1772-1775, 1994
- 6) Nagai M, Aoki M, Miyoshi I et al : Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis : associated mutations develop motor neuron disease. J Neurosci 21 : 9246-9254, 2001

- 7) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M et al : Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342 : 440-443, 1989
- 8) Sun W, Funakoshi H, Nakamura T et al : Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci* 22 : 6537-6548, 2002
- 9) Ishigaki A, Aoki M, Nagai M et al : Intrathecal delivery of HGF from the ALS onset suppresses disease progression in rat ALS model. *J Neuropathol Exp Neurol* (in press)
- 10) Kato S, Funakoshi H, Nakamura T et al : Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) : immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. *Acta Neuropathol (Berl)* 106 : 112-120, 2003

Challenge to Develop a New Therapeutic Approach for Amyotrophic Lateral Sclerosis

Yasuto ITOYAMA

Department of Neurology Tohoku University School of Medicine

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a late onset, slowly progressive and ultimately fatal neurodegenerative disease, caused by the loss of motor neurons in the brain and spinal cord. ALS is thought to be one of the most relentless neurological diseases. The cause of ALS remains unknown, but a mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) gene is thought to be one of most likely causes. Unfortunately, there are no effective medicines for this disease. In order to develop a new therapeutic method or medicines for ALS, we invented a new ALS rat model, SOD1 transgenic rat, which is 20 times larger in size than the mouse ALS model. Hepatocyte growth factor (HGF), which was discovered by Professor Nakamura in Osaka University, is known to have a potent neurotrophic effect on motor neu-

rons through c-Met receptor. Our recent experimental trial in which HGF was continuously administered to ALS rats by an intrathecal route after the onset of disease showed significant effects on the clinical course and histopathological findings. ALS rats in the HGF group survived 1.6 times longer than those in the placebo group. Moreover, an expression of HGF and c-Met was immunohistochemically observed in spinal motoneurons in sporadic ALS patients as well as familial ALS patients with SOD1 gene mutation. For the clinical application of HGF for patients with ALS, we began to determine the safe doses and duration of HGF medication or possible side effects using marmosets. In future, genetical treatment and neural stem cell transplantation are promising for new treatment for ALS.