

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

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、後者が90%以上を占めるALSの治療には、両者の共通病態である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いる。肝細胞増殖因子(HGF)は運動ニューロンを含む神経細胞への強力な神経生存促進因子であることから、私達はHGFの発現誘導がALSにおける運動ニューロン変性を抑制する有効な戦略と考えこれまで解析を続けてきた。そしてHGFがヒトALSの原因遺伝子の1つであるSOD1G93Aを過剰発現するトランスジェニックマウス(ALS-Tg)の脊髄運動ニューロンの細胞死および神経繊維変性をよく抑制し、ALS-Tgの運動機能を改善し、寿命を延長する事を見いだしてきた。一方で、ALSでは脊髄に加えて脳幹部の運動ニューロンも広範囲に変性するが、ALS-Tgの脳幹部の神経変性を抑制する効果のある因子は良く明らかとされていない。また、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シスが知られる。最近、活性化ミクログリアの増加を伴うグリオシスがALSの発症後進行に重要である事が明らかとされた。したがってミクログリオシスの抑制が、運動ニューロンへの栄養作用とは別の治療ターゲットとして注目されている。本研究では、HGFがALSの脳幹部神経変性を抑制すること、また、ALSの病態末期に於けるミクログリオシスを大幅に抑制することを明らかとした。これらの結果から、HGFは脊髄から脳幹部迄広範囲の運動ニューロン死を抑制し、また疾患末期のグリオシスも抑制する効果を持つことが明らかとなった。以上からHGFが発症前の病態改善効果から発症後のALSの進行抑制にも有効な薬剤として臨床適用できることが期待される。東北大学神経内科との共同研究の結果、臨床適用に適した髄腔内投与の方法で、リコンビナントヒトHGF蛋白質がALS-Tgラットの運動神経細胞死を抑制し、寿命を延長することも明らかとなった。これらの動物レベルの研究成果を基盤に、今後さらに研究を進め、日本オリジナルな分子HGFによる新しいALS治療法をぜひ日本から発信していきたい。

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治療には、その共通病態である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。肝細胞増殖因子(Hepatocyte growth factor: HGF)は、初代培養肝細胞の増殖活性を基に精製・クローニングされた日本オリジナルな分子である(Nakamura T. et al, BBRC, 1984; Nakamura T et al., Nature 1989)。我々はこれまでHGFが多くの神経細胞に対して神経生存促進・神経突起伸張作用を示すことを明らかにしてき

た(Honda S. et al., Mol. Brain Res; Funakoshi et al., Clin Chim. Acta 2003)。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は運動神経に対して神経保護作用を示すことを報告した(Sun, Funakoshi et al., J. Neurosci., 2002)。この解析により、HGFを神経系に特異的に発現させると、脊髄運動ニューロンの神経細胞とその軸索の変性を抑制する事に加え、運動機能の改善、さらに寿命の延長効果をもつことを明らかとした。一方で、ALSでおこる運動神経細胞は、脊髄にとどまら

ず、舌下神経核や顔面神経核における運動神経細胞も変性するため、嚥下障害をはじめ多彩な運動機能障害がおこる、呼吸障害もしくは嚥下障害に続発する肺炎等で最終的に死にいたる点悲惨な病気である。多くの神経栄養因子は脊髄と脳幹の両方に神経栄養作用を示さない。そこでHGFが脳幹部の運動神経細胞に対しても神経変性を阻止できるかを知ることが、HGFをALS患者への治療に適用する上で最も重要なポイントとなる。また、最近グリア細胞(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制御とその分子機構について解析を行った。その結果、ここ3年の研究で、HGFは脊髄に加えて脳患部の運動神経細胞変性も阻止すること、さらにはグリオース抑制にも寄与することが明らかとなった。

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、ALS依存的なグリオースのHGFによる制御とその分子機構を免疫組織化学的に解析した。

[倫理面への配慮]

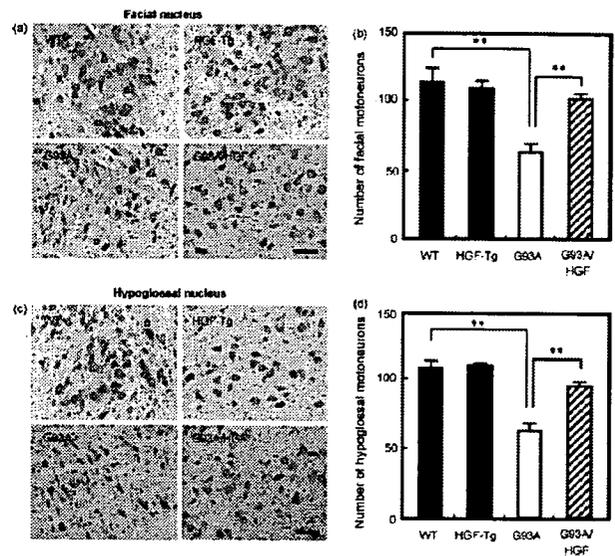
遺伝子組換え実験及び動物実験については、それぞれ大阪大学遺伝子組換え実験計画の承認のもと安全尾確保に留意するとともに、動物実験に関しても大阪大学医学部医学科動物実験委員会の承認のもと、倫理面および動物愛護に配慮し執権を実施する。

C & D. 研究結果および考察

(1) HGFは脳幹部の運動神経細胞死を抑制する

8ヶ月齢のWild-type littermate, HGF-Tg, ALS-Tg, ALS/HGFの4群について脳幹部の運動神経核である顔面神経核と舌下神経核について運動神経細胞死を比較・評価した。

その結果、ALS-TgにおいてはWild-type littermateに比べて顔面神経核における運動神経細胞数の顕著な減少を認めた。一方でALS/



上段:顔面神経核、下段:舌下神経核のNissl染色像と運動神経細胞数の定量評価の結果

Kadoyama, Funakoshi et al., Neurosci Res, 59 446-456, 2007

HGFにおいては、ALS-Tgで認めた顔面運動神経細胞数の低下が著明に抑制されていた。このことから、HGFが顔面神経核の運動神経細胞死を抑制することが明らかとなった。同様に舌下神経核の運動神経細胞についても、ALS-Tgで認められる神経細胞数の減少がALS/HGFでは著明に抑制されていた。以上の結果から、HGFは脊髄運動神経に加えて顔面、舌下と脳幹部の運動神経細胞死も抑制できることが初めて明らかとなった。このことは、脊髄運動神経細胞と脳幹部運動神経細胞の両方に機能できる点で、HGFの利点といえる。

(2) HGFの運動神経細胞死抑制の作用機序の解析:

HGFの作用分子機構についても解析を進め、1つの機序としてはHGFが活性化カスパーゼ1、-3、-9の誘導を抑制すること、またカスパーゼの上流でアポトーシス抑制に機能することが知られるXIAPを誘導する機能を持つことが明らかになった。これらの分子機序は、HGFが運動神経細胞に直接作用しneurotrophic作用を意味する。

(3) グリオースに対するHGFの機能:

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, Funakoshi, *et al*, J. Neurosci, 2002; Kadoyama, Funakoshi, *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の脊髄から脳幹部までの広範囲な運動神経細胞死を抑制することが明らかになったことに加えて、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も過去に報告した (Sun, Funakoshi, *et al*, J Neurosci., 2002)。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。東北大学神経内科石垣らにより リコンビナントHGF蛋白質の髄腔内投与が有効であることが明らかとなり (Ishigaki *et al*, 2007)、臨床に向けた現実的な投与方法も確立された。サルでの安全性が確認されれば、HGFによるALS臨床適用が実現する日も近いかもしれない。現在その準備を進めている。

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) M.Z. Zhao, *et al.*, Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells

- and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector, *J Cereb Blood Flow Metab* 26 (2006) 1176-1188.
- 9) M. Tanaka, *et al.*, Hepatocyte growth factor in mouse soleus muscle increases with reloading after unloading., *J. Phys. Ther. Sci.* 18 (2006) 33-41.
- 10) M. Niimura, *et al.*, Prevention of apoptosis-inducing factor translocation is a possible mechanism for protective effects of hepatocyte growth factor against neuronal cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab* 26 (2006) 1354-1365.
- 11) M. Niimura, *et al.*, Effects of hepatocyte growth factor on phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and hippocampal cell death in rats with transient forebrain ischemia, *Eur J Pharmacol* 535 (2006) 114-124.
- 12) M. Niimura, *et al.*, The protective effect of hepatocyte growth factor against cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia is related to the improvement of apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 level and inhibition of NADPH oxidase activity, *Neurosci Lett* 407 (2006) 136-140.
- 13) K. Nakamura, *et al.*, Possible role of scavenger receptor SRCL in the clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease, *J Neurosci Res* 84 (2006) 874-890.
- 14) Y. Hayashi, *et al.*, Adenoviral gene transfer of hepatocyte growth factor prevents death of injured adult motoneurons after peripheral nerve avulsion, *Brain Res* 1111 (2006) 187-195.
- 15) I. Date, *et al.*, Hepatocyte growth factor attenuates cerebral ischemia-induced increase in permeability of the blood-brain barrier and decreases in expression of tight junctional proteins in cerebral vessels, *Neurosci Lett* 407 (2006) 141-145.
- 16) S. Tanaka, *et al.*, Expression of Hepatocyte Growth Factor in Rat Skeletal Muscle., *J. Phys. Ther. Sci.* 17 (2005) 109-113.
- 18) K. Isogawa, *et al.*, Anxiolytic effect of hepatocyte growth factor infused into rat brain, *Neuropsychobiology* 51 (2005) 34-38.
- 19) N. Ishihara, *et al.*, Inhibition of apoptosis-inducing factor translocation is involved in protective effects of hepatocyte growth factor against excitotoxic cell death in cultured hippocampal neurons, *J Neurochem* 95 (2005) 1277-1286.
- 20) 船越 洋 他、HGFの神経疾患治療効果. *Clinical Neurosci*, 25: 500-501, 2007.
- 21) 船越 洋 他、HGFの神経保護作用機序. *Clinical Neurosci*, 25, 620-621, 2007.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 船越 洋 他、神経栄養因子・神経再生因子としてのHGF, 分担, 松本邦夫・田畑泰彦編集, **細胞増殖因子と再生医療**, 268-274, メディカルレビュー社, 2006.
- 26) 大谷 若菜 他、肝細胞増殖因子 (HGF) 、**広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査 (第6版)** 日本臨床 63, 116-122, 2005.

2. 学会発表

- 1) H. Funakoshi *et al.*, HEPATOCYTE GROWTH FACTOR (HGF) AS A NOVEL NEUROTROPHIC FACTOR FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS), The 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, Dec., 2006. 他.

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)

ALS 脊髄での神経再生の試み

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：ALS脊髄での神経再生のため、胚性幹細胞由来の運動ニューロンの正常ラット脊髄への移植、および増殖効果の高いEGF+FGF2投与による内在性神経幹細胞の活性化を試みた。移植された胚性幹細胞由来の運動ニューロンは生着し、EGF+FGF2投与により、発症したALS脊髄では内在性未分化神経幹細胞増殖は活性化し、神経前駆細胞への分化が活性化した。

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、胚性幹細胞(ES cell)から神経系への分化を導くことができることがわかり、脊髄では内在性神経幹細胞は中心管の上皮細胞周囲に存在し、外傷で神経幹細胞の増殖は活性化することがわかっている。しかし胚性幹細胞由来の運動ニューロンが移植により脊髄に生着するか、またALS脊髄での内在性神経幹細胞の増殖、移動、分化については十分わかっていない。

そこで本研究では、胚性幹細胞から運動ニューロンへの分化誘導し、正常ラット脊髄への移植を試みた。またALSモデルマウスである、SOD1(G93A) Tgマウスの脊髄と正常マウスの脊髄に、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、ALS脊髄での神経幹細胞の増殖、移動、分化を検討し、神経再生の活性化を試みた。

B. 研究方法

【胚性幹細胞由来運動ニューロンの移植】

胚性幹細胞(ES cell)は、運動ニューロンの発生期に特異的に発現するHB9のプロモーターの支配下で緑色蛍光タンパク(GFP)が発現するように作製されたTgマウスから確立した。

このTgマウスの脊髄では運動ニューロンのみがGFPを発現する。確立したES cellをレチノイン酸、ソーニックヘッジホッグ(Shh)を加えた培地で培養し、運動ニューロンに分化させた。運動ニューロンに分化した細胞を生後2日の正常ラット脊髄にガラスピペットを使用して移植した。ラットはシクロスポリンを投与して免疫抑制をして3週間飼育し、その後4% PFAを用いて灌流固定し、脊髄を切片にして移植された細胞を観察した。

【内在性神経幹細胞の活性化】

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 μg) + FGF2(4 μg)を腰髄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腰髄を灌流固定し、切片にした。Nissl染色にてL4腰髄前角の運動ニューロン数を計測した。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抗体と未分化神経幹細胞に対する抗nestin抗体、未分化神経前駆細胞に対する抗PSA-NCAM抗体、成熟ニューロンに対する抗neuron-specific nuclear protein(NeuN)抗体、アストロサイトに対する抗glial fibrillary acidic protein(GFAP)抗体、ミクログリアに対する抗

Iba1 抗体による免疫染色を行った。

〔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

【胚性幹細胞由来運動ニューロンの移植】

ES cell からレチノイン酸、Shh を用いて分化誘導した細胞は30%がGFPを発現しており、それらは短い神経突起を伸ばしており、また神経細胞のマーカーである、ニューロフィラメント、運動ニューロンのマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼを発現しているため、運動ニューロンに分化したものと考えられた。レシピエントラット脊髄に移植した運動ニューロンは、3週間後も生存していた。形態学的には神経突起を伸ばし、ニューロフィラメント、HB9 (GFP)、コリンアセチルトランスフェラーゼを発現していた。神経突起は、移植した脊髄前角から対側まで灰白質内を伸ばしたが、白質内への進入はみられなかった。

【内在性神経幹細胞の活性化】

L4 腰髄の運動ニューロン数は、Tg マウスは、vehicle 投与群、EGF+FGF2 投与群とも、Non-Tg マウスよりも明らかに減少していた (図1)。

BrdU 陽性細胞数は、Tg マウスにおいて増

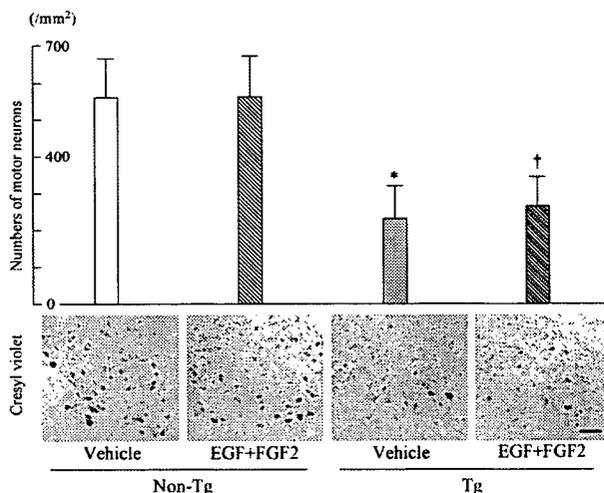


図1 L4 腰髄における運動ニューロン数

加しており、Tg マウスの灰白質では、BrdU 陽性細胞は後角よりも前角に多く存在した。EGF+FGF2 投与により、Tg マウス、Non-Tg マウスとも BrdU 陽性細胞数は増加した (図2)。

BrdU との二重免疫染色では、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 を発現しており、次いで Iba1、GFAP、PSA-NCAM の順に発現が多かったが、BrdU+NeuN 二重陽性細胞は存在しなかった (図2)。

BrdU+nestin 二重陽性細胞数は、Tg マウスにおいて増加しており、EGF+FGF2 投与によりさらに増加した。BrdU+nestin 二重陽性細胞は、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 投与により、前角での BrdU+nestin 二重陽性細胞数はさらに増加した (図2)。

BrdU+PSA-NCAM 二重陽性細胞数は、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、BrdU+GFAP 二重陽性細胞数は、

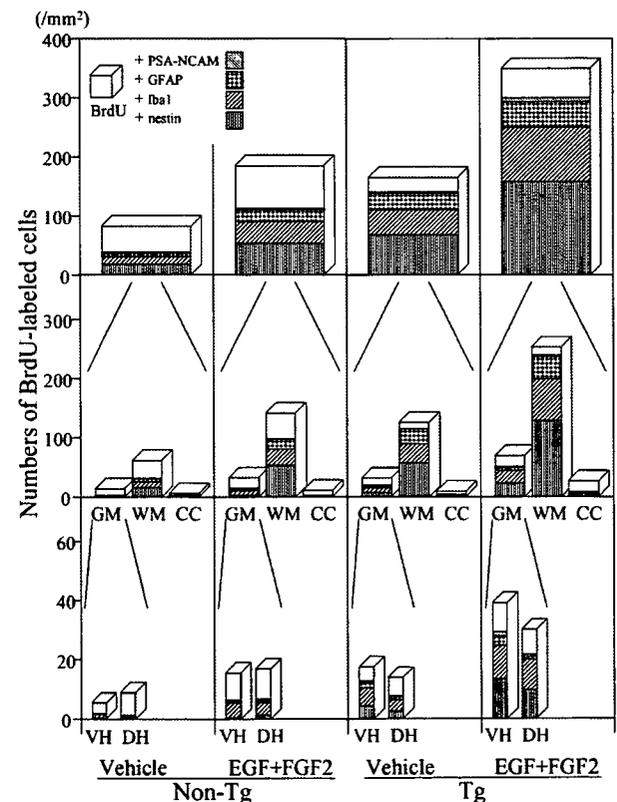


図2 L4 腰髄における BrdU 陽性細胞数

vehicle 投与群ではTgマウスにおいてNon-Tgマウスより増加しており、EGF+FGF2投与をすると、やや増加した(図2)。

BrdU、nestin、GFAPの三重免疫染色では、多くのBrdU+nestin二重陽性細胞はGFAPを発現しなかった。

D. 考察

ES cellからレチノイン酸、Shhを用いて分化誘導した細胞は運動ニューロンのマーカーを発現し、移植したラット脊髄内で神経突起を伸ばすことが分かったが、周囲の細胞とシナプスを形成するなどの機能の誘導が必要と考えられた。

BrdU陽性細胞数は、vehicle 投与群ではTgマウスにおいて増加しており、発症したALS脊髄では細胞増殖が活性化していることを示唆している。BrdU、nestin、GFAPの三重免疫染色の分析で、多くのBrdU+nestin二重陽性細胞はGFAPを発現しなかったことから、BrdU+nestin二重陽性細胞の多くが増殖した神経幹細胞であると考えた。BrdU+nestin二重陽性細胞数は、vehicle 投与群ではTgマウスにおいて増加しており、発症したALS脊髄では神経幹細胞の増殖が活性化していることを示唆している。Tgマウスの灰白質では、BrdU+nestin二重陽性細胞は後角よりも前角に多く存在し、EGF+FGF2投与により増強した。またEGF+FGF2投与により、Tgマウスの前角での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が神経幹細胞の増殖を促し、EGF+FGF2投与によりさらにその増殖が増強され、神経前駆細胞への分化を活性化することを示唆している。

E. 結論

胚性幹細胞由来の運動ニューロンは移植により脊髄に生着し、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

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

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

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)
共同協力者：加藤 雅子¹⁾、青木 正志²⁾、糸山 泰人²⁾、船越 洋³⁾、大谷 若菜³⁾、
角山 圭一³⁾、中村 敏一³⁾、西野 武士⁴⁾、阿部 靖子⁴⁾、平野 朝雄⁵⁾

- ¹⁾鳥取大学医学部分子病理学分野
- ²⁾東北大学大学院医学系研究科神経内科分野
- ³⁾大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野
- ⁴⁾日本医科大学生化学第一教室
- ⁵⁾米国 Montefiore Medical Center 神経病理部門

研究要旨：筋萎縮性側索硬化症 (ALS) SOD1 トランスジェニックマウス：G1H-G93A トランスジェニックマウスにおいては、変異SOD1 (G93A-SOD1) ストレスにより、脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、最終的には細胞死に至る。しかし、肝臓においては、一度は変性組織像を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈した。この肝細胞正常回復機構に関しては、G93A-SOD1 ストレスに対して、肝細胞がレドックスシステムの up-regulate 機構が寄与していたことに加え、同時に、自ら守って生存する機構として、HGF/活性型リン酸化cMet (pcMet) システムの up-regulation 機構が強く関与していたことを解明した。一方、G93A-SOD1 ストレスに対し、脊髄前角細胞は内因性生存機構として、レドックスシステムと HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を惹起し続けるが、最終的には、この機構を振り切るかたちで細胞死に至っていることが判明した。即ち、細胞死のプロセスを歩む脊髄前角細胞に対して、レドックスシステム基幹酵素及びHGF治療による組織学的完全回復の病理組織的論拠たり得ることを証明した。この証明過程に、偶然にも、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である化合物 (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 が、G1H-G93A トランスジェニックマウスにおいて顕著に優れた ALS 治療作用を示すことを見出した。ALS 治療効果については、生後 80 日より 5mg/kg の化合物 (3) を連日経口に投与したところ、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

致死的神経変性疾患の代表である。変異SOD1を伴った生体系においては、変異SOD1ストレスは脊髄前角細胞だけでなく、肝臓にも影響を及ぼすが、神経系と異なり、これら組織では、細胞死に至らない。今回我々は、肝臓の

組織変化に着目し、これらの各臓器の細胞が、変異SOD1ストレスから、どのようなメカニズムで自らを守って生存しているのかについて、我々はレドックス・HGF/活性型リン酸化cMet (pcMet) システムの観点から解析した。ALS-変異SOD1ストレスに対する脊髄前角細胞死の治療戦略目的として、レドックス・HGF/pcMet システムの観点から、ALS-変異SOD1トランスジェニックマウスの肝臓における一過性組織変性からの組織回復機序の病態解明を行い、脊髄前角細胞死回避、即ち、ALSの画期的治療に応用することを本研究の目的とした。この研究過程に、偶然にも、キサラ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が、G1H-G93Aトランスジェニックマウスにおいて顕著に優れたALS治療作用を示すことを発見した。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、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、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. レドックス・HGF/pcMetシステムに関する自己生存機構の基盤研究

脊髄と肝臓の各臓器の経時的病理組織学的解析には、ALS SOD1トランスジェニックマウス：G1H-G93Aマウスを使用し、対照には同時期の同胞を用いた。G1H-G93Aマウスでは神経症状発症前の生後90日齢、神経症状発症時の生後100日齢、神経症状進展期の生後110日齢、終末期に相当する生後120日齢までの4時点で解析した。灌流固定後、各臓器を取り出した。取り出された各臓器組織はそれぞれパラフィン包埋し、パラフィンブロックを作製した後、マイクロトームにてパラフィン切片とする。パラフィン切片は、HE染色法を施すと同時に、レドックス・HGF/pcMet システムの検索

として免疫組織化学的解析を施行した。即ち、ペルオキシレドキシシン (Prx) I, PrxII, グルタチオンペルオキシダーゼ (GPxI)、rabbit polyclonal anti-rat HGF antibody、rabbit polyclonal anti-c-Met phosphospecific antibodyの精製ポリクローナル抗体を使用し、ABC法との組み合わせで、DAB発色にて可視化した。

II. 化合物(3)によるALS治療研究

1. 材料及び方法

(1) 薬 剤

以下の2種類を用いた。

- 1) 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)と同様にして行なった。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定し、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(T_A 秒)を測定した後、角度(A度)と維持できた秒数(T_A 秒)との掛けた数値の総和： $\sum(A \times T_A)$ 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、 $\sum(A \times T_A) = 80 \times 5 + 65 \times 5 + 45 \times 5 = 950$ 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ホームを設置したものである。マウスを一方のプラットホーム上に置き、30cmの長さのビームを渡りきり反対側のプラットホ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

I. レドックス・HGF/pcMetシステムに関する自己生存機構の基盤研究

1. G1H - G93A トランスジェニックマウスにおける病理組織的所見の経時的形態変化

同胞における組織像:すべての日齢を通じて、

脊髄組織は正常脊髄組織所見そのものであった。肝臓の組織所見においても、すべての日齢を通じて、全く異常なく正常組織所見であった。

神経症状発症前の生後90日齢の時点における病理組織変化：脊髄組織では、脊髄前角細胞数には変化がみられないが、軽度ながら脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに空胞病理所見 (vacuolation pathology) を認めた。肝臓組織では、空胞形成を伴う水腫状変性肝細胞 (swollen hydropic hepatocyte) と好酸性暗肝細胞 (dark eosinophilic hepatocyte) とが混在した変性像を示した。この日齢では、swollen hydropic hepatocyte の数のほうが dark eosinophilic hepatocyte の数に比べ多数認められた。

神経症状発症時の生後100日時点における病理組織変化：脊髄組織では、著明な vacuolation pathology を認め、脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに多数の空胞が見られた。残存した脊髄前角細胞はやや小型化を示し、脊髄前角細胞数自体はわずかながら減少傾向を示した。肝臓組織では、依然として、swollen hydropic hepatocyte と dark eosinophilic hepatocyte とが混在した変性所見を示したが、生後90日齢の肝臓組織に比べ、両タイプの変性細胞の占める割合が変化していた。即ち、swollen hydropic hepatocyte の数の占める割合が減少し、dark eosinophilic hepatocyte 数の割合が増加した。また、swollen hydropic hepatocyte および dark eosinophilic hepatocyte のいずれにも空胞形成が認められたが、その大きさは、90日齢時点の空胞と比較すると、その大きさは減少し、小型化していた。

生後120日齢の終末期における病理組織変化：脊髄組織では、脊髄前角細胞は高度に変性・脱落・消失し、反応性アストロサイトの増生と高度のグリオーシスを認めた。同時に、封入体病理所見 (inclusion pathology) としては、Lewy body-like hyaline inclusion と astrocytic hyaline inclusion との両封入体を多数認めた。また vacuolation pathology としては、脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに多くの空胞を依然認めた。注目すべき所見は、肝臓においては、脊髄組織とは対照的に、swollen hydropic change や eosinophilic change 等の変性所見は認められず、肝細胞はほぼ正常組織所見に復していた。

2. G1H - G93A トランスジェニックマウスにおけるレドックスシステムの免疫組織化学的解析
マウスの正常脊髄の免疫組織化学的解析では、ほとんど全ての前角細胞の胞体および樹状突起がびまん性に PrxII を発現し、核も一部で陽性所見を示した。GPxI 染色でも、ほとんどの前角細胞の胞体および樹状突起がびまん性に染色され、核は染色性を示さなかった。即ち、正常脊髄前角細胞ではレドックスシステムの基幹酵素 PrxII/GPxI を一定レベル発現することにより、レドックスシステムを維持していた。G1H - G93A トランスジェニックマウスでは、レビー小体様硝子様封入体 (Lewy body-like hyaline inclusion, LBHI) が一部の残存前角神経細胞に認められ、SOD1、PrxII、GPxI の三者に強陽性を示した。LBHI を胞体内に形成している神経細胞胞体は、PrxII/GPxI ほとんど発現せず、レドックスシステムが破綻していた。G1H - G93A トランスジェニックマウスにおける発症時期の LBHI を持たない残存前角神経細胞の一部には、PrxII/GPxI の両者を同時強発現して、レドックスシステムを upregulate している神経細胞が認められた。しかし、多くの残存前角神経細胞は、PrxII/GPxI を発現せず、レドックスシステムに破綻を来していた。終末期では、SOD1/PrxII/GPxI 三者強陽性を示す封入体を認めるものの、ほとんどすべての残存神経細胞は、PrxII/GPxI を発現せずレドックスシステムの破綻を認めた。

マウスの正常肝の免疫組織化学的解析では、ほとんど全ての肝細胞がびまん性に PrxI/PrxII を発現し、核も一部で陽性所見を示した。GPxI 染色でも、ほとんどの肝細胞がびまん性に染色され、核は染色性を示さなかった。即ち、正常肝細胞ではレドックスシステムの基幹酵素 PrxI/PrxII/GPxI を一定レベル発現することにより、レドックスシステムを維持していた。

G93A-G1H トランスジェニックマウスの生後90日齢肝は、レドックスシステムの基幹酵素 PrxI/PrxII/GPxI を高発現している少数の hepatocyte とレドックスシステムの基幹酵素を低発現している多数の hepatocyte が heterogeneity を呈して混在していた。生後100日齢では、レドックスシステムを高度に upregulate している hepatocyte の数が増加し、低発現している hepatocyte と heterogeneity を示して混在してい

た。しかし、正常組織像を示した生後110日齢と終末期(120日齢)肝細胞のレドックスシステムの基幹酵素PrxI/PrxII/GPxIは、ほぼ正常の染色性を示した。

3. HGF/pcMetシステムの調節機構の免疫組織化学的解析

同胞におけるHGF/pcMetシステムの免疫組織化学的解析：脊髄組織におけるHGFの免疫組織化学的解析では、すべての日齢を通じて、ほとんどすべての脊髄前角細胞はHGFを発現し、その発現レベルは多少のvariationを伴いながら、免疫組織化学的にはHGF発現は同定可能のレベルであった。HGFの受容体である活性化型リン酸化cMet (pcMet)の免疫組織化学的解析では、HGFとは対照的に、すべての日齢を通じて、すべての脊髄前角細胞はpcMetの発現を認めなかった。肝臓HGF/pcMetシステムの免疫組織化学的解析では、肝細胞では、すべての日齢を通じて、HGF及びpcMetの発現は認めなかった。

G1H - G93Aトランスジェニックマウスにおける神経症状発症前の生後90日齢の時点におけるHGF/pcMetシステムの免疫組織化学的解析：HGFの免疫組織化学的解析では、ほとんどすべての脊髄前角細胞は、HGFを正常脊髄前角細胞と同一レベルで発現し、その発現様式、発現強度は同胞脊髄における正常脊髄前角細胞と同一であった。c-Met受容体の活性化の指標であるリン酸化c-Met (pcMet)の発現についても、脊髄前角細胞では全く認められなく、同胞脊髄における正常脊髄前角細胞と同一所見であった。しかし、生後90日齢の肝臓のHGF発現については、発現強度のvariationを有しながら、一部のswollen hydropic hepatocyteおよびdark eosinophilic hepatocyteにHGF陽性所見が認められた。HGFの発現様式はHGF陽性細胞とHGF陰性細胞とが入り交じったモザイク染色様式を示した。HGFの活性化型受容体であるpcMetの肝臓における発現についても、HGF発現様式と同一であった。即ち、生後90日齢の肝臓では、一部の肝細胞にHGF/pcMetシステムのup-regulation機構が認められた。

G1H - G93Aトランスジェニックマウスにおける神経症状発症時の生後100日時点におけるHGF/pcMetシステムの免疫組織化学的解

析：生後100日齢の時点では、ほとんど全ての脊髄前角細胞においてHGFとpcMetの強発現がみられ、高度のHGF/pcMetシステムのup-regulation機構を認めた。この時期の肝臓では、dark eosinophilic hepatocyteとswollen hydropic hepatocyteとの両細胞の一部にHGFとpcMetとの強発現があり、強発現している細胞と発現していない細胞とが入り交じったモザイク様式の発現パターンが著しく強調された。即ち、生後100日齢の肝臓においては、heterogeneityを示しながら、HGF/pcMetシステムの高度のup-regulation機構が認められた。

G1H - G93Aトランスジェニックマウスにおける生後120日齢の終末期におけるHGF/pcMetシステムの免疫組織化学的解析：脊髄組織では、一部の脊髄前角細胞はHGF/pcMetシステムの破綻を示すものの、多くの脊髄前角細胞はまだHGF/pcMetシステムをup-regulateさせていた。注目すべき所見は、肝臓においては、正常組織所見に復するに従い、脊髄組織とは対照的にHGF/pcMetシステムの発現レベルは低下しはじめ、ほぼ正常状態であるHGF/pcMetシステムの発現停止状態を示した。即ち、生後120日齢では肝臓は正常組織像を示し、HGFとpcMetとの発現は認めなかった。

II. 化合物(3)によるALS治療研究

(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
病悩期間延長効果 ($P > 0.05$, 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、病悩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。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 \pm 0.5、115日ではスコア \pm 3.3 \pm 0.5、120日以降140日まではスコア \pm 4.0 \pm 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 \pm 0.0 \pm 0.0、100日ではスコア \pm 0.7 \pm 0.8、105日ではスコア \pm 2.1 \pm 0.9、110日以降140日まではスコア \pm 3.0 \pm 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 \pm 0.0 \pm 0.0、100日ではスコア \pm 0.4 \pm 0.5、105日ではスコア \pm 1.4 \pm 0.5、110日以降140日まではスコア \pm 2.0 \pm 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 \pm 0.0 \pm 0.0、110日ではスコア \pm 0.1 \pm 0.3、115日ではスコア \pm 0.5 \pm 0.5、120日ではスコア \pm 1.1 \pm 0.6、125日ではスコア \pm 1.7 \pm 0.5、130日以降140日まではスコア \pm 2.0 \pm 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 \pm 0.0 \pm 0.0、115日ではスコア \pm 0.1 \pm 0.3、120日ではスコア \pm 0.8 \pm 0.6、125日ではスコア \pm 1.2 \pm 0.8、130日ではスコア \pm 2.3 \pm 0.7、135日ではスコア \pm 2.9 \pm 0.3、140日ではスコア \pm 3.0 \pm 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 \pm 0.0 \pm 0.0、110日ではスコア \pm 0.1 \pm 0.3、115日ではスコア \pm 0.7 \pm 0.8、120日ではスコア \pm 1.6 \pm 1.0、125日ではスコア \pm 2.7 \pm 0.5、130日ではスコア \pm 3.3 \pm 0.5、135日ではスコア \pm 3.9 \pm 0.3、140日ではスコア \pm 4.0 \pm 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 \pm 0.0 \pm 0.0、110日ではスコア \pm 0.4 \pm 0.8、115日ではスコア \pm 1.3 \pm 1.3、120日ではスコア \pm 2.5 \pm 0.5、125日以降140日まではスコア \pm 3.0 \pm 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 \pm 0.0 \pm 0.0、110日ではスコア \pm 0.1 \pm 0.3、115日ではスコア \pm 0.7 \pm 0.8、120日ではスコア \pm 1.4 \pm 0.7、125日以降140日まではスコア \pm 2.0 \pm 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。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 \pm 0.0 \pm 0.0、100日ではスコア \pm 0.1 \pm 0.3、105日ではスコア \pm 0.5 \pm 0.5、110日ではスコア \pm 1.1 \pm 0.6、115日ではスコア \pm 1.8 \pm 0.4、120日以降140日まではスコア \pm 2.0 \pm 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 \pm 0.0 \pm 0.0、110日ではスコア \pm 0.6 \pm 0.7、115日ではスコア \pm 1.6 \pm 0.7、120日ではスコア \pm 2.8 \pm 0.4、125日以降140日まではスコア \pm 3.0 \pm 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 \pm 0.0 \pm 0.0、105日ではスコア \pm 0.7 \pm 0.8、110日ではスコア \pm 1.8 \pm 0.9、115日ではスコア \pm 2.8 \pm 0.4、120日ではスコア \pm 3.8 \pm 0.4、125日以降140日まではスコア \pm 4.0 \pm 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 \pm 0.0 \pm 0.0、100日ではスコア \pm 0.6 \pm 1.0、105日ではスコア \pm 1.5 \pm 1.2、110日ではスコア \pm 2.5 \pm 1.0、115日以降140日まではスコア \pm 3.0 \pm 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 \pm 0.0 \pm 0.0、105日ではスコア \pm 0.7 \pm 0.8、110日ではスコア \pm 1.6 \pm 0.7、115日以降140日まではスコア \pm 2.0 \pm 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：

GIH-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

I. レドックス・HGF/pcMetシステムに関する自己生存機構の基盤研究

ALS SOD1モデル動物においては、変異SOD1ストレス(毒性)に対して脊髄前角細胞は傷害され、細胞死に至る。レドックスシステムに着目すると、発症期間中の一部の残存脊髄前角細胞は、細胞死回避のために内因性レドックスシステムをupregulateさせていた。しかし、長期間にわたるALSストレスに対し最終的にはすべての脊髄前角細胞はレドックスシステムを維持できなくなり、破綻をきたし、やがては脊髄前角細胞死を迎えた。ALS SOD1モデル動物の変異SOD1ストレス下の肝の経時的組織変化は、肝細胞は脊髄前角細胞より早期に変性像を示すものの、脊髄前角細胞が高度脱落した脊

髄組織の荒廃を認める終末期には正常組織像に復していた。この肝におけるレドックスシステムの経時的変化は、変異SOD1ストレスに対して、肝細胞の最も病理組織変化が高度な時期では、脊髄前角細胞と同様に病的肝細胞は内因性レドックスシステムをupregulateさせていた。しかし、レドックスシステム破綻をきたす脊髄前角細胞とは異なり、肝細胞は、全経過を通じて内因性レドックスシステムを維持し、破綻を生じさせなかった。

一方、レドックスシステムはPrxとGPxを基幹酵素として、SOD1にリンクし、スーパーオキシドラジカルからSOD1により変換される過酸化水素を安全な水と酸素に分解するシステムであると同時に、細胞の生存・維持には不可欠なシグナルトランスダクションシステムでもある。また、レドックスシステムの基幹酵素の一部は、分子チャペロンとして作用することにより、ミスフォールドした変異SOD1などの異常蛋白質を修復・除去する。それ故、肝細胞は脊髄前角細胞とは異なり、全経過を通じて内因性レドックスシステムを維持し、破綻させないことで、レドックス生存機構により細胞死を抑制し、病的形態的变化を完全に回復させる正常細胞回復機構の一助にレドックス機構を活用していることが推測される。このレドックス生存機構仮説に基づき、レドックスシステム基幹酵素を強制的に脊髄前角細胞に導入することで、最終的にtotal cell deathのプロセスを歩む脊髄前角細胞の完全回復、即ち、ALSの画期的治療法確立につながる基盤研究とした。

さらに、同時に、HGF/活性型リン酸化cMet (pcMet) システムを詳細に解析した。正常脊髄のHGF/活性型リン酸化cMet (pcMet) システムの免疫組織化学的解析により、正常状態においては、脊髄前角細胞はHGFを一定レベル発現しているが、脊髄前角細胞におけるHGFの受容体であるcMetはチロシン残基のリン酸化は受けていなく、活性型pcMetは発現していなかった。即ち、正常脊髄前角細胞はHGFのcMetを介するシグナルを細胞内に伝達していないことが判明し、HGF/pcMetシステムを賦活化していないことが明らかとなった。

G1H-G93A マウスの神経症状発症時の生後100日時点においては、ほとんど全ての脊髄前

角細胞において高度のHGF/pcMetシステムのup-regulation機構を認め、生後120日齢の終末期においてさえ、一部の脊髄前角細胞はHGF/pcMetシステムの破綻を示すものの、多くの脊髄前角細胞はまだHGF/pcMetシステムをup-regulateさせていた。この脊髄前角細胞におけるHGF/pcMetシステムの解析結果は、ALS-G93A変異SOD1ストレスに対して、細胞死回避のために内因性HGF/pcMetシステムをupregulateさせていたことを意味する。しかし、最終的には脊髄前角細胞はHGF/pcMetシステムのupregulationという内因性生存機構さえも振り切るかたちで、細胞死に至ってしまう。即ち、G1H-G93Aマウスにおける脊髄前角細胞は、ALS-G93A変異SOD1ストレスにより、最終的には脊髄前角細胞は細胞死を生ずる。しかし、ALS-G93A変異SOD1ストレスに対して、脊髄前角細胞は無抵抗に細胞死を受け容れているのではないことが解明され、内因性生存機構の一つとしてのHGF/pcMetシステムの存在を明らかにした。

G1H-G93Aマウスにおける肝臓の経時的組織変化は、脊髄前角細胞より早期に一過性に変性像を示すものの、脊髄前角細胞が高度脱落した脊髄組織の荒廃を認める終末期にはほぼ正常組織像に復していた。この肝細胞におけるHGF/pcMetシステムの経時的変化をみると、まだ脊髄前角細胞がHGF/pcMetシステムをupregulateさせていない生後90日齢において、肝細胞はALS-G93A変異SOD1ストレスに対して、HGF/pcMetシステムをupregulateさせていた。神経症状発症時の生後100日齢頃の肝細胞において、最も高度にHGF/pcMetシステムをupregulateさせていたが、正常組織像に復するに従いHGF及びpcMetの発現レベルは低下を認めた、生後120日齢では、正常状態であるHGF/pcMetシステムをほぼ停止した。即ち、ALS-変異SOD1ストレスにより脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、最終的には細胞死に至るが、肝臓においては、一度は変性組織像を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈した。この組織学的完全回復機構の一つに内因性HGF/pcMetシステムのup-regulation機構の存在を明らかにできた。一方、ALS-変異SOD1ストレスに対し、脊髄前角細胞は内因性生存機構として、HGF/pcMetシステムのup-regulation

機構を惹起し続けるが、この機構を振り切るかたちで細胞死に至る。本研究の解析により、細胞死のプロセスを歩む変性運動ニューロンへのHGF治療の正当性に対する組織学的完全回復の病理組織的論拠たり得ることが証明できた。

II. 化合物(3)によるALS治療研究

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ず、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

I. レドックス・HGF/pcMetシステムに関する自己生存機構の基盤研究

筋萎縮性側索硬化症(ALS)SOD1トランスジェニックマウスにおいては、ALS-変異SOD1スト

レスにより脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、最終的には細胞死に至る。しかし、肝臓は変性組織像を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈した。この組織学的完全回復機構には、内因性レドックス・HGF/活性型リン酸化c-Met (pcMet) システムのup-regulation機構が強く関与していたことを解明した。一方、ALS-変異SOD1ストレスに対し、脊髄前角細胞は内因性生存機構として、内因性レドックス・HGF/pcMet システムのup-regulation機構を惹起し続けるが、この機構を振り切るかたちで細胞死に至る。即ち、細胞死のプロセスを歩む変性運動ニューロンへのレドックス・HGF治療の正当性に対する組織学的完全回復の病理組織的論拠たり得ることを証明した。

II. 化合物(3)によるALS治療研究

キサントリ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, 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* 2005, 110 (2) : 101-112.
- 2) Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y: Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. *Neuropathology* 2005, 25 (4) : 365-370.
- 3) 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* 2005; 82 (1) : 63-70.
- 4) Fukada M, Kato S, Miyoshi M, Yamaguchi K, Imoto T, Watanabe T: Systemic administration of lipopolysaccharide upregulates angiotensin II expression in rat renal tubules: immunohistochemical and ELISA studies. *Peptides* 2005, 26 (11) : 2215-2221.
- 5) 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 and Histopathol* 2006; 21 (7) : 729-740.
- 6) Kato M, Kato S, Horiuchi S, Nagai R, Horie Y, Hayashi K: Mallory bodies in hepatocytes of alcoholic liver disease and primary biliary cirrhosis contain N^ε-(carboxymethyl) lysine-modified cytokeratin, but not those in hepatic carcinoma cells. *Yonago Acta medica* 2006; 49 (3) : 83-92
- 7) Sumi H, Nagano S, Fujimura H, Kato S, Sakoda S: Inverse correlation between the formation of mitochondria-derived vacuoles and Lewy-body-like hyaline inclusions in G93A superoxide-dismutase-transgenic mice. *Acta Neuropathol* 2006 112 (1) : 52-63.
- 8) 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).
- 9) 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
- 10) 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.
- 11) 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
- 12) 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
 - 13) 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; Online Publish* 2007; 282 (49): 35933-35944.
2. 学会発表
- 1) 加藤信介, 加藤雅子, 青木正志, 糸山泰人, 阿部靖子, 西野武士, 朝山光太郎, 栗屋昭, 平野朝雄, 大浜栄作. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における残存運動神経細胞生存機序としてのレドックス機構 upregulation の解明. 第46回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005, 宇都宮).
 - 2) 加藤信介. 脱髄疾患の病理 (含PML): 第46回日本神経学会教育コース「神経病理学の基礎」第46回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005, 宇都宮).
 - 3) 加藤信介. SOD1 遺伝子異常を伴う生体系における細胞死のメカニズム: AGE 形成に伴う凝集毒性. 第15回日本メイラード学会 (2005, 大阪).
 - 4) 加藤雅子, 加藤信介, 青木正志, 糸山泰人, 阿部靖子, 西野武士, 朝山光太郎, 大浜栄作. 変異SOD1を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症のモデル動物における肝の経時的病理組織像の検討: 肝細胞と脊髄前角細胞の比較. 第46回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005, 宇都宮).
 - 5) 加藤雅子, 加藤信介, 堀江 靖. 肝細胞癌における fetal glycoprotein 68 の発現の検討. 第94回日本病理学会総会 (2005, 横浜).
 - 6) Kato S, Kato M, Ohama E, Abe Y, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Hirano A. Immunohistochemical dynamics of the redox system in the motor neurons in ALS: Self-survival mechanism under ALS stress. XVth International Congress of Neuropathology, September 10-15, 2006, San Francisco, USA.
 - 7) Kato S, Kato M, Ohama E, Abe Y, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Hirano A. Redox System Up-Regulation in ALS Motor Neurons: A Survival Mechanism under Stress. 17th International Symposium on ALS/MND November 30-December 2, 2006, Yokohama, Japan.
 - 8) 加藤信介, 加藤雅子, 篠沢隆雄, 平野朝雄, 大浜栄作. ALSにおける新しい神経成長因子ミッドカイン(MK)に関する研究: モノクローナル抗体作成とALSの免疫組織化学的解析. 第47回日本神経病理学会総会学術研究会 (2006, 5月24-26日, 岡山).
 - 9) 加藤雅子, 加藤信介, 青木正志, 糸山泰人, 阿部靖子, 西野武士, 大浜栄作. 変異SOD1を伴うALSモデル動物肝の終末期における正常肝細胞回復機構の解明: レドックスシステムからのアプローチ. 第47回日本神経病理学会総会学術研究会 (2006, 5月24-26日, 岡山).
 - 10) 隅 寿恵, 長野清一, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎. 変異SOD1 (G93A) mice における vacuole と LBHI 形成の関係. 第47回日本神経病理学会総会学術研究会 (2006, 5月24-26日, 岡山).
 - 11) 加藤雅子, 加藤信介, 堀江 靖, 林 一彦. 家族性筋萎縮性側索硬化症のモデル動物を用いた肝と脊髄の経時的病理組織像の検討. 第95回日本病理学会総会 (2006, 4月30日-5月2日, 東京).
 - 12) 隅 寿恵, 長野清一, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎. 変異SOD1 (G93A) mice における vacuole と LBHI 形成の関係. 第47回日本神経学会総会 (2006, 5月11-13日, 東京).
 - 13) 村上哲郎, 倉田智子, 太田康之, 奈良井恒, 瓦林 毅, 武久 康, 永井真理子, 東海林幹夫, 加藤信介, 阿部康二. 抗ヒトSOD1 特異的抗体によるALSモデルマウスの検討. 第47回日本神経学会総会 (2006, 5月11-13日, 東京).
 - 14) 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).
 - 15) 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)
 - 16) 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)
 - 17) 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