

ており、次いでIba1、GFAP、PSA-NCAMの順に発現が多かった。

BrdU+PSA-NCAM二重陽性細胞数は、BrdU+nestin二重陽性細胞に比べるとわずかだが、Tgマウスにおいてやや増加しており、EGF+FGF2投与によりさらに増加したが、特に前角において増加した。

BrdU+Iba1二重陽性細胞数は、Tgマウス、Non-Tgマウスとも、BrdU+GFAP二重陽性細胞数より多く、Tgマウスの灰白質では後角よりも前角に多く存在した。EGF+FGF2投与をすると、Tgマウス、Non-Tgマウスとも、やや増加した。

D. 考察

Tgマウスの灰白質では、BrdU+nestin二重陽性細胞に比べるとわずかだがEGF+FGF2投与により、前角でのBrdU+PSA-NCAM二重陽性細胞は増加した。この結果は、SOD1遺伝子変異による運動ニューロン死での神経幹細胞から神経前駆細胞への分化、および前角での増殖の活性化はわずかだが、EGF+FGF2投与により増強されることを示唆している。

またTgマウス、Non-Tgマウスとも、BrdU+Iba1二重陽性細胞はBrdU+GFAP二重陽性細胞よりも多いことから、グリア系では、正常脊髄、ALS脊髄ともミクログリアのほうが、アストロサイトよりも増殖しやすいことを示唆している。

本研究では、EGF+FGF2投与により、発症したALS脊髄において、神経幹細胞から神経前駆細胞への分化が活性化し、神経前駆細胞が前角において特に増加することを示した。

E. 結論

発症したALS脊髄では神経幹細胞の増殖、前角への移動が活性化しており、EGF+FGF2投与によりそれはさらに活性化され、かつ神経前駆細胞への分化が進む。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohta Y, Nagai M, Nagata T, Murakami T, Nagano

I, Narai H, Kurata T, Shiote M, Shoji M, Abe K: Intrathecal injection of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes proliferation of neural precursor cells in the spinal cords of mice with mutant human SOD1 gene. *J Neurosci Res.* 84: 980-992, 2006

2. 学会発表

1) Yasuyuki Ohta, Makiko Nagai, Tetsuya Nagata, Tetsuro Murakami, Isao Nagano, Hisashi Narai, Tomoko Kurata, Mito Shiote, Yasushi Takehisa, Nobutoshi Morimoto, Kazunori Miyazaki, Tatsushi Kamiya, and Koji Abe. Intrathecal injection of EGF and FGF2 promotes proliferation of neural precursor cells in the spinal cords of ALS model mice. *Brain* '07, May 20-24, 2007, Osaka, Japan.

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

キサントニ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

研究協力者：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)
共同研究者：加藤 雅子¹⁾, 阿部 靖子²⁾, 西野 武士²⁾

¹⁾鳥取大学医学部分子病理学教室, ²⁾日本医科大学医学部生化学第一教室

研究要旨：キサントニ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として化合物(3)：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を、ALSモデル動物であるG93A点変異のヒト変異SOD1遺伝子を高コピー数(25コピー)過剰発現させたトランスジェニックマウスB6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur(G1H-G93Aトランスジェニックマウス)に、生後80日より5mg/kgの化合物(3)を連日経口に投与した。プラセボとしては化合物(3)の溶剤であるメチルセルロースを用い、生後80日より5mg/kgを連日経口に投与した。投与期間はそれぞれのG1H-G93Aトランスジェニックマウスが四肢麻痺を呈し瀕死状態に至るまでの期間である。臨床症候学的結果については、化合物(3)は、プラセボより、発症日を有意に遅延させる発症遅延効果(P<0.001、Mann-Whitney U検定)、生存期間を有意に延長させる生存期間延長効果(P<0.001、Mann-Whitney U検定)、病悩期間を有意に延長させる病悩期間延長効果(P<0.01、Mann-Whitney U検定)を認めた。運動負荷試験の結果については、化合物(3)は、プラセボより、伸展反射試験・傾斜面角度試験・フットプリント試験・ロタロッド試験・ビームバランス試験の各試験に関して、有意な有効効果(P<0.05、Mann-Whitney U検定)を示した時期が必ず存在していた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(以下、ALS)は、進行性の原因不明の疾患であり呼吸筋麻痺により死亡する致死運動ニューロン疾患として位置づけられ、有効な治療法確立が強く希求されている致死神経変性疾患の代表である。現在、ALS治療薬として販売されているのは、グルタミン酸受容体のアゴニストとしてグルタミン酸抑制作用のあるリルゾールのみである。しかしながら、リルゾールのみではALSに対する治療効果は十二分とはいえず、さらに新たなALS治療薬の開発が強く望まれている。かかる実状において、我々は、ヒト変異SOD1過剰発現トランスジェニックマウスを使用し、種々の薬物についてのALS治療作用を検討してきたところ、全く意外にも、キサントニン脱水素酵素阻害

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が、顕著に優れたALS治療作用を示すことを見出し、本発明を完成するに至ったので、当該化合物を特徴とするALS治療薬の開発とその基盤研究を研究目的とする。

B. 研究方法

I. 材料及び方法

1. 薬剤

以下の2種類を用いた。

- 1)キサントニ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として、化合物(3)：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を使用した。

2) 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る化合物として、アロプリノールを使用した。

2. 投与方法

1) 化合物(3)の濃度調整と投与量・投与方法は次の要領で行った。基剤として、0.5%メチルセルロースを作製する。化合物(3)5mgを瑪瑙製の乳鉢にてすりつぶした後、少量の0.5%メチルセルロースを加え、完全に懸濁させる。その後、徐々に少量の0.5%メチルセルロースを加え、最終的に10mLの0.5%メチルセルロースに化合物(3)5mgを懸濁させる。以上の方法により、5mg化合物(3)・0.5%メチルセルロース10mL(5mg/10mL)を作製し、化合物(3)をマウス体重1kg当たり5mg(5mg/kg)を1日1回経口的に投与した。

2) アロプリノールの濃度調整と投与量・投与方法は化合物(3)と同様にして行った。この方法により、5mgアロプリノール・0.5%メチルセルロース10mL(5mg/10mL)を作製し、アロプリノールをマウス体重1kg当たり5mg(5mg/kg)を1日1回経口的に投与した。

3) プラセボとしては、溶剤である0.5%メチルセルロースのみをマウス体重1kg当たり10mL(10mL/kg)、すなわち、薬剤投与マウスの溶剤と等容量を1日1回経口投与した。

経口投与の方法は、プラスチックシリンジにて正確に容量を測量し、プラスチックシリンジに直接マウス用胃ゾンデをつなげ、経口・経食道的に確実に投与した。

3. 実験動物

実験動物には、G93A点変異のヒト変異SOD1遺伝子を高コピー数(25コピー)過剰発現させた雄トランスジェニックマウスB6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur(G1H-G93Aトランスジェニックマウス, JR2726;Hemizygote)をJackson Laboratory(Bar Harbor, 米国)から購入し、使用した。同時に、その雄の野生型同腹仔マウスB6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur(Wild-type)もJackson Laboratoryから購入し、使用した。

4. マウスの臨床症候学的評価

マウスは毎日臨床症候学的評価を行った。臨

床症候学的評価は、Jackson Laboratoryから到着1週間後から施行した。マウスの臨床症候学的評価は、次に示した基準にて行った。ステージ0度=正常歩行が可能で、野生型同腹仔と同一俊敏性の行動をとれる。ステージ1度=不活発性、小刻みなふるえ(jittering/tremor)、尻尾挙上不全(limp tail)、俊敏性の欠如した緩徐歩行、一側性の軽度麻痺のいずれか一つ以上の臨床症状を呈した場合。ステージ2度=一側あるいは両側の後肢不完全麻痺を呈するが、前肢は正常。ステージ3度=両側後肢高度麻痺を呈するが、前肢はほぼ正常。ステージ4度=一側あるいは両側の前肢不完全麻痺を呈し、かつ両側後肢高度麻痺を呈する。ステージ5度=高度四肢麻痺を呈しているか、もしくは瀕死状態。発症日、生存期間及び病悩期間については日数を持って表示した。病悩期間の日数表示については、1日間(1病日間)とは発症(臨床症候学的評価のステージ1度を持って発症したとする)より24時間以内に相当し、2日間(2病日間)とは発症より24時間を過ぎてから48時間以内に相当するものとし、以下同様にして、発症後の病悩日数を決定した。

5. マウスの運動負荷試験

生後70日目より5日目ごとに、以下の5種類の運動負荷試験を施行し、各運動負荷試験における運動能力を評価した。すなわち、運動負荷試験施行日は、生後70日、75日、80日、85日…と5日目ごとであり、生存期間中は運動負荷試験を施行し、死後の評価は以下の5種類の各運動負荷試験の定義に基づいた。

1) 伸展反射試験

正常のマウスは、尾を持って空中に持ち上げると、両後肢の伸展反射が認められる。

マウスの伸展反射試験の評価は、次に示した基準にて行った。スコア0=両後肢の伸展反射が認められる。スコア1=どちらか一方の後肢の伸展反射が認められるのみで、反対側の後肢の伸展反射は認められない。スコア2=両後肢の伸展反射が認められない。死後の伸展反射試験評価はスコア2と定義する。

2) 傾斜面角度試験

傾斜面角度試験に用いた装置は、木製のボードを水平面より、それぞれ45度、65度、80度の

各角度に固定可能な装置である。各角度に傾けた木製ボードの上に頭を上方に向けてマウスを置き、下方に落ちることなく、そのポジションを5秒間維持させる。マウスの傾斜面角度試験の評価方法は、45度、65度、80度の各角度(A度)において、下方に落ちることないポジションを維持できた秒数(TA秒)を測定した後、角度(A度)と維持できた秒数(TA秒)との掛けた数値の総和： $\Sigma(A \times TA)$ を算定する。正常のマウスは、各角度に傾けた木製ボード上でそのポジションを5秒間以上維持可能であるので、 $\Sigma(A \times TA) = 80 \times 5 + 65 \times 5 + 45 \times 5 = 950$ 以上の値となる。マウスの傾斜面角度試験の評価は、次に示した基準にて行った。スコア0=950以上。スコア1=550を超え950未満。スコア2=225を超え550以下。スコア3=225以下。死後の傾斜面角度試験評価はスコア3と定義する。

3) フットプリント試験

マウスの両後肢を黒インク瓶の中に浸し、その後に白い紙の上を歩かせる。歩行後のマウスの両後肢のフットプリントを解析する。マウスのフットプリント試験の評価は、次に示した基準にて行った。スコア0=両後肢の歩幅がそれぞれ6cmを超え、且つ両後肢を引きずった所見を認めない。スコア1=両後肢を引きずった所見を認めないが、両後肢の歩幅がそれぞれ6cmを超えない。スコア2=一側の後肢を引きずった所見を認める。スコア3=両後肢を引きずった所見を認める。スコア4=歩行ができない状態。死後のフットプリント試験評価はスコア4と定める。

4) ロタロッド試験

ロタロッド試験に用いた装置(Rota Rod Treadmill 7600型、Ugobasile社、ミラノ、イタリア)は、直径3.6cmの回転軸であり、1分間にこの回転軸が16回転(1回転：3.75秒)するように設定してある。マウスをこの条件設定で作動させているロタロッド試験装置の回転軸上に置き、この回転軸から落下するまでの時間を測定する。ただし、60秒を超える時間に達したときは、ロタロッド試験を中止する。マウスのロタロッド試験の評価は、次に示した基準にて行った。スコア0=60秒を超える。スコア1=30秒を超え60秒以下。スコア2=4秒を超え30秒以下。スコア3=4秒以下。死後のロタロ

ッド試験評価はスコア3と定める。

5) ビームバランス試験

ビームバランス試験に用いた装置は、直径1.5cmの木製の円柱(梁：ビーム)を水平に保ち、30cmの距離にそれぞれ足場となるプラットフォームを設置したものである。マウスを一方のプラットフォーム上に置き、30cmの長さのビームを渡りきり反対側のプラットフォームに達する時間を測定する。マウスのビームバランス試験の評価は、次に示した基準にて行った。スコア0=10秒以下。スコア1=10秒を超え15秒以下。スコア2=20秒を超えか、あるいは落下する。死後のビームバランス試験評価はスコア2と定める。

6. プラセボ・薬剤投与方法による実験デザイン

プラセボ投与と化合物(3)及びアロプリノール投与方法とにより、3群に分けて実験を行った。すなわち、プラセボ投与実験群、化合物(3)投与治療実験、アロプリノール投与治療群の3群である。各群の詳細については以下に述べる。

1) プラセボ投与実験群：

G1H - G93Aトランスジェニックマウス10匹と野生型同腹仔マウス10匹とを使用した。両者ともに生後80日よりプラセボとして0.5%メチルセルロース(10mL/kg)を経口的に投与した。経口投与期間は、G1H-G93Aトランスジェニックマウスにおいて運動麻痺が発症し、四肢麻痺及び瀕死状態に至るまで、連日投与した。野生型同腹仔マウス10匹は、プラセボである0.5%メチルセルロース(10mL/kg)を連日経口投与した。0.5%メチルセルロース(10mL/kg)を経口投与した野生型同腹仔マウス10匹は正常対照群として使用した。

2) 化合物(3)投与治療実験群：

G1H - G93Aトランスジェニックマウス10匹を使用した。生後80日より5mg/kgの化合物(3)を連日経口に投与した。投与期間はそれぞれのG1H - G93Aトランスジェニックマウスが四肢麻痺を呈し瀕死状態に至るまでの期間である。

3) アロプリノール投与治療実験群：

G1H - G93Aトランスジェニックマウス10匹を使用した。生後80日より5mg/kgのアロプリノールを連日経口に投与した。投与期間はそれぞれのG1H - G93Aトランスジェニックマウス

が四肢麻痺を呈し瀕死状態に至るまでの期間である。

7. 統計解析法

臨床症候学的評価の結果については、発症日、生存期間(四肢麻痺を呈し瀕死状態に至るまでの日数)、病悩期間(発症日を含め、四肢麻痺を呈し瀕死状態に至るまでの日数)、臨床症候学的評価の各ステージ度数の期間の各データ値は平均値±標準偏差で表示した。運動負荷試験の結果については、伸展反射試験、傾斜面角度試験、フットプリント試験、ロタロッド試験、ビームバランス試験の各運動負荷試験の各スコア値を平均値±標準偏差で表示した。すべての統計解析はマッキントッシュソフトウェアのStatview (Ver.5.0, SAS Institute Inc., カリフォルニア、米国)を用いて実施した。有意差検定にはMann - WhitneyのU検定とKaplan - Meier法のLogrank検定とを用い、危険率 $P < 0.05$ を持って統計的有意差があると判定した。

C. 研究結果

1. プラセボ・薬剤投与の各実験群の臨床症候学的評価の結果

1) プラセボ投与実験群：

プラセボ投与実験群におけるG1H - G93Aトランスジェニックマウスの発症日は、 99.9 ± 2.4 日、生存期間は、 119.7 ± 3.3 日、病悩期間 20.8 ± 2.3 日であった。プラセボ投与実験群におけるマウスの臨床症候学的評価の各ステージ度数の期間は、それぞれステージ1度= 6.6 ± 0.7 日、ステージ2度= 5.4 ± 0.8 日、ステージ3度= 4.3 ± 0.8 日、ステージ4度= 2.8 ± 0.6 日、ステージ5度= 1.7 ± 0.5 日であった。プラセボ投与実験群の正常対照群である野生型同腹仔マウスでは、10匹全例臨床症候学的評価のステージは全経過を通じて0度であった。

2) 化合物(3)投与治療実験群：

化合物(3)投与治療実験群におけるG1H - G93Aトランスジェニックマウスの発症日は、 112.0 ± 4.6 日、生存期間は、 136.4 ± 3.3 日、病悩期間 25.4 ± 3.2 日であった。化合物(3)投与治療実験群におけるマウスの臨床症候学的評価の各ステージ度数の期間は、それぞれステージ

1度= 7.5 ± 0.9 日、ステージ2度= 6.7 ± 1.2 日、ステージ3度= 5.4 ± 1.1 日、ステージ4度= 3.9 ± 1.1 日、ステージ5度= 1.9 ± 0.3 日であった。

3) アロプリノール投与治療実験群：

アロプリノール投与治療実験群におけるG1H - G93Aトランスジェニックマウスの発症日は、 102.2 ± 4.4 日、生存期間は、 122.2 ± 1.3 日、病悩期間 21.0 ± 3.6 日であった。アロプリノール投与治療実験群におけるマウスの臨床症候学的評価の各ステージ度数の期間は、それぞれステージ1度= 6.8 ± 1.1 日、ステージ2度= 5.4 ± 1.3 日、ステージ3度= 4.4 ± 1.2 日、ステージ4度= 2.9 ± 0.7 日、ステージ5度= 1.5 ± 0.5 日であった。

2. 薬剤の有効性の臨床症候学的解析結果

1) 化合物(3)投与治療の臨床症候学的有効性：

G1H - G93Aトランスジェニックマウスに、生後80日より 5mg/kg の化合物(3)を連日経口に投与することにより、プラセボ投与群より、発症日を有意に遅延させる発症遅延効果($P < 0.001$ 、Mann - Whitney U検定)、生存期間を有意に延長させる生存期間延長効果($P < 0.001$ 、Mann - Whitney U検定)、病悩期間を有意に延長させる病悩期間延長効果($P < 0.01$ 、Mann - Whitney U検定)を認めた。すなわち、発症前化合物(3)投与によって、発症遅延効果、生存期間延長効果、病悩期間延長効果の各効果の明らかな有効性を認めた。臨床症候学的評価の各ステージ度数の期間に関して、発症前化合物(3)投与群はプラセボ投与群と比して、ステージ1度($P < 0.05$ 、Mann - Whitney U検定)、ステージ2度($P < 0.05$ 、Mann - Whitney U検定)、ステージ3度($P < 0.05$ 、Mann - Whitney U検定)、ステージ4度($P < 0.05$ 、Mann - Whitney U検定)の各項目においてそれぞれ有意差を持って延長していた。

2) アロプリノール投与治療の臨床症候学的有効性：

G1H - G93Aトランスジェニックマウスに、生後80日より 5mg/kg のアロプリノールを連日経口に投与することにより、プラセボ投与群より、発症日を有意に遅延させる発症遅延効果($P > 0.05$ 、Mann - Whitney U検定)、生存期間を有意に延長させる生存期間延長($P > 0.05$ 、Mann - Whitney U検定)、病悩期間を有意に延長させる

病脳期間延長効果 ($P > 0.05$, Mann - Whitney U 検定) を認めなかった。すなわち、アロプリノール投与によって、発症遅延効果、生存期間延長効果、病脳期間延長効果の各効果の明らかな有効性を認めなかった。臨床症候学的評価の各ステージ度数の期間に関して、発症前アロプリノール投与群はプラセボ投与群と比して、ステージ1度 ($P > 0.05$, Mann - Whitney U 検定)、ステージ2度 ($P > 0.05$, Mann - Whitney U 検定)、ステージ3度 ($P > 0.05$, Mann - Whitney U 検定)、ステージ4度 ($P > 0.05$, Mann - Whitney U 検定)、ステージ5度 ($P > 0.05$, Mann - Whitney U 検定) の各項目においてそれぞれ有意差を認めなかった。

3. プラセボ・薬剤投与の各実験群の運動負荷試験の結果

1) プラセボ投与実験群：

プラセボ投与実験群の正常対照群である野生型同腹仔マウスでは、伸展反射試験、傾斜面角度試験、フットプリント試験、ロタロッド試験、ビームバランス試験の各運動負荷試験において、それぞれのスコアは全経過を通じて10匹全例スコア=0であった。

プラセボ投与実験群におけるGIH - G93Aトランスジェニックマウスの各運動負荷試験の評価に関しては、以下の如くである。すなわち、伸展反射試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日ではスコア=0.0±0.0、100日ではスコア=0.4±0.5、105日ではスコア=1.0±0.0、110日ではスコア=1.4±0.5、115日ではスコア=1.9±0.3、120日以降140日まではスコア=2.0±0.0であった。傾斜面角度試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日、100日ではスコア=0.0±0.0、105日ではスコア=0.2±0.4、110日ではスコア=1.0±0.8、115日ではスコア=2.3±0.5、120日以降140日まではスコア=3.0±0.0であった。フットプリント試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日ではスコア=0.0±0.0、100日ではスコア=0.4±0.5、105日ではスコア=1.4±0.5、110日ではスコア=2.3±0.5、115日ではスコア=3.3±0.5、120日以降140日まではスコア=4.0±0.0であった。ロタロッド試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日ではス

コア=0.0±0.0、100日ではスコア=0.7±0.8、105日ではスコア=2.1±0.9、110日以降140日まではスコア=3.0±0.0であった。ビームバランス試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日ではスコア=0.0±0.0、100日ではスコア=0.4±0.5、105日ではスコア=1.4±0.5、110日以降140日まではスコア=2.0±0.0であった。

2) 化合物(3)投与治療実験群：

化合物(3)投与治療実験群におけるGIH - G93Aトランスジェニックマウスの各運動負荷試験の評価に関しては、以下の如くである。すなわち、伸展反射試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日、100日、105日ではスコア=0.0±0.0、110日ではスコア=0.1±0.3、115日ではスコア=0.5±0.5、120日ではスコア=1.1±0.6、125日ではスコア=1.7±0.5、130日以降140日まではスコア=2.0±0.0であった。傾斜面角度試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日、100日、105日、110日ではスコア=0.0±0.0、115日ではスコア=0.1±0.3、120日ではスコア=0.8±0.6、125日ではスコア=1.2±0.8、130日ではスコア=2.3±0.7、135日ではスコア=2.9±0.3、140日ではスコア=3.0±0.0であった。フットプリント試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日、100日、105日ではスコア=0.0±0.0、110日ではスコア=0.1±0.3、115日ではスコア=0.7±0.8、120日ではスコア=1.6±1.0、125日ではスコア=2.7±0.5、130日ではスコア=3.3±0.5、135日ではスコア=3.9±0.3、140日ではスコア=4.0±0.0であった。ロタロッド試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日、100日、105日ではスコア=0.0±0.0、110日ではスコア=0.4±0.8、115日ではスコア=1.3±1.3、120日ではスコア=2.5±0.5、125日以降140日まではスコア=3.0±0.0であった。ビームバランス試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日、100日、105日ではスコア=0.0±0.0、110日ではスコア=0.1±0.3、115日ではスコア=0.7±0.8、120日ではスコア=1.4±0.7、125日以降140日まではスコア=2.0±0.0であった。

3) アロプリノール投与実験群：

アロプリノール投与治療実験群におけるG1H-G93Aトランスジェニックマウスの各運動負荷試験の評価に関しては、以下の如くである。即ち、伸展反射試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日ではスコア＝0.0±0.0、100日ではスコア＝0.1±0.3、105日ではスコア＝0.5±0.5、110日ではスコア＝1.1±0.6、115日ではスコア＝1.8±0.4、120日以降140日まではスコア＝2.0±0.0であった。傾斜面角度試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日、100日、105日ではスコア＝0.0±0.0、110日ではスコア＝0.6±0.7、115日ではスコア＝1.6±0.7、120日ではスコア＝2.8±0.4、125日以降140日まではスコア＝3.0±0.0であった。フットプリント試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日、100日ではスコア＝0.0±0.0、105日ではスコア＝0.7±0.8、110日ではスコア＝1.8±0.9、115日ではスコア＝2.8±0.4、120日ではスコア＝3.8±0.4、125日以降140日まではスコア＝4.0±0.0であった。

ロタロッド試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日ではスコア＝0.0±0.0、100日ではスコア＝0.6±1.0、105日ではスコア＝1.5±1.2、110日ではスコア＝2.5±1.0、115日以降140日まではスコア＝3.0±0.0であった。

ビームバランス試験のスコアは、生後70日、75日、80日、85日、90日、95日、100日ではスコア＝0.0±0.0、105日ではスコア＝0.7±0.8、110日ではスコア＝1.6±0.7、115日以降140日まではスコア＝2.0±0.0であった。

4. 薬剤の有効性の運動負荷試験の解析結果

1) 化合物(3)投与治療の運動負荷試験における有効性：

G1H-G93Aトランスジェニックマウスに、生後80日より5mg/kgの化合物(3)を連日経口に投与することにより、伸展反射試験に関しては、プラセボ投与群に比べて、105日、110日、115日、120日において、有意な有効効果(P<0.005、Mann-Whitney U検定)を示した。傾斜面角度試験に関しては、プラセボ投与群に比

べて、110日、115日、120日、125日、130日において、有意な有効効果(P<0.05、Mann-Whitney U検定)を示した。フットプリント試験に関しては、プラセボ投与群に比べて、105日、110日、115日、120日、125日、130日において、有意な有効効果(P<0.01、Mann-Whitney U検定)を示した。ロタロッド試験に関しては、プラセボ投与群に比べて、105日、110日、115日において、有意な有効効果(P<0.005、Mann-Whitney U検定)を示した。ビームバランス試験に関しては、プラセボ投与群に比べて、105日、110日、115日において、有意な有効効果(P<0.005、Mann-Whitney U検定)を示した。

2) アロプリノールの有効性の運動負荷試験の解析結果：

G1H-G93Aトランスジェニックマウスに、生後80日より5mg/kgのアロプリノールを連日経口に投与することにより、伸展反射試験、傾斜面角度試験、フットプリント試験、ロタロッド試験、ビームバランス試験の各運動負荷試験において、プラセボ投与群に比べて、それぞれの運動負荷試験スコアは全経過を通じて、有意差を認めなかった(P>0.05、Mann-Whitney U検定)。

D. 考察

ALSは、有効な治療法確立が強く希求されている致死的神経変性疾患の代表であり、ALSの有病率は10万人人口当たり約3人から5人とされ、現在日本では約4,000から5,000人の患者がいると考えられている。尚かつ、本疾患は働き盛りである中年以降に発症する。従って、ALSの新規治療法の開発は、極めて重要である。

歴史的には、ALSは1869年にCharcotとJoffroyにより記載された一つの疾患単位である。主に上位運動ニューロンと下位運動ニューロンの両者が障害される進行性の原因不明の疾患であり呼吸筋麻痺により死亡する運動ニューロン疾患として位置づけられる。この疾患が初めて記載されて以来、約130年経過した現在尚、その真に有効な治療法は確立していない。治療剤として神経栄養因子、神経保護効果、カスパーゼ抑制、銅キレート作用、グルタミン酸抑制作用、抗酸化剤等に基づいた薬剤の効果についての検討がなされ、一定の効果は認められている。し

かし、現在、ALS治療薬として販売されているのは、グルタミン酸受容体のアゴニストとしてグルタミン酸抑制作用のあるリルゾールのみである。しかしながら、リルゾールのALSに対する治療効果は十二分とはいえ、さらに新たなALS治療薬の開発が望まれている。かかる実状において、我々は、ヒト変異SOD1過剰発現トランスジェニックマウスを使用し、種々の薬物についてのALS治療作用を検討してきたところ、全く意外にも、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が、顕著に優れたALS治療作用を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

E. 結 論

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(3) : 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、ALSの治療薬にたり得る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato S: Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008; 115 (1) : 97-114 (DOI 10.1007/s00401-007-0308-4).
- 2) Suzuki M, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ueno M, Kato S, Kitamura Y, Hosokawa H, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H: Endosomal accumulation of Toll-like receptor 4 causes constitutive secretion of cytokines and activation of signal transducers and activators in Niemann-Pick disease type C (NPC) fibroblasts: a potential basis for glial cell activation in the NPC brain. *J Neuroscience* 2007; 27 (8) : 1879-1891
- 3) Kitamura Y, Okazaki T, Nagatsuka Y, Hirabayashi Y, Kato S, Hayashi K: Immunohistochemical distribution of phosphatidylglucoside using anti-phosphatidylglucoside monoclonal antibody (DIM21). *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362 (2) : 252-255.
- 4) 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 Exp Neurol Neuropathol* 2007; 66 (11) :1037-1044

- 5) 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
- 6) Fujiwara N, Nakano M, Kato S, Yoshihara D, Ookawara T, Eguchi H, Taniguchi N, Sizuki K: Oxidative modification to cysteine sulfonic acid of cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem; Online Publish* 2007; 282 (49) : 35933-35944.

2. 学会発表

- 1) 加藤雅子, 加藤信介, 堀江 靖, 林 一彦. SOD1遺伝子異常を伴うALSモデル動物肝におけるレドックス関連酵素の発現について. 第96回日本病理学会総会 (2007, 3月13日-15日, 東京)
- 2) 隅 寿恵, 新沢康英, 伊川正人, 松岡洋祐, 岡部 勝, 加藤信介, 衛藤昌樹, 辻本賀英, 佐古田三郎. iPLA2 β ノックアウトマウスにおける臨床病理学的解析—INADモデル動物の確立. 第48回日本神経学会総会 (2007, 5月16日-18日, 名古屋)
- 3) 加藤信介, 加藤雅子, 大浜栄作, 船越 洋, 角山圭一, 中村敏一, 青木正志, 糸山泰人, 平野朝雄. ALS及びALSマウスの運動ニューロンにおける肝細胞増殖因子(HGF)・活性化型受容体(pcMet)の発現機構: ALS治療戦略の基盤研究. 第48回日本神経病理学会総会学術研究会 (2007, 5月30-6月1日, 東京)
- 4) 隅 寿恵, 山寺みさき, 長野清一, 深田 慶, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎. ミトコンドリア由来の空胞におけるcopper chaperone for superoxide dismutase (CCS)の関与. 第48回日本神経病理学会総会学術研究会 (2007, 5月30-6月1日, 東京)
- 5) 加藤雅子, 加藤信介, 緒浜栄作. ヒト変異SDS1導入ALS-トランスジェニックマウスにおける肝臓・腎臓・心臓における一過性組織変化からの回復機構の存在. 第48回日本神経病理学会総会学術研究会 (2007, 5月30-6月1日, 東京)

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

孤発性筋萎縮性側索硬化症患者ゲノムの CNV (copy number variation) 解析

研究協力者：加藤 丈夫 (山形大学医学部生命情報内科(第三内科) 教授)
共同研究者：佐藤秀則^{1,2)}, 川並 透¹⁾, 栗田 啓司¹⁾, 江見 充^{1,2)}

¹⁾山形大学医学部生命情報内科(第三内科), ²⁾ヒュービット・ジェノミックス

研究要旨: 孤発性筋萎縮性側索硬化症 (SALS) 患者 11 例および対照例 63 例の末梢血 DNA を用いて、ゲノムワイド CNV (copy number variation) 解析を行った。その結果、複数のゲノム領域において、SALS 患者と対照者間で種々の CNV の違いを認めた。以上より、CNV が SALS の病因・病態に関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (SALS) の発症や病態に関わる疾患感受性遺伝子探索のため、一塩基多型 (SNP) を用いて候補遺伝子との関連解析や網羅的遺伝子解析が行われている。しかし、未だ、疾患感受性遺伝子として確立されたものは見出されていない。ヒトゲノムには多様性のあることはよく知られているが、最近、SNP やマイクロサテライトなどの既知の多型に加えて、遺伝子コピー数に想像以上の多様性があることが示され、コピー数多型 (copy number variation : CNV) と呼ばれ脚光をあびている。CNV 領域は複雑な構造多型を持つヒトゲノム上の領域で、タンデムリピートが多い故に、遺伝子重複、欠失、逆位などが頻繁に起こり、そのために遺伝子コピー数の多様性が生じる領域である。感受性遺伝子の解析を行う上で、ごく最近、その全体像が明らかになってきた CNV は、SNP 以上に疾患の病態に強い効果を呈する例が報告され始めている。我々は、SALS の感受性遺伝子の探索を目的に、SALS 患者のゲノムにおける CNV 異常の解析を行った。

B. 研究方法

日本人 SALS 患者 11 例の末梢血より DNA を抽出し、下記の CNV chip にて解析した。また、対照例として日本人 non-ALS 患者 63 例の

DNA を同様に解析した。用いた CNV chip は、性染色体を除くゲノム上の 15,000 以上の CNV segments (合計 200 Mb) をカバーする約 44,000 のマーカーを搭載し、ゲノム上に散在するほとんど全ての CNV 領域をカバーすることができる。尚、本研究計画は山形大学医学部倫理審査委員会の承認を得て実施し、対象者からは文書でインフォームド・コンセントを得ている。

C. 研究結果

複数のゲノム領域において、SALS 患者と対照者間で種々の CNV の違いを認めた。ゲノム上の 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 コピーであった。一方、SALS では全例 (n=11) が 3 コピーであった。SALS と対照者間では統計学的に有意な差が認められた (logistic $p = 3.87 \times 10^{-9}$)。また、ゲノム上の locus-y のマーカーは、対照者の 98% (n=59) で 2 コピー、2% (n=1) で 3 コピー (3 名の対照者では CNV 解析は不成功) であったのに対して、SALS では 27% (n=3) で 2 コピー、73% (n=8) で 3 コピーであった。SALS と対照者間では統計学的に有意な差が認められた (logistic $p = 2.69 \times 10^{-8}$)。

D. 考察

1) 今回のゲノムワイド CNV 解析で明らかと

なった候補CNVを別の方法(real-time qPCR等)を用いて、現在、多数例で大規模に検証を進めている。

- 2) SALSの発症に特定のCNV(コピー数異常)が寄与するかどうか、さらに、CNV領域にSALSのリスクとなる遺伝子が存在するかどうか、明らかにする必要がある。
- 3) 大きなリスクとなる遺伝子を特定できれば、それによる運動ニューロン死の病態を解明し、さらに、そこをターゲットとしたSALSの創薬研究が可能となると思われる。

E. 結 論

CNVがSALSの病因・病態に関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

なし

ALS患者の脳脊髄液中シスタチンCの検討

研究協力者：菊地 誠志 (国立病院機構札幌南病院神経内科 診療部長)
共同研究者：辻 幸子¹⁾, 矢部 一郎¹⁾, 佐々木秀直¹⁾

¹⁾北海道大学大学院医学研究科神経内科

研究要旨：【目的】筋萎縮性側索硬化症(ALS)の早期診断において髄液シスタチンCの有効性を検討する。【方法】2005年4月以降に精査のため髄液検査を行ったALS患者14名、多発末梢神経障害患者13名、その他疾患16名を対象とした。-80℃で凍結保存した髄液を、サンドイッチELIZA法にて測定した。【結果】ALS患者群では髄液中シスタチンC濃度は $5.5 \pm 0.3 \text{mg/L}$ 、多発神経障害群では $6.7 \pm 0.4 \text{mg/L}$ 、疾患コントロール群では $6.9 \pm 0.3 \text{mg/L}$ であった。三群間には有意な差があり、ALS群は他群と比べ低濃度であった(vs.多発神経障害群： $p=0.014$ 、vs.疾患コントロール群： $p=0.024$)。カットオフ値を 6.1mg/L とすると感度0.64、特異度0.79であった。【結論】髄液シスタチンCはALSの早期診断の補助診断として有用な可能性がある。

A. 研究目的

ALSの診断は経過と臨床症状、除外診断でなされるが、時に進行性球麻痺型や、下位運動ニューロン優位型などの病型では診断が困難である。動物実験で多数の進行抑制治療が有効と報告されているにもかかわらず、臨床的な治療研究が成功しない一因として、早期の確定診断が困難で、エントリー時には症状が進行していることが挙げられる。臨床試験の成功のために、できるだけ早期に治療開始が可能となるよう、早期診断の生化学的マーカーを確立することが必要である。

近年、患者髄液のプロテオミクス解析により数種類の生化学的マーカーの候補が明らかとなった。中でも、シスタチンCは二施設から報告があり、Bunina小体の構成成分であるなど、疾患マーカーとして有望である。そこで、髄液シスタチンC濃度について、多発末梢神経障害との比較検討、ALS内での病型との相関などを検討した。

B. 研究方法

2005年10月～2007年9月までに北海道大学病院で診断されたALS14名、多発末梢神経障

害13名、その他の疾患コントロール16例を対象とした。多発末梢神経障害群と疾患コントロール群の具体的な疾患内訳は表1に示す。髄液は臨床診断目的で採取した際に、保存・研究に関して文書による同意を得て、測定まで-80℃で保存した。測定直前に解凍し使用した。測定はヒトシスタチンC測定ELIZAキット(R & D)を用いて、サンドイッチELIZA法で行った。統計解析は、有意水準5%で一元配置分散分析を行い、有意差のあった場合、post-hocテストとしてStudent-Newman-Keuls検定を行った。

C. 研究結果

各群の平均年齢、男女比を表2に示す。ALS群の男女比は男性に偏りがあったため、対照群は年齢・性別をマッチさせて抽出した。髄液シスタチンCの疾患別濃度を図1に示す。各群における平均値はALS群 $5.5 \pm 0.3 \text{mg/L}$ 、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 $6.9 \pm 0.3 \text{mg/L}$ であった。有意水準を5%とすると、一元配置分散分析で有意差を認めた。Post-hocテストでは、ALS群が他の2群に対し有意に低下していた(末梢神経障害 $p=0.024$ 、疾患コン

末梢神経障害群 n = 13		疾患コントロール群 n = 16	
慢性炎症性脱髄性多発神経炎	5	正常圧水頭症	7
多巣性運動ニューロパチー	3	頸椎症性脊髄症	3
アレルギー性肉芽腫性血管炎	2	脳梗塞後遺症	2
Charcot-Marrie-Tooth 病	2	脳出血後遺症	1
シスプラチンニューロパチー	1	特発性頭蓋内圧亢進症	1
		フェニトイン中毒	1
		身体表現性障害	1

	患者数	年齢 (平均±SD)	男女比
ALS	14	62 ± 10	12:2
末梢神経障害	13	56 ± 18	11:2
疾患コントロール	16	64 ± 15	14:2

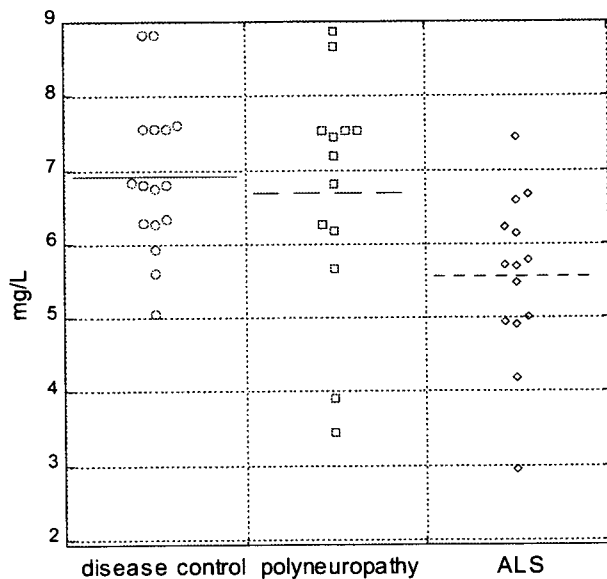


図1 髄液 Cystatin C

トロール群 p=0.014)。

更にALS群内で、シスタチンC値に影響を与える因子について検討した(図2)。罹病期間とシスタチンC値は相関しなかった。PBPやLMN優位型では時として診断が問題になるが、髄液採取時に進行性球麻痺(PBP)と診断され、その後の経過観察で四肢の症状が出現し最終的にALSと診断した症例においては、シスタチ

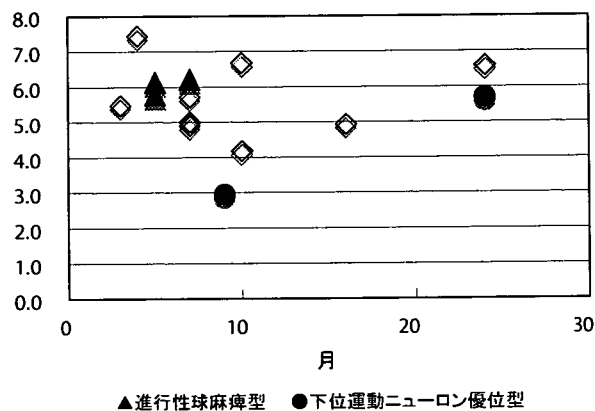


図2 罹病期間、病型と髄液シスタチンC

ンC低下の程度は軽度であった。また、初発症状が球症状の患者群で低下の程度は軽い傾向にあった。病変の拡がりとの相関を見るため、障害のある領域数と髄液シスタチンC値の相関を見たが、明らかな相関はなかった(図3)。

D. 考察

ALSの臨床診断は症状、経過、除外診断によりなされ、補助診断として筋電図が取り入れられているが、生化学的マーカーはない。PBPや下位運動ニューロン徴候が優位で上位運動ニューロン徴候に乏しいタイプ(LMN型)では、ALSを強く疑っても確定診断できず、臨床仕上げしば問題となる。これらのタイプにおいて、生化学的マーカーを組み合わせれば、診断可能となれば、臨床上大変有用である。今回の検討ではPBPでは比較的低下の割合は軽度に留まったが、症例が3例と少なく、早期診断のマーカーとしての妥当性は更に症例の蓄積が必要である。

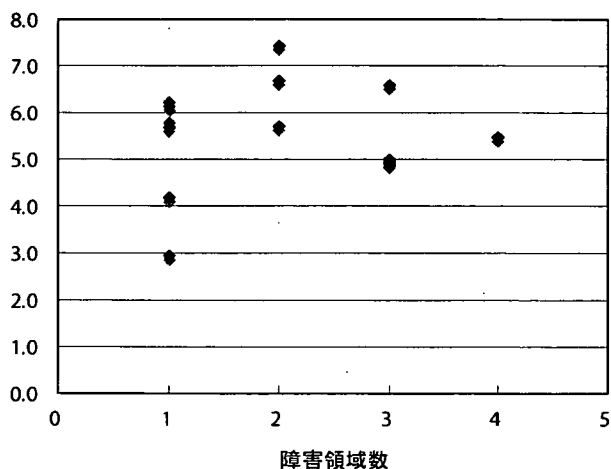


図3 障害の拡がり と 髄液シスタチンC

シスタチンCは122アミノ酸からなる約13KDaの蛋白で、システインプロテアーゼ阻害物質であり、全身の体液に含まれている。中でも髄液は濃度が高く血清の数倍であり、中枢神経内でもニューロン、アストロサイト、ミクログリア、脈絡叢などの細胞から産生されている。

シスタチンCは多くの神経疾患のプロテオミクス解析で変動が報告されている。Creutzfeldt-Jakob病や腰椎椎間板ヘルニアで増加、前頭側頭型認知症、炎症性脱髄性多発神経炎で減少、などである。しかし、2007年に-20℃下での髄液長期保存によるアーチファクトで、全長型シスタチンCが分解されて減少しtruncated formが増加することが報告された。同様な手法を用いた一連のプロテオミクス解析の結果について検体の取り扱いを含め再度検証する必要がある。今回は測定に当たり、検体の保管には融解後すぐに使用するよう注意して行った。

E. 結 論

髄液シスタチンCはALS患者で低値を示し、ポリニューロパチーとの鑑別に有用である可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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の修飾を介した神経毒性発現機構の解析

研究協力者：佐古田三郎 (大阪大学大学院医学系研究科神経内科学 教授)

研究要旨：家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) に関連した変異Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) で特異的にみられる高銅親和性分画の生化学的特徴を解析した。金属親和性クロマトグラフィーにより高銅親和性分画に溶出される変異SOD1は遊離システイン残基が何らかの修飾を受けるとともにモノマーとして存在していた。また高銅親和性変異SOD1は野生型SOD1や低銅親和性分画に存在する変異SOD1に比べ、そのミクログリア系細胞に対するTNF- α やiNOSの誘導能が亢進していた。この高銅親和性変異SOD1が酸化ストレスなどの機序を介して神経毒性に関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

FALSにおける変異SOD1の毒性の本体として以前より同蛋白内に存在する銅を介した酸化ストレスの関与が指摘されており、我々も変異SOD1トランスジェニックマウスの発症に対する銅キレート剤や抗酸化剤の効果を報告してきた。一方でSOD1活性部位への銅結合の抑制によっても変異SOD1による神経細胞死は抑制されず、活性部位の銅の関与は否定的とみられている。この点に関し、我々は変異SOD1と銅との相互作用の性質を明らかにするため銅飽和カラムを用いた金属親和性クロマトグラフィー(Cu-IMAC)を行い、変異SOD1が野生型ではみられない特異的な高銅親和性分画を持つことを明らかにした。本年度はこの高銅親和性変異SOD1のより詳細な生化学的特徴を明らかにすることを目的として種々の解析を行うとともに、その細胞毒性の有無につき検討を行った。

B. 研究方法

カルボキシ末端側にFLAGタグを持つ野生型もしくは変異ヒトSOD1をCOS7細胞で発現させ、その細胞破碎液をCu-IMACカラムに通し洗浄した後漸増濃度の銅キレート剤(イミダゾール)溶液により溶出、低銅親和性(low affinity component: LAC)および高銅親和性(high affinity component: HAC)分画を得た。各分画にシステイン残基修飾剤であるAMSを反

応させた後SOD1 Western blotを行い、それぞれにおけるSOD1遊離システイン残基の修飾の有無を確認した。次に精製野生型SOD1を過酸化水素あるいはニトロソグルタチオンにより酸化修飾した後にCu-IMACを行い、各分画のSOD1 Western blotによりその溶出パターンの変化を解析した。システイン残基どうしの架橋剤であるBMOEで処理したG85R変異SOD1発現COS7細胞破碎液で同様にしてCu-IMAC溶出パターンの変化をみた。さらにLAC、HACそれぞれをゲル濾過クロマトグラフィーにより分離し、各分画中のSOD1の分子量の相違を検討した。最後にLAC、HACそれぞれより抗FLAG抗体を用いた免疫沈降によりSOD1を抽出し、それらを培養ミクログリア系(6-3)細胞の培地中に添加し6時間後に細胞を回収、mRNAより合成したcDNAを用いたreal-time PCR法により各条件でのTNF- α 、iNOSの発現誘導能の差異を比較検討した。

[倫理面への配慮]

臨床研究や実験動物を用いた研究ではないため、特に問題ないと考えられる。

C. 研究結果

LACに存在する野生型・変異SOD1はAMSにより遊離システイン残基が修飾されWestern blotでバンドの高分子側へのシフトがみられたが、

HAC変異SOD1ではAMSによる修飾がほとんどみられなかった。精製野生型SOD1ではCu-IMACによりHACはほとんど出現せずCOS7細胞で発現させた野生型SOD1同様の所見であったが、同蛋白を過酸化水素あるいはニトロソグルタチオンと反応させたところ、Cu-IMACによるHACの出現がみられた。逆にG85R変異SOD1をBMOEにより架橋したところ、ダイマーのサブユニット間で架橋されたSOD1はLACにしか出現しなくなった。ゲル濾過クロマトグラフィーによる検討ではニトロソグルタチオン修飾野生型SOD1、変異SOD1ともLAC SOD1はダイマーとして存在しているのに対し、HAC SOD1はそのほとんどがモノマー化していた。さらに培地へのSOD1添加後の6-3細胞でのTNF- α 、iNOSの発現量は、G85R変異HAC SOD1で野生型およびG85R変異LAC SOD1よりも上昇する傾向がみられた。

D. 考 察

今までの検討により変異SOD1でHACが特異的にみられることを示してきたが、このHAC SOD1では遊離システイン残基が何らかの修飾を受けており、かつモノマー化していることを明らかにした。野生型SOD1でも同様の変化を起こさせることによりHACが出現すること、逆に変異SOD1でこの変化を抑制することによりHACが消失することより、上記の修飾・モノマー化がHACの出現には必須であることが示唆される。またこのHAC SOD1がLAC SOD1よりも高いミクログリア系細胞活性化能を持つこと、および変異SOD1による神経細胞死にはミクログリアの関与が重要であると示唆されていることより、HAC SOD1がFALSにおける神経細胞毒性の本体となっている可能性が推測される。このHAC 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。

E. 結 論

変異SOD1ではシステインをはじめとするアミノ酸残基が修飾を受けやすい状態にあり、それにより高次構造の変化を起こしてモノマー化した変異SOD1成分が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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe S, Nagano S, Duce J, Kiaei M, Li QX, Tucker SM, Tiwari A, Brown RHJ, Beal MF, Hayward LJ, Culotta VC, Yoshihara S, Sakoda S, Bush AI. Increased affinity for copper mediated by cysteine 111 in forms of mutant superoxide dismutase 1 linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 42, 1534-1542, 2007.

2. 学会発表

- 1) 岸上 仁, 長野清一, 渡邊将平, 深田 慶, 中西豊文, 佐古田三郎. 変異型SOD1におけるシステイン残基の翻訳後修飾についての検討. 第48回日本神経学会総会、名古屋、2007年5月.
- 2) 隅 寿恵, 長野清一, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎. ミトコンドリア由来の空胞におけるcopper chaperone for superoxide dismutase (CCS)の関与. 第48回日本神経病理学会総会、東京、2007年5月.

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

なし

SOD1のCys111残基の酸化とALS治療ターゲットへの可能性

研究協力者：谷口 直之 (大阪大学微生物病研究所疾患糖鎖学 教授)

共同研究者：藤原 範子¹⁾，中の三弥子²⁾，松本 紋子²⁾，鈴木敬一郎¹⁾

¹⁾兵庫医科大学大学生化学，²⁾大阪大学大学院医学系研究科生化学

研究要旨：Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ(Cu/Zn-SOD, 以下SOD1)は生体にとって有害なスーパーオキシドを酸素と過酸化水素に変換する酵素で、酸化ストレスから生体を守る役割を果たしている。本酵素の変異体が家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)の原因になることが明らかになっているが、その発症機構はまだ解明されていない。その生成物である過酸化水素でSOD1自身が酸化されて凝集化が起こること、野性型SOD1でも酸化されると変異SOD1と同じような毒性を持つようになることが示唆され始めてきた。Cys111はタンパク質分子の外側にあるGreek key loop内に存在し、特に反応性が高いと予想される。Cys111が他のアミノ酸残基よりも速く酸化されること、SH基がスルフィン酸(SO₂H)またはスルホン酸(SO₃H)になることをMALDI-TOF-MS およびLC-ESI-MSMSで同定した。また、Cys111に2-MEが結合した2-ME-SOD1ではCys111の酸化が起こらず、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が抑えられることがわかった。さらにCys111がスルホン酸(SO₃H)になった酸化型SOD1を特異的に認識する抗体を作製し、この抗体がALSモデルマウスの脊髄の封入体と空砲の縁を特異的に染色することを見いだした。これはALSの病態において酸化ストレスおよび酸化型SOD1が関与していることを示唆するものである。変異SOD1のCys111のSHを特異的に保護する薬剤を開発すればFALSの治療にもつながると考えられる。

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子がSOD1であることが報告されて以来、現在まで100以上の変異が報告されている。変異SOD1がtoxicな作用を有することは様々な実験で明らかにされているが、その毒性の本体、さらにはいかなるメカニズムで運動神経を障害するかは全く不明である。また、FALS患者や変異SOD1トランスジェニックマウス、および弧発性のALS患者ではSOD1免疫陽性の封入体が観察されており、特に変異SOD1は生体内で構造変化を起こし、aggregationを起こしやすいことが示唆されている。また活性酸素種がaggregationを起こす可能性も示唆されている。SOD1タンパク自身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

た。またシステイン残基の酸化との関連性を検討するために、Cys111のSH基に2-メルカプトエタノール(2-ME)を導入した2-ME-SOD1を用いて、SOD1の酸化におけるCys111の役割を検討した。

B. 研究方法

2-MEを導入したSOD1タンパク質は宇部興産から供与していただいた。まず、Cys111にのみ2-MEが結合していること、ほかのCysには2-MEが結合していないことをMALDI-TOF-MS解析で確認した。さらに2-MEを加えてCys111の2-MEがはずれて元の野生型SODに戻るかどうかを検討した。20mMの2-MEで処理すると完全に2-MEがとれたSODに戻ることが示唆されたため、そのSODをトリプシン処理し、Cys111を含むペプチドにも2-MEが結合し

ていないことを確かめた。そこで、2-MEがついたSODを2-ME-SOD、はずして元に戻したものをWT-SOD1と呼ぶことにする。この2つのSODを用いて、酸化に対する反応性を比較検討した。WT-SOD1を酸化するとSDS-PAGEで上にシフトした2本目のバンドが現れた。このバンドは酸化的修飾されたSOD1と予想されたため、その分子をMALDI-TOF-MSおよびLC-ESI-MSMSを用いて同定を行った。また、2-ME-SOD1およびWT-SOD1を酸化させ、2次元電気泳動を行い、チャージアイソマー生成について検討した。さらに、スルホン酸にしたCys111を含むペプチド-KLHをウサギに免疫し、酸化型SOD1に特異的な抗体を作製し、ALSモデルマウスであるG93Atgマウスの脊髄切片の免疫組織染色を行った。

C. 研究結果

Cys111にのみ2-MEが結合していること、もう1つのフリーのシステインであるCys6には2-MEが結合していないことをMALDI-TOF-MS解析で確認した。さらに20 mMの2-MEとインキュベートすることで、Cys111の2-MEがはずれて元のSH型のシステインになることを確認した。

次に種々の濃度の過酸化水素を両SODに加え20分間インキュベート、希釈した後、SDS-PAGEを行った。過酸化水素の濃度が1 mM以上になると、WT-SOD1では主に2本のバンドになり、時間がたつとSODが分解され、バンドの色が薄くなっていく様子が見られた。一方、2-ME-SODも分解はされたが、その程度は低く、2本目のバンドは認められなかった。従って、この2本目のバンドはCys111に由来することが予想された。回転式攪拌器でゆっくり攪拌させる空気酸化によっても、WT-SOD1のみ2本目のバンドを出現させることがわかった。この空気酸化WT-SOD1をMonoQカラムにかけると、2本のピークに分かれた。MS解析によって、2本目のピークには元のSOD1の質量と約45大きい質量の2種類のSOD1が存在することがわかった。また、それぞれのピーク部分をSDS-PAGEすると、1本目のピーク(a)は1本のSOD1バンド、2本目のピーク(b)は2本のバンドが観察された(図1)。

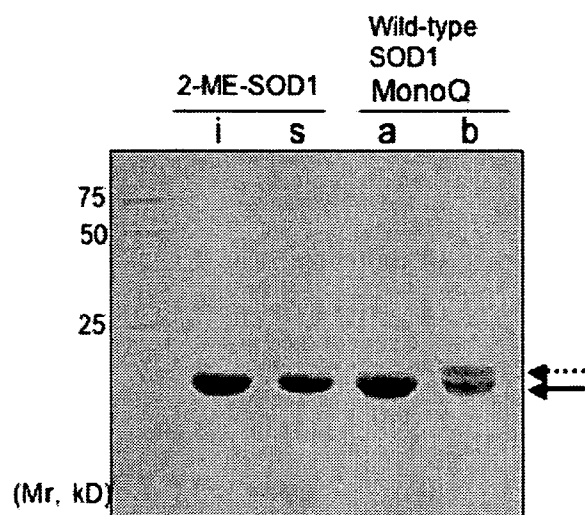


図1 2-ME-SOD1の空気酸化後(s)およびWT-SOD1の空気酸化後にMonoQで分離した後のSDS-PAGE

そこで、図1のSDS-PAGEで分離した2本のバンドのそれぞれを切り出し、トリプシン処理し、Cys111を含むペプチドの質量を調べたところ、上のバンドからはペプチドの質量+32および+48の質量数が得られた。さらに2本バンドのMonoQカラム画分をリジエンドペプチダーゼ処理して得られたペプチドをMSMS解析することで、Cys111はスルフィン酸(SO₂H)およびスルホン酸(SO₃H)に酸化されることを証明した。さらに、隣のHis110や酸化されやすいと報告されてきたHis120は酸化されていないことを証明した。

次に2-ME-SOD1およびWT-SOD1を酸化させ、2次元電気泳動を行い、チャージアイソマー生成について検討した。図1に示すように、2-ME-SOD1およびWT-SOD1はpI5.15のメインスポットの他に3つの小さなスポットを有する。両者を過酸化水素で酸化させると、2-ME-SOD1では、pI 5.15のメインスポットとpI 5.8のスポットの間に3つのスポットが新たに生成されることがわかった。一方、WT-SOD1では、上記3つのスポット以外に、メインスポットよりも酸性側に大きなスポットが2つ、そしてそれぞれのスポットの上にシフトしたスポットが6つ生成した。またWT-SOD1を空気酸化した場合はpI 5.15のメインスポットよりも酸性側に上下4つの新たなスポットが生成したが、メインスポットの塩基性側には小さなスポットが1

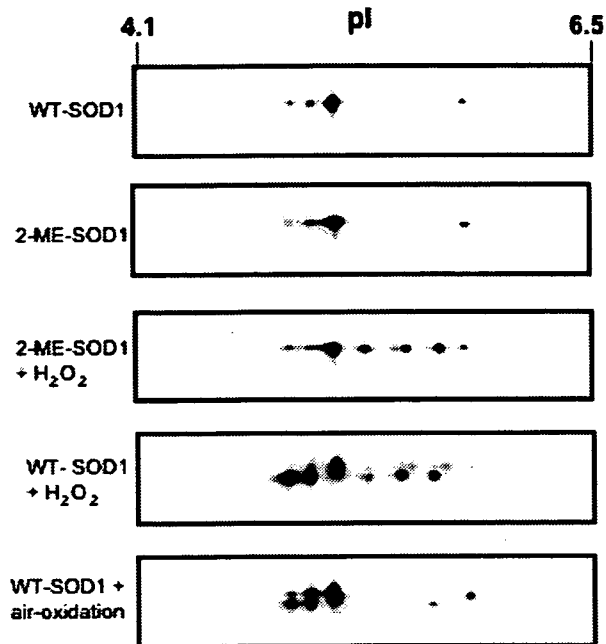


図2 2-ME-SOD1およびWT-SOD1の酸化、未酸化状態における二次元電気泳動

つ生まれたただけであった。従って、pI 5.15のメインスポットよりも酸性側にできたスポットはCys111の酸化に依るものであると考えられる。アルツハイマー病患者の病変脳からもSOD1のチャージアイソマーの存在が報告されており、これらのアイソマーがALSに関わっているかどうか、今後の検討課題である。

Cys111をスルホン酸にした合成ペプチドを免疫し、酸化型SOD1に特異的な抗体を作製した。本抗体はウエスタンブロットで、上バンドのみを強く認識することがわかった。本抗体を用いて、ALSモデルマウスの脊髄切片の免疫組織染色を行ったところ、病変部にできた封入体と空胞の縁がこの抗体によって特異的に染色されることを見いだした(図3)。

これらの結果は、ALSの病態において酸化ストレスおよび酸化型SOD1が関与していることを強く示唆するものである。

D. 考察

哺乳類の中でヒトのみがCys111を有する。Cys6には家族性ALSを引き起こす変異が認められているが、Cys111の変異は報告例がない。つまり、すべてのFALS変異SOD1にはCys111のフリーのSH基が存在し、酸化や他分子との

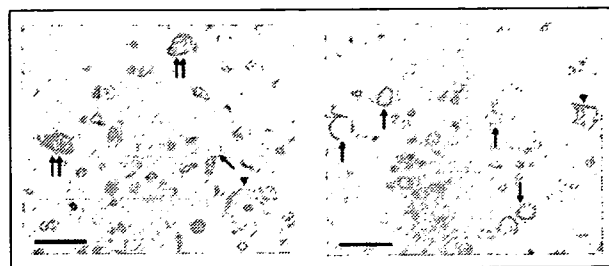


図3 G93Aトランスジェニックマウス脊髄切片の酸化型SOD1特異抗体による免疫組織染色

会合が起こりやすい状態にある。本研究の結果より、Cys111はマイルドな酸化条件下でも酸化されやすく、スルフィン酸(SO₂H)さらにスルホン酸(SO₃H)へ酸化されることがわかった。システイン残基同士のS-S結合によって凝集体を形成することが報告されており、ALSへの関与が示唆されている。本研究では、システイン残基がS-S結合への酸化に寄与するだけでなく、Cys111がスルホン酸へと酸化修飾されることを見いだした。ALSモデルマウスでの病変に見られた酸化型SOD1の存在は、Cys111の酸化が家族性ALSを引き起こす変異SOD1の構造変化や凝集体形成にかかわっていることを示唆している。従って、Cys111のフリーのSH基をマスクすることによって変異SOD1の不安定性や酸化による凝集性を低減できると考えられる。変異SOD1のCys111のSHを特異的に保護する薬剤を開発すればFALSの治療にもつながる可能性があると考えられる。また、新規に作製した酸化SOD1特異抗体はALSへの酸化ストレスの関与のさらなる解明に役立つと期待できる。

E. 結論

Cys111はマイルドな酸化条件下でも酸化されやすく、スルフィン酸(SO₂H)さらにはスルホン酸(SO₃H)に酸化される。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、二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、ALSの病変部位である脊髄において酸化型SOD1の沈着が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiwara N., Nakano M, Kato S, Yoshihara D, Ookawara T, Eguchi H, Taniguchi N, Suzuki K.: Oxidative modification to cysteine sulfonic Acid of cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* (2007) 282, 35933-35944.

2. 学会発表

- 1) Fujiwara,N., Nakano,M., Yoshihara,D., Ookawara,T., Eguchi,H., Taniguchi,N. and Suzuki,K. (2007) Role of Cys111 in an oxidative damage of human Cu/Zn-superoxide dismutase, 第30回日本神経科学大会, 第50回日本神経化学会大会, 第17回日本神経回路学会大会, 合同大会 (Neuro 2007), 9. 10-12, 横浜, (講演要旨集, S119)
- 2) Fujiwara,N., Nakano,M., Yoshihara,D., Ookawara,T., Taniguchi,N. and Suzuki,K. (2007) Role of Cys111 in an oxidative damage and generation of charge isomers of human Cu/Zn-superoxide dismutase, 第30回日本分子生物学会大会, 第80回日本生化学会大会, 合同大会 (BMB2007), 12. 11-15, 横浜 (講演要旨集, 838)

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

なし

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

研究協力者：野本 明男 (東京大学大学院医学系研究科 教授)

研究要旨：運動神経細胞特異的な疾患である筋萎縮性側索硬化症の治療・発症遅延・病態進行遅延を目的としたウイルスベクターとして、運動神経細胞に感染するポリオウイルスの利用法を検討している。ベクターとして使用するには、ポリオウイルスが持つ神経毒性を抑える必要がある。研究の過程で、神経細胞はポリオウイルスの1回感染には抵抗性を示し、感染から回復する能力を持つことを見出した。したがって、1回のみ感染するウイルスベクターを作製することとした。すなわち、ウイルスのキャプシド蛋白質領域の遺伝子を欠損させ、そこに外来遺伝子を挿入する。外来遺伝子としては、HGFおよびXIAPを取り上げることにしたが、発現効率は悪く、特に分泌蛋白質であるHGFの発現は全く観察されなかった。そこで、ジシストロニックゲノムとし、外来遺伝子をポリオウイルスのIRESで、RNA複製用の蛋白質をEMCVのIRESで発現させるべくベクターを構築した。この組換えにより、両外来遺伝子とも発現させることに成功した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動神経細胞の異常により発症する疾患である。そこで、ALS治療・発症遅延・病態進行遅延ベクターとして、運動神経細胞に向性を持つポリオウイルス(PV)に着目した。

昨年度までに、神経細胞はポリオウイルスの1回感染に対し抵抗性を示すこと、細胞変性に中心的役割を持つPV特異的2Aプロテアーゼの単独発現にも抵抗性を示すことなどを明らかにしてきた。

そこで、1回感染のみ起こり、外来遺伝子を発現するベクターを構築した。外来遺伝子としては、HGFおよびXIAPを用いることとした。昨年度までの実験で、HGFなどの分泌型の蛋白質は通常のポリオウイルスベクターでは発現が困難であることが明らかとなっていたので、今年度はジシストロニックゲノムに改変したベクターを用いた。

B. 研究方法

PVゲノムのキャプシド領域に外来遺伝子を挿入し、PVのIRESで発現するように構築した。RNA複製用の蛋白質領域はEMCVのIRESで発現するように構築した。これらの組換えウイル

スはcDNAとして構築した後、試験管内でRNAに転写し、PVのキャプシド蛋白質を発現するプラスミドと共に細胞にトランスフェクションし、ウイルス粒子として回収した。

回収したウイルス粒子を神経細胞(SK-N-SH細胞)に感染させ、組換えゲノムのRNAレプリコンとしての活性、および外来遺伝子の発現について抗体を使用した免疫学的方法により検討した。

C. 研究結果

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、しかも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。更に、感染神経細胞は細胞変性効果を示さなかった。

D. 考 察

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。今後は、成功した理由を探っていきたいと考えている。一方、SODマウスの系統と、PV感受性マウスを掛け合わせたマウスは、PVにも感受性で、ALSを発症することを既に示しているので、このモデ