

200833024A

厚生労働科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症に対する
肝細胞増殖因子を用いた
画期的治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 糸山泰人 / 東北大学大学院医学系研究科神経内科
平成21年3月 印刷

目 次

I. 研究者一覧

II. 総括研究報告書

東北大学大学院医学系研究科神経内科

糸山 泰人

III. 分担研究報告書

1. ヒトリコンビナントHGF蛋白のマーモセットモデルに対する髄腔内投与による治療法の開発

慶応義塾大学医学部生理学
慶応義塾大学医学部整形外科

岡野 英之
中村 雅也

2. HGFによるALS治療法の開発—臨床適用に向けた分子基盤研究

大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

船越 洋

3. ALSモデルマウス肝臓一過性組織変化からの回復過程におけるHGF-c-Met systemの活性化

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

加藤 信介

4. ヒトリコンビナントHGF蛋白の髄腔内投与によるALS治療法の開発

東北大学病院神経内科

青木 正志

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 研究成果に関する刊行物

研 究 者 一 覽

筋萎縮性側索硬化症に対する
肝細胞増殖因子を用いた画期的治療法の開発

研 究 者 一 覧

研究代表者	糸山泰人	東北大学大学院医学系研究科神経内科	教授
研究分担者	岡野栄之	慶応義塾大学医学部生理学	教授
	船越 洋	大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学	准教授
	加藤信介	鳥取大学医学部附属脳研究施設神経病理	准教授
	中村雅也	慶応義塾大学医学部整形外科	専任講師
	青木正志	東北大学病院神経内科	講師

総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子を用いた画期的治療法の開発

研究代表者 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学講座神経内科学分野 教授

研究要旨：本研究の目的は神経難病でも最も苛酷な筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対して肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor; HGF）を用いた画期的治療法を開発することとそれに関わる基盤研究を進めることにある。ALS の病因研究および治療研究には変異 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 導入 ALS ラットが重要な役割を果している。私共はこの ALS ラットを用いて運動ニューロンに対し神経栄養因子作用を有する recombinant human HGF (rhHGF) の髄腔内持続投与で ALS に対する有効性を示してきた。多くの神経栄養因子のなかでもこの様に変異 SOD1 トランスジェニック動物による ALS モデルに対して明確な治療効果を示したものは少なく、この有効性を ALS 患者に臨床応用する意義と必要性がある。しかも、臨床応用の最も可能性の高いルートとしての髄腔内投与での効果が ALS ラットで確認されたので、霊長類（マーモセット）に対する髄腔内投与での安全試験および容量設定を開始した。マーモセットによる ALS モデルは確立されていないので、rhHGF の安全試験および臨床用量決定には慶応大学の岡野らが確立したマーモセットによる脊髄損傷モデルを用いた。ALS ラットおよび脊髄損傷ラットで効果が確認された容量（400 μ g/4weeks）の rhHGF をマーモセット頸髄圧挫損傷モデルに対して損傷後よりくも膜下腔に持続投与したところ、著明な損傷範囲の縮小および良好な運動機能回復が得られた。同時に安全性も確認中である。ヒト ALS 患者に対する rhHGF による治療は医薬品機構との安全性相談が終了し、現在の安全性試験計画をクリアできればフェーズ1の治験を進めることを確認している。rhHGF はわが国発の ALS 治療薬候補としてスーパー特区（代表 岡野栄之）に選定された。

分担研究者

船越 洋（大阪大学大学院医学系研究科
分子再生医学）
岡野栄之（慶応義塾大学医学部生理学）
中村雅也（慶応義塾大学医学部整形外科）
加藤信介（鳥取大学医学部神経病理）
青木正志（東北大学病院神経内科）

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な細胞死が惹起されて、全身の筋萎縮と脱力が進行する原因不明の難治性神経筋疾患である。しかも2~3年の経過で呼吸筋の麻痺をきたす極めて予後不良な疾患であるが、現状では有効な治療法がない。ALS の病因と病態の解明を行ない、そ

れを基盤にした新規治療法の開発が世界的に切望されている。

わが国で発見された神経栄養因子である肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor; HGF) は、運動ニューロンに対する強力な保護作用が知られており、私たちは遺伝子工学的に ALS マウスにおける HGF の運動ニューロン死に対する抑制効果を確認している。さらには ALS の臨床応用を目指し、私たちが開発した大型 ALS 動物モデルである変異 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 導入 ALS ラットに対して HGF 蛋白の髄腔内投与実験を行い、その有効性も確認している。

すでに ALS ラットに対してヒトリコンピナント HGF 蛋白 (rhHGF) の髄腔内持続投与で有効性を示したので、霊長類を用いて HGF の髄腔内投与による安全性を検証すると共に臨床用量の設定を行う。その結果を元に、ALS 患者に対する治験フェーズ 1 に進む。同時に HGF の治療効果の機序を特にミクログリアの特性変化に注目して明らかにする。

B. 研究方法

1) HGF 投与によるミクログリアの特性変化の分子機序の検討

ALS モデル動物として SOD1(G93A)発現するトランスジェニックマウス(ALS-Tg)、そのコントロールとして同一年齢の野生型 Littermate を用いた。これと神経特異的に HGF を発現する HGF-Tg マウス (HGF-Tg) を交配することで、WT, ALS-Tg, HGF-Tg, ALS/HGF-Tg を作成した。組織解析は、動物を深麻酔後、脊髄をすみやかに取り出し、アルコール系列によ

り組織を固定後、パラフィン包埋し、切片を作成した。組織片は、Nissl 染色、および免疫染色(Iba-1, Mac2 および P2Y12 抗体)を施行した。

2) コモンマーモセットの脊髄損傷モデルに対する rhHGF の髄腔内投与

成体メスのコモンマーモセットの第 5 頸椎高位に 20g の重錘を 5cm の高さから落として圧挫損傷を作製した。直後より第 7 頸椎高位のくも膜下からカテーテルを挿入し、rhHGF 400 μ g を髄腔内に 4 週間持続投与した (n=6)。対照群には PBS を投与した (n=5)。術後 12 週まで Bar grip test にて上肢筋力を、独自に開発した Open field scoring にて上肢の神経学的機能を評価した。損傷後 1・3・12 週に頸髄 MRI (7.0 tesla) を撮像し、損傷範囲を同一個体で経時的に評価した。また、拡散テンソル投射路撮影 (Diffusion tensor tractography; DTT) にて脊髄軸索を描出し途絶の程度を評価した。損傷後 12 週目に脊髄を採取し腫瘍形成の有無を含めた免疫組織学的検討を行った。

3) 治験に関するプロトコルの作成

ALS 患者を対象した治験を行うために、東北大学トランスレーショナルリサーチセンターと共にプロトコルの検討を行った。

(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かつ利用動物数を極力減らすように務めた。

C 及び D. 研究結果及び考察

1) HGF 投与によるミクログリアの特性変化の分子機序の検討

組織解析の結果、SOD1(G93A)を発現する ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) の脊髄運動ニューロンは、経時的に死細胞数が増え、回復する事はなかった。特に運動ニューロン死のおこる advanced stage になると、ALS-Tg の脊髄中には、resting microglia のマーカー陽性細胞数が極端に減少し、逆に Mac2 陽性細胞数が著明に増加した。その免疫染色性の変化は相反的であり、Mac2 陽性細胞数が増殖してくる、もしくは血液中から recruit されてくる事に加えて、resting microglia から Mac2 陽性細胞への特性変化がおこっている可能性が示唆された。

一方で、ALS/HGF-Tg においては、初期から ALS-Tg の advanced stage に相当する時期までの間、resting microglia の数が多く、逆に Mac2 陽性細胞数が少なかった。このことから、HGF は、resting microglia から活性化型ミクログリアへの特性変化を抑制、あるいは積極的に resting な状態にもどす可能性が示唆された。

HGF が ALS 病態進行時のミクログリアに直接作用してミクログリアの特性修飾を行う事が示唆され、発症後 HGF 投与の効果そのものに加えて、発症後 HGF 投与による ALS 治療の分子基盤が明確となった。

2) コモンマーマーモセットの脊髄損傷モデルに対する rhHGF の髄腔内投与

rhHGF 投与群で Bar grip test、Open field scoring いずれの評価法においても対照群に比べ有意に良好な運動機能回復が認められた。観察期間中に異常行動は認めなかつ

た。

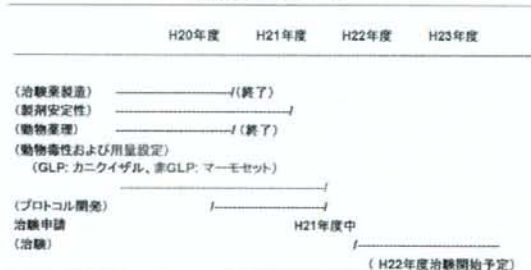
損傷後3週目までのMRI像では両群間に明らかな差は認められなかったものの、12週目には T1-low、T2-high を示す異常信号領域が rhHGF 投与群で著明に縮小していた。また DTT の結果より、rhHGF 投与群で有意に多い脊髄軸索が描出された。LFB 染色の結果から、rhHGF 投与群で空洞形成面積が縮小し、髄鞘化面積が有意に保たれていた。次に皮質脊髄路を示す calmodulin-dependent protein kinase 2- α (CaMK2- α)陽性線維が、損傷部より尾側においても有意に良好に保たれていることが明らかとなった。

また、脊髄灰白質後角における Calcitonin gene-related peptide (CGRP) 陽性の C 線維分布に両群間で有意な差を認めなかった。rhHGF 投与群で腫瘍形成は1例も認めなかった。

3) 治験に関するプロトコルの作成

rhHGF による ALS 治療は医薬品機構との安全性相談が終了し、現在の安全性試験計画をクリアできればフェーズ1の治験に進めることを確認した。東北大学トランスレーショナルリサーチセンターと共にプロトコルの検討を行っている。

(参考)ヒトリコンビナントHGF蛋白製剤 開発スケジュール



E. 結論

本研究の目的は神経難病でも最も苛酷な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対して肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた画期的治療法を開発することとそれに関わる基盤研究を進めることにある。臨床応用の最も可能性の高いルートとしての髄腔内投与での効果が ALS ラットで確認されたので、霊長類 (マーモセット) に対する髄腔内投与での安全試験および容量設定を開始した。マーモセットによる ALS モデルは確立されていないので、HGF の安全試験および臨床用量決定には慶応大学の岡野らが確立したマーモセットによる脊髄損傷モデルを用いた。

マーモセット脊髄損傷モデルに対して損傷後より rhHGF をくも膜下腔に持続投与し、損傷範囲の著明な縮小ならびに有意に良好な運動機能の回復を認めた。霊長類脊髄損傷に対してもラットと同じ体重比の容量で有効性が確認され、また腫瘍形成や異常行動が認められなかったことから、本治療法がヒト ALS に対し有効かつ安全な治療法となり得る可能性が大きく示唆された。さらに今回はげっ歯類では評価困難な、霊長類で特に発達した上肢の機能に注目することで、rhHGF のくも膜下腔持続投与により霊長類に対しても著明な治療効果が得られることを明らかとした。

rhHGF による ALS 治療は平成 21 年度中の治験届けの提出を目指している。わが国発の ALS 治療薬候補としてスーパー特区 (代表 岡野栄之) に選定された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama Y. Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironment of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis transgenic rats. *J Neurosci Res* 86(11): 2512-2523, 2008
- 2) Suzuki Y, Funakoshi H, Machide M, Matsumoto K, Nakamura T. Regulation of cell migration and cytokine production by HGF-like protein (HLP) / macrophage stimulating protein (MSP) in primary microglia. *Biomed Res.* 29(2): 77-84, 2008.
- 3) Akita H, Takagi N, Ishihara N, Takagi K, Murotomi K, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S. Hepatocyte growth factor improves synaptic localization of the NMDA receptor and intracellular signaling after excitotoxic injury in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol.* 210(1): 83-94, 2008.
- 4) Sumi H, Kato S, Mochimaru Y, Fujimura H, Etoh M, Sakoda S: Nuclear TAR DNA Binding Protein 43 Expression in Spinal Cord Neurons Correlates With the Clinical Course in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68 (1): 37-47, 2009.

ほか

2. 学会発表

- 1) Kitamura K, Fujiyoshi K, Toyota F, Hikishima K, Yamane J, Funakoshi H,

Nakamura T, Nomura T, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Intrathecal administration of recombinant human hepatocyte growth factor promotes functional recovery after spinal cord injury; pre-clinical trial using common marmoset. Neuroscience 2008 (SFN). (Washington D.C., USA, 2008, 11/15-19)

2) Warita H, Mizuno H, Aoki M, and Itoyama Y. Digestion of the extracellular chondroitin sulfate promotes an intrinsic regenerative process in the spinal cord of ALS transgenic rats. 19th International Symposium on ALS/MND, Birmingham, UK. November 3-5, 2008.

3) 青木正志, 割田 仁, 糸山泰人. 肝細胞増因子の髄腔内持続投与は発症期からの投与開始でも筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態進行を抑制する. Neuroscience 2008 [第31回日本神経科学学会大会]2008. 5 東京

4) 割田 仁, 青木正志, 水野秀紀, 糸山泰人. ALSモデルラット脊髄における血管内皮細胞新生 第49回日本神経学会総会, 2008. 5 横浜

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ほか

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録(申請中)

発明の名称: 脊髄損傷治療薬剤

発明者: 岡野栄之 戸山芳昭 中村雅也 岩波明生 北村和也 中村敏一 船越洋

整理番号: P10001205

申請日: 2007.2.28

PCT出願: PCT/JP2007/053804

分 担 研 究 報 告 書

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子を用いた画期的治療法の開発に関する研究

研究分担者 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室教授

戸山 芳昭 慶應義塾大学医学部整形外科教授

中村 雅也 慶應義塾大学医学部整形外科専任講師

研究要旨 本研究では、コモンマーモセット第5頸髄に圧挫損傷を作製し、直後より rhHGF (肝細胞増殖因子ヒト組み換え蛋白質) を髄腔内に4週間持続投与することで、霊長類脊髄損傷に対する rhHGF の有効性と安全性を運動機能的・組織学的に検討した。rhHGF 投与群で有意な運動機能回復および損傷範囲の縮小が認められた。また異痛症の原因となる神経線維の異常分布や異常行動、腫瘍形成は一例も認めなかった。今回の結果より、rhHGF を用いた脊髄損傷治療法の有効性・安全性が霊長類において確認できたことから、臨床応用へ結びつく可能性が大きく示唆されたと考えている。

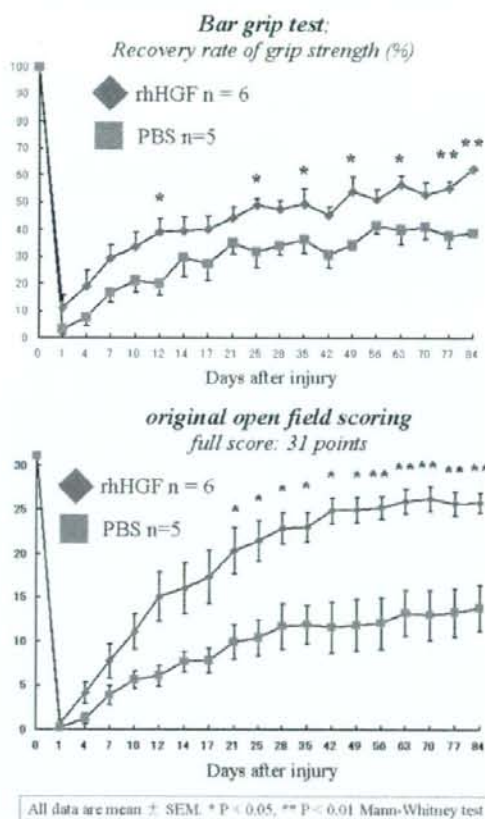
A. 研究目的

われわれは、ラット胸髄圧挫損傷モデルに対して損傷前にヘルペスウィルスベクターを用いて HGF を髄内に供給することにより、神経保護・血管新生・軸索伸長作用を介して有意な運動機能回復が得られることを報告した。そこで本研究の目的は、前臨床試験として霊長類コモンマーモセット頸髄損傷モデルに対するヒト組み換え HGF 蛋白質 (recombinant human HGF; rhHGF) の有効性と安全性を検討することである。

B. 研究方法

成体メスのコモンマーモセットの第5頸椎高位に20gの重錘を5cmの高さから落として圧挫損傷を作製した。直後より第7頸椎高位のくも膜下からカテーテルを挿入し、rhHGF 400 μ g を髄腔内に4週間持続投与した (n=6)。対照群には PBS を投与した (n=5)。術後12週まで Bar grip test にて上肢筋力を、独自に開発した Open field scoring にて上肢の神経学的機能を評価した。損傷後1・3・12週に頸髄 MRI (7.0 tesla) を撮像し、損傷範囲を同一個体で経時的に評価した。また、拡散テンソル投射路撮影 (Diffusion tensor tractography; DTT) にて脊髄軸索を

Figure 1

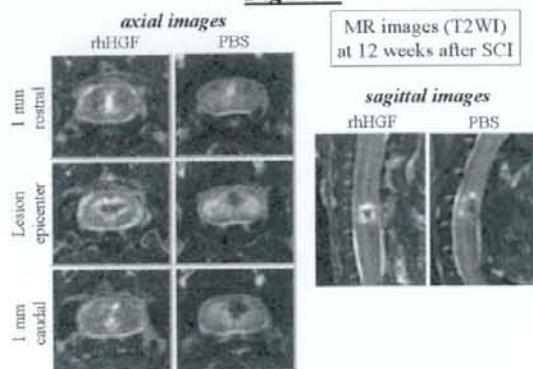


描出し途絶の程度を評価した。損傷後12週目に脊髄を採取し腫瘍形成の有無を含めた免疫組織学的検討を行った。

C. 研究結果

rhHGF 投与群で Bar grip test、Open field scoring いずれの評価法においても対照群に比べ有意に良好な運動機能回復が認められた (Fig. 1)。観察期間中に異常行動は認めなかった。

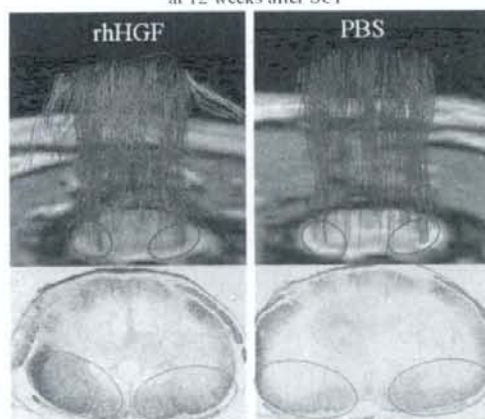
Figure 2



損傷後 3 週目までの MRI 像では両群間に明らかな差は認められなかったものの、12 週目には T1-low、T2-high を示す異常信号領域が rhHGF 投与群で著明に縮小していた (Fig. 2)。

Figure 3

Diffusion tensor tractography (DTT) of spinal tracts at 12 weeks after SCI



また DTT の結果より、rhHGF 投与群で有意に多い脊髄軸索が描出された (Fig. 3)。LFB 染色の結果から、rhHGF 投与群で空洞形成面積が縮小し、髄鞘化面積が有意に保たれていた (Fig. 4)。次に皮質脊髄路を示す calmodulin-dependent protein kinase 2- α (CaMK2- α) 陽性線維が、損傷部より尾側においても有意に良好に保たれていることが明らかとな

った (Fig. 5)。

Figure 4

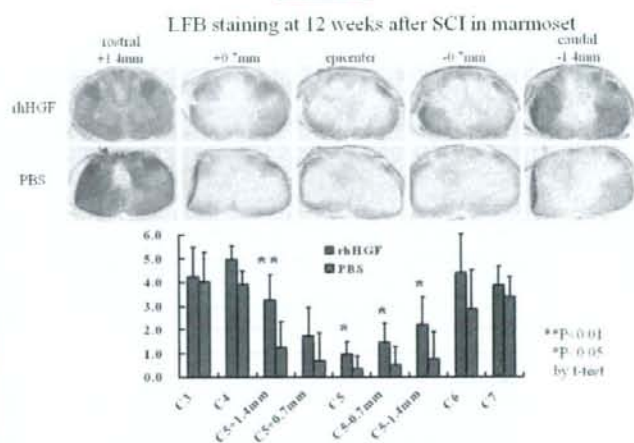
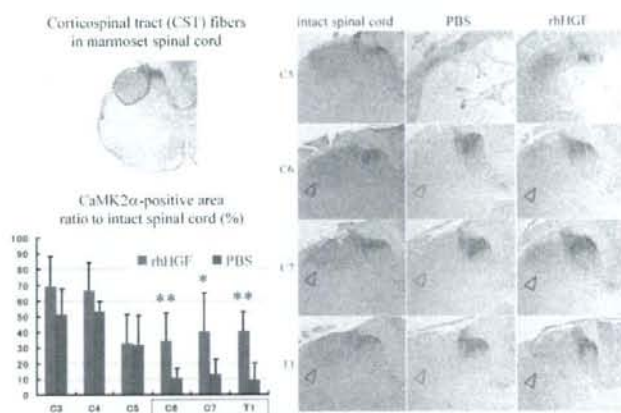


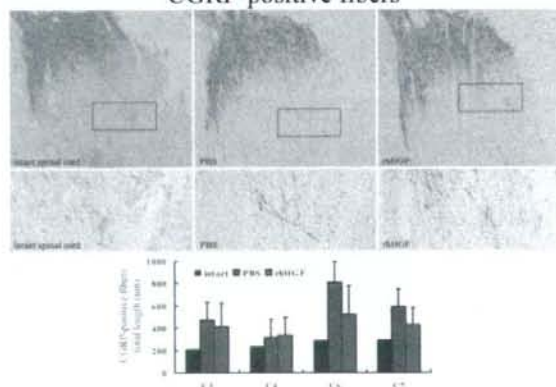
Figure 5



また、脊髄灰白質後角における Calcitonin gene-related peptide (CGRP) 陽性の C 線維分布に両群間で有意な差を認めなかった (Fig. 6)。rhHGF 投与群で腫瘍形成は 1 例も認めなかった。

Figure 6

CGRP-positive fibers



D. 考察

既に我々はラット脊髄圧挫損傷モデルに対する HGF の有効性を報告した。しかしながらマウスやラット等のげっ歯類と霊長類の間には神経解剖学的・機能的にも大きな隔りがあることは明らかであり、これまでの成果をそのまま臨床へ結びつけることはできなかった。今回我々はげっ歯類では評価困難な、霊長類で特に発達した上肢の機能に注目することで、rhHGF のくも膜下腔持続投与により霊長類脊髄損傷に対しても著明な治療効果が得られることを明らかとした。またアロディニアや腫瘍形成を認めず、安全性についても確認できたことから、本研究結果は HGF を用いた脊髄損傷治療の臨床応用へ結びつく大きな可能性を示すものと考えている。

E. 結論

霊長類コモンマーモセット脊髄損傷モデルに対する rhHGF の有効性および安全性が確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

北村和也、中村雅也、岩波明生、山根淳一、藤吉兼浩、山根淳一、豊田史香、疋島敬吾、船越洋、中村敏一、戸山芳昭、岡野栄之、Hepatoocyte Growth Factor は損傷脊髄の内在性修復および運動機能回復を促進する;げっ歯類から霊長類へ臨床応用へ向けて、第 31 回日本神経科学会、東京、2008 年 7 月

北村和也、中村雅也、藤吉兼浩、山根淳一、疋島啓吾、豊田史香、岩波明生、船越洋、中村敏一、岡野栄之、戸山芳昭、脊髄損傷に対する recombinant human Hepatoocyte Growth Factor (rhHGF) の有効性の検討、第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、2008 年 10 月

北村和也、中村雅也、Francois Renault Mihara、

岩波明生、船越洋、中村敏一、岡野栄之、戸山芳昭、Hepatoocyte growth factor (HGF) は脊髄損傷後反応性アストロサイトの遊走を促進する、第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、2008 年 10 月

Kitamura K, Nakamura M, Okano H, Toyama Y. Therapeutic Strategy Using Hepatoocyte Growth Factor; from Rodent to Primate. Joint Symposium of three Global COEs. "Evolution of Human Brain". Tokyo 2008. 11.

Kitamura K, Nakamura M, Okano H, Toyama Y. Practical implementation of feasible regenerative medicine -Intrathecal administration of recombinant human heptocyte growth factor promotes functional recovery after spinal cord injury; pre-clinical trial using common marmoset. ハイテクリサーチセンター整備事業 再生医学・治療研究開発センタープロジェクト、グローバル COE プログラム「幹細胞医学のための教育研究拠点」共催シンポジウム 2009 Forefront of the regenerative medicine, 東京、2009 年 1 月

北村和也、藤吉兼浩、山根淳一、疋島啓吾、豊田史香、岩波明生、船越洋、中村敏一、戸山芳昭、中村雅也、岡野栄之、rhHGF は霊長類脊髄損傷後の上肢運動機能回復を促進する、コモンマーモセットを用いた前臨床試験、第 8 回日本再生医療学会総会、東京、2009 年 3 月

Kitamura K, Okano H. Hepatoocyte Growth Factor Promotes Endogenous Repair and Functional Recovery after Spinal Cord Injury; Preclinical Trial from Rodents to Primates. The 3rd International Conference of Neurons and Brain Diseases. (Seoul, Korea, 2008, 8/5-7)

Kitamura K, Nakamura M, Okano H, Toyama Y. Novel Therapeutic Treatment for Spinal Cord Injury; the latest research, strategies and visions. USP / KEIO International Symposium for the Celebration of the Japanese Centennial Immigration to Brazil and the Sesquicentennial Anniversary of KEIO University. (San Paulo, Brazil, 2008, 8/16-20)

Kitamura K, Fujiyoshi K, Toyota F, Hikishima K, Yamane J, Funakoshi H, Nakamura T, Nomura T, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Intrathecal

administration of recombinant human hepatocyte growth factor promotes functional recovery after spinal cord injury; pre-clinical trial using common marmoset. Neuroscience 2008 (SFN). (Washington D.C., USA, 2008, 11/15-19)

Kitamura K, Fujiyoshi K, Yamane J, Toyota F, Hikishima K, Iwanami A, Funakoshi H, Nakamura T, Okano H, Chiba K, Toyama Y, Nakamura M. Intrathecal administration of recombinant human hepatocyte growth factor promotes recovery of hand dexterity after cervical spinal cord injury in primate: Preclinical trial using common marmoset. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). (Las Vegas, Nevada-USA, 2009, 2/22-25)

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得（申請中）
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

「HGF による ALS 治療法の開発— 臨床適用に向けた分子基盤研究」

研究分担者： 船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学
共同研究者： 大谷 若菜 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学
中村 敏一 大阪大学先端科学イノベーションセンター

研究要旨

私達は、これまで HGF が ALS モデルトランスジェニック動物の脊髄と脳幹部両方の運動神経細胞死やグリオシスを抑制し、運動機能を改善し、寿命を延長することを明らかとしてきた。本研究では、臨床適用に際して実際的な、発症時もしくは発症後投与に対する HGF の作用分子機序について解析をすすめた。その結果、発症後の病態悪化に critical な分子機序の 1 つとされるミクログリアの特性変化に対して、HGF がミクログリアに対する直接作用を介してその修飾作用をもつことが、HGF および c-Met 阻害剤の実験から明らかとなった。GMP 準抛リコンビナントヒト HGF 蛋白質の準備も整い、サルを含めた安全性試験も施行最終段階にあり、東北大学神経内科、慶應義塾大学生理学及び整形外科教室と共同で、HGF の ALS への臨床適用に向けて最終的な準備を進めている。

A. 研究目的

HGF を神経系に供給すると ALS モデルトランスジェニックマウスの運動神経細胞死を抑制し、運動機能を改善、寿命を大幅に延長させる事が明らかになったが、当初はトランスジェニックマウスを用いて HGF 遺伝子を ALS マウス神経系に強制発現させる家族性 ALS (FALS) の発症機序の 1 つに SOD1 の遺伝子変異があげられる。このモデル動物の 1 つとして、ヒトで認められる SOD1 (G93A) の変異遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスが知られる。これら動物はヒト

ALS 患者と同様に脊髄および脳幹部の運動ニューロンの持続的・進行性的変性・脱落がおこり、運動機能不全により最終的に死亡する。これまで我々は、HGF が運動ニューロンに直接作用して運動ニューロンの変性抑制をもつことに加えて、グリオシス抑制作用をあわせもつことを、脊髄に加えて脳幹部についても示してきた。しかし、最近発症後の病態進行に critical な分子機序の 1 つが、運動ニューロンそのものの分子機序はもとより、むしろミクログリアの特性変化にある可能性が示唆されている。特に発症後のミクログリアにおける変異 SOD1 レベル、

すなわちミクログリアの数を変動させるといふよりむしろその特性を変化させることで発症後の病態進行を左右する事が報告されている。逆に健全なミクログリアの供給が ALS モデル動物の病態進行をむしろ改善する方向に作用することが報告され、ミクログリアの特性を病態進行の抑制・改善に有利な方向に転換できたら、発症後の治療に有用である事が示唆されている。しかし、ミクログリアの特性変化の分子機序は未だ明らかとなっていない。さらに治療候補分子のミクログリアの特性変化に対する効果の評価例はほとんどない。本研究では、発症時および発症後の治療を想定し、HGF の作用分子機序の1つとしてミクログリアの特性変化に対する修飾効果について解析を進めた。

B. 研究方法

(I) In vivo の系を用いた解析

(1) ALS モデル動物として SOD1(G93A) 発現するトランスジェニックマウス (ALS-Tg)、そのコントロールとして同一年齢の野生型 Littermate を用いた。これと神経特異的に HGF を発現する HGF-Tg マウス (HGF-Tg) を交配することで、WT, ALS-Tg, HGF-Tg, ALS/HGF-Tg を作成した。

(2) 組織解析：動物を深麻酔後、脊髄をすみやかに取り出し、アルコール系列により組織を固定後、パラフィン包埋し、切片を作成した。組織片は、Nissl 染色、および免疫染色 (Iba-1, Mac2 および P2Y12 抗体) を施行した。

(II) In vitro の系を用いた解析

(1) 初代培養ミクログリアを用いた解析：初代培養ミクログリアは、recombinant ヒト HGF 蛋白質 (rhHGF) お

よび c-Met inhibitor (SU11274) を用いた。

免疫染色には、各種神経系細胞のマーカー抗体による蛍光染色 (MAP2, NeuN, SMI32, Iba1, Mac2 & GFAP) と c-Met および phospho-c-Met^{1230, 1234, 1235} (活性化型 c-Met) の蛍光多重染色を用いた。

C. 研究結果

(1) In vivo 脊髄におけるミクログリアの特性変化：組織解析の結果、SOD1(G93A)を発現する ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) の脊髄運動ニューロンは、経時的に死細胞数が増え、回復する事はなかった。運動ニューロンの細胞死を伴わない初期の stage では、resting microglia のマーカーの免疫染色性を示す細胞が、ventral side から dorsal まで脊髄全体に広がっていたが、Mac2 陽性の活性化型とされるミクログリアの免疫染色性を示す細胞はほとんど認めなかった。このとき、ミクログリアのマーカーと 2 重染色される c-Met 陽性細胞はほとんど認めず、この時期のミクログリアにおいては HGF の受容体である c-Met の発現が低く、HGF による応答性が低い事が示唆された。運動ニューロン死のおこる advanced stage になると、ALS-Tg の脊髄中には、resting microglia のマーカー陽性細胞数が極端に減少し、逆に Mac2 陽性細胞数が著明に増加した。その免疫染色性の変化は相反的であり、Mac2 陽性細胞数が増殖してくる、もしくは血液の中から recruit されてくる事に加えて、resting microglia から Mac2 陽性細胞への特性変化がおこっている可能性が示唆された。

一方で、ALS/HGF-Tg においては、初

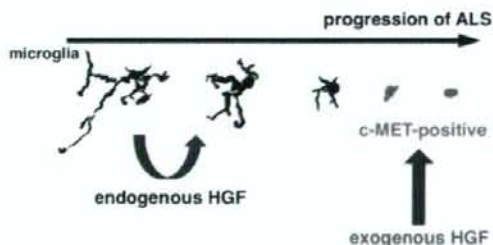
期から ALS-Tg の advanced stage に相当する時期までの間、resting microglia の数が多く、逆に Mac2 陽性細胞数が少なかった。このことから、HGF は、resting microglia から活性化型ミクログリアへの特性変化を抑制、あるいは積極的に resting な状態にもどす可能性が示唆された。

(2) *In vitro* における HGF のミクログリアに対する機能解析：Wild-type のラット (P1.5) から初代培養ミクログリアを調整し、HGF と c-Met の発現を解析すると、ミクログリアは培養初期には c-Met の発現が高く、逆に HGF 発現が比較的 low かった。培養後時間が経つと反転して、HGF のレベルが上がり、逆に c-Met の発現が下がった。したがって、培養ミクログリアでは、培養初期に HGF に機能的レスポンスが強い可能性が示唆された。ミクログリアにリコンビナント HGF および c-Met 阻害剤を *in vitro* で用いると、形態学的には、HGF 処理で *in vivo* で resting の形態とされる ramified 型に近い形をとり、逆に c-Met 阻害剤処理で round 型の形態をとった。このことから、HGF はミクログリアに直接的に作用し、ミクログリアの形態学的特性を変化させる事が明らかとなった。

D. 考察

脊髄や脳幹部運動ニューロンが進行性、持続的に変性・脱落していくのに対して、HGF が運動ニューロンに直接作用して治療効果をもつことを示してきたが、本研究から、HGF がミクログリア細胞に直接作用してミクログリアの特性を修飾する事が *in vivo*,

in vitro の両面から明らかとなった。HGF の臨床適用にあたっては、特に孤発性 ALS (SALS) の患者さんの治療を考慮すると、発症時、もしくは発症後の HGF 投与による治療が現実的である。いいかえると、HGF が発症後の投与で治療効果を示す事を明らかにするとともに、その分子基盤を明らかにしておく必要がある。東北大学神経内科の糸山先生、青木先生のグループは、ALS モデルトランスジェニックラットに対して、リコンビナント HGF の発症時投与が有効である事を共同研究で明らかにしており、投与自体の有効性は明らかであったが、その分子基盤として発症後病態進行の分子機序に対する機能は不明であった。今回、HGF の発症後投与の有効性の分子基盤が明らかとなった。GMP 準拠のリコンビナントヒト HGF の準備も順調に進んでおり、また、サルを用いた安全性試験も最終段階にあり、HGF の ALS 治療の臨床適用に向けて最終段階に入ってきた。現在 ALS に対する有効な治療法はなく、大阪大学だけでなく、東北大学神経内科、慶應義塾大学生理学、同整形外科教室と強力な協力の下で、日本初の有効な ALS 治療法開発に向けて今後も研究を推進していきたい。



E. 結論

本研究で、HGF が ALS 病態進行時のミクログリアに直接作用してミクログ

リアの特性修飾を行う事が示唆され、発症後 HGF 投与の効果そのものに加えて、発症後 HGF 投与による ALS 治療の分子基盤が明確となった。GMP 準拠リコンビナント HGF 蛋白質の準備も整い、臨床適用に向けての最終準備段階にある。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Suzuki Y, Funakoshi H, Machide M, Matsumoto K, Nakamura T. Regulation of cell migration and cytokine production by HGF-like protein (HLP) / macrophage stimulating protein (MSP) in primary microglia. *Biomed Res.* 29(2): 77-84, 2008.
- (2) Akita H, Takagi N, Ishihara N, Takagi K, Murotomi K, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S. Hepatocyte growth factor improves synaptic localization of the NMDA receptor and intracellular signaling after excitotoxic injury in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol.* 210(1): 83-94, 2008.
- (3) Kanai M., Nakamura T., and Funakoshi H. Identification and characterization of novel variants of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene: differential regulation in the mouse nervous system during development. *Neurosci. Res.*, 2009, in press.
- (4) Tanaka S., Miyata T., Fujita T., Kawahara E., Tachino K., Funakoshi H., and Nakamura T. Differing responses of satellite cell activity to exercise training in

rat skeletal training in rat skeletal muscle. *JPTS*, 2009, in press.

- (5) Takeo S, Takagi N, Takagi K, Date I, Ishida K, Besshoh S, Nakamura T, Tanonaka K. Hepatocyte growth factor suppresses ischemic cerebral edema in rats with microsphere embolism. *Neurosci Lett.* 448(1):125-9, 2008.

2. 学会発表

- (1) Funakoshi H., Ohya W., and Nakamura T., Hepatocyte growth factor (HGF) as a novel and versatile neurotrophic factor during development and regeneration of the nervous system. *Katzir Conference on Life and Death in the Nervous System: NGF2008, Symposium.* Kfar Blum, Upper Galilee, Israel, Sept, 2008
- (2) Funakoshi H., and Nakamura T., HGF as a versatile and critical neurotrophic factor during development and regeneration of the nervous system. *Neuroscience 2008, The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Symposium*, 2008.
- (3) Ohya W., Funakoshi H., and Nakamura T., Modulation of microglial characteristics by HGF: a new potential approach to attenuate the progression of disease in a transgenic mouse model of ALS. *Neuroscience 2008, The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Oral*, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記なし。
2. 実用新案登録
特記なし。
3. その他
特記なし。

ALS モデルマウス肝臓一過性組織変化からの回復過程における HGF-c-Met system の活性化

研究分担者：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：鳥取大学医学部分子病理学教室
大谷若菜：大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学
船越 洋：大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学
中村敏一：大阪大学先端科学イノベーションセンター

研究要旨

SOD1 (G93A) を高発現する ALS のモデルトランスジェニックマウスは、脊髄および脳幹部の運動ニューロンが持続的・進行性に変性・脱落するのに対し、神経外組織である肝臓・腎臓・心臓においては組織変化が一過性でそこから組織学的に回復していく。本研究では、その過程における HGF-c-Met system の活性化について解析した。その結果、一過性組織変化の認められる時期に一致して c-Met のリン酸化（活性化）を認めた。HGF は肝臓・腎臓・心臓の細胞保護、再生因子であることから、ALS における肝臓・腎臓・心臓の一過性組織変化からの回復に HGF-c-Met system が寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

家族性 ALS (FALS) の発症機序の 1 つに SOD1 の遺伝子変異があげられる。このモデル動物の 1 つとして、ヒトで認められる SOD1 (G93A) の変異遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウス (G1H) が知られる。この動物はヒト ALS 患者と同様に脊髄および脳幹部の運動ニューロンの持続的・進行性的変性・脱落がおり、運動機能不全により最終的に死亡する。これまで神経系の変化について詳細な検討がなされてきたが、神経以外についても G1H のみならず SOD1 (G93A) コピー数の少ない G1L から G93A トランスジェニックラットでも肝臓で一過性の組織変化がおこること、その変化は神経と異なり一過性で、その後肝臓の組織変化から回復する事を報告した (Kato M et al.,

Histol Histopathol 2006)。しかし、なぜ肝臓の組織変化が一過性でそこから回復可能で、なぜ神経系では組織変化が持続・進行性かは不明である。前者の分子機構を明らかにし、その分子機構を神経系に適用できれば有用と期待できる。本研究では、肝臓の細胞保護、再生の本体として日本で同定された肝細胞増殖因子 (HGF; Nakamura T et al., Nature 1989) とその受容体 c-Met に着目し、肝臓に加えて腎臓および心臓における c-Met の活性化について詳細に検討した。

B. 研究方法

(1) ALS モデル動物としてヒト変異 SOD1 (G93A) を高発現するトランスジェニックマウス (G1H) (日齢 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 齢) を用い、そのコントロールと