

200731043A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・治療法に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 祖父江 元
(名古屋大学大学院医学系研究科教授)

平成20(2008)年3月

目 次

I. 総括研究報告

筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・治療法に関する研究

主任研究者 祖父江 元 …………… 1

II. 研究報告(分担研究者)

1. 孤発性ALS線虫モデルの開発 祖父江 元 他 …………… 7
2. ALSラットモデル脊髄におけるコンドロイチン硫酸の役割 糸山 泰人 他 …… 11
3. 胚性幹細胞、神経幹細胞を用いた神経系の再生医学 岡野 栄之 …………… 17
4. ADAR2コンディショナルノックアウトマウスにおける運動ニューロン死と孤発性ALS 郭 伸 …………… 20
5. 変異SOD1による家族性ALSに対する治療用薬物/低分子化合物のハイスループットスクリーニングシステムの開発 高橋 良輔 …………… 23
6. オートファジーによる運動ニューロン疾患の治療法の開発 田中 啓二 …………… 24
7. AAVベクター脳内投与における安全性 中野 今治 他 …… 29
8. ALSに対するHGFの治療解析—
HGFはALSにおける発症末期のグリオシスを抑制する 船越 洋 …………… 31

III. 研究報告(研究協力者)

9. EGF+FGF2髄腔内投与によるALSモデルマウス脊髄での内在性未分化神経幹細胞および神経前駆細胞増殖の試み 阿部 康二 …………… 35
10. キサンチン脱水素酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物を含有することを特徴とするALS治療薬の開発とその基盤研究 加藤 信介 …………… 37
11. 孤発性筋萎縮性側索硬化症患者ゲノムのCNV (copy number variation) 解析 加藤 丈夫 他 …… 44
12. ALS患者の脳脊髄液中シスタチンCの検討 菊地 誠志 他 …… 46
13. 変異SOD1の修飾を介した神経毒性発現機構の解析 佐古田三郎 …………… 49

14. SOD1のCys111残基の酸化とALS治療ターゲットへの可能性	谷口 直之 他 ……	51
15. ALS病態進行遅延を目指したポリオウイルスベクターの開発	野本 明男 ……	55
16. Angiogeninを標的とした筋萎縮性側索硬化症 モデルマウス作製の試み	水澤 英洋 他 ……	57

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. ワークショップ・班会議プログラム

VI. 研究者一覧

VII. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

総括研究報告

筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・治療法に関する研究

主任研究者：祖父江 元

(名古屋大学大学院医学系研究科細胞情報医学専攻 脳神経病態制御学講座神経内科学 教授)

研究要旨：本研究班では、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を克服するため、基礎系、臨床系研究者を結集し集約的な研究の推進体制を構築している。本研究の目標は、病態に関連する新規標的分子の探索同定による病態解明、新規治療法・治療手段の開発、孤発性ALS新規疾患モデルの開発であり、三者の研究を有機的に結合させることによって成果の生産性を向上させた。まず、新規標的分子の探索同定・ALS病態解明の分野では、CNV(copy number variation)が発症に係わることを示し、診断マーカーとしての髄液シタチンC濃度測定の有用性を明らかにした。また、オートファジーが病態に果たす役割を解明し大きな成果を得た。さらに、高銅親和性、酸化型SOD1の立場より変異SOD1の神経細胞毒性発現機序の解明を行った。新規治療法開発では、低分子化合物モニタリングシステムの開発に加え、新規低分子化合物をマウスに投与しその有効性を確認した。また、遺伝子治療に向けて、AAVベクター、ポリオウイルスベクターの安全性確保を目指して改良、開発を行い臨床応用への道筋をつけることに成功した。HGFによる治療法開発は臨床応用に近い段階にまで到達しており、その有効性の根拠を示すことができた。さらに、大きな期待が寄せられる再生療法へ向けての展開では、マウスES細胞からのニューロスフェア誘導と動物への移植に成功し、ヒトES細胞や人工多能性幹細胞(iPS細胞)による研究にも着手している。一方で内在性神経幹細胞の活性化、軸索再生許容環境の構築をねらった治療法開発も行った。さらに、逆行性軸索輸送を司るdynactin1、グルタミン酸受容体サブタイプであるGluR2のQ/R部位RNA編集酵素であるADAR2、血管新生因子であるangiogeninをターゲットとし、これらの発現を抑制することによって孤発性ALSの病態をシミュレートする新規動物モデルの開発を行った。これらの多岐に渡る研究成果には、分担研究者、研究協力者間の共同研究、情報交換が重要な役割を果たした。

分担研究者

糸山 泰人(東北大学大学院医学系研究科神経学講座神経内科学分野教授)
岡野 栄之(慶應義塾大学医学部生理学講座教授)
郭 伸(東京大学大学院医学系研究科臨床神経精神医学講座神経内科学分野准教授)
高橋 良輔(京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学分野教授)
田中 啓二(東京都臨床医学総合研究所所長代行)
中野 今治(自治医科大学内科学講座神経内科部門教授)
船越 洋(大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学講座分子組織再生分野准教授)

研究協力者

阿部 康二(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経病態内科学講座神経内科学分野教授)
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)
加藤 丈夫(山形大学医学部器官病態統御学講座生命情報内科学分野教授)
菊地 誠志(国立病院機構札幌南病院神経内科診療部長)
佐古田 三郎(大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学専攻情報統合医学講座神経内科学分野教授)

谷口 直之(大阪大学微生物病研究所疾患糖鎖学(生化学工業)教授)

野本 明男(東京大学大学院医学系研究科微生物学講座教授)

水澤 英洋(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学講座神経内科学分野教授)

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンの選択的細胞変性死によって発症後3〜5年で死に至る神経難病である。ALSに対する有効な治療法は未だ確立しておらず、患者本人のみならず家族や社会にも重大な苦痛と損失を伴う疾患であり、一刻も早い克服が望まれている。本疾患の進行を阻止し有効な治療法の開発に結びつけるためには、基礎・臨床を問わずALS研究者を結集し、集約的な研究を推進していく体制を構築する必要がある。

本研究班の目的は、ALSの病態に基づく治療法の開発に向けて、ALSの病態を担う病態関連分子を探索・同定し、これを基に有効な分子標的治療を開発することである。病態関連分子の同定は本症の分子マーカーの開発や、有効な診断法の開発にもつながるものである。

平成19年度も前年度に引き続き、病態に関連する新規標的分子の探索同定による病態解明の分野では、発症および診断に係わるマーカーの同定、オートファジーの役割解明、変異SOD1の神経細胞毒性の発現機序解明を目指した。また、新規治療法・治療手段の開発では、遺伝子治療に向けたデリバリーシステムの確立、低分子化合物、肝細胞増殖因子(HGF)による治療法開発に加え、再生療法へ向けての基礎的研究を推進した。さらにALS病態関連分子を標的とした3種類の孤発性ALS疾患モデル開発に取り組んだ。

B. 研究方法

研究内容をサブセクション毎に主任および分担研究者の各テーマに沿った独自の研究を進展させつつ情報交換を密に行い、研究組織としての有機的協力態勢を強化した。

【発症および診断に係わるマーカーの同定】

孤発性ALSの発症や病態に関与する疾患感受性遺伝子を明らかにする目的で、ALS患者11例、非ALS患者63例のDNAにつき、CNV(copy number variation) chipを用いてゲノムワイドに

CNV解析を行った。

また、ALSの早期確定診断のためのバイオマーカーとしての髄液シスタチンCの有用性をALS患者14名、多発末梢神経障害患者13名、その他疾患16名から採取した髄液を用いてヒトシスタチンC測定ELIZAキット(R&D)で解析した。

【オートファジーのALS病態に果たす役割解明】

オートファジー不能マウスの作成と解析を通じてオートファジーと神経変性の関係を明らかにする。特にユビキチン陽性封入体の形成に関わる新規分子の同定を試み、その解析を通じて封入体形成の分子機構解明に取り組んだ。

【変異SOD1の神経細胞毒性の発現機序解明】

高銅親和性獲得におけるシステイン残基の役割、および銅親和性の違いによる変異SOD1の細胞毒性の違いなどを明らかにすることを目指した。

また、SOD1に及ぼす酸化ストレスの影響を検討し、ALSへの酸化ストレスの関与を明らかにするための手段を探ることを目的とし、SOD1の酸化におけるCys111の役割を検討した。

【低分子化合物による治療法開発】

変異SOD1ゲノムを用いて内在性promoter制御下に分泌型ルシフェラーゼを発現するベクターを構築、ヒトグリア細胞株にそのベクターを導入し恒常的に発現するクローンを樹立する。そして、ハイスループットスクリーニングを行い変異SOD1の転写を抑制する低分子化合物を同定することを目的とした。

また、ALSストレスに対するHGF/pcMetシステムの解明中に偶然発見した、キサンチン脱水素酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物である2-(3-シアノ-4-イソブトキシフェニル)-4-メチル-5-チアゾールカルボン酸、2-(3-cyano-4-isobutoxyphenyl)-4-methyl-5-thiazolecarboxylic acidの治療効果を検討した。

【遺伝子治療に向けたデリバリーシステムの確立】

パーキンソン病の遺伝子治療として、実際に AAV ベクターをヒト脳内に投与した臨床症例について、PCR 法によりベクター投与後の体液中のベクターゲノムの有無を、また、AAV に対する血中中和抗体価の変動を検討した。さらに、臨床研究と同じ構成の AAV ベクターをマウス脳内に投与し、2 週間以後に LAM-PCR を使用して、ベクターゲノムのマウス染色体への組み込みの検出を試みた。

ALS 発症阻止効果を示す遺伝子を発現させるベクターとして運動ニューロンに感染するポリオウイルス (PV) に着目し、ジシストロニックゲノムにより、毒性を発現することなく HGF や XIAP の発現が可能なベクターの構築を試みた。PV ゲノムのキャプシド領域に外来遺伝子を挿入し、これを PV の IRES で、また RNA 複製用の蛋白質領域は EMCV の IRES で発現するようなベクター構築を行った。

【肝細胞増殖因子 (HGF) による治療法開発】

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。このマウスを用いて ALS 依存的なグリオシスの HGF による制御機構を解析した。

【ALS 再生療法へ向けての基礎的研究】

マウス ES 細胞から胚様体を介して、一次ニューロスフェア (ニューロンのみ)、二次、三次ニューロスフェア (ニューロンのみならずグリア細胞) を誘導し、脊髄損傷モデルマウス (C57/BL6) に移植した。移植は、損傷による炎症が収まり、グリア癒痕を形成する前の損傷後 9 日目に行い、細胞の生着、分化および動物の運動機能の改善について免疫組織化学、および BBB スコアを用いて評価を行った。

一方、脊髄における内在性神経前駆細胞を活性化することを目的に、再生誘導因子 EGF と FGF-2 を ALS モデルマウスの髄腔内に投与した。BrdU 陽性細胞の phenotype の検討のために、抗 BrdU 抗体と未分化神経前駆細胞に対する抗 PSA-NCAM 抗体、ミクログリアに対する抗 Iba1 抗体による二重免疫染色を行った。

また、再生誘導療法開発を念頭に、その障害となる軸索再生阻害因子に注目し、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の発現を ALS ラットモデル脊髄において解析し、さらに発症後の *in vivo* におけるコンドロイチン硫酸 (CS) 分解効果を検討した。

【孤発性 ALS 疾患モデルの開発】

孤発性 ALS 患者脊髄で観察される分子動態を反映するモデルを作成する目的で、運動ニューロン特異的な遺伝子発現プロファイルの詳細な解析により神経変性初期から発現変化を示すことが明らかとなった dynactin1 の遺伝子発現変化を線虫に展開した。

また、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集を特異的に触媒する酵素 ADAR2 の運動ニューロン選択的コンディショナルノックアウトマウスを作成し、この分子異常と神経細胞死との関連性を明らかにし、孤発性 ALS モデルマウスとして機能しうるかを検討した。

さらに、我々の開発した新規 shRNA 発現 AAV ベクターを用い、家族性および孤発性 ALS の新しい原因遺伝子 angiogenin (ANG) の複数の発現を一度に抑制する ANG-siRNA トランスジェニックマウスの作製を試みた。

【倫理面への配慮】

採取した剖検組織等については、遺伝子解析を含む医学研究への利用についてのインフォームド・コンセントを患者および患者家族より得た。剖検組織等のヒト由来試料を用いる研究については名古屋大学をはじめ、各分担研究者が所属する研究施設の倫理委員会から承認を得た。組み替え DNA 実験を行う際には、「遺伝子組み換え生物等の使用などの規制による生物の多様性の確保に関する法律」などに基づき、各研究者が所属する研究施設での組み替え DNA 実験規定に従った。また実験動物の取り扱いについては、カルタヘナ条約および、各研究施設の動物実験指針に基づいた。ヒト ES 細胞の使用については、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成 14 年 11 月 7 日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認を受けている。

C&D. 研究結果と考察

【発症および診断に係わるマーカーの同定】

複数のゲノム領域において、ALS患者と対照者間で種々のCNV (copy number variation) に有意差を認め、例えば、locus-xのマーカーは、対照者の86% (n=54) で2コピー、14% (n=9) で3コピー、一方ALSでは全例 (n=11) が3コピーであった。これにより、孤発性ALSの発症に特定のCNVが関与している可能性、またはCNV領域にALSのリスクとなる遺伝子が存在する可能性が考えられた。

髄液シスタチンC濃度は、ALS $5.5 \pm 0.3\text{mg/L}$ 、多発末梢神経障害群 $6.7 \pm 0.4\text{mg/L}$ 、疾患コントロール群 $6.9 \pm 0.3\text{mg/L}$ であり、ALS群が他の2群に比し有意に低下していた。ALS診断のための生化学マーカーは存在しないことから、この知見は診断の一助になるとと思われる。

【オートファジーのALS病態に果たす役割解明】

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同定したp62はユビキチン化蛋白質と相互作用し、さらに自己凝集能を有する。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機能を有すると推定された。また、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、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。

【変異SOD1の神経細胞毒性の発現機序解明】

変異SOD1では遊離システイン残基が修飾を受け、コンフォメーション変化を介してモノマー化し、銅との親和性亢進による酸化ストレスなどを介して神経細胞毒性に関与する可能性が考えられた。この高銅親和性SOD1の神経細胞毒性のメカニズムをさらに詳細に検討する必要があるとともに、その出現の抑制による新規治療法の開発が期待される。

変異SOD1のCys111はマイルドな酸化条件下でも酸化されやすく、スルホン酸 (SO_3H) に酸化された。Cys111を2-MEで修飾したSOD1は酸化分解や凝集を起こしにくく、2次元電気泳動で見られる数多くのチャージアイソマー生成も抑えられることがわかった。さらに、ALS

モデルマウスにおいて、病変部位である脊髄に酸化型SOD1の沈着が認められたことより、Cys111の酸化が病態形成に重要な役割を果たしており、有効な治療ターゲットになりうると考えられた。

【新規治療薬のスクリーニング】

変異SOD1のpromoter制御下に分泌型ルシフェラーゼを発現するヒトグリア細胞細胞株のいくつかのクローンを樹立し、サザンブロットイングにより高copy数が導入されたヒトグリア細胞細胞株を同定した。このクローン上清中のルシフェラーゼ活性は最も高値を示した。今後、このクローンを用いて変異SOD1転写活性を抑える低分子化合物をスクリーニングする。

また、研究過程において偶然発見した2-(3-シアノ-4-イソブトキシフェニル)-4-メチル-5-チアゾールカルボン酸、2-(3-cyano-4-isobutoxyphenyl)-4-methyl-5-thiazolecarboxylic acidは、プラセボ投与に比較し、SOD1モデルマウスの発症を 99.9 ± 2.4 日 \rightarrow 112.0 ± 4.6 日に、生存期間を 119.7 ± 3.3 日 \rightarrow 136.4 ± 3.3 日に、脳期間を 20.8 ± 2.3 日 \rightarrow 25.4 ± 3.2 日に延長し、優れた治療効果を示した。

【遺伝子治療に向けたデリバリーシステムの確立】

両側被殻に総量 3×10^9 vector genomeの2型AAVベクターを定位脳手術的に注入した2例について、術後連続3日間の全血・血清・尿においてベクターゲノムは検出せず、AAVに対する中和抗体の有意な上昇を認めなかった。また、AAVベクターゲノムのマウス染色体への組み込みは検出されず、episomalに2本鎖の環状DNAとして存在すると推察された。これらよりAAVベクターの安全性が確認された。

今回作製したポリオウイルスの発現ベクターのゲノムは、いずれもRNAレプリコンとしての活性を持ち、このレプリコンをゲノムとして持つウイルス粒子を感染させた細胞内には、HGFまたはXIAPの発現が見られた。これにより、ポリオウイルスベクターによる分泌型蛋白質の発現に世界で初めて成功した。

【肝細胞増殖因子(HGF)による治療法開発】

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や反応性アストロサイトの増加といった発症後の疾患進行を規程する因子を抑制することを意味し、その有効性の根拠となると考えられた。

【ALS再生療法へ向けての基礎的研究】

マウスES細胞から誘導した主にニューロンを生み出すニューロスフェアと、ニューロンおよびグリア細胞を生み出す二次ニューロスフェアを脊髄損傷マウスに移植すると、二次ニューロスフェアを移植した群において、脊髄の萎縮や脱髄の程度が減少し、運動機能の改善が見られた。このことは、神経再生において、特にグリア細胞が大きな役割を果たしている可能性を示唆していた。さらに、マウスiPS細胞やヒトES細胞からも*in vitro*におけるニューロスフェアの誘導を行っている。

ALS Tgマウスでは内在性神経幹細胞の増殖は後角よりも前角で活性化しており、EGF+FGF2投与により、BrdU+nestin二重陽性細胞、さらにはわずかではあるが、BrdU+PSA-NCAM二重陽性細胞数も増加し、内在性神経幹細胞の活性化に成功した。

再生機転の障害となりうる軸索再生阻害因子に関してはその代表的因子、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)のALSラットモデル脊髄での発現は、発症前より亢進し進行性であった。これに対してコンドロイチナーゼABCを発症後の髄腔内に持続投与したところ、CSの酵素的分解が確認でき、前角の新生細胞増加が認められた。再生誘導戦略においては、このような軸索再生許容環境の構築をねらった治療法開発が細胞補充と同時に重要であると考えられた。

【孤発性ALS疾患モデルの開発】

変異SOD1トランスジェニックマウスやラットは正確には家族性ALSの疾患モデルであり、孤発性ALSの病態をそのまま反映しているわけではない。

そこで、孤発性ALS患者脊髄運動ニューロンの変性過程初期に発現低下を示す分子とし

て同定したdynactin1を線虫においてノックダウンし疾患モデル作成を試みた。この結果、*dnc-1*ノックダウン群は生存率の短縮、首振り回数の低下、水中でのむち打ち回数の低下、運動ニューロンの機能障害と変性を示唆するCoiler uncoordinatedの表現型、さらにventral cordの形態異常を認めた。今後、線虫モデルの利点を生かした孤発性ALSの効率的な病態解明が進むことが期待される。

また、我々は同じく孤発性ALS患者脊髄運動ニューロンにおける観察で、グルタミン酸受容体サブタイプであるGluR2のQ/R部位RNA編集が選択的に低下していることを報告してきた。RNA編集酵素ADAR2を運動ニューロン選択的にノックアウトしたマウスでは脊髄前角の未編集型GluR2が増加し、RNA編集が欠落した運動ニューロンに選択的な細胞死を引き起こした。また、緩徐進行性の運動機能選択的な行動異常、生存期間の短縮が認められた。このマウスモデルは孤発性ALSの重要な病態を反映する優れたモデルとして重要な役割を果たすものと考えられる。

ANG-siRNAトランスジェニックマウスの作製では、マウスに複数存在するANGを効率よく抑制するANG-siRNAを作成後、これをES細胞に導入し、抑制効果の異なる5つのクローンを選択した。これをマウス胚盤胞期胚に導入し、キメラマウスの作製に成功した。孤発性ALS患者でもANG変異が報告されている点、またANG変異を伴うALS患者は典型的なALSの経過を示すことが多いことから、本マウスが完成すれば孤発性ALSの疾患モデルとして機能することが期待される。

E. 結論

本研究が目的とするALSの病態に基づく治療法の確立は今世紀の最も重要な課題の1つであり、本疾患に対する有効な治療法の開発は、我々神経疾患の研究に携わる者にとっての使命である。本研究によって新規治療法開発へ向けてのALSの病態解明がさらに進み、新たな分子標的が次々と明らかになった。

また、低分子化合物による治療、さらには将来、重要な治療法になりうる遺伝子治療、再生治療についてもより優れたデリバリーシステム

や効率的な再生システムを構築することができた。さらに孤発性ALSの疾患モデルの開発研究も順調に推進することができた。

本研究班が目指すALSという難治性疾患に対する分子標的治療の開発は患者や家族にとっても大きな希望をもたらすものである。さらに、運動ニューロンの過酷な変性死の機序解明へ向けてのチャレンジは他の神経変性疾患研究に対しても重要なインパクトを与えると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, N., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131, 1149-1163.

他の研究発表は別掲

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

発明の名称：筋萎縮性側索硬化症治療薬

特願2006-196343

PCT/JP2007/000765

他の出願・登録状況は研究報告(分担研究)に別掲

II. 研究報告(分担研究者)

孤発性ALS線虫モデルの開発

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)

研究協力者：和座 雅浩¹⁾、田中 章景¹⁾、黄 哲¹⁾、蔣 月梅¹⁾、
勝野 雅央^{1,3)}、曾根 淳¹⁾、飯島 正博¹⁾、井口 洋平¹⁾、
山田 新一¹⁾、山本 正彦²⁾

¹⁾名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学

²⁾愛知学院大学 心身科学部 健康科学

³⁾名古屋大学大学院高等研究院

研究要旨：孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)は現在もその病因は不明のままであり、病態関連分子に関する情報が乏しく疾患モデルが存在しないことが。我々は孤発性ALS患者脊髄から、レーザーマイクロダイセクションによる運動ニューロンのサンプリングにより、運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成、そ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は、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。今年度は、この遺伝子変化をin vivoモデルとして線虫に展開したところ、神経組織特異的なdynactin1遺伝子ノックダウンは線虫運動ニューロン変性を誘発した。dynactin1遺伝子発現レベルの低下は、ALS発症の上流に位置する重要なイベントであると考察され、孤発性ALSの病態の一部を反映するモデルになる可能性がある。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)に関する研究においては、約10%をしめる遺伝性ALSの一部のものは原因遺伝子が同定され、そのトランスジェニックマウスモデルの作成により一定の成果が得られている。しかしヒトALS患者のほとんどを占める孤発性ALSについては、現在もその病因は不明のままであり、より病態を反映した優れた動物モデルの作成が切望されている。

これまでに我々は孤発性ALS患者脊髄から、レーザーマイクロダイセクションにより運動ニューロンを単離することにより、運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成、4845遺伝子中、コントロール例に比べ有意な発現上昇を示す52遺伝子(1%)、発現低下を示す144遺伝子(3%)を同定することに成功した。こうした発現変化の中でも、その発現動態や神

経変性マーカーとの関係を詳細に検討することにより、dynactin1の遺伝子発現低下が、神経変性過程の初期よりしかもユニバーサルに生じていることを昨年度までに明らかにした。孤発性ALSのモデルを作成するにあたり、このような神経変性過程の比較的上流に位置する病態をシミュレートすることが重要と考えられる。本年度は培養細胞モデル及び線虫モデルにおいて、dynactin1の選択的な発現量低下が、運動ニューロン変性を誘発するかを検証する。

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。コントロール群として、線虫とは無関係な LacZ 遺伝子を標的とした shRNA を発現させた。また、運動ニューロンの同定及び shRNA の導入の確認を容易にするために GFP を共発現させた。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

【ALS病態関連分子の発現動態】

A. 残存運動ニューロン数との関連

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

B. ニューロフィラメント H (NFH) 蓄積との関連

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

で発現レベルが低下していた。

ALS 運動ニューロン特異的な発現変化をきたした遺伝子のうち、発現上昇が見られた遺伝子は 54、発現低下が認められたものは 144 であった。発現変化をきたした遺伝子の real time RT-PCR および in situ hybridization または免疫組織学的にも発現変化を確認した。これらの結果、*dynactin1* の遺伝子発現変化は、ALS 発症の早期のイベントであると考察した。

【ALS培養細胞モデルの作成と解析】

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, caspase3 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。

【ALS線虫モデルの作成と解析】

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 *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2つの

研究グループから既に報告されている Kamath RS et al, Nature, 2003; Sonnichsen B et al, Nature 2005)。これでは成虫期の神経細胞の形態変化を観察することができず、神経変性疾患のモデルにはなりがたい。胚性致死を回避するためにL1期にfeedingやsoakingにより生体外から二本鎖RNAを取り込ませる手法が考えられるが、こうした手法によるノックダウン効果は神経組織では極めて乏しいことが明らかにされている。神経系でも十分なRNA干渉効果が得られやすい *rrf-3* 等の変異体を用いる方法も考えられるが (Simmer F et al, PLoS Biol 2003)、brood sizeが小さいなどの変異表現型を持っているため、神経変性疾患モデルとして最適とは言い難い。

これらの問題を解決するために神経特異的なプロモータ支配下にshRNAを発現させる Neuro-specific Transgenic RNAi法は、組織特異的な遺伝子抑制効果を可能にしており、また従来の数百bpのdsRNAを導入する方法に比べてオフターゲット効果のリスクを回避できる可能性が高く、単一の遺伝子抑制効果を検証するには最適な手法といえる。ま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と言え、その発症要因に何らかの遺伝子の loss of functionを想定した神経変性疾患の線虫モデル作成にあたっては、非常に有用な手法になると思われる。本手法は簡便性の点ではこれまでのRNAi法に劣るものの、今後の神経変性疾患線虫モデル作成におけるRNAi法の主流のひとつになると思われる。

本研究の研究対象である dynactin1 はそのパートナープロテインである dynein とともに逆行性軸索輸送を制御するモーター蛋白質であり、効率的なタンパク輸送を担っていることが知られている。dynein 遺伝子変異によりマウスに (Hafezparast M et al. Science 2003)、また dynactin1 遺伝子変異によりヒトに運動ニューロン障害をおこすことが知られている (Puls I et al. Nat Genet 2003)。しかし、これらの遺伝子変異は孤発性ALSに共通するものではない。本

研究は dynactin1 遺伝子の変異ではなく、ヒトALSで明らかとなったその発現レベルが下がることが、運動ニューロン変性を誘発することを証明しており、ALS病態をより忠実に反映していると言える。

一方で我々は、ALSと同じく運動ニューロン病に分類される球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) においても、dynactin1 の発現レベルの低下が発症早期に認められることを、SBMA トランスジェニックマウスを用いた解析により証明している。孤発性ALSにおいて、何故運動ニューロンが選択的に障害されるかは不明のままであるが、運動ニューロンは長い軸索を持っており、軸索輸送の機能低下の影響を特に受けやすいことが知られており、dynactin1 の発現レベルの低下による軸索輸送の障害は、運動ニューロンの脆弱性を説明するひとつの理由になると思われる。

現在我々は、dynactin1 ノックダウンによる細胞死メカニズムをさらに詳細に解析し、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り、ALS発症の上流に位置する重要なイベントであると考察される。また dynactin1 遺伝子ノックダウンモデルは、孤発性ALSの少なくとも一部の病態を反映していると予想され、病態解明のための有用な動物モデルとなりうる可能性を秘めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jiang YM et al, *Ann Neurol* 57: 236-251, 2005.
- 2) Waza M et al, *Nat Med* 11, 1088-1095, 2005
- 3) Tanaka F et al. *Ann NY Acad Sci.* 1086:1-10, 2006
- 4) Katsuno M et al, *J Neurosci.* 26:12106-12117, 2006
- 5) Yamada S et al, *J Biol Chem.* 281: 23842-23851, 2006

- 6) Jiang YM et al, *J Neuropathol Exp Neurol* 66. 617-627, 2007
 - 7) Niwa J et al, *J Biol Chem* 282. 28087-28095, 2007
 - 8) 田中章景ら, 難病と在宅ケア 13巻, 66-69, 2007
2. 学会発表
- 1) Tanaka F et al, *17 th International Symposium on ALS/MND*, Yokohama, Japan, Oct 2006
 - 2) Katsuno M et al, *17 th International Symposium on ALS/MND*, Yokohama City, Japan, Oct 2006
 - 3) Tanaka F et al. *The 4th Asian Congress of Hyperthermic Oncology (ACHO)*, Nara City, Japan, tember 2006
 - 3) 勝野雅央ら, 日本神経学会 名古屋, 2007年
 - 4) 田中章景ら, 日本神経学会 名古屋, 2007年

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ALSラットモデル脊髄におけるコンドロイチン硫酸の役割

分担研究者：糸山 泰人 (東北大学大学院医学系研究科神経内科学 教授)
研究協力者：割田 仁¹⁾, 水野 秀紀¹⁾, 青木 正志¹⁾, 岡野 栄之²⁾

¹⁾東北大学神経内科, ²⁾慶応義塾大学生理学

研究要旨：ALSの画期的治療となり得る再生誘導療法開発を念頭に、本研究は再生機転促進に有利な細胞外微小環境の構築を目的とした。細胞外基質の主要構成成分で代表的な再生阻害因子でもあるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CS-PG)の発現は、ALSラットモデル脊髄で発症前から進行性に運動ニューロン周囲に沈着亢進していた。なかでも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。そこで発症後のALSラット髄腔内にコンドロイチン硫酸(CS)分解酵素を持続投与すると、脊髄に沈着するコンドロイチン硫酸の分解とともに新生細胞の増加、NG2陽性前駆細胞、未成熟神経細胞の増加が認められた。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。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)は運動ニューロン変性による進行性筋萎縮と筋力低下を主徴とし、発症からわずか数年で呼吸筋麻痺に至るきわめて予後不良な難治性神経疾患である。現在有効な治療がないため新規治療法開発が強く望まれており克服すべき疾患の代表である。従来ALS研究は運動ニューロン自体の異常に焦点がおかれてきたが、近年グリア細胞による運動ニューロン毒性を示した報告が複数なされ運動ニューロンをとりまく細胞外微小環境が注目されている。また再生誘導において細胞補充につづく再生ステップ(軸索伸長促進や細胞遊走、シナプス新生による神経回路への機能的組み込み)を実現するためには、細胞外微小環境に存在する再生阻害因子を無視することができない。

このような中で昨年度、我々は自ら開発したALSの新しい動物モデル、ヒト変異Cu/Zn SODトランスジェニックラット(以下Tgラット)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)の発現亢進を報告し、さらにコンドロイチン硫酸(chondroitin sulfate, CS)分解による介入研究の端緒を報告した。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。

本研究では昨年度に引き続いて変性脊髄におけるCS-PGの意義を明らかにするため、ALS様病態進行によるCS-PGの発現変動、その分子種による相違、発症後のALSラットモデル脊髄における*in vivo*のCS分解効果についてより詳細に検討した。

B. 研究方法

実験1. CS-PG・各分子種の発現解析

東北大学神経内科で系統維持している雌性

His46Arg 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ソフトウェアを使用した。

また、異常蛋白質凝集、異常リン酸化ニューロフィラメント蓄積を検索して病態進行を評価するためのニューロン (Hu C/D), ubiquitin (Ub), リン酸化ニューロフィラメント M/H (pNF) に対する三重免疫組織化学、CS-PG 発現と関連する細胞種を特定するための各種細胞選択的マーカーと CS-PG による二重免疫組織化学を加え、CS-PG と同様に半定量的に評価した。さらに、上述の各病期におけるラット新鮮腰髄を深麻酔下に素早く摘出し急速凍結 (各群 n=3)、必要に応じ CS 分解酵素 (コンドロイチナーゼ ABC, ChABC) による前処理を行った上で常法に則り蛋白質を抽出して免疫ブロッティングに供した。得られた各 CS-PG コア蛋白定量結果を比較検討した。

実験 2. *in vivo* における CS 分解効果の検討

発症後 2 週経過した Tg ラット (27 週齢) を ChABC (20U) 投与群 (ChABC 群) と生理食塩水のみを投与するコントロール群 (各群 n=5) に分け、浸透圧ポンプにより腰髄髄腔内に持続投与した。髄腔内投与を行う 7 日の間、同時に新生細胞を標識するためチミジン類似体 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) も浸透圧ポンプにより皮下持続投与した。

投与終了翌日、深麻酔下に灌流固定・浸漬固定後の腰髄凍結切片を作成、以下の (多重) 蛍光免疫組織化学を実験 1. と同様に行い半定量的解析を加えた。

(a) 実験 1. と同じ 3 種の CS-PG、(b) 再生阻害因子として知られるミエリン関連蛋白 3 種 (MAG

(myelin-associated glycoprotein)、Nogo-A、OMgp (oligodendrocyte myelin glycoprotein))、(c) 幼若神経細胞 (PSA-NCAM) とニューロン特異的マーカー (Hu C/D)、(d) BrdU と各細胞種選択的マーカー、(e) 再生軸索やシナプスのマーカー (GAP-43, synaptophysin)、(f) 変性病態とアストロサイト増生 (Ub, pNF, GFAP)。

[倫理面への配慮]

すべての遺伝子操作は東北大学 DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は同動物実験指針に従った上で動物愛護面に十分配慮しかつ利用動物数を極力減らすように努めた。

C. 研究結果

実験 1. CS-PG 各分子種の発現変動

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 (図 1A)。これに伴い Ub 陽性凝集体も有意かつ進行性に増加し (図 1B)、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 (図 2)。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 (図 2) 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

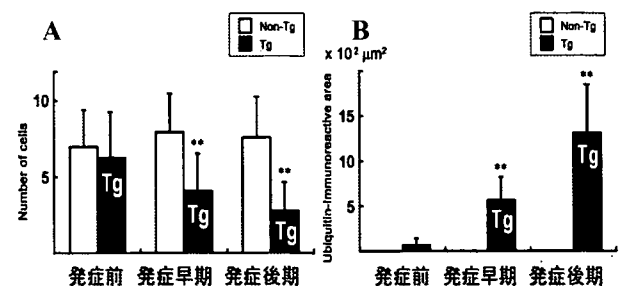


図 1. ALS ラットモデル腰髄前角における進行性変性
A. 前角細胞数：発症早期から有意な進行性減少を認める。B. Ub 陽性面積：発症早期から有意かつ進行性の増加を認める。(平均 ± SD, **p<0.01, one-way ANOVA with post hoc test)

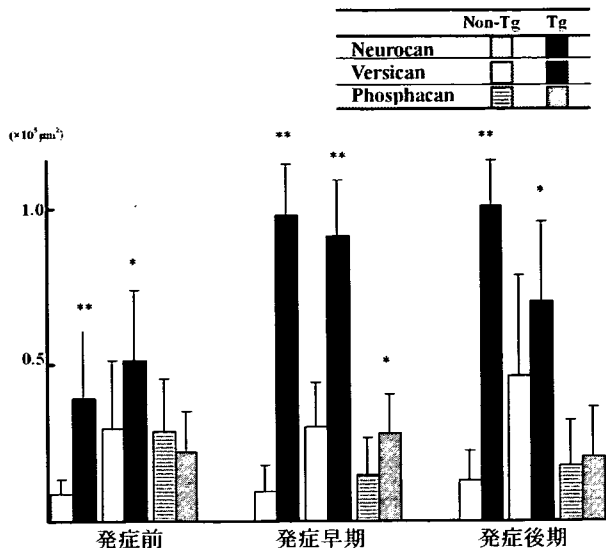


図2. ALSラットモデル腰髄前角におけるCS-PG免疫反応陽性面積

Tgラットでは発症前からneurocanの有意な進行性発現亢進を認め、versicanも同様な亢進を認めるがピークは発症早期にみられた。phosphacanは発症早期にのみ有意な亢進を示し、分子種よる差異が明らか。(平均±SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, one-way ANOVA with post hoc test)

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2)。

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(図3A)。

一方でphosphacan、versicanに関しても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(図2)。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(図3B, C)。

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。

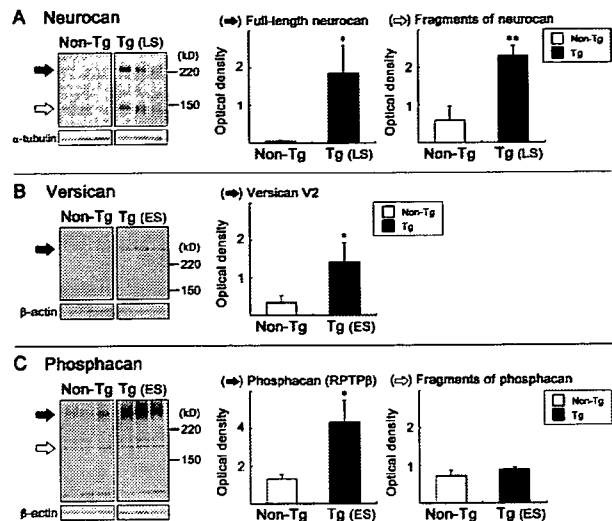


図3. ALSラットモデル腰髄におけるCS-PG免疫ブロッティング

A. 発症後期Tgラットにおける全長型neurocan、断片型neurocanの発現亢進、B, C. 発症早期におけるversican V2およびphosphacan (RPTP β)の有意な発現亢進。以下本文。(平均±SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, t-test)

実験2. *in vivo*におけるCS分解効果

ChABC投与群腰髄ではCS分解効果が確認され、CS沈着がコントロールに比して有意に減少していた(昨年度報告)。免疫組織化学的に各種CS-PGコア蛋白への影響をみると、ChABC投与群ではneurocanが軽度増加(前角)、versicanは不変(前角・白質)、phosphacanは有意に減少しており(前角・白質)、これも分子種によって差異が認められた(図4)。一方、CS-PGとは異なる再生阻害因子・ミエリン関連蛋白について同様に検討すると、CS分解効果の高い白質においてMAG、Nogo-A、OMgpのいずれもChABC投与群で有意に増加し、前角においてもNogo-AがChABC投与群で増加しており、CS分解に伴う代償性変化が示唆された(図4)。

また、腰髄前角の新生細胞を検討するとBrdU陽性の新生細胞はChABC投与群で有意に総数が増加しており(昨年度報告)、なかでもNG2陽性前駆細胞とIba-1陽性マクログリアが有意に増殖していることが明らかとなった。さらに、GAP-43については有意差がなかったものの、PSA-NCAM/Hu C/D二重陽性の未成熟ニュー

ロンと synaptophysin 陽性像が ChABC 投与群で有意に増加していた。最後に変性病態への影響を検討すると、ChABC 投与群で明らかな腰髄前角細胞脱落の促進は認められず、Ub 陽性異常蛋白質凝集体や pNF 蓄積、GFAP 陽性のアストロサイト増生も両群間で有意差がなく、明らかな変性病態への影響は認められなかった。

D. 考察

実験1.により、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(昨年度報告)。これらは本年度の免疫プロットニングに

よっても確認された。

さらに本年度 CS-PG の発現変動をより詳細に検討した結果、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

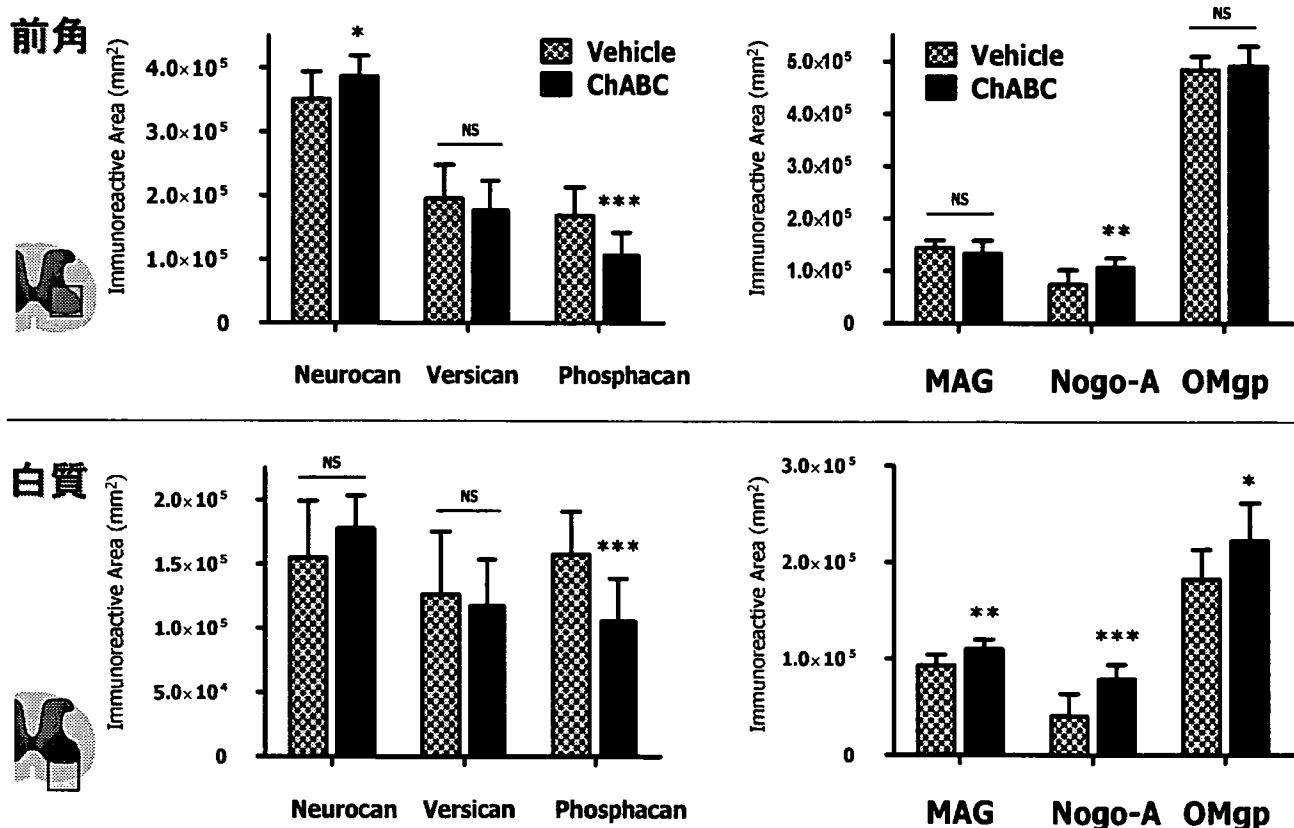


図4. 髄腔内にコンドロイチン硫酸 (CS) 分解酵素 (ChABC) を持続投与した ALS ラットモデル腰髄

(上段が前角、下段がその周囲白質)における CS-PG コア蛋白(左グラフ: neurocan, versican, phosphacan) とミエリン関連再生阻害因子 (MAG, Nogo-A, OMgp) の免疫組織化学(陽性面積を対照 (Vehicle) 群と比較)。本文参照。(平均±SD, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, NS: not significant, one-way ANOVA with post-hoc test)

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、本研究においても実験1.で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。

実験2.によって、このような過度に蓄積したCS-PGを*in vivo*で酵素的に分解することで、その意義を解明することを試みた。CS-PGの再生阻害能はCS、あるいはコア蛋白そのものの両者によって発揮される。ChABCはこのCSを分解するだけでなく、細胞外基質に存在してCS-PGが結合する足場となっているヒアルロン酸についても軽度で分解することから、間接的にCS-PGコア蛋白にも影響し得る。CS分解が確認されたTgラットではphosphacan以外のCS-PGコア蛋白蓄積には明らかな変化を伴わなかったが、前角における新生細胞、とくにNG2陽性前駆細胞やマイクログリアの増加が明らかとなり、さらに幼若神経細胞やsynaptophysin陽性シナプスの増加も明らかとなった。これらの結果から、ALSラットモデル病態下での過度なCS(-PG)発現を抑制することで変性脊髄における内在性の再生機転(前駆細胞増殖・分化・遊走・シナプス可塑性など)を促進し得る可能性が示唆された。

また、ChABC投与群で明らかな変性病態の増悪が認められなかったことは重要である。この結果から、本研究のような短期間かつ局所的なCS分解酵素投与によって病態悪化をもたらさずに再生許容環境構築を実現し得ることが示された。

最後に、とくにCS分解効果の高かった白質においてミエリン関連再生阻害因子の発現亢進がChABC投与群で認められ、CS分解に伴う代償的反応である可能性が示唆された。したがって、将来的にはグリア増生そのものの調節や

CS-PGの内在性分解酵素、液性因子、CS-PG発現の細胞内調節メカニズムなどに対するアプローチも広汎な再生許容環境構築には重要と考えられる。

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沈着は病態初期において神経保護的にはたらく可能性を否定できないが、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り、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* 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) Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama