

200833024B

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18～20年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告書（研究代表者）

東北大学大学院医学系研究科神経内科

糸山泰人

## III. 総合研究報告書（研究分担者）

1. ヒトリコンピナント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

慶應義塾大学医学部生理学  
慶應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治療法開発 -臨床適用をめざして

大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

船越 洋

3. 肝細胞増殖因子(HGF)に基づく筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する画期的治療組織学的・免疫組織化学的・超微形態学的論拠

鳥取大学医学部附属脳研施設脳神経病理部門

加藤信介

4. ヒトリコンピナント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. 資料

1. 平成18年度 総括研究報告書  
研究成果の刊行に関する一覧表およびその刊行物
2. 平成19年度 総括研究報告書  
研究成果の刊行に関する一覧表およびその刊行物
3. 平成20年度 総括研究報告書  
研究成果の刊行に関する一覧表およびその刊行物

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

總 合 研 究 報 告 書



厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
総合研究報告書

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。

HGF の臨床適用にあたっては、必要な細胞以外へ HGF が作用することによる副作用を考慮する必要があるが、この点に関して ALS 病態における HGF の活性化細胞を評価した。その結果、ALS の病態の進行していない時期の運動神経細胞は c-Met のセリン残基がリン酸化されている、すなわち不活性化されており、ALS マウスの神経系に特異的に HGF を供給してもチロシン残基のリン酸化（活性化）がほとんど認められないのに対して、ALS 病態進行期においてはセリン残基が脱リン酸化され、c-Met のチロシン残基のリン酸化（活性化）がおこること、さらに HGF を供給するとリン酸化運動神経細胞数が増加することが明らかとなり、HGF は ALS 病態進行にしたがって、より効率よく運動神経細胞を活性化し細胞保護に働くことが明らかとなった。また、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。さらには病理学的検討により脊髄前角細胞には G93A-SOD1 ストレスに対する内因性生存機構の一つとして、肝細胞増殖因子(HGF) /活性型リン酸化 cMet(pcMet)システムが存在していることを解明した。

HGF の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 $\mu$ 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 の治験に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 ALS 病態における HGF の活性化細胞を評価し、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解析を行うことにより、ALS に対する HGF による治療の基盤研究を行う。

#### B. 研究方法

- 1) HGF を ALS $\cdot$  (トランスジェニック) Tg マウスの神経系に供給した際の c-Met のチロシン残基リン酸化 (活性化) が ALS 依存性におこるか否かの評価とその分子機構の解析
- 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同胞を用いた。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。これら① WT ② HGF-Tg ③ ALS-Tg ④ ALS/HGF-Tg の 4 群を比較して、経時的に解析した。
- (a) c-Met の活性化および不活性化の評価 : c-Met の活性化を c-Met のチロシン残基のリン酸化特異的抗体



(phospho-c-Met<sup>1230,1234,1235</sup>; c-Met の 1230, 1234, 1235 番目のチロシン残基のリン酸化を特異的に認識し c-Met の活性化を反映する) による免疫染色性で評価し、不活性化を独自の作成したセリン残基のリン酸化特異抗体の免疫染色性で評価した。

- (b) 脱リン酸化酵素群の発現調節解析: 膜近傍領域のある特異的セリン残基について、その脱リン酸化を担う可能性のある酵素 (PP2A 他) について、上記 4 群の脳幹神経核における免疫染色を施行した。
- (c) 神経特異的とグリア細胞特異的マーカーを用いて、上記の解析の責任細胞を確認した。

## 2) 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

1) で作成した 4 群にてマクログリアの解析を行った。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。

## 3) ALS Tg マウスにおける組織学的・免疫組織化学的・超微形態学的解析

### ①脊髄、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の経時的病理組織学的解析:

ALS SOD1Tg マウス: G1H-G93A マウス (日齢 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 日) を使用し、対照にはそれぞれの同一日齢の同胞を用いた。光学顕微鏡的組織学および免疫組織化学的形態の解析には、全身臓器血液の完全除去後、直ちに 4°C 4% パラホルムアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液

(pH7.3) にて灌流固定した後、脊髄、肝臓、心臓、腎臓の各臓器を取り出した。パラフィン切片は、HE 染色、および免疫染色として HGF および phospho-c-Met<sup>1230, 1234, 1235</sup> を施行した。

超微形態学的解析には、全身臓器血液の完全除去後、4°C 5% グルタルアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液 (pH7.3) にて灌流する。その後、脊髄、肝臓の各臓器を取り出し、4°C 5% グルタルアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液 (pH7.3) 内に再び、60 分間浸潤固定し、目標部位を切り出す。切り出された組織は 4°C 1% 四酸化オスミウムにて、180 分間固定を行い、エポキシ樹脂: エポン (エポック 812) に包埋し、エポンブロックを作製する。エポンブロックから、1 μm 厚の切片を作製して、トルイジンブルー染色を施し、病変を同定した後に、同部位をウルトラミクロトーム (MT2-B, Sorvall, USA) にて、超薄切片化して、電子顕微鏡下にて観察した。

### ②生化学的解析:

生化学的解析には、マウスを体重 1 Kg 当たり 1 ml のペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射にて、深麻酔を施行した。完全に麻酔下にあることを確認した後、開腹・開胸を行い、まず、左心室より血液を採取し、左心室・大動脈経路にて、37°C の生理的食塩水の灌流にて全身臓器の血液を完全に除去する。その後に各臓器の新鮮材料を採取した。

1) 定量的 Real-time (RT)-PCR 法を用いて HGF mRNA 量を定量した。

2) HGF タンパク質量を ELISA 法にて定量した。

3) ALT (GPT) の定量: WAKO トランスアミ



ナーゼ CII Kit を用いて定量した。

### ③抗 HGF 抗体投与による解析：

Alzet mini pump を用いて抗 HGF 機能阻害抗体を肝臓の組織変化が顕著になる時期から持続的に 2 週間皮下投与し、HGF・c-Met system の一過性組織変化からの回復過程での寄与を評価した。

### 4) 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 $\mu$ 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。

### 5) 治験に関するプロトコールの作成

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ールの検討を行った。

#### (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つつ

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 を ALS-Tg の神経系に供給した際の c-Met のチロシン残基リン酸化 (活性化) が ALS 依存性におこるか否かの評価とその分子機構の解析

HGF の臨床適用にあたっては、必要な細胞以外へ HGF が作用することによる副作用が心配されるが、この点に関して、c-Met/HGF 受容体のチロシン残基のリン酸化 (活性化) およびセリン残基のリン酸化 (活性化抑制) 特異抗体を用いて ALS における HGF の活性化細胞を評価した。その結果、ALS の病態の進行していない時期の運動神経細胞は c-Met のセリン残基がリン酸化されている、すなわち不活性化されており、ダブルトランスジェニックマウスを作製することで ALS マウスの神経系に特異的に HGF を供給してもチロシン残基のリン酸化 (活性化) がほとんど認められないのに対して、ALS 病態進行期においてはセリン残基が脱リン酸化され、c-Met のチロシン残基のリン酸化 (活性化) がおこること、さらに HGF を供給するとリン酸化運動神経細胞数が増加することが明らかとなり、HGF は ALS 病態進行にしたがって、より効率よく運動神経細胞を活性化し細胞保護に働くことが明らかとなった。すなわち、不必要な細胞へは HGF の作用がおこりにくく副作用が出にくい可能性が示唆された。これは、脱リン酸化酵素 (PP2A) が ALS 病態進行により誘導されてくることで c-Met セリン残基の脱リン酸化がおこることで、標的細胞である運動神経細胞の c-Met のチロシン残基のリン酸化 (活性化) がおこりやすくなることがそ

の分子機序の1つと考えられた。

## 2) 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。

## 3) ALS Tg マウスにおける組織学的・免疫組織化学的・超微形態学的解析

脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、細胞死に至る。脊髄前角細胞には G93A-SOD1 ス

トレスに対する内因性生存機構の一つとして、肝細胞増殖因子(HGF)/活性型リン酸化 cMet(pcMet)システムが存在していたことを解明した。一方、神経外臓器である肝臓、腎臓、心臓においては、G93A-SOD1 ストレスによる脊髄前角細胞と同様な変性組織像を一時期には呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈した。肝臓については、詳細な超微形態学的解析法を用いて検討したところ、肝細胞においては、一時的には超微細構造学的異常を示すもの、最終的にはほぼ正常な超微形態像に回復していることを解明した。さらに、肝臓、腎臓、心臓における組織学的回復機構には、HGF/pcMet システムが寄与している可能性が示唆された。本研究の結果は、細胞死のプロセスを歩む ALS 脊髄前角細胞に対して、HGF 治療による完全回復の病理組織学的論拠たり得る。

## 4) コモンマウス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った。

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- $\alpha$  (CaMK2- $\alpha$ )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。

### 5) 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。

基盤研究の成果として HGF は ALS 病

態進行にしたがって、より効率よく運動神経細胞を活性化し細胞保護に働くことが明らかとなった。また、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。さらには病理学的詳細な検討により脊髄前角細胞には G93A-SOD1 ストレスに対する内因性生存機構の一つとして、肝細胞増殖因子 (HGF) / 活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムが存在していることを解明した。

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) 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* 66(11): 1037-44, 2007
- 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* 2(10): e1030, 2007
- 3) Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H, Miyatake S, Coffin RS, Nakamura T, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte Growth Factor Promotes Endogenous Repair and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J Neurosci Res* 85(11):2332-42, 2007
- 4) Fujiyoshi K, Yamada M, Nakamura M, Yamane J, Katoh H, Kitamura K, Kawai K, Okada S, Momoshima S, Toyama Y, Okano H. In vivo tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets by diffusion tensor tractography. *J Neurosci* 27(44): 11991-8, 2007
- 5) Fujiwara N, Nakano M, Kato S, Yoshihara D, Ookawara T, Eguchi H, Taniguchi N, Suzuki KOxidative modification to cysteine sulfonic acid of cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase *J Biol Chem* 282 (49): 35933-35944, 2007
- 6) 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.
- 7) 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
- 8) 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.
- 9) 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) 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. XVIth International Congress of Neuropathology, September 10-15, 2006, San Francisco, USA.
- 2) 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.
- 3) 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)
- 4) 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.

- 5) 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
- 6) 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

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

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

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 ヘルペスウィルスベクターを成体ラット胸髄内に注入し肝細胞増殖因子(HGF)を過剰発現させた後に同部に圧挫損傷を作成すると、損傷後急性期にはニューロンおよびオリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制、血管新生を促進することで損傷範囲を縮小し、慢性期にかけてセロトニン線維の再生を促進することで有意に良好な後肢運動機能回復が得られた。さらには臨床応用へ向けて、ラット胸髄圧挫損傷モデルおよびコモンマーモセット頸髄圧挫損傷モデルに対し recombinant human HGF (rhHGF) を損傷後よりくも膜下腔に持続投与したところ、同様に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。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

げっ歯類脊髄損傷モデルに対する肝細胞増殖因子(HGF)の有効性およびその作用メカニズムを検証した上で、霊長類サル脊髄損傷モデルに対する recombinant human HGF (rhHGF)を用いた治療法の有効性・安全性を証明し、ヒト脊髄損傷に対する画期的治療法を確立することが本研究の目的である。

B. 研究方法

1) 成体ラット第10胸髄部に圧挫損傷を作製し、脊髄内のHGFおよびその受容体であるc-Metについて損傷後経時的なm-RNA発現の変化をreal time RT-PCR法で調べた。また同様にして血漿中および脊髄中のHGF蛋白濃度をELISA法で測定した。さらにはneuron、astrocyte、oligodendrocyteにおける損傷前後でのc-Met発現の変化を免疫組織学的に検討した。

2) 成体ラット第10胸髄部にHGFを発現するウィルスベクターを注入し、3日後に同部に圧挫損傷を作製した(HGF群 n=8)。対照群にはLacZ発現ウィルスベクターを注入し同様に脊髄損傷を作製した(LacZ群 n=8)。損傷後6週間にわたりBBB score

を用いた運動機能評価を行い、損傷後1週・6週に組織学的検討を行った。

3) 成体SDラットの第10胸椎高位に圧挫損傷を作成し、直後に第12胸椎くも膜下腔からカテーテルを挿入し、浸透圧ミニポンプを用いてrhHGF200 $\mu$ gを髄腔内に2週間持続投与した。対照群にはPBSを投与した。損傷後6週目までBBB scoringを用いて運動機能回復を評価し、組織学的検討を加えることでrhHGFの有効性を評価した。

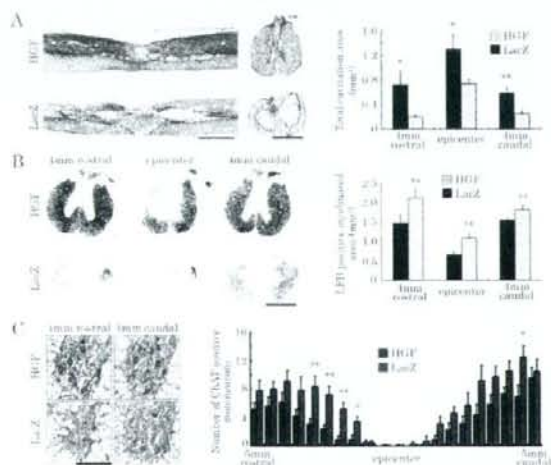
4) 成体メスのコモンマーモセットの第5頸椎高位に20gの重錘を5cmの高さから落として圧挫損傷を作製した。直後より第7頸椎高位くも膜下からカテーテルを挿入し、rhHGF 400 $\mu$ gを髄腔内に4週間持続投与した(n=6)。対照群にはPBSを投与した(n=5)。術後12週までBar grip testにて上肢筋力を、独自に開発したOpen field scoringにて上肢の神経学的機能を評価した。損傷後1・3・12週に頸髄MRI(7.0 tesla)を撮像し、損傷範囲を同一個体で経時的に評価した。また、拡散テンソル投射路撮影(Diffusion tensor tractography;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



### C. 研究結果

1) ラット脊髄内のc-Met mRNA発現は損傷直後より急激に増加するのに対し、HGF mRNA発現は損傷後緩やかに増加し2週後にピークに達した。脊髄内HGF蛋白の発現もmRNA発現と同じ傾向を示し損傷後4週でピークに達した。一方、血漿中では損傷後もHGF蛋白量はほぼ一定であった。また、HGFの受容体であるc-METの発現は正常脊髄内ではneuron、oligodendrocyteにみられたが、astrocyteにおいては損傷後にc-METの発現が明らかとなった。

Figure 1.



2) 損傷後6週では、HGF群において空洞形成 (figure1A)および脱髄範囲 (figure1B)が有意に縮小し、脊髄前角部の運動ニューロンが有意に多く生存していることが明らかとなった (figure1C)。これらの結果にもとづき、Western blotting法により損傷脊髄内での活性型caspase-3発現量を定量したところ、両群ともに損傷後3日に最も多く活性型caspase-3が発現していたが、HGF群では有意にその発現が抑制されていた。さらに、活性型caspase-3を発現するニューロン、オリゴデンドロサイトがHGF群で減少していたことから、HGFは損傷後急性期にニューロン、オリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制することでその生存を促進し、損傷範囲の縮小に寄与したものと考えられた。

また、HGFは様々な組織において強力な血管新生作用を有することがよく知られている。そこで、血管内皮細胞を認識する抗RECA-1抗体を用いて損傷後1週目の脊髄内の新生血管を免疫組織学的に検討したところ、両群において太い内径を有した新生血管

が出現していたが、その数がHGF群で有意に増加していた。

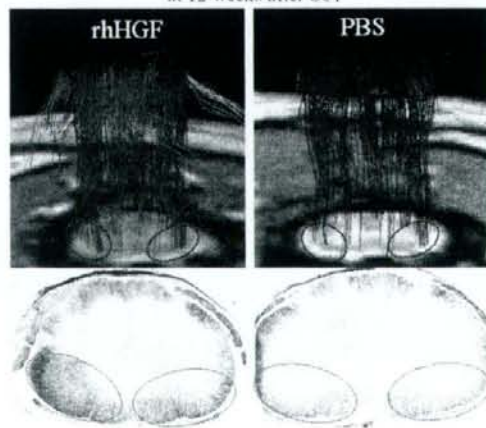
さらに、げっ歯類脊髄損傷モデルにおいて後肢運動機能回復と大きな相関を有する5HT陽性の raphe-spinal serotonergic fiber (縫線核脊髄路の神経線維、以下セロトニン線維)についても検討した。損傷部より尾側4mmにおいては、損傷後1週ではセロトニン線維が両群においてほとんど確認されなくなるが、損傷後6週になるとHGF群で有意に多くのセロトニン線維が損傷部尾側に分布していることが明らかとなった。また、これらのセロトニン線維はHGFの受容体であるc-Metを発現しており、一部の線維では再生軸索のマーカであるGAP-43も発現していたことから、HGFはセロトニン線維に直接作用しその再生を促進した可能性も示唆された。

BBB scoring による下肢運動機能評価では、両群ともに損傷後1日は0点であったが、その後HGF群で有意な改善がみられ、対照群では不可能な後肢荷重が可能となった。

3) 成体SD ラットの第10胸髄圧座損傷モデルに損傷直後よりrhHGFを2週間にわたり持続投与したところ、rhHGFの脊髄損傷部への高率な導入および内在性rat HGFの発現上昇がELISA法にて確認され、有意に良好な下肢運動機能回復を認めた。またLFB染色、H.E.染色の結果より損傷範囲が著明に縮小していることが明らかとなった。即ち、損傷後よりrhHGFをくも膜下腔に持続投与することによっても、HSV-1 vectorを用いたこれまでのHGF導入法と同様の効果が得られることが明らかとなった。

Figure 2.

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

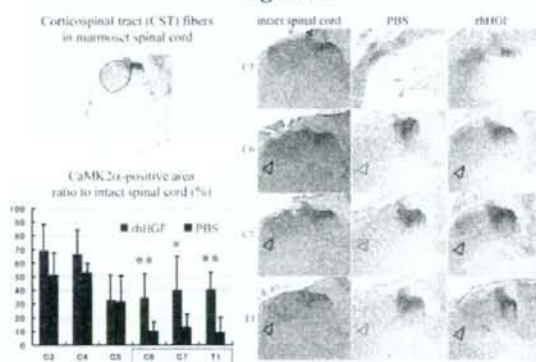




4) マーモセットを用いた検討では、rhHGF 投与群で Bar grip test, Open field scoring いずれの評価法においても対照群に比べ有意に良好な運動機能回復が認められた。観察期間中に異常行動は認めなかった。損傷後3週までのMRI像では両群間に明らかな差は認められなかったものの、12週目にはT1-low、T2-highを示す異常信号領域が rhHGF 投与群で著明に縮小していた。またDTTの結果より、rhHGF 投与群で有意に多い脊髄軸索が描出された(前項 figure2)。

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。さらには、皮質脊髄路を示す calmodulin-dependent protein kinase 2- $\alpha$  (CaMK2- $\alpha$ )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(figure3)。また、allodynia(異痛症)の原因とされる Calcitonin gene-related peptide (CGRP)陽性C線維の異常分布についても検討したが、脊髄灰白質後角における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。

Figure 3.



#### D. 考察

損傷後急性期の脊髄内ではHGFの受容体であるc-Met発現の急激な増加に対して、内在性HGFの供給が不足していることが明らかとなった。そこでHSV-1 vectorを用いて損傷脊髄にHGFを供給したところ、損傷後急性期のCaspase-3活性の抑制ならびに血管新生促進作用により損傷範囲が著明に縮小し、有意に良好な5HT陽性神経線維の再生および運動機能回復が得られた。即ち、脊髄損傷後急性期に脊髄内にHGFを供給することによって、有効な治療効果が得られることが示された。

次に、HSV-1 vectorの脊髄内への直接注入はヒト脊髄損傷への応用が不可能であることから、rhHGFを損傷後よりも膜下腔に持続投与する方法を検討したところ、ラット脊髄損傷に対しこれまでと同様に有効な治療効果を得た。

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・機能学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。そこで前臨床試験として、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

ラットおよび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

Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H, Miyatake S, Coffin RS, Nakamura T, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte Growth Factor Promotes Endogenous Repair and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci. Res.* Aug 15;85(11):2332-42, 2007

Fujiyoshi K, Yamada M, Nakamura M, Yamane J, Katoh H, Kitamura K, Kawai K, Okada S, Momoshima S, Toyama Y, Okano H. In vivo tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets by diffusion tensor tractography. *J. Neurosci.* Oct 31;27(44): 11991-8, 2007

北村和也, 中村雅也, 戸山芳昭, 岡野栄之: 臨床応用を目指す脊髄再生. *Medical Bio.* 2007. 7.

北村和也, 中村雅也, 船越洋, 中村敏一, 岡野榮之, 戸山芳昭: Hepatocyte growth factor を用いた脊髄損傷治療戦略. 脊椎脊髄ジャーナル. 2007.12. vol.12, No.12, 1239-46

北村和也, 中村雅也, 岩波明生, 船越洋, 中村敏一, 岡野榮之, 戸山芳昭: Hepatocyte growth factor を用いた脊髄損傷治療戦略—新たな治療法の確立へ向けて—. 関節外科. 2008.2. Vol.27, No.2, 37-46

北村和也, 中村雅也, 戸山芳昭, 岡野榮之: 脊髄再生へ向けた軸索再生のストラテジー. 蛋白質核酸酵素. 2008.3. Vol.53, No.4, 411-17.

## 2. 学会発表

北村和也, 中村雅也, 岩波明生, 山根淳一, 船越洋, 岡野榮之, 戸山芳昭: 脊髄損傷に対する Hepatocyte Growth Factor (HGF) の有効性の検討. 第 35 回日本脊椎脊髄病学会 東京 2006, 4 月

中村雅也, 岩波明生, 北村和也, 戸山芳昭, 岡野榮之: HGF gene therapy for the treatment of spinal cord injury. 第29回日本神経科学大会 京都 2006, 7 月

藤吉兼浩, 中村雅也, 山田雅之, 山根淳一, 岡野榮之, 戸山芳昭: コモンマーモセット損傷脊髄における拡散テンソル tractography. 第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会、長崎、2006 年 10 月

北村和也, 中村雅也, 岩波明生, 船越洋, 岡野榮之, 戸山芳昭: 損傷脊髄に対する Hepatocyte Growth Factor の有効性の検討. 第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会 長崎 2006, 10 月

北村和也, 中村雅也, 岩波明生, 船越洋, 岡野榮之, 戸山芳昭: 脊髄損傷に対する Hepatocyte Growth Factor の有効性の検討. 第3回 CHIBA NEURORESEARCH MEETING、千葉、2007 年 5 月

北村和也, 中村雅也, 岩波明生, 山根淳一, 渡辺航太, 芝田晋介, 船越洋, 戸山芳昭, 岡野榮之, Hepatocyte 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. 第 28 回日本炎症・再生医学会、東京 2007 年 8 月

Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J, Fujiyoshi K, Watanabe K, Shibata S, Funakoshi H, Toshikazu N, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte Growth Factor (HGF) Promotes Endogenous Repair and Functional Recovery after Spinal Cord Injury; Preclinical Trial Using Recombinant Human HGF from Rodents to Primates. KEIO International Symposium on Photonics and Molecular Therapy. Tokyo. 2007, 8

北村和也, 中村雅也, 岩波明生, 山根淳一, 岡野榮之, 戸山芳昭, Hepatocyte 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. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会、静岡、2007 年 10 月

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, 岡野榮之, Hepatocyte 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, 疋島敬吾, 豊田史香, 岩波明生, 船越洋, 中村敏一, 岡野榮之, 戸山芳昭, 脊髄損傷に対する recombinant human Hepatocyte 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, 岡野榮之, 戸山芳昭, Hepatocyte 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 Hepatocyte Growth Factor; from Rodent to Ptimate. 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 hepatocyte 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, 足島啓吾, 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
- K. Fujiyoshi, M. Nakamura, M. Yamada, J. Yamane,  
 H. Katoh, K. Kitamura, Y. Tanioka, Y. Toyama, H.  
 Okano: Diffusion tensor tractography of the intact  
 and injured spinal cord in non-human primates.  
 36th Annual meeting of Neuroscience. Atlanta,  
 USA, 2006, 11
- Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J,  
 Funakoshi H, Okano H, Toyama Y. Application of  
 hepatocyte growth factor enhances neuronal  
 survival and axonal regeneration and promotes  
 functional recovery after spinal cord injury.  
 Cervical Spine Research Society (CSRS) 34<sup>th</sup>  
 Annual Meeting. Palm Beach, Florida-USA, 2006,  
 11
- Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J,  
 Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H,  
 Nakamura T, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte  
 growth factor promotes endogenous repair and  
 functional recovery after spinal cord injury; a trial  
 from rodents to primates. 37<sup>th</sup> Annual Meeting of  
 the Society For Neuroscience. San Diego, CA,  
 USA. 2007, 11
- Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J,  
 Fujiyoshi K, Funakoshi H, Okano H, Toyama Y.  
 Hepatocyte Growth Factor (HGF) Promotes  
 Endogenous Repair and Functional Recovery after  
 Spinal Cord Injury; Preclinical Trial Using  
 Recombinant Human HGF from Rodents to  
 Primates. Cervical Spine Research Society  
 (CSRS) 35<sup>th</sup> Annual Meeting. San Francisco, CA,  
 USA. 2007, 11
- Kitamura K, Nakamura M, Iwanami A, Yamane J,  
 Fujiyoshi K, Funakoshi H, Okano H, Toyama Y.  
 Hepatocyte Growth Factor (HGF) Promotes  
 Endogenous Repair and Functional Recovery after  
 Spinal Cord Injury; Preclinical Trial Using  
 Recombinant Human HGF from Rodents to  
 Primates. 54<sup>th</sup> Annual Meeting of Orthopaedic  
 Research Society. San Francisco, CA, USA. 2008,  
 3
- Kitamura K, Okano H. Hepatocyte Growth Factor  
 Promotes Endogenous Repair and Functional  
 Recovery after Spinal Cord Injury; Preclinical  
 Trial from Rodents to Primates. The 3<sup>rd</sup>  
 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. 55<sup>th</sup> 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)
- 出願番号: PCT/JP2007/053804, 出願日: 2007年2

月 28 日, 発明の名称: 脊髄損傷治療薬剤, 整理  
番号: P10001205, 出願人および発明者: 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

出願番号: PCT/JP2008/053557, 出願日: 2008 年 2  
月 28 日, 発明の名称: 脊髄損傷治療薬剤, 整理  
番号: P20001205, 出願人および発明者: 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, 花田敬吾

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし