

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. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1. 特許登録

ラットを用いた ALS モデル (出願済)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

胚性幹細胞、神経幹細胞を用いた神経系の再生医学

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し、ALSモデルラット(SOD1^{G93A}トランスジェニックラット)に移植すると*in vivo*での生着と分化が見られたが、さらに、脊髄損傷モデルマウスに移植したところ、*in vivo*で、やはりニューロンおよびグリア細胞に分化し、また運動機能の回復が見られた。現在、ヒトES細胞や人工多能性幹細胞(iPS細胞)からもニューロスフェアを誘導する方法を構築し、神経再生への応用を行っている。

A. 研究目的

これまでの研究で、胚性幹細胞(ES細胞)から誘導した、発生早期の、運動ニューロンをも生み出すことのできる特異性を持つ神経系前駆細胞/幹細胞(ニューロスフェア)を、発症直前のALSモデルラットの脊髄に移植すると、生着し、*in vivo*でコリン作動性ニューロンに分化し得ることを示してきた。しかし、このモデルにおいては、十分な生存期間が得られず、機能回復までには至らなかった。

そこで、このES細胞由来ニューロスフェアを脊髄損傷モデルマウスに移植し、*in vivo*における分化能、および運動機能改善へ寄与し得るかどうかを評価する。さらに、ヒトES細胞やiPS細胞からのニューロスフェアの誘導を行い、神経再生医療へ応用する。

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ことができる。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る。また、EB形成時に後方化因子であるレチノイン酸(RA)を低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、さらに後方化させたNS/PCsを誘導することができる。これまでの研究で、この発生早期の特異性を持ち、運動ニューロンをも生み出すことのできる一次ニューロスフェアをALSモデルラットの脊髄に移植すると、生着し、コリン作動性ニューロンに分化しうることを示してきたが、運動機能の回復までは観察することができなかった。

そこで、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、低濃度RAを作用させて作成した、主にニューロンを生み出す一次ニューロスフェア、また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免疫組織化学、および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や倫理的問題を回避するために、人工多能性幹細胞(iPS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19年10月31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、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

まず、生きた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 (CBRLuc) 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-CBRLuc-IRES-Venus)。この細胞から低濃度 RA を用いてニューロンを主に生み出す一次ニューロスフェア、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誘導し、脊髄損傷後9日目のモデルマウスに移植し、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) を行い、さらに組織学的評価を行った。IVISを用いた解析では、一次ニューロスフェア、二次ニューロスフェアを移植した群において、それぞれ、最初の1週間で生着細胞数は減少するものの、6週間後には、約20%程度の細胞が生着し、異常な腫瘍性の増殖は見られなかった。また、組織学的解析においては、二次ニューロスフェアを移植した群では、一次ニューロスフェア移植群に比べて *in vivo* においてもグリア細胞への分化傾向が強く見られ、さらに、PBS注入群や一次ニューロスフェア移植群に対し、脊髄の萎縮や脱髄の程度が軽減し、5-HT陽性ファイバーが多く見られた。さらに、BBBスコアを用いた運動機能解析では、二次ニューロスフェア移植群において優位な機能改善がみられた。これらの結果は、ES細胞由来NS/PCs、特に、そこから生み出されるグリア細胞が脊髄損傷の機能的な改善に対し 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) の誘導系を作成した。このヒトES細胞由来ニューロスフェアは、継代して二次、三次以降の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神経系の細胞 (主にニューロン)

を生み出し、電気生理学的解析により、機能的なニューロンであることが示された。

さらに、細胞移植治療における免疫学的拒絶反応や、ES細胞の持つ倫理的問題を回避するために、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) を用い、この細胞からも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た。また、やはり接着培養で分化させるとニューロンおよびグリア細胞が生み出されることを見出した。

今後は、さらにヒトES細胞やヒトiPS細胞を用いた神経再生への応用を行っていく予定である。

D. 考 察

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、さらに運動機能の改善が見られた。これは、ES細胞由来NS/PCsの細胞移植が、神経系疾患において機能改善に寄与できることを示す結果であった。また、疾患や損傷における神経再生において、特にグリア細胞が、その機能改善に大きな役割を果たしている可能性を示唆していた。

また、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。iPS細胞は、倫理的問題や免疫学的拒絶の問題を解決するための、ヒトES細胞は将来の臨床応用の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、ヒトiPS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、ALSや脊髄損傷などの神経疾患における神経再生を目指した研究を進めていく予定である。

E. 結 論

マウスES細胞から誘導したニューロスフェアを脊髄損傷マウスに移植したところ機能改善がみられた。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た。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

- 1) 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
- 2) 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 *isll* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Developmental Biology* 278 (2) : 587-606. 2005
- 3) 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
- 4) 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

- 1) 岡田洋平、松本有史、石井聖二、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、ES細胞由来神経幹細胞／前駆細胞の時間的・空間的特異性制御、第28回日本炎症再生医学会、東京、2007年8月
- 2) 岡田洋平、松本有史、石井聖二、島崎琢也、祖父江元、岡野栄之、ES細胞由来神経幹細胞/前駆細胞の時間的・空間的特異性制御、第25回日本ヒト細胞学会、東京、2007年8月
- 3) Yohei Okada, Arifumi Matsumoto, Takuya Shimazaki, Amane Koizumi, Ryosuke Enoki, Seiji Ishii, Yasuto Itoyama, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Four-dimensional recapitulation of central nervous system development by ES cell-derived neural stem/progenitor cells. CDB Joint forum, Kobe, September, 2007
- 4) Yohei Okada, Arifumi Matsumoto, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Four-

dimensional recapitulation of developing central nervous system by ES cell-derived neural stem/progenitor cells. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, San Diego, November 2007

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

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

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

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 准教授)
研究協力者：日出山拓人¹⁾，山下 雄也¹⁾，辻 省次¹⁾，高橋 良輔²⁾，三澤日出巳³⁾，鈴木岳之⁴⁾

¹⁾東京大学 神経内科，²⁾京都大学 神経内科，³⁾共立薬科大学 薬理学，⁴⁾同 基礎生物学

研究要旨：我々は孤発性ALSの脊髄運動ニューロンでグルタミン酸受容体サブタイプであるAMPA受容体サブユニットGluR2のQ/R部位におけるRNA編集異常が神経細胞死に関連する、疾患特異的な分子変化であることを報告してきた。GluR2 Q/R 部位のRNA編集はRNA編集酵素 adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) により特異的に触媒され、孤発性ALS脊髄ではADAR2 mRNA発現量が低下していること、ADAR2 欠損により興奮性神経細胞死が生ずることから、孤発性ALSにおけるADAR2活性低下、GluR2 Q/R部位のRNA編集低下は、神経細胞死に直接関連する分子変化である、という仮説を立てた。この仮説を検証するために、Cre-loxPシステムを利用して脊髄運動ニューロン選択的にADAR2をノックアウトする変異マウスを作製した。このマウスは、緩徐進行性の運動機能低下を示し、生存期間も正常対照マウスより有意に短く、単一運動ニューロンの検討でADAR2を欠損した運動ニューロンはGluR2 Q/R 部位のRNA編集を欠如するとともに緩徐進行性の細胞死が生じることを明らかにした。これは、我々の仮説を支持し、今回開発した変異マウスは、孤発性ALSの病因解明・治療法開発に有用なツールとなるものと期待される。

A. 研究目的

我々は、孤発性ALSの脊髄運動ニューロンに発現するAMPA受容体サブユニットGluR2のQ/R部位においてRNA編集を受けない未編集型GluR2(Q)が増加していることを明らかにした(1)この分子変化は、AMPA受容体のCa²⁺透過性を亢進させることにより神経細胞死を引き起こす一次的な原因になること(2)SOD1関連家族性ALS(ALS1)の運動ニューロンには見られない分子変化であること(3)これまで検討した30例以上の孤発性ALSと診断された症例全例に認められたこと(4)からALSの病因と密接に関連している疾患特異的な分子変化であると考えられる。そして、GluR2 Q/R部位のRNA編集はRNA編集酵素ADAR2(adenosine deaminase acting on RNA type 2)により特異的に触媒され、孤発性ALS前角組織のADAR2 mRNA発現量が正常対照に比し有意に低下しているため、ADAR2の酵素活性低下がGluR2 Q/

R部位のRNA編集異常及び運動ニューロン死を引き起こしている可能性が高い。我々は、この仮説を検証するためにADAR2のノックアウトマウスの開発した。しかし、全身的ADAR2ノックアウトマウスは、GluR2 Q/R部位の編集が10%に低下し、痙攣重積で生後20日以内に死亡し(5)このような非特異的な痙攣死を避けるために、ADAR2を脊髄運動ニューロン選択的にノックアウトする変異マウスを作製し、ADAR2活性低下により、GluR2 Q/R部位のRNA編集低下、および孤発性ALSに見られる緩徐進行性の運動ニューロン死が生じるかどうかを検証した。

B. 研究方法

ADAR2をコンディショナルにノックアウトするためにCre-loxP系を用いて、変異マウスを作成した。ADAR2の活性基であるdeaminase domainを2個のLoxPで挟んだ変異アリルをホ

モに持つマウス (ADAR2^{flx/flx}) を作成し、運動ニューロン選択的に Cre recombinase を発現する2系統の変異マウス (VChT-Cre.Fast および -Cre.Slow) (6) との交配により、ADAR2^{flx/flx}/VChT-Cre.Fast と -Cre.Slow を作製した。これらの変異マウス系統は、小胞性アセチルコリントランスポータのプロモーターに依存して Cre を発現するので、運動ニューロンで ADAR2 の欠失が起こると考えられる。本研究では ADAR2^{flx/flx}/VChT-Cre.Fast (以下、Fast 系、n=25)、ADAR2^{flx/flx}/VChT-Cre.Slow (以下、Slow 系、n=33) を用いた。対照として、VChT-Cre および ADAR2^{flx/flx} マウス (各 n=10) を野生型マウスとともに用いた。

ADAR2^{flx} 遺伝子の組み替えの有無を in situ hybridization 法、PCR 法を用いて検討し、生後4週以降、運動機能をロータロッド (10rpm)、上肢牽引力により判定した。抗リン酸化ニューロフィラメント抗体 (SMI32)、抗 ADAR2 抗体の二重染色を用いた免疫組織化学により運動ニューロン数の経時変化を計測した。対照として、VChT-Cre および ADAR2^{flx/flx} マウスを用いた。

[倫理面への配慮]

実験方法については東京大学医学部研究倫理委員会の承認を得、動物実験倫理規範に基づいて行った。

C. 研究結果

約40%の運動ニューロンでは、ADAR2^{flx} 遺伝子に Cre 発現依存性に組み換えが起こり、不完全長 ADAR2 mRNA を発現していることを ISH、PCR 法にて確認した。これらの運動ニューロンでは ADAR2 タンパクが発現していないことを免疫組織化学で確認し、更に GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が全く起こらず、未編集型の GluR2 mRNA のみが発現していたことより、ADAR2 活性も消失していることを確認した。このようにこのコンディショナルノックアウトマウスは、予測通り Cre 依存性に ADAR2 遺伝子のノックアウトが生じ、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が欠如することを確認した。

ロータロッドは、コントロール群は1年以上180秒可能であったが、Fast 系は5週目から、

Slow 系は8週目から低下が認められ、その後、経時的に低下していった。上肢牽引力も、Fast 系は10週目から、Slow 系は28週目から進行性の低下が認められた。このように緩徐進行性に運動機能の低下が認められ、生存期間もコントロール群に比べ有意に短縮した。SMI32 陽性前角運動ニューロンのうち、ADAR2 抗体陰性運動ニューロンのみが、2か月以降12か月にかけて約40%、緩徐に減少した。

D. 考察

これらのノックアウトマウスは、緩徐進行性に運動機能の低下が認められ、生存期間もコントロール群に比べ有意に短縮し、ADAR2 を欠如した運動ニューロンの変性・脱落が緩徐進行性に認められた。つまり、このノックアウトマウスは、ADAR2 活性が欠如したことによる未編集型 GluR2 の増加により、進行性の運動ニューロン死を伴う運動機能低下を示したと考えられる。したがって、孤発性 ALS 運動ニューロンに生じている GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は神経細胞死の直接原因であり、この分子異常は ADAR2 活性の低下によると考えられる。

E. 結論

緩徐進行性の運動ニューロン死を引き起こす ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスを作成し、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常が孤発性 ALS における運動ニューロン死の直接原因であることを示した。このコンディショナルノックアウトマウスは孤発性 ALS のモデル動物として、今後の病因解明、治療薬の開発研究に有用なツールとなると考えられる。

文献

- 1) Kawahara Y, et al. : *Nature* 427: 801. 2004
- 2) Kawahara Y, et al. : *Neurosci Res* 54: 11-14. 2005
- 3) Kwak S, Weiss JH. : *Curr Opin Neurobiol.* 16: 281-7. 2006
- 4) 郭 伸ら : 厚労省変性班報告書. 2007
- 5) Higuchi, M. et al. : *Nature* 406, 78-81, 2000
- 6) Misawa, H. et al. : *Genesis* 37, 44-50, 2003

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山下雄也, 郭 伸: グルタミン酸受容体と神経細胞死, 神経変性疾患のサイエンス, 高橋良輔編, 南山堂, 91-102, 2007
- 2) 日出山拓人, 郭 伸: 孤発性ALSの病因, 難病と在宅ケア2007年6月号, 7-10, 2007
- 3) 日出山拓人, 郭 伸: 孤発性ALSと興奮性アミノ酸, *Clinical Neuroscience* 26巻3号, 印刷中
- 4) 日出山拓人, 郭 伸: 筋萎縮性側索硬化症のAMPA受容体仮説, *Annual Review* 2008神経, 212-221

2. 学会発表

- 1) 日出山拓人ら, 第48回神経学会総会, 2007年5月16日, 名古屋
- 2) Hideyama T, et al: *17th Meeting of the European Neurological Society*, Rhodes, Jun 16-20, 2007
- 3) 郭 伸: 日本薬物動態学会ビジョン・シンポジウム「薬効・毒性・動態 個人間変動の新機軸: Inventions and Innovations in Interindividual Variability of Drug Efficacy, Toxicity and Disposition」, Tokyo, July 19-20, 2007
- 4) Kwak S: Japan-Korea Neuroscience Symposium “Cutting Edge of Neuroscience”, Yokohama, September 13, 2007
- 5) 日出山拓人ら, 神経科学大会 (Neuro2007), 横浜, 2007年9月10日
- 6) 山下雄也ら, 神経科学大会 (Neuro2007), 横浜, 2007年9月10日
- 7) Yamashita T, et al, *37th Annual Meeting Society for Neuroscience*, San Diego, 3-7 November 2007, Abstr Neurosci 591.16, 2007
- 8) Hideyama T, et al, 18th ALS/MND International Symposium, Toronto, 2007年12月2日

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

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

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：家族性ALSの原因遺伝子の1つである変異SOD1の転写活性を抑制する薬物／低分子化合物を同定するためのハイスループットスクリーニングシステムを開発した。

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の原因タンパク質、変異SOD1の転写を抑制する低分子化合物を同定し、原因タンパク質の転写制御による治療法を開発する。FALS標的細胞における標的分子の発現モニタリングシステムを用いた治療法開発を目的とする。

B. 研究方法

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する。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し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。

C. 研究結果

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株clone#1を同定した。clone#1の上清中のルシフェラーゼ活性は最も高値を示した。今後、clone#1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。

E. 結論

FALS治療標的分子の標的細胞における発現モニタリングシステムを確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Igaki, T., Suzuki, Y., Tokushige, N., Aonuma, H., Takahashi, R., Miura, M. (2007) Evolution of mitochondrial cell death pathway: Proapoptotic role of HtrA2/Omi in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun.* 356:993-7.
- 2) Yamashita H, Kawamata J, Okawa K, Kanki R, Nakamizo T, Hatayama T, Yamanaka K, Takahashi R, Shimohama S. (2007) Heat-shock protein 105 interacts with and suppresses aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase; clues to a possible strategy for treating ALS. *J. Neurochem.* 102:1497-505
- 3) Takahashi, R. (2007) The molecular pathway to neurodegeneration in parkin-related parkinsonism. In *Protein Degradation*, eds. Mayer, R.J., Ciechanover, A.J. and Rechsteiner, M. Wiley-VCH, Weinheim, pp195-210.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

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によって細胞質成分を飲み込んだ小胞(オートファゴソーム)がリソソームと融合することによって内容物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。オートファジーが発見された1960年前後から今日に至るまでの長い間、酵母などの下等単細胞生物においては、オートファジーは飢餓に応答した生存戦略が唯一・究極の働きと考えられてきた。しかしながら、我々は条件的にオートファジーが不能となるマウス($Atg7^{Flox/Flox}$)を作出、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失させた $Atg7^{Flox/Flox};Nes$ 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。その結果‘恒常的オートファジー’の重要性に対する認識が国内外で高まった。さらに興味深いことに、オートファジーが欠損した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)が蓄積してくることを見出し、我々はユビキチン化した不良品蛋白質を選択的に分解する‘選択的オートファジー’経路が存在することを提唱してきた。本年、我々はマウスの遺伝学的研究から、この選択的オートファジー経路に関与するキー分子としてp62モレキュルを同定することに成功すると共にp62/Sqstm1がオートファジーの破綻による観察される封入体形成に不可欠な役割を担っていることを突き止めた。

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(所謂封入体)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(アミロイド様蛋白質)が毒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の解明とその阻止手段の開発に貢献するための重要なポイントになると思われる。

封入体形成については、これまでユビキチン・プロテアソームシステムの破綻が主な原因であることが、プロテアソーム阻害剤を用いた実験や遺伝学的解析から明確になってきており、世界的にもコンセンサスを得ていると言っても過

言でない状況である。しかし同時に、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であるオートファジー(自食作用: Self-eating)・リソソーム系の破綻が非分裂細胞である肝細胞(1)や神経細胞(2)内でのユビキチン陽性封入体の形成に関係するという新概念をオートファジーの遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルの研究から提唱してきた(3, 4-8)。

しかし、凝集体の蓄積(封入体形成)に関する報告は、数多くあるものの凝集体・封入体形成の分子機構は、今日に至るも全くの謎であった。そこで、選択的オートファジーの分子機構を解明する研究から、本年、選択的オートファジー経路に関与するキー分子としてp62モレキュルを同定すると共に封入体形成におけるp62の必須な役割について構造生物学的手法を駆使して検討した(3)。

B. 研究方法

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

ターゲットベクターの作製とES細胞のスクリーニングは、文献1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およびサザンブローディングにより確認した。最終的にヘテロマスを交配して条件的Atg7欠損ホモマウス (Atg7^{Flox/Flox}) を作製した(1)。

「中枢神経系特異的オートファジー不能マウス (Atg7^{Flox/Flox}:Nes) の作製」

Atg7^{Flox/Flox}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^{Flox/Flox}:Nes) を作製した(2)。

「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^{-/-}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教授のグループから供与された。

「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^{Flox/Flox}:Nesマウス) と p62^{-/-}マウスを交配して作製した(3)。

「組織化学的及び免疫組織化学染色解析」

Atg7^{Flox/Flox}: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- μ 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% OsO₄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: in vivoとin vitroの解析

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の作動に必須な蛋白質)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(Komatsu, M. et al. Cell 131,1149-1163, 2007)。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構成分子の一つであることが少なからず報告されている。

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蛋白質を用いたインビトロでのImmunoprecipitation (IP) /Western分析でも確認された(Komatsu, M. et al. Cell 131,1149-1163, 2007)。さらにごく最近、我々はLC3と相互作用するp62のドメインをdeletion mutantsを作製して同定、最終的に12アミノ酸からなる領域(p62の中央部)を突き止めた。そしてこのペプチドとLC3の共結晶化に成功、X線を用いた立体構造(四次構造)の解析に成功した。その結果、LC3とp62の物理的相互作用の実体が原子レベルで明らかとなった(市村/小松ら、論文投稿中)。

【結果2】封入体形成におけるp62の役割の解明

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共局在を示した。またp62はLC3と共にリソソーム機能の阻害剤(E64dやペプスタチン:リソソーム・プロテアーゼであるカテプシン群の阻害剤)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や中枢神経系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の細胞質(大きな封入体の多くは、核近傍に存在)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んで処理する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(Komatsu, M. et al. Cell 131,1149-1163, 2007)。

【結果3】p62のノックアウトマウスの解析

p62^{-/-}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- κ Bシグナリングの阻害)のosteoclastogenesisの障害が観察された(石井ら、未発表データ)。これらの結果は、Moscat's groupの報告(Dev Cell 6, 303-309, 2004)と同じであった。

一方、p62欠損MEFs細胞を用いた解析から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p62欠損においても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(Komatsu, M. et al. Cell 131,1149-1163, 2007)。

【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(Komatsu, M. et al. Cell 131,1149-1163, 2007)。

【結果5】p62が選択的オートファジーのキーモレキュルであることの証明

我々は[結果1]で述べたようにLC3-p62ペプチドの立体構造の解明から、両分子の相互作用に関わるLC3のアミノ酸残基の同定に成功した。この相互作用の構造情報に基づいて当該アミノ酸残基に置換変異を導入(p62のアミノ酸変異も同様に導入)すると、IP/Westernで解析した相互作用は阻害された。[結果4]で示したようにp62とAtg7の同時欠損は、Atg7欠損即ちオートファジー欠失によって引き起こされる封入体を抑制するが、これはin vitro細胞系でも再現できた。即ち野性型のp62の発現はAtg7欠損によって生じる封入体形成に必須であったが、LC3と相互作用できない変異p62は封入体形成を阻止した。この結果はp62とLC3の相互作用がp62を介したユビキチン化蛋白質のオートファジー系への移行に必須であることを示している。即ちp62は選択的オートファジーのキーモレキュルであることが世界で初めて証明された(市村/小松ら、論文投稿中)。

D. 考 察

本研究において我々は、マウス遺伝学的解析から 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蛋白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 (オートファジー)・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蛋白質の凝集体形成を引き起こす中心的な分子であることを証明した。

これの結果から、細胞内に発生した異常蛋白質の処理においては、これまで知られていた (1) 分子シャペロンによる再生、(2) プロテアソームやオートファジーによる分解 (クリアランス・細胞内浄化) という手段以外に、(3) p62 依存的に凝集体 (封入体) を形成して隔離することが重要な戦略の一つであることが示唆された。即ち、異常に累積したユビキチン化蛋白質が再生や分解できない場合 (あるいはそれらの蓄積が過剰になった場合)、それら自身には凝集する能力はないが、p62 の C 末端側・UBA ドメインに会合し、p62 の自己凝集能 (N 末端側の PB1 ドメイン) を利用して封入体を形成すると推定できる。これは、異常な障害性蛋白質を封入体の中に隔離することによって細胞の恒常性を維持監視する細胞内の品質管理手段と考えられる。

しかし、この異常蛋白質の隔離手段は諸刃の剣 (危険なシステム) であり、封入体を形成する前段階のアミロイド (変性蛋白質のオリゴマー) 状態は強い細胞毒性を發揮する。このために封入体形成が迅速・適切におこなわれないと、アミロイド様蛋白質が主因となって肝実質細胞やニューロンなどの非分裂細胞を激しく傷害し、組織変性を誘発すると考えられる。実際、オートファジー欠損マウスのように急激な蛋白質のクリアランス異常は、p62 経路による封入体形成が間に合わず障害性異常蛋白質の蓄積を引き起こし、細胞死を誘発すると考えられる。p62 が存在しない場合、アミロイド様蛋白質の蓄積を免れて一見正常な表現型を示す。しかしながら、この便宜的な手段では恒久的な細胞保護には適応できず、実際に神経疾患のように長期間の後にこれらのクリアランス異常が累積すると、不可逆的な細胞死ひいては組織変性を誘発すると想定される。

E. 結 論

- 1) 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。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-末端に持っていることと N-末端側の PB1 ドメインに余って自己凝集できる能力を持っていることでユニーク分子である。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) ユビキチン化蛋白質を選択的に分解する経路が発見され、p62 がその選択性を担う分子であり、構造生物学的解析によってその分子的基盤を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Komatsu M., Wang QJ., Holstein GR., Friedrich VL., Iwata JI., Kominami E., Chait BT., Tanaka K.,

Yue Z. (2007) Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 14489-14494.

- 5) Komatsu, M., Kominami, E., and Tanaka K. (2006) Autophagy and neurodegeneration. *Autophagy*, 2, 315-317.
- 6) 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* 14, 887-894.
- 7) Sanjuan, M.A., Dillon, C.P., Tait, S.W.G., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J. L., Withoff, S., Green, D. R. (2007) Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450, 1253-1257
- 8) Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K., and Uchiyama, Y. (2008) Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after Hypoxic-Ischemic Injury. *Am. J. Pathol.* 172, 454-469.

2. 学会発表

- 1) Keiji Tanaka and Masaaki Komatsu : Protein Quality Control by Constitutive Autophag. The Ubiquitin Family (CSHS Symposium) : Quality Control. April 25 - 29, 2007, New York, USA.
- 2) Keiji Tanaka and Shigeo Murata : Discovery of thymus-specific proteasomes "thymoproteasomes" that regulate the development of CD8+T cells. COE INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2007 Inamori / Yamauchi Hall, Kyoto University. Friday, June 1st -2nd 2007, Kyoto, Japan
- 3) Keiji Tanaka : Discovery of Thymoproteasomes - Implication for Thymic Selection - 2007 Korea-Japan Joint Symposium in Seoul (September 5th) Seoul, Korea
- 4) Keiji Tanaka, and Shigeo Murata : Regulation of Thymic Selection by the Thymus-specific Proteasome "Thymoproteasome" EMBO CONFERENCE / Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Cellular Regulation September 22nd to 26th, 2007, Riva Del Garda, Italy
- 5) Keiji Tanaka and Masaaki Komatsu Pathophysiology of Constitutive Autophagy. The 20th Naito Conference / Innate Immunity in Medicine and Biology [III] (October 10 - 12, 2007) 湘南国際村センター, 神奈川
- 6) Keiji Tanaka : Discovery of Thymus-specific Proteasomes "Thymoproteasome" that regulate the Development of CD8+ T Cells. International

Symposium on Protein Modification and Degradation in Beijing, SPMDB 2007 (Beijing Friendship Hotel, Nov. 4-7, 2007) Beijing, China

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

AAV ベクター脳内投与における安全性

分担研究者：中野 今治 (自治医科大学内科学講座神経内科部門 教授)
研究協力者：村松 慎一¹⁾、水上 浩明²⁾、島崎久仁子³⁾、小澤 敬也²⁾

¹⁾自治医科大学神経内科, ²⁾同 遺伝子治療部門, ³⁾同 神経脳生理学部門

研究要旨：アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを使用して中枢神経に治療用遺伝子を導入した場合の安全性について検討した。パーキンソン病の遺伝子治療として、実際に AAV ベクターを脳内に投与した2症例では、ベクターゲノムが術直後に一時的に血液中に検出されたが、2日目以降は全血・血清・尿のいずれも検出されず、血中中和抗体の上昇も見られなかった。また、マウス脳内に投与した AAV ベクターゲノムの染色体への組み込みは、LAM-PCR 法などでは検出されなかった。

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) ベクターを応用して神経栄養因子 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) の遺伝子を持続的に発現させることにより運動ニューロンの脱落を抑制する方法を開発してきた。脳実質内への AAV ベクター投与の安全性について検討する。

B. 研究方法

- 1) 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、ベクター投与後に全血・血清・尿などの体液中のベクターゲノムの有無を PCR 法により経時的に評価した。また、AAV に対する血中中和抗体価の変動を HEK293 細胞に AAV-LacZ を感染させた際の遺伝子発現を指標として評価した。
- 2) 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。また、マウスにおけるヒト Alu 配列様繰り返し配列である B1 エlement をあらかじめ PCR で増殖させた場合と、Plasmid safe DNAase 処理後のウイルスゲノムコピー数の変化を解析した。

C. 研究結果

- 1) 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・尿のいずれにおいてもベクターゲノムは検出されなかった。また、AAV に対する中和抗体の有意な上昇を認めなかった。
- 2) LAM-PCR 法にて、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なかった。また、B1 エlement PCR によるウイルスゲノムコピー数の増加はなく、Plasmid safe DNAase 処理後もウイルスゲノムが検出された。(厚生労働省、文部科学省、環境省の認可を得ている。)

D. 考察

2007年7月に米国で、慢性関節リウマチの遺伝子治療として腫瘍壊死因子 TNF α :Fc 遺伝子を AAV ベクターによって関節内に注入した女性が、2回目のベクター投与後に死亡した事例が報告された。また、同じ頃、マウスの肝臓への AAV ベクターによる遺伝子導入で、肝細胞癌の発生頻度が高まることが報告され、AAV ベクターに対する安全性が問題になった。その後、TNF α :Fc の臨床試験における死亡原因は、合併したヒストプラズマ症によるもので、

AAVベクターとは無関係であることが明らかになっている。また、マウスの肝臓癌については、AAVベクターを投与していないマウスにおいても、8%という高率に肝臓癌を生じていることから、実験系の妥当性に疑問が残る。今回、パーキンソン病の遺伝子治療として脳内に高力価のAAVベクターを投与した2症例では、ベクター投与による副作用は認めておらず、中和抗体の上昇もなかった。マウスの実験結果からは、AAVベクターは、神経細胞内ではほとんど染色体に組み込まれずepisomalに2本鎖の環状DNAとして存在すると推察された。

E. 結論

AAVベクターの脳実質内投与は、定位脳手術による出血などのリスクを除き、AAVベクター自体の安全性は高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 河又千鶴、森田光哉、柴田亮行、中野今治：新しいSOD1遺伝子変異をみとめた家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の症例：剖検結果をふまえて。臨床神経学47 (5) : 211-216, 2007.
- 2) Ishikawa T, Morita M, Nakano I: Constant blood flow reduction in premotor frontal lobe regions in ALS with dementia –a SPECT study with 3D-SSP. *Acta Neurol Scand* 116: 340-344, 2007.

2. 学会発表

- 1) 浅利さやか, 西田紘子, 奈良優子, 滝野直美, 古寺美加, Wei-ZhongXiao, 佐々木康郎, 菊地哲, 松下卓, 岡田尚巳, 星美奈子, 小澤敬也, 中野今治, 村松慎一: 8型AAVベクターによる乏突起細胞へ高効率遺伝子導入. 第30回日本神経科学大会, 横浜, 2007年9月11日. (プログラム p124)
- 2) Muramatsu S, Ono F, Takino N, Nishida H, Asari S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Tsukada H, Terao K, Ozawa K and Nakano I. Long-term behavioral recovery in a primate model of parkinson's disease after gene transfer of dopamine-synthesizing enzymes. The Japan society of gene therapy's 13th annual meeting. Nagoya, June 29, 2007.

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ーススを抑制する

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：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ーススが知られる。最近、活性化ミクログリアの増加を伴うグリオーススが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運動神経細胞死を抑制する事を明らかとしてきたが、グリオースス、中でもミクログリオーススに対する作用は不明であった。本研究で、HGFがALSの病態末期に於けるミクログリオース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。

A. 研究目的

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・神経突起伸張作用を示すことを明らかにしてきた。そして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は脊髄および脳幹の広範な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、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。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依存的なグリオースス制御とその分子機構について解析を行った。

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、ALS依存的なグリオーススの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執権を実施する。

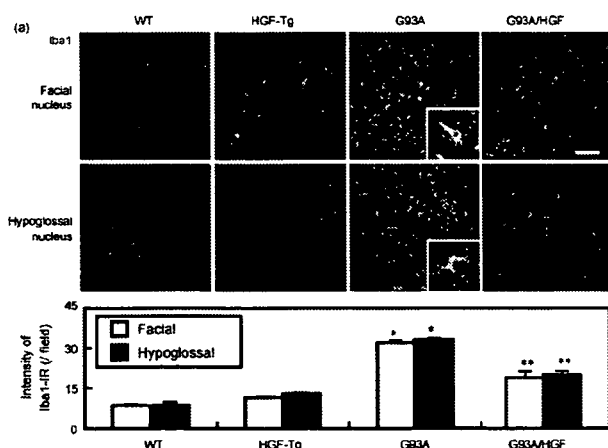
C & D. 研究結果および考察

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。

E. 結論

HGFはALS-Tgの神経細胞死を抑制することに加えて、今回新たに病態末期の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



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)

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。

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* (in press).
- 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

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および神経前駆細胞増殖の試み

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：前回の研究で、ALSモデルマウスであるSOD1 (G93A) Tgマウス脊髄では、発症時より神経幹細胞が増殖しており、増殖効果の高いEGF+FGF2投与により、その増殖が活性化されたことを確認した。今回、神経幹細胞の分化をより検討し、発症したALS脊髄ではEGF+FGF2投与により神経前駆細胞への分化が活性化され、それが前角で増加したことを確認した。

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主に存在し、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。昨年われわれは、ALSモデルマウスである、SOD1 (G93A) Tgマウスの脊髄での神経幹細胞の増殖、移動、分化について検討し、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、その効果を評価した。その結果、発症したALS脊髄では神経幹細胞の増殖は活性化しており、EGF+FGF2投与により、その増殖はさらに活性化され、灰白質では前角においてその数が増加した。また、神経幹細胞はアストロサイトには少し分化したが、成熟したニューロンには分化しなかった。

そこで本研究では、SOD1 (G93A) Tgマウスの脊髄にて、神経幹細胞のニューロン系への分化をさらに検討し、EGF+FGF2投与による、神経再生の可能性につき検討した。またグリア系のさらなる検討のため、ミクログリアの増殖につき検討した。

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 μ g) + FGF2 (4 μ g) 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。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。

[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。

C. 研究結果

BrdUとの二重免疫染色の結果は、前回行ったnestin、GFAPとの二重免疫染色の結果も踏まえて検討した。nestin、GFAP、PSA-NCAM、Iba1の4種類のマーカーの中では、EGF+FGF2投与の有無に関わらずTgマウス、Non-Tgマウスとも、BrdU陽性細胞の多くがnestinを発現し