

200731043B

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17年度～19年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

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. 遺伝子発現プロファイリングに基づく ALS の病態解明
・治療法開発・新規疾患モデルの開発 祖父江 元 他 …………… 9
2. 筋萎縮性側索硬化症に対する再生誘導療法の開発 糸山 泰人 他 …………… 13
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. 孤発性 ALS 運動ニューロンにおける AMPA 受容体サブユニット
GluR2 の RNA 編集異常の病因的意義に関する検討 郭 伸 …………… 21
5. ALS モデルマウス病因タンパク質凝集体による
軸索変性と酸化ストレスに関する研究 高橋 良輔 …………… 24
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 …………… 26
7. ALS 遺伝子治療のための AAV ベクターの開発、
特性および脳内投与における安全性 中野 今治 他 …………… 34
8. ALS に対する HGF の治療解析—HGF は ALS における脳幹部運動ニューロンの
神経細胞死および発症末期のグリオシスを抑制する 船越 洋 …………… 37

III. 研究報告(研究協力者)

9. ALS 脊髄での神経再生の試み 阿部 康二 …………… 41
10. ALS ストレスに対する自己生存機構：レドックス・HGF/活性型リン酸化 cMet (pcMet)
システムの解明と ALS 治療薬の開発までの過程 加藤 信介 他 …………… 44
11. 「ALS モデルマウスを用いた変異型 SOD1 の solubility に関する研究」および
「孤発性 ALS 患者ゲノムの copy number variation 解析」 加藤 丈夫 他 …………… 57
12. ALS 患者の脳脊髄液中シスタチン C の検討 菊地 誠志 他 …………… 59
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 …………… 62

14. 変異SOD1の構造学的特性と酸化型SOD1のALSへの関与	谷口 直之 他 ……	65
15. ALS治療を目指したポリオウイルスベクターの開発	野本 明男 ……	71
16. RNAiを用いた筋萎縮性側索硬化症の治療法の開発	水澤 英洋 他 ……	74

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 研究者一覧

VI. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総合研究報告

総合研究報告

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スタチン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、運動ニューロン特異的遺伝子発現解析により多くのALS病態関連分子を発見した。さらに、システイン残基のジスルフィド結合、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、Dorfinキメラ蛋白質、変異SOD1の発現抑制による治療法も開発中である。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疾患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助教授)
- 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助教授)

分担研究者

- 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。

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、孤発性ALSの運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイリング、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)、Dorfinキメラ蛋白質、変異SOD1の発現抑制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。

【孤発性ALSの運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイリング】

孤発性ALS患者脊髄運動ニューロンをレーザーマイクロダイセクション法にて単離しDNAマイクロアレイ解析を行うことで運動ニューロン特異的な遺伝子発現プロファイルを得た。この結果明らかとなったALS病態関連分子の発現動態を様々な病期の孤発性ALS脊髄を用いて検討した。

【変異SOD1の神経細胞毒性の発現機序解明】

SOD1分子内の4か所のシステイン残基をセリン残基に置換した変異型SOD1を培養細胞に発現させ、凝集体形成や細胞毒性に及ぼすジスルフィド結合の影響を解析した。

また、変異SOD1の銅親和性を金属親和性クロマトグラフィーにより解析し、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の性質を明らかにすることを目指した。

変異SOD1の構造特性を明らかにするために、

変性処理後の野生型および変異SOD1の抗ヒトSOD1モノクローナル抗体との反応性の違いを検討し、SOD1の酸化などその要因を解明した。

【低分子化合物による治療法開発】

変異SOD1のゲノムを用いて、内在性の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探索した。これにより変異SOD1の転写を抑制する低分子化合物のスクリーニングシステムの確立を目指した。

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-イソプロトキシフェニル)-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】

AAV8のマウス尾静脈注入後の遺伝子発現を組織学的に解析した。Cre recombinaseとエストロゲン受容体の変異型リガンド結合部位との融合蛋白CreERT2をdoxycyclineの存在下で発現するAAVベクターを作製し、Doxおよび4-OHTによる遺伝子発現調整をめざした。またヒト脳内に投与した臨床症例について、ベクターゲノムや中和抗体の検出により安全性の確認を行った。

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に着目し、その神経毒性発現のメカニズム解析を通じて、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。

【肝細胞増殖因子(HGF)による治療法開発】

HGFの臨床応用に際しては、その効果発現機序の解明が重要である。そこで神経特異的HGF発現トランスジェニックマウス(HGF-Tg)とALSモデルTgマウス(ALS-Tg)を交配することで脳神経系にHGFを供給した際の病態進行に対する効果を解析した。さらにHGFのグ

リオーシス抑制効果の解析を行った。

【Dorfinキメラ蛋白質による治療法開発】

Dorfinの変異SOD1認識部位であるC末と、CHIPのE3活性部位であるU-Boxを融合した種々のキメラタンパク質発現コンストラクトを作成し、強力なE3活性の発現を目指した。これらの変異SOD1結合能、ユビキチン化活性、神経細胞保護効果等を解析した。

【変異SOD1の発現抑制による治療法開発】

G93A SOD1 Tgマウスをanti-SOD1 shRNA Tgマウスと掛け合わせることで変異SOD1の発現を抑制し発症を防ぐことを試みた。さらに、shRNA毒性を回避するために新規shRNA発現AAVベクターの作成を行った。

【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ニューロスフェア(神経幹細胞)へ誘導する際に、様々な誘導因子を用いることによって、領域特異性を制御した運動ニューロン前駆細胞を作成した。次にこの細胞の正常ラット脊髄への移植を試みた。ヒトES細胞についても同様にニューロスフェアおよび運動ニューロン前駆細胞の誘導を試みた。

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モデルラットの髄腔内に投与した。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培養細胞と線虫に展開した。

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。

また、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。

診断マーカーとしての髄液シスタチンC濃度は、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 $6.9 \pm 0.3\text{mg/L}$ であり、ALS群が他の2群に比し有意に低下していた。髄液シスタチンCは特にALSとポリニューロパチーとの鑑別に有望であることが明らかとなった。

【オートファジーのALS病態に果たす役割解明】

中枢神経系でオートファジーを欠損させたマウス (Atg7Flox/Flox:Nesマウス) を作製すると反射異常、協調運動障害などの神経変性疾患の症状を示した。また、オートファジー欠損ニューロンには、ユビキチン陽性のタンパク質の凝集体 (封入体) が累積しており、ユビキチン化タンパク質がプロテアソーム系のみならずオートファジー系によっても処理されることが明らかになった。さらにオートファゴソーム膜の内外に局在するLC3と相互作用する分子としてp62/Sqstm1を同定した。p62はオートファジーの破綻によるユビキチン陽性の封入体形成に必須な分子であり細胞内における異常凝集体形成の分子機構解明に成功した。

【孤発性ALSの運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイリング】

ALS運動ニューロンにおいて、解析を行った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%) を同定した。各種の神経変性マーカーの運動ニューロンでの発現程度との関連を解析した結果、神経変性過程初期から発現低下をきたしている遺伝子の一つとして、逆行性軸索輸送を制御するdynactin1を同定した。

【変異SOD1の神経細胞毒性の発現機序解明】

SOD1のシステイン残基の置換により、変異SOD1の高分子凝集体形成が著明に抑制され細胞毒性が減弱した。すなわち、システイン残基が分子間で誤ったジスルフィド結合を形成することが、変異SOD1の凝集体形成および細胞毒性に強く関与していることが明らかとなった。

変異SOD1の高銅親和性獲得には変異SOD1の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として存在することが重要であることを明らかにした。また高銅親和性変異SOD1は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おり、病態形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

変性処理後のSOD1と抗ヒトSOD1モノクローナル抗体 (mAb) の反応性は、野生型と逆

に変異型では減少することを明らかにした。この違いはCys111残基を有するGreek key loop部分の構造の差異によると考えられた。さらに、Cys111残基のSH基がスルホン酸(SO₃H)になった酸化型SOD1を特異的に認識する抗体が、モデルマウスの脊髄封入体を特異的に染色することを見いだした。この結果は、ALSの病態への酸化ストレスおよび酸化型SOD1の関与を示唆し、Cys111のSH基を保護する薬剤の開発が治療につながると考えられた。

【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株のいくつかのクローンを樹立した。中でも、サザンブロッティングにより高copy数が導入されたclone#1を同定し、この上清中のルシフェラーゼ活性は最も高値を示した。変異SOD1の転写を抑制する低分子化合物モニタリングシステムを確立したことにより新規治療薬の同定を目指す。

また、研究過程において偶然発見した2-(3-シアノ-4-イソプロトキシフェニル)-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→112.0±4.6日に、生存期間を119.7±3.3日→136.4±3.3日に、病脳期間を20.8±2.3日→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】

AAV8ベクターは効率よく神経細胞およびグリア細胞に遺伝子導入でき、マウス尾静脈への注入により、全身の骨格筋や脳へ導入できた。また、過剰発現を防ぐ安全機構として、誘導型Cre recombinaseの発現をDoxと4-OHTという経口投与可能な薬剤により調整可能なAAVベクターの開発に成功した。パーキンソン病患者2症例の両側被殻に2型AAVベクターを注入したところ、体液中にベクターゲノムは検出されず、中和抗体の上昇も認めなかったことで安全性が確認された。

一方、ポリオウイルスでは、キャプシド蛋白質コーディング領域を欠損したRNAをゲノム

として持つDI粒子の感染では細胞毒性は見られなかった。そこで、この領域にHGF mRNAを挿入しベクターを構築した。しかし、モノシストロニックRNAへの挿入では分泌型蛋白質の発現が起こらなかったため、ジシストロニックmRNAとし、第1シストロンで外来mRNAを、第2シストロンからRNA複製用蛋白質を発現させた。これにより神経細胞毒性を示さず分泌型蛋白質を発現するポリオウイルスベクターを作製することに成功した。

【肝細胞増殖因子(HGF)による治療法開発】

HGFは脊髄運動ニューロンに加え、脳幹部運動ニューロンの細胞死抑制効果を持つことを明らかにした。その作用分子機構として、HGFは運動ニューロンに直接作用し、活性化型カスパーゼ-1,-3および-9やカスパーゼ阻害因子のXIAPの発現抑制作用をもつことを明らかにした。また、HGFは活性化ミクログリアや反応性アストロサイトの集積を抑制し、神経細胞への直接作用に加えて、グリオーシスを修飾することでALSの病態進行抑制に寄与することが明らかとなった。

【Dorfinキメラ蛋白質による治療法開発】

CHIP-Dorfinキメラタンパク質は野生型Dorfinに比べ、より強い変異SOD1結合性、ユビキチン化活性、変異SOD1分解能、神経毒性軽減効果を有していた。このキメラタンパク質を導入することで、変異SOD1-Tgマウスの治療効果が高まることが期待される。

【変異SOD1の発現抑制による治療法開発】

G93A SOD1マウスをanti-SOD1 shRNAマウスと掛け合わせ、変異SOD1の発現を抑制し発症を防ぐことを示した。しかし、このマウスでは内因性の野生型SOD1も抑制され肝障害が認められた。そこでSOD1に対する新規shRNA発現AAV8ベクターを開発し、トランスジーンをU6-shRNAを8つ繋げることにより効果を増強し、これをマウスに経静脈的に全身性に投与したところ、shRNAに起因する明らかな副作用なく、肝臓において長期間持続するSOD1の発現抑制に成功した。

【ALS再生療法へ向けての基礎的研究】

マウスES細胞から低濃度レチノイン酸処理した胚様体を介してニューロスフェアを誘導する方法を開発した。このニューロスフェアをALSモデルラットの腰髄に移植したところ、NeuN陽性およびChAT陽性コリン作動性ニューロンに分化した。また、生着したニューロンは、SynaptophysinやPSD95で染色されるシナプスを形成していた。これらの結果から、ES細胞由来神経幹細胞は、*in vivo*でも機能的なニューロンに分化し得ると考えられた。さらに、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。

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、さらにBrdU+nestin二重陽性細胞が増加し、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、CSPG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を培養細胞および線虫においてノックダウンし疾患モデル作成を試みた。培養細胞モデルにおいては、細胞死とともにautophagosome-lysosomeの癒合障害によるautophagosome形成の促進が観察された。オートファジーの障害はALS患者脊髄運動ニューロンでも確認された。一方、線虫モデルにお

いては、*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。これらのモデルは、孤発性ALSの少なくとも一部の病態を反映しており、有用なモデルとなる可能性を秘めている。

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RNA編集率は低下し、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、ANG1-4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られられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Niwa J, Yamada S, Ishigaki S, Sone J, Takahashi M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. *J Biol Chem.* 282:28087-28095. (2007)

他の論文発表や学会発表は別掲

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)

遺伝子発現プロファイリングに基づく ALS の病態解明 ・ 治療法開発・新規疾患モデルの開発

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：田中 章景, 和座 雅浩, 丹羽 淳一, 黄 哲, 蔣 月梅,
石垣 診祐, 勝野 雅央, 曾根 淳, 井口 洋平, 山田 新一,
飯島 正博, 山本 正彦, 道勇 学

研究要旨：我々は、これまで遺伝子発現プロファイルの作成を通じて、多くの ALS 病態関連分子の同定を行ってきた。このうち新規ユビキチンリガーゼ (E3) Dorfin は、家族性 ALS の原因である変異 SOD1 の分解を促進する活性を有している。そこで、Dorfin による治療効果を高めるために Dorfin と、同じく E3 活性を有する CHIP のキメラタンパクを作成し、変異 SOD1 に対する優れた神経毒性抑制効果を確認した。また、変異 SOD1 の神経細胞毒性発現機序を明らかにするために、SOD1 分子のシステイン残基に注目した変異 SOD1 特異的な異常ジスルフィド結合による高分子凝集体形成、さらに神経細胞毒性は、SOD1 分子の 6 番および 111 番のシステイン残基を同時に置換することにより著明に抑制された。また、変異 SOD1-Tg マウスにおいても、病変存在部位に異常なジスルフィド結合による高分子凝集体形成が生じていることが明らかになった。一方、孤発性 ALS においては、患者の運動ニューロン特異的な遺伝子発現プロファイル解析、およびそれに引き続く発現動態の解析の結果、神経変性過程初期に発現低下を示す分子として dynactin1 を同定した。そこで、この発現変化を培養細胞、線虫に再現することにより ALS の疾患モデル作成を試みた。siRNA 法により SH-SY5Y 細胞において dynactin1 をノックダウン (KD) したところ、細胞死が引き起こされ、autophagosome-lysosome の癒合障害による autophagosome 形成の促進を認めた。また、線虫においては、神経組織特異的な dynactin1 遺伝子ノックダウンの結果、運動ニューロン変性が誘発され、運動機能障害の表現型が観察された。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り、これらの培養細胞モデル、線虫モデルは孤発性 ALS の重要な病態を反映する疾患モデルになりうると考えられた。

A. 研究目的

ALS は、運動ニューロンが選択的に変性し細胞死に陥ることが最終病理像であるが、この病態形成機序は不明である。我々は、これまで遺伝子発現プロファイルの作成を通じて、多くの ALS 病態関連分子の同定を行ってきた。このうち Dorfin はヒト脊髄よりクローニングした新規ユビキチンリガーゼ (E3) であり、家族性 ALS の原因である変異 SOD1 の分解を促進する活性を有している。治療への展開を見据え、Dorfin の半減期が短いという欠点を補うべく、Dorfin の変異 SOD1 特異的結合能を保存しながら、より安定して高発現する人工 E3 の開発を試みた。

また、家族性 ALS では病変特異的な凝集体形成能の獲得が ALS の病態に密接に関わっていると推定される。我々は SOD1 を発現させた培養細胞モデルにおいて、ユビキチン-プロテアソーム系阻害に伴い、異常なジスルフィド結合を形成した SOD1 高分子凝集体が変異 SOD1 特異的に生じることを見出した。そこで、SOD1 分子のシステイン残基が凝集体形成および細胞毒性発揮に及ぼす影響を明らかにすることを目指した。

一方、孤発性 ALS は遺伝性のものに比べはるかに有病率が高いにも関わらず、病態形成の出発点となる病因分子が不明なため、病態関連

分子の発見は遅れていた。我々はレーザーマイクロダイセクション法を用いた運動ニューロン特異的な遺伝子発現プロファイリングの結果、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。そこで、これらの遺伝子の発現変化を培養細胞および線虫において再現することにより孤発性ALSの疾患モデルを開発することを目的とした。

B. 研究方法

【Dorfin キメラタンパク質による治療法開発】

Dorfinの変異SOD1認識部位であるC末側部分と、強力なタンパク質品質管理活性を有するCHIPのE3活性部位であるU-Boxを様々な組み合わせで融合した種々のキメラタンパク質発現コンストラクトを作成し、各々の神経細胞保護効果等を解析した。

【変異SOD1の神経細胞毒性の発現機序解明】

SOD1分子は、アミノ酸残基6番, 57番, 111番, 146番に4か所のシステイン残基を有するが、これらを種々の組み合わせでセリン残基に置換したC→S変異体を発現するベクターを作製し、培養細胞(HEK293, Neuro2a)に発現させた。抽出したタンパク質のうち可溶性画分はWestern解析、不溶性画分はフィルタートラップアッセイによりSOD1高分子凝集体形成を検討した。また蛍光顕微鏡下でのSOD1封入体の出現頻度の評価、およびMTSアッセイによる細胞viabilityの測定を行った。変異SOD1-Tgマウスでは大脳、脳幹、小脳、脊髄および肝臓より抽出したタンパク質について、変異SOD1のジスルフィド結合による凝集体形成の組織選択性を解析した。

【孤発性ALS疾患モデルの開発】

遺伝子発現プロファイルの結果、運動ニューロン特異的な発現変化を確認したALS病態関連分子の一部(Dynactin1, EGR3, ACATN, KIAA0231, DR5, CCNC)の発現動態を、様々な病期の孤発性ALS20例およびコントロール7例の腰髄を用いて、神経変性マーカー(残存運動ニューロン数、ニューロフィラメントH(NFH)蓄積、ユビキチン化蛋白出現)との関連で解析した。

この結果、特に神経変性過程初期から発現低

下を来していることが明らかとなったdynactin1について、siRNA法によりSH-SY5Y細胞において遺伝子発現をノックダウン(KD)し、その影響を各種アッセイ(細胞死、アポトーシス、オートファジー関連)により検討し、孤発性ALS培養細胞モデルの確立を目指した。

一方、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。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。

C. 研究結果

【Dorfin キメラタンパク質による治療法開発】

CHIPのU-Box部位をN末に持ち、Dorfinの変異SOD1結合部位をC末に有するキメラタンパク質において、より強い変異SOD1結合性とユビキチン化活性を認め、野生型Dorfinに比べて変異SOD1の分解をより促進した。さらに、その中で野生型Dorfinよりも優れた神経毒性抑制効果を有するDorfinキメラタンパク質を同定しえた。

【変異SOD1の神経細胞毒性の発現機序解明】

変異SOD1特異的な異常ジスルフィド結合による高分子凝集体形成は、SOD1分子の6番および111番のシステイン残基を同時に置換することにより著明に抑制された。変異SOD1を発現させたNeuro2aを神経分化させると核近傍に封入体を形成するとともに神経細胞毒性を生じるが、6番および111番のシステイン残基をセリン残基に同時置換することによりこれらは抑制された。さらに、変異SOD1-Tgマウスにおいても、病変の存在する脳幹および脊髄において界面活性剤抵抗性の異常なジスルフィド結合による変異SOD1の高分子凝集体形成が生じていることが明らかになった。

【孤発性ALS疾患モデルの開発】

ALS20例における詳細な検討の結果、NFHやユビキチン化蛋白が蓄積しておらず、残存運動ニューロン数が保たれている神経変性前もし

くは変性初期から dynactin1 の発現が低下していた。そこで、このように神経変性過程の上流に位置すると考えられる dynactin1 の遺伝子発現変化を培養細胞、線虫に展開することにより、ALS の疾患モデル作成を試みた。

SH-SY5Y 細胞では、dynactin1 KD により、MTT assay, PI staining の結果、時間依存性に細胞死が生じることを確認したが、DNA ladder assay、caspase3 ウェスタンブロット、Tunel 法での検討では、これがアポトーシス性である証拠は得られなかった。次に、細胞死に至る経路を明らかにするためオートファジー機能を検討したところ、autophagosome 形成のマーカーである LC3 の発現が上昇、さらに、電顕の結果からも autophagosome 形成が亢進していることが明らかとなった。また、lysosome のマーカーとして lgp85 を用いると、dyactin1 KD では autophagosome と lysosome の癒合障害が認められた。さらに、ALS 患者脊髄運動ニューロンにおいても、dynactin1 の発現が低下するほど LC3 の発現が上昇するという相関を認めた。

線虫モデルにおいては、dnc-1 KD 群はコントロール群に比して、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 KD 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。これは、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 KD 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

【変異 SOD1 の神経細胞毒性の発現機序解明】

本研究により、野生型 Dornfin に比べ、より強力な変異 SOD1 ユビキチン化・分解促進活性を有し、安定して発現するキメラタンパク質が得られた。このキメラタンパク質を導入することで、変異 SOD1-Tg マウスの治療効果が高まることを期待できる。遺伝子工学的手法を用いて、神経変性疾患の原因となる異常タンパク質をより強力に分解する人工タンパク質を開発する手

法は、異常タンパク質蓄積により生ずる神経変性疾患の治療戦略として今後有望であると思われる。

【変異 SOD1 の神経細胞毒性の発現機序解明】

SOD1 タンパク質は分子内ジスルフィド結合を形成することにより分子を安定化させているが、システイン残基が分子内ではなく分子間で誤ったジスルフィド結合を形成することが、変異 SOD1 の凝集体形成および細胞毒性に強く関与していると考えられた。この異常なジスルフィド結合形成は病変選択的に生じており、選択性に係わる因子の存在が示唆される。今後このような因子を同定してゆくことにより、変異 SOD1 による ALS 病態の分子機序がさらに詳細に明らかになるものと思われる。

治療に向けた展開では、異常ジスルフィド結合の形成を抑制することが重要であると考えられる。変異 SOD1 の異常ジスルフィド結合を標的とした新規 ALS 治療薬の創薬のために、変異 SOD1 の異常ジスルフィド結合形成を簡便に評価することができる我々の開発した培養細胞モデルは非常に有用であると考えられた。

【孤発性 ALS 疾患モデルの開発】

ALS 研究においては変異 SOD1 トランスジェニックマウスがその疾患モデルとして広く使われているが、これは必ずしも孤発性 ALS の病態をそのまま反映しているわけではない。そこで、我々は、ALS 患者脊髄運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイリングからスタートし、その発現動態の解析により神経変性初期より発現変化を来している分子の 1 つとして dynactin1 を同定し、その発現変化を培養細胞や動物に展開することにより疾患モデルができないだろうか考えた。

dynactin1 の発現低下を siRNA 法を用いて SH-SY5Y 細胞に再現したところ、細胞死が引き起こされた。dynactin1 KD 細胞、さらに患者脊髄運動ニューロンではコントロールに比較して autophagosome の形成が亢進しており、これは、オートファジーの亢進または、autophagosome の外膜が lysosome と微小管依存性に癒合し autolysosome を形成していく autophagosome の成熟過程の障害に基づく。dynactin1 KD 細胞では LC3 と lgp85 の共局在エリアが、コントロールに比して少ないことより autophagosome の成

熟過程の障害が示唆された。

一方、線虫モデル作成にあたって採用した、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、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である。この手法により作成した線虫モデルでは、運動ニューロン障害に一致する表現型を示し、運動ニューロン変性を示唆する形態異常も確認することができた。

これらの培養細胞モデル、線虫モデルを今後さらに詳細に解析することにより孤発性ALSの病態解明および治療法開発を目指している。

E. 結論

孤発性ALS患者の運動ニューロン特異的な遺伝子発現プロファイル解析、およびそれに引き続く発現動態の解析の結果、神経変性過程初期から発現低下を示す分子としてdynactin1を同定した。この発現変化を培養細胞、線虫に展開することによって孤発性ALSの重要な病態の少なくとも一部を反映する疾患モデルの開発に成功した。現在作成中のdynactin1コンディショナルノックアウトマウスと併せ、これらのモデルが孤発性ALSの病態解明と治療法開発に大きく貢献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) Niwa J, Yamada S, Ishigaki S, Sone J, Takahashi M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. *J Biol Chem.* 282:28087-28095. (2007)

- 2) Jiang YM, Yamamoto M, Tanaka F, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Gene expressions specifically detected in motor neurons (dynactin 1, early growth response 3, acetyl-CoA transporter, death receptor 5, and cyclin C) differentially correlate to pathologic markers in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 66:617-627. (2007)
- 3) Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G. Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol Dis.* 25:331-341. (2007)

2. 学会発表

- 1) Tanaka F, Jiang YM, Yamamoto M, Huang Z, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Sobue G. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *17th International Symposium on ALS/MND* Yokohama, Japan, Oct 2006
- 2) 丹羽淳一, 山田新一, 曾根 淳, 高橋美穂, 道勇学, 祖父江元: 変異SOD1と特異的に結合するタンパク質の探索同定 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 2007.5

その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)

1. 特許登録

出願番号: PCT/JP2007/055493

発明者: 山田新一、丹羽淳一、祖父江元

発明の名称: 凝集体形成性タンパク質分解用の発現コンストラクト、及び凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法

出願人: 国立大学法人名古屋大学

出願日: 2006年3月20日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

筋萎縮性側索硬化症に対する再生誘導療法の開発

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⁾、船越 洋²⁾、
中村 敏一²⁾、岡野 栄之³⁾

¹⁾東北大学神経内科, ²⁾大阪大学分子再生医学, ³⁾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、細胞補充(内在性神経前駆細胞を再生誘導因子によって賦活する試み)と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。発症後のALSラットモデル髄腔内に再生誘導因子EGFとFGF-2を同時投与すると新生細胞の増加、未分化神経前駆細胞の増殖が促進された。また、ALSラットモデル脊髄では細胞外基質に再生阻害因子コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CS-PG)が発症前から進行性に発現亢進していたことから、コンドロイチン硫酸(CS)分解酵素を髄腔内投与すると、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。再生誘導因子投与や移植による細胞補充と再生許容環境構築を組み合わせることで、ALSにおける有効な神経再生戦略の実現が期待される。

A. 研究目的

系統的かつ進行性の運動ニューロン変性を主徴とする筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は致死的にもかかわらず有効な治療法がなく新規治療法開発が希求されている。正常成体脊髄にも神経幹(前駆)細胞が存在し潜在的再生能が報告されてきた中で、ALSに対する神経再生療法の開発は画期的治療戦略として注目されている。本研究では我々が開発したラットのALSモデルを用いて、①内在性神経前駆細胞を再生誘導因子の髄腔内投与によって賦活するとともに、②再生許容的な細胞外微小環境の構築を試み、将来的な再生医療開発へと寄与することを目的とした。

B. 研究方法

研究1. 再生誘導因子の髄腔内投与による内在性神経前駆細胞賦活の試み

His46Arg変異Cu/Zn SOD遺伝子導入(Tg)ラットを以下の研究で対象とした。発症後のTgラットにEGFおよびFGF-2の同時に一週間髄腔内へ持続投与して、人工髄液のみを投与する対照

群と比較した。新生細胞はBrdUの皮下持続投与によって標識し、共焦点レーザー顕微鏡下にBrdUと各種細胞選択的マーカーとの多重免疫組織化学を行い、PCソフトウェアを用いて半定量的に解析した。

研究2. コンドロイチン硫酸分解酵素の髄腔内投与による再生許容環境構築の試み

- A) 発症前から発症後期まで3病期のTgラット腰髄における再生阻害因子コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CS-PG)の発現を経時的に免疫組織化学と免疫ブロッティングにより解析した。
- B) さらに発症後のTgラット髄腔内にコンドロイチン硫酸(CS)分解酵素(chondroitinase ABC, ChABC)を一週間持続投与して*in vivo*でのCS分解効果の確認した上で、各種CS-PG発現、ミエリン由来再生阻害因子の変動、新生細胞(BrdUで標識)の挙動や内在性再生機転促進の有無、変性病態そのものの変化を免疫組織化学的に検討した。

〔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

研究1.において、対照群に比してEGF+FGF2投与群ではBrdU陽性の新生細胞が腰髄実質広汎にわたって有意に増加しており、未分化神経前駆細胞やグリア前駆細胞などの増殖促進が明らかとなった。FGF受容体はニューロンのみならず中心管周囲上衣層やグリア前駆細胞、アストロサイトに発現が確認され、前角細胞数に両群間の有意差がなかったことから、EGF+FGF2の前駆細胞への直接効果が示唆された。

研究2.においては、neurocanを筆頭として中枢神経系の主要なCS-PGが発症前からTgラット腰髄の病変主座(前角)とその周囲白質に有意に発現亢進していた。とくにneurocanは顕著かつ一貫して進行性の沈着亢進を示す一方でversican V2やphosphacanの発現亢進ピークは発症早期にあってCS-PG分子種ごとに異なる意義・調節メカニズムが示唆された。Tgラット発症後期には対照に比して約40倍にも沈着する全長型neurocanが確認され、正常成体脊髄ではほとんど検出されない再生阻害能の強いアイソフォームが見出された。

このようなTgラット髄腔内にChABCを投与すると、腰髄白質から前角外縁部を中心に有意なCS分解効果が確認された。ChABC投与群ではCS-PGのうちphosphacanの減少とともに代償性とみられるミエリン由来再生阻害因子(MAG, Nogo-A, OMgp)の発現亢進もみられたが、ALS病変の主座である前角では、新生細胞の有意な増加が明らかとなった。ChABC群では対照群に比して腰髄前角のNG2陽性前駆細胞、ミクログリアの増殖、PSA-NCAM/Hu C/D二重陽性の未成熟ニューロン数の増加、シナプスマーカーの増加なども有意に認められた。

D. 考 察

研究1.により細胞移植のみならず、再生誘導因子の髄腔内投与という方法によって内在性神経前駆細胞を脊髄実質広汎にわたって賦活し得

ることが示された。今後、EGF+FGF2以外の因子も含めた適切な再生誘導因子の組合せ投与がより有効な内在性神経前駆細胞賦活法となる可能性があり、投与時期、用量、期間も十分検討していく必要がある。また、研究2.によりALSモデル脊髄では本来再生誘導に対して非許容的な環境が存在する可能性が初めて示唆された。短期間のCS分解によって細胞外微小環境を変化させるだけで、脊髄前角における内在性再生機転を促進し得る結果が得られたことから、今後ChABC投与のような細胞外微小環境を標的とした介入を研究1.のような細胞補充と組み合わせることで、より有効な神経再生誘導を実現できる可能性がある。

E. 結 論

ALSにおける画期的治療法となり得る神経再生療法の開発をめざすにあたっては、外来性細胞移植や内因性再生機転の活性化、いずれの再生戦略においても神経再生の有効な誘導のためには、再生しやすい細胞外微小環境(再生許容環境)の形成も同時に重要と考えられる。今後、再生誘導因子の投与、再生阻害因子の抑制、反応性グリア増生のコントロールなどを組み合わせることで、ALSにおける画期的治療法の一翼を担う神経再生療法の開発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 Y: Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironment of spinal motor neurons in ALS transgenic rats. *J Neurosci Res*, in press
 - 6) Kato M, Kato S, Abe Y, Nishino T, Ohama E, Aoki M, Itoyama Y: Histological recovery of the hepatocytes is based on the redox system upregulation in the animal models of mutant superoxide dismutase (SOD) 1-linked amyotrophic lateral sclerosis. *Histol Histopathol* 2006; 21: 729-42.
 - 7) Koyama S, Arawaka S, Chang-Hong R, Wada M, Kawanami T, Kurita K, Kato M, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Sobue G, Chan PH, Kato T: Alteration of familial ALS-linked mutant SOD1 solubility with disease progression: its modulation by the proteasome and Hsp70. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 719-30.
 - 8) Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H: Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 83: 119-133, 2006
 - 9) Mizuno T, Aoki M, Shimada Y, Inoue M, Nakaya K, Takahashi T, Itoyama Y, Kanazawa M, Utsumi A, Endo Y, Nomura T, Hiratsuka M, Mizugaki M, Goto J, Hongo M, Fukudo S: Gender difference in association between polymorphism of serotonin transporter gene regulatory region and anxiety. *J Psychosom Res* 2006; 60: 91-7.
 - 10) Onodera Y, Aoki M, Mizuno H, Warita H, Shiga Y, Itoyama Y. Clinical features of chromosome 16q22.1 linked autosomal dominant cerebellar ataxia in Japanese. *Neurology* 2006; 67: 1300-2.
 - 11) Takahashi T, Aoki M, Imai T, Yoshioka M, Konno H, Higano S, Onodera Y, Saito H, Kimura I, Itoyama Y: A case of dysferlinopathy presenting choreic movements. *Mov Disord* 2006; 21: 1513-5.
 - 12) Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y: Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. *Neuropathology* 25: 365-370, 2005
 - 13) Ikeda K, Aoki M, Kawazoe Y, Sakamoto T, Hayashi Y, Ishigaki A, Nagai M, Kamii R, Kato S, Itoyama Y, Watabe K: Motoneuron degeneration after facial nerve avulsion is exacerbated in presymptomatic transgenic rats expressing human mutant Cu/Zn superoxide dismutase. *J Neurosci Res* 82: 63-70, 2005
 - 14) Kato S, Kato M, Abe Y, Matsumura T, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E: Redox system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) : immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1) -mutated familial ALS, and SOD1-mutated ALS animal models. *Acta Neuropathol* 110: 101-112, 2005
 - 15) Chang-Hong R, Wada M, Koyama S, Kimura H, Arawaka S, Kawanami T, Kurita K, Kadoya T, Aoki M, Itoyama Y, Kato T: Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 194: 203-211, 2005
 - 16) Suzuki N, Aoki M, Hinuma Y, Takahashi T, Onodera Y, Ishigaki A, Kato M, Warita H, Tateyama M, Itoyama Y: Expression profiling with progression of dystrophic change in dysferlin-deficient mice (SJL) . *Neurosci Res* 52: 47-60, 2005
2. 学会発表
- 1) 割田 仁 ほか, ALSモデルラット髄腔内へのコンドロイチン分解酵素持続投与, 第48回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋
 - 2) 水野秀紀 ほか, ALSモデルラット脊髄におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの変化, 第48回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋
 - 3) 青木正志 ほか, ALSモデルラット脊髄変性における内因性HGF/c-Met機構の意義, 第48回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋
 - 4) 割田 仁 ほか, 髄腔内成長因子投与による変異SOD1遺伝子導入ラットNG2陽性神経前駆細胞の活性化, Neuro2007 [第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同学会] 2007. 9 横浜
 - 5) Warita H, *et al.* Intrathecal infusion of anti-hepatocyte growth factor antibody exacerbates disease progression in a rat model of ALS. 17th International Symposium on ALS/MND, November 30 – December 2, 2006. Yokohama

- 6) 割田 仁 ほか, 発症後のALSモデルラットにおける再生誘導因子の髄腔内複合投与, 第47回日本神経学会総会 2006.5 東京
- 7) 水野秀紀 ほか, ALSモデルラット脊髄における再生阻害因子の発現, 第47回日本神経学会総会 2006.5 東京
- 8) 青木正志 ほか, 抗HGF抗体の髄腔内投与によるALSラット病態進行の促進, 第47回日本神経学会総会 2006.5 東京
- 9) 割田 仁 ほか, 外来性再生誘導因子投与によるALSモデルラット脊髄神経前駆細胞賦活の試み, 第46回日本神経学会総会 2005.5 鹿児島
- 10) 青木正志 ほか, ALSラットに対する肝細胞増殖因子髄腔内投与による病態進行抑制の機序, 第46回日本神経学会総会 2005.5 鹿児島

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