

「HGF による ALS 治療法開発  
—臨床適用をめざして」

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）  
角山 圭一（姫路独協薬科大学）  
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の運動神経細胞死やグリオシスを抑制・運動機能を改善し、寿命を延長することを報告してきた。本研究では、新たに脳幹部運動神経に対しても HGF が運動神経細胞死を抑制することが明らかとなり、HGF が ALS の標的となる広範囲の運動神経細胞死を抑制する作用があることが示された。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。さらに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も解析をすすめた。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 準拠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

### 【背景】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、約 10% を占める家族性 ALS (FALS) と、90% 以上を占める孤発性 ALS (SALS) に分類される。私達は、SOD1G93A を発現する FALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) の神経系に HGF 遺伝子を供給すると、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抑制し、運動機能を維持、寿命を延長する事を報告した (Sun, Funakoshi et al., 2002)。さらに、FALS のみならず、SALS の患者さんの脊髄組織中では、HGF と c-Met/HGF 受容体が ALS-Tg と同様の発現制御を受けることを明らかにした (Kato, Funakoshi et al., 2003)。以上から、HGF は、FALS に加えて SALS においても ALS の進行に従い、内因性に発現制御を受けることが明らかとなり、HGF が FALS と SALS に共通の有効な治療薬となることが期待されている。

【目的】本研究では、これらを背景に HGF の ALS への臨床適用をめざした基盤研究を進めることにある。そこで臨床適用にあたり、以下の点を解明し、臨床適用に向けて準備を進めることを目的とした。

- (1) これまで明らかになっている脊髄に加えて脳幹部の運動ニューロンに対して細胞死抑制作用を持つかどうかを明らかにする。
- (2) HGF の神経系への供給の安全性を、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で評価する。また、その分子機構を明らかにする。
- (3) 発症後の ALS 病態進行に重要なミクログリアの活性化 (ミクログリオシス) に対する HGF による修飾作用を評価する。

## B. 研究方法

- (1) 脳幹部の運動ニューロンに対して細胞死抑制作用の解析
  - (a) 神経系特異的に rat HGF を発現する HGF-Tg と SOD1G93A 発現 ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) を交配することで、① WT ② HGF-Tg ③ ALS-Tg ④ ALS/HGF-Tg の 4 群を作成し、経時的に解析した。
  - (b) 上記 4 群の動物を深麻酔後、脳を摘出し、パラフィン切片を作製した。その後 Nissl 染色を施行し、脳幹部 (顔面神経核および舌下神経核) の運動神経細胞死を定量的に評価した。
  - (c) HGF 蛋白質の脳幹神経核への供給量は、ELISA 法で測定した。
- (2) 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
  - (a) 上記と同様にして① WT ② HGF-Tg ③ ALS-Tg ④ ALS/HGF-Tg の 4 群を作成し、経時的に解析した。
  - (b) 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>) による免疫染色性で評価し、不活性化をセリン残基のリン酸化特異抗体 (研究室で作成) の免疫染色性で評価した。
  - (d) 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。
  - (e) 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。
- (3) ミクログリアの活性化 (ミクログリオシス) に対する HGF による修飾作用を評価する。

### (I) In vivo の系を用いた解析

- (a) 上記と同様にして① WT ② HGF-Tg ③ ALS-Tg ④ ALS/HGF-Tg の4群を作成し、経時的に解析した。
- (b) 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

- (a) 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。
- (b) 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<sup>1230, 1231, 1235</sup> (活性化型 c-Met) の蛍光多重染色を用いた。

## C. 研究結果

### (1) 脳幹部運動ニューロン変性に対する

HGF の効果：ヘテロ ALS-Tg とヘテロ HGF-Tg の交配実験から、ALS-Tg における脳幹部運動ニューロン変性が、ALS/HGF-Tg では大幅に抑制されることが明らかとなった。この効果は、脳幹部の中今回解析した舌下運動ニューロンと顔面運動ニューロンで同様に認められた。すなわち、HGF が ALS-Tg の広範囲の脳幹部運動神経変性をよく抑制することを示している。

### (2) 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

- (a) HGF-Tg の脳幹では、WT マウスに比較して高レベルの HGF 蛋白質が検出され、HGF が確実に供給できている事が確認された。

- (b) 脳幹神経核における c-Met のチロシン残基リン酸化 - WT, HGF-Tg, ALS-Tg, ALS/HGF-Tg の比較 - : ALS-Tg および ALS/HGF-Tg マウスの脳幹運動神経核 (舌下神経核および顔面神経核) においては、c-Met は共にチロシン残基のリン酸化を受けていた。その程度は、ALS/HGF-Tg で強い傾向を認めた。脳幹神経核においてチロシン残基のリン酸化を認めたのは神経細胞であった。一方、野生型マウスでは c-Met のチロシン残基のリン酸化をほとんど認めなかったことに加え、HGF-Tg マウスにおいても脳幹神経核における c-Met のチロシン残基のリン酸化をほとんど検出できなかった。
- (c) c-Met セリン残基のリン酸化抗体およびフォスファターゼ抗体を用いた免疫染色結果：4群の比較解析から、c-Met のセリン残基のリン酸化とフォスファターゼの発現レベルが ALS に罹患しているか否かで調節されていることが明らかとなった。

### (3) ミクログリオシスに対する HGF の効果

- (a) 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。

- (b) **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 発現が比較的低かった。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。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 et al, J. Neurosci, 2002; Kadoyama 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。

- (4) 脳幹神経核における c-Met のチロシン残基リン酸化 - WT, HGF-Tg, ALS-Tg, ALS/HGF-Tg の比較 - : ALS-Tg および ALS/HGF-Tg マウスの脳幹運動神経核 (舌下神経核および顔面神経核) においては、c-Met は共にチロシン残基のリン酸化を受けていた。その程度は、ALS/HGF-Tg で強い傾向を認めた。脳幹神経核においてチロシン残基のリン酸化を認めたのは神経細胞であった。一方、野生型マウスでは c-Met のチロシン残基のリン酸化をほとんど認

めなかったことに加え、HGF-Tg マウスにおいても脳幹神経核における c-Met のチロシン残基のリン酸化をほとんど検出できなかつた。

- (5) c-Met セリン残基のリン酸化抗体およびフォスファターゼ抗体を用いた免疫染色結果：4群の比較解析から、c-Met のセリン残基のリン酸化とフォスファターゼの発現レベルが ALS に罹患しているか否かで調節されていることが明らかとなった。
- (6) HGF-Tg の脳幹では、WT マウスに比較して高レベルの HGF 蛋白質が検出され、HGF が確実に供給できている事が確認された。

#### D. 考察

##### (1) 脳幹部の運動ニューロンに対して細胞死抑制作用の解析

ヘテロ ALS-Tg とヘテロ HGF-Tg の交配実験から、ALS-Tg における脳幹部運動ニューロン変性が、ALS/HGF-Tg では大幅に抑制されることが明らかとなった。この効果は、脳幹部の中今回解析した舌下運動ニューロンと顔面運動ニューロンで同様に認められた。すなわち、HGF が ALS-Tg の広範囲の脳幹部運動神経変性をよく抑制することを示している。これは、多くの神経栄養因子が ALS やこれに類似する運動神経細胞死モデル動物の実験から、脊髄と脳幹部のどちらかへの効果が主体であったら、単独の因子では神経細胞死と運動神経繊維の一方しか抑制しないことが報告されているのに対して、HGF が脊髄と脳幹部を含む広い運動神経細胞死を抑制する作用をもつことは、私たちが過去に明らかにしてきた HGF の ALS-Tg に対する神経繊維変性抑制作用を有することを考慮すると、HGF が他の治療因子と比較して有用性が示唆された。

##### (2) 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

本研究において、HGF の神経系への局所性な供給は、解析した HGF 供給量では野生型マウスの神経組織の c-Met を活性化せずすむことが明らかとなった。その分子機構としては、ALS 依存的なフォスファターゼの発現調節を介した c-Met の分子内セリン残基のリン酸化調節を介している可能性が示唆される。本研究結果は、HGF の ALS 臨床適用に向けての投与の安全性について有望な基礎研究結果と考えられる。

以上本研究において、HGF の神経系への局所的な供給では、ALS に罹患していない神経組織での c-Met の活性化は乏しく、一方 ALS に罹患した神経組織に於ける c-Met の活性化が HGF の濃度依存的に促進されることが明らかとなった。

##### (3) ミクログリオシスに対する HGF の効果：

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

HGF の ALS 臨床適用に向けて、HGF が脊髄に加えて脳幹部の運動神経細胞の細胞死を抑制し、運動機能を改善、寿命を延長することが明らかとなった。安全性の面では e-Met のチロシン残基のリン酸化で活性化状態を評価すると、HGF が ALS に罹患していない神経組織を活性化しない観点から、安全性がと確認された。その分子機構については、e-Met の膜近傍領域のリン酸化調節が関与していることが示唆された。この調節は、ALS によるプロテインフォスファターゼの発現調節に依存している事が示唆された。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らかとなってきた。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.
6. 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.
7. Ohya W *et al.*, Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during development in the rat. *Brain Res* 1147 (2007) 51-65.
8. 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.
9. K. Kitamura, *et al.*, Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res* 85 (2007) 2332-2342.
10. M. Nakano, *et al.*, Hepatocyte growth factor promotes the number of PSD-95 clusters in

- young hippocampal neurons, *Exp Neurol* 207 (2007) 195-202.
11. Hayashi Y, et al., (2006) Adenoviral gene transfer of hepatocyte growth factor prevents death of injured adult motoneurons after peripheral nerve avulsion. *Brain Res* 1111:187-195.
  12. Tanaka M, et al. (2006) Hepatocyte growth factor in mouse soleus muscle increases with reloading after unloading. *J Phys Ther Sci* 18:33-41.
  13. Nakamura K, et al., (2006) Possible role of scavenger receptor SRCL in the clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 84:874-890.
  14. Niimura M, et al., (2006) 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* 26:1354-1365.
  15. Zhao MZ, et al., (2006) 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* 26:1176-1188.
  16. Niimura M, et al., (2006) 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* 535:114-124.
  17. Date I, et al., (2006) 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* 407:141-145.
  18. Niimura M, et al., (2006) 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* 407:136-140.
  19. 船越 洋 他, HGFの神経疾患治療効果. *Clinical Neurosci*, 25: 500-501, 2007
  20. 船越 洋 他, HGFの神経保護作用機序. *Clinical Neurosci*, 25, 620-621, 2007
  21. 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
  22. 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.
  23. 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.
2. 学会発表
- シンポジウム・ワークショップ発表**
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, 第31回日本神経学会大会シンポジウム, 東京 2008.
  3. 船越 洋他 Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO)-ノックアウトマウスでは, 神経新生の促進と不安行動の修飾が認められる. 第51回日本神経化学学会大会シンポジウム
  4. 船越 洋, 金井 将昭, 中村 敏一 トリプトファン代謝と情動. シンポジウム, 第30回トリプトファン研究会, 岡山 2008.
  5. 船越 洋他, ALSワークショップ-ALSの克服に向けて・ワークショップ, 東京, 2006
  6. Funakoshi H. and Nakamura T., HGF as a novel neurotrophic factor for neurodegenerative diseases. 第29回日本神経学会大会シンポジウム, Kyoto, 2006.
  7. Funakoshi H & Nakamura T, Hepatocyte growth factor (HGF) as a novel neurotrophic factor for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) .17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, 2006.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他

## 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法の 組織学的・免疫組織化学的・超微形態学的論拠

分担研究者：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、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

青木正志、糸山泰人：東北大学大学院医学系研究科神経内科分野

### 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 マウスにおいては、G93A-SOD1 ストレスにより、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。

### A. 研究目的

SOD1 遺伝子異常を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症では、脊髄前角細胞死をきたす。変異SOD1 遺伝子導入ALS モデル動物においても、ヒトと同様に、脊髄前角細胞の変性・細胞死をきたす。このモデル動物の臨床症状の変化に対応した経時的な組織変化の探索より、変異SOD1 を伴った生体系においては、ALS-変異 SOD1 ストレスは神経系である脊髄前角細胞だけでなく、神経外臓器である肝臓、腎臓、心臓の各組織細胞にも影響を及ぼしていることが判明した。SOD1 ストレスにより脊髄前角細胞は細胞死を起こすが、肝臓、腎臓、心臓の各組織細胞では、一時的な組織変性所見を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈し、細胞死に至らない。HGF/pcMet システムの観点から、神経外臓器である肝臓・腎臓・心臓の各組織の経時的組織変化に着目し、これらの神経外各臓器のHGF/pcMet システムの

経時的変遷について解析した。本研究では、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正当性の確立にある。

### B. 研究方法

#### 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 SOD1 トランスジェニックマウス：G1H-G93A マウス(日齢 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 齢)を使用し、対照にはそれぞれの同一日齢の同胞を用いた。マウスは体重 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、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。

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°C4%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。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、および免疫染色として HGF および 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)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°C5%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°C5%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°C1%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、1μm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、同部位をウルトラマイクロトーム（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1Kg当たり1ml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。

## C. 研究結果

### 1. 光顕的病理組織的所見

1) 同胞における光顕的組織像: 脊髄・肝臓・腎臓・心臓の各臓器は、すべての日齢を通じて正常組織所見であった。

2) 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 (vacuolation) 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。腎臓・心臓でも、肝臓と同質の病理変性所見を呈した。

3) 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、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、その空胞の大きさは、90日齢時点の空胞と比較すると、大きさが減少し、小型化していた。腎臓・心臓でも、肝臓と同質の病理変性所見を呈した。

4) 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、多数の Lewy body-like hyaline inclusion (LBHI) と astrocytic

hyaline inclusion (Ast-HI) とが認められた。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、腎臓、心臓の各臓器組織においては、脊髄組織とは対照的に、ほぼ正常組織所見に復していた。

## 2. 脊髄における超微形態学的組織所見

1) 同胞における超微形態学的病理組織像：すべての日齢を通じて、全く異常は認められなかった。

2) 神経症状発症前の生後 90 日齢の時点における超微形態学的病理組織像：脊髄前角細胞の細胞体、樹状突起、軸索に極く少数の vacuolation が認められた。

3) 神経症状発症時の生後 100 に日齢の時点における超微形態学的病理組織像：脊髄前角細胞の細胞体、樹状突起、軸索に大小不同の多数の vacuolation が認められた。核周囲の vacuolation は、rough ER が拡大していた。また mitochondria の outer membrane と inner membrane 間が主に拡大して、vacuolation を形成していた。初期には rough ER 由来が目立つが、経過と共に mitochondria 由来の vacuolation が増加してゆき、これが vacuolation pathology の主体となっていた。

4) 生後 120 日齢の終末期における超微形態学的病理組織像：多数の LBHI と Ast-HI とが認められた。LBHI も Ast-HI もともに約 15-25nm 径の granule-coated fibril から成っていた。LBHI は、樹状突起内に多数認められ、時に神経細胞体内に典型的 LBHI として同定された。軸索内にはまれではあるが認められることもあった。多数の反応性アストロサイトと共に、Ast-HI を胞体内に有する多数のアストロサイトも同定された。この終末期には inclusion pathology が主体であるが、vacuolation pathology もみられ、主に mitochondria 由来の vacuolation が主に神経樹状突起内に多数みられた。即ち、脊髄前角細胞の超微形態学的病理像は、vacuolation pathology と inclusion pathology であり、この両者の特徴的病理所見を伴いながら、前角細胞は消失していた。細胞内小器官に焦点をあててみると、vacuolation pathology は、rough ER と mitochondria の破綻を意味する。Inclusion pathology は、granule-coated fibril から成る

inclusion が形成されることによって、細胞内小器官が物理的な圧迫等によって障害を受けていた。

## 3. 肝における超微形態学的組織所見

1) 同胞における超微形態学的組織像：すべての日齢を通じて、肝細胞における超微形態学的組織所見には全く異常なく、正常組織所見であった。

2) 神経症状発症前の生後 90 日齢の時点における超微形態学的病理組織変化：光顕上、HE 染色で同定した空胞形成を伴う swollen hydropic hepatocyte は、超微形態学上は、肝細胞質内に多量の細胞内液が貯留している像で、細胞内小器官は多量の細胞内液の中に浮かんでいると表現できる像を示した。細胞内小器官そのものには超微形態学的には、病的所見は認められず、正常細胞内小器官の像を示していた。Swollen hydropic hepatocyte の細胞膜には異常はなかった。核そのものの像にも異常はなく、核膜も正常であった。Dark eosinophilic hepatocyte は、超微形態学上は、全体にやや小型の肝細胞で、細胞質内マトリックスが減少していて、細胞内小器官は、そのために密接に局在していた。超微形態学的には、細胞小器官そのものには病的所見はなく、正常構造を保っていた。ただ、細胞内小器官の高密度局在が、光顕上、HE 染色では、dark eosinophilic 像を示した。

3) 神経症状発症時の生後 100 日齢の時点における超微形態学的病理組織変化：細胞内液が多量に貯留し、細胞自体が腫大を示す swollen hydropic hepatocyte の数が減少していた。逆に、細胞内小器官が密に局在していて、HE 染色上、dark eosinophilic hepatocyte と同定される細胞の数が増加していた。超微形態学的には、生後 100 日齢でみられた swollen hydropic hepatocyte と dark eosinophilic hepatocyte は、生後 90 日齢で観察された swollen hydropic hepatocyte と dark eosinophilic hepatocyte と同一であった。

4) 生後 120 日齢の終末期の時点における超微形態学的病理組織変化：正常肝細胞として、1 $\mu$ m 厚トルイジンブルー染色 semi-thin section で同定された肝細胞の超微形態学的組織所見は、細胞内マトリックスには、極く少量の細胞内液の貯留を認めるのみで、この所見は病的所見とは認められなかった。また、肝細胞の細胞膜および核には著変は

認められなかった。細胞内小器官の形態そのものにも著変は認められなかった。

#### 4. HGF/cMet システム、特に活性型リン酸化 cMet (phospho-cMet, pcMet) の調節機構の免疫組織化学的解析

1) 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 発現は同定可能なレベルであった。HGF の受容体である活性型リン酸化 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・腎臓・心臓の各臓器の HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析では、すべての日齢を通じて、HGF 及び pcMet の発現は認めなかった。

2) 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。cMet 受容体の活性化の指標であるリン酸化 cMet (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 pcMet 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 pcMet 陽性所見が認められた。pcMet の発現様式は陽性細胞と陰性細胞とが入り交じったモザイク染色様式を示した。即ち、生後 90 日齢の肝臓では、一部の肝細胞に pcMet 免疫染色性が強く認められた。腎臓・心臓においても、肝臓と同様に、heterogeneity を示しながらも、一部の細胞に pcMet 陽性所見が認められた。

3) 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 pcMet 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、pcMet の高度の強発現が認められた。腎臓・心臓においても、肝臓と同様に、heterogeneity を示しながらも、生後 90 日齢に比べ、一部の細胞には、heterogeneity を示しながら、より高度の pcMet の高発現が認められた。

4) 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、依然として多くの脊髄前角細胞は HGF/pcMet システムを up-regulate させつづけていた。注目すべき所見は、肝臓、腎臓、心臓の各臓器においては、正常組織所見に復するに従い、脊髄組織とは対照的に、pcMet 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、腎臓、心臓は正常組織像を示し、pcMet の発現はほとんど認めなかった。

#### 5. 生化学的解析

##### 1) ALT (GPT) の定量

ALS SOD1 トランスジェニックマウスにおいて、全経過の日齢 (日齢 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 日齢) において、血中 ALT (GPT) 値の上昇を認めなかった。

##### 2) 組織および血漿中の HGF mRNA もしくは HGF タンパク質の定量

脳神経系を除く一部のサンプルで、HGF の一過性の誘導が認められ、その time course は pcMet の免疫組織化学的解析の結果と一致していた。

#### 6. 抗 HGF 抗体投与

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/cMet 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ところ、preliminary には抗 HGF 機能阻害抗体の投与により、肝臓の一過性組織変化からの回復過程が修飾された。

#### D. 考察

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、正常脊髄前角細胞では、HGFのcMetを介するシグナルを細胞内に伝達していない状態にあることが判明し、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システムの賦活化の存在を明らかにした。超微形態学的には、脊髄前角細胞は、ALS-G93A変異SOD1ストレスにより、rough ERとmitochondriaにおいて、拡大するという形態的病的所見を呈しながら、rough ERとmitochondriaの両者は障害を受ける。この病的変化はvacuolation pathologyとして認識されることが判明した。また、ALS-G93A変異SOD1がaggregationを生じることにより、多数のgranule-coated fibrilが形成され、この形成により神経細胞内のconstitutive proteinの恒常性が障害される。また、granule-coated fibril形成に基づく細胞内容積占居により、細胞内小器官への物理学的圧迫等によって、細胞内小器官が障害されてゆく。この病的変化はinclusion pathologyとして認

識されることが解明された。

G1H-G93Aマウスにおける肝臓、腎臓、心臓の各臓器の経時的組織変化は、ほぼ画一的であり、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞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。この肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞における活性型cMet(pcMet)の経時変化をみてみると、まだ脊髄前角細胞がcMetを活性化させていない生後90日齢において、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞はALS-G93A変異SOD1ストレスに対して、すでにcMetを活性化させていた。神経症状発症時の生後100日齢頃の肝臓、腎臓、心臓において、最も高度にcMetを活性化させていた。しかし、正常組織像に復するに従いpcMetの発現レベルが低下を認め、生後120日齢では、pcMetはほぼその発現を停止した正常状態に復していた。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、腎臓、心臓においては、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。超微形態学的には、肝細胞は、ALS-G93A変異SOD1ストレスにより、初期には肝細胞内液の制御機構が障害される。このために肝細胞質内液の多量の貯留を来し、swollen hydropic hepatocyteとしての病理像を形成する。やがて、肝細胞質内液貯留修復に伴い、肝細胞質内マトリックス減少を惹起し、肝細胞質内小器官が密に局在してしまうために、dark eosinophilic hepatocyteという病的所見を示す。しかし、やがて、超微形態的には、ほぼ正常の肝細胞の構造となる。即ち、一度は病的所見としてswollen hydropic hepatocyte及びdark eosinophilic hepatocyteの像を呈するが、最終的には超微細構造学的にもほぼ完全回復を示す。この超微細構造学的完全回復機序は、ALS SOD1トランスジェニックマウスの全病期期間(日齢60, 70, 80, 90, 100, 110, 120日齢)において、血中ALT(GPT)値の上昇を認めなかったという生化学的事実と一致している。即ち、組織学的、免疫組織化学的、超微細構造学的完全回復機構の一つに内因性HGF/cMetシステムの寄与の可能性を明らかにできた。また、preliminaryには抗HGF機能阻害抗体の投与により、肝臓の一過性

組織変化からの回復過程が修飾されたことも、内因性 HGF/cMet システムが組織の完全回復機構に関与していることを裏付けている。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。本研究の結果は、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、免疫組織化学的、超微細構造学的完全回復の病理組織的論拠たり得る。

## E. 結論

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデル動物であるヒト変異 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が、その過程において、ALS 脊髄前角細胞は内因性生存機構としての HGF/活性型リン酸化 cMet (pcMet) システムの up-regulation 機構を惹起させ、自らを守って生存し続けようとするが、この機構を振り切るかたちで細胞死に至る。一方、肝臓、腎臓、心臓においては、一度は組織障害像を呈するものの、最終的にはほぼ完全回復を呈する。この組織学的、免疫組織化学的、超微細構造学的完全回復機構の一つに内因性生存機構としての HGF/pcMet システムの存在を明らかにした。即ち、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 治療による組織学的、免疫組織化学的、超微細構造学的完全回復の病理学的正当性の論拠たり得る。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kato 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 (7): 729-742.
- 2) 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<sup>6</sup>-(carboxymethyl)lysine-modified cytokeratin, but not those in hepatic carcinoma cells.  
Yonago Acta medica 2006; 49 (3): 83-92.
- 3) 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.
- 4) 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).
- 5) 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
- 6) 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.
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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.
- 10) 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* 2009; 68 (1): 37-47.
- 11) 加藤信介  
 ALS1の神経病理と発症機序.  
*Clinical Neuroscience* 2008; 26(3): 319-322.
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) 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)
- 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, 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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 $\beta$  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)
- 11) 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)
- 12) 隅 寿恵, 山寺みさき, 長野清一, 深田 慶, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎. ミトコンドリア由来の空胞における copper chaperone for superoxide dismutase (CCS) の関与  
第48回日本神経病理学会総会学術研究会 (2007、5月30—6月1日、東京)
- 13) 加藤雅子, 加藤信介, 緒浜栄作. ヒト変異 SDS1 導入 ALS-トランスジェニックマウスにおける肝臓・腎臓・心臓における一過性組織変化からの回復機構の存在  
第48回日本神経病理学会総会学術研究会 (2007、5月30—6月1日、東京)
- 14) 西野武士, 加藤信介. 抗痛風薬の1つの利用法を例に本学会を考える.  
第41回日本痛風・核酸代謝学会総会 (2008、2月14—15日、福井)
- 15) 加藤雅子, 加藤信介, 堀江 靖, 北村幸郷, 寺田忠史, 林 一彦. マロリー小体形成機序: 最終糖化反応物による修飾.  
第97回日本病理学会総会 (2008、5月15—17日、金沢)
- 16) 隅 寿恵, 加藤信介, 藤村晴俊, 佐古田三郎. ALS1 にも TDP43 pathology は存在する.  
第49回日本神経学会総会 (2008、5月15日—17日、横浜)
- 17) 加藤信介, 山岸寛, 小山佳久, 片山泰一, 谷口 学, 人見淳一, 松崎伸介, 加藤昌明, 青木正志, 糸山泰人, 大浜栄作, 加藤雅子, 平野朝雄, 遠山正彌. *In vitro*系における LBHI/Ast-HI 形成機序と *In vitro* ALS モデル開発の基盤研究.  
第49回日本神経病理学会総会学術研究会 (2008、5月20日—22日、東京)
- 18) 隅 寿恵, 新沢康英, 加藤信介, 井岡正人, 松岡洋祐, 岡部 勝, 衛藤昌樹, 辻元賀英, 佐古田三郎. Ca 非依存性 phospholipase A2  $\beta$  ノックアウトマウス神経系における経時的病理学的検討.  
第49回日本神経病理学会総会学術研究会 (2008、5月20日—22日、東京)
- 19) 加藤信介, 山岸寛, 小山佳久, 片山泰一, 谷口学, 人見淳一, 松崎伸介, 加藤昌明, 青木正志, 糸山泰人, 大浜栄作, 加藤雅子, 平野朝雄, 遠山正彌, 中島健二. ヒト FALS・ALS マウスと *In vitro* ALS モデルとの共通点に関する基盤研究.  
第84回日本神経学会中国・四国地方会 (2008、7月5日、米子)
- 20) 藤原範子, 中の三弥子, 大河原知水, 吉原大, 横江俊一, 加藤信介, 谷口直之, 鈴木敬一郎. ヒト Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) の Cys<sup>111</sup>の酸化と酸化型 SOD1 特異抗体の作製.  
第61回日本酸化ストレス学会学術集会 (2008、6月19—20日、京都)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし。
  2. 実用新案登録  
なし。
  3. その他  
なし。

## 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

研究分担者 青木正志 東北大学病院神経内科

**研究要旨** 私たちは肝細胞増殖因子（HGF）が筋萎縮性側索硬化症（ALS）のモデルマウス・ラットの両方で運動ニューロン保護、生存延長効果をもつことを報告してきた。この HGF が ALS 様病態進行を抑制する重要な生理的因子であるか否かを明らかにするため、抗 HGF 抗体を用いて内因性 HGF の中和を試み、病態進行の促進を確認した。さらにはその作用機序の解析から内因性 HGF-c-Met 機構が ALS 病態の進行を抑制する重要な因子である可能性が示唆された。

ヒトリコンビナント HGF 蛋白による ALS 治療は、これまでの研究で臨床応用の最も可能性の高いルートとして髄腔内投与での効果が ALS ラットで確認されている。そこで霊長類（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。ヒトリコンビナント HGF 蛋白による 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ている。

分担研究者：青木正志

東北大学病院神経内科講師

研究協力者：割田 仁<sup>1</sup>、水野秀紀<sup>1</sup>、船越 洋<sup>2</sup>、中村敏一<sup>2</sup>、中村雅也<sup>3</sup>、岡野栄之<sup>4</sup>、糸山泰人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東北大学大学院医学系研究科神経内科

<sup>2</sup>大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

<sup>3</sup>慶應義塾大学医学部整形外科

<sup>4</sup>慶應義塾大学医学部生理学

### A. 研究目的

肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor, HGF）は細胞分裂・形態形成・細胞遊走促進、細胞死抑制、そしてアポトーシス抑制といった多様な作用をもつ生体内物質である。この HGF を外来性に筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデル

動物に供給することで運動ニューロン死を抑制し生存期間を延長できることが、(1) 変異 *Cu/Zn SOD* 遺伝子導入マウスと中枢神経系内に HGF を過剰発現する *HGF* 遺伝子導入マウスの交配実験（ダブルトランスジェニックマウスの作製）<sup>1</sup>、および (2) 変異 *Cu/Zn SOD* 遺伝子導入トランスジェニックラットに対する髄腔内 HGF 投与実験<sup>2</sup> という二つの方法によって既に示されている。

最初に、トランスジェニックラットにおける内因性肝細胞増殖因子（HGF）の ALS 様病態進行に対する生理的意義を明らかにするため、抗 HGF 抗体を髄腔内投与して中和すると病態が悪化するか否かを検討し、さらにはその機序の検討を行った（研究 1）。

さらには霊長類を用いて 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（研究 2）。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明らかにする。

## B. 研究方法

### 研究 1

東北大学神経内科で確立・系統維持している Gly93Ala 変異 Cu/Zn SOD-トランスジェニックラット<sup>3</sup>と正常同腹仔ラット腰髄の内因性ラット HGF レベルを酵素免疫測定法で明らかにした。その結果をもとに同トランスジェニックラットを対象に内因性 HGF が誘導されてくる週齢から 4 週間、皮下に留置した浸透圧ポンプよりウサギポリクローナル抗ラット HGF 特異抗体を 5 μg/体重(g) 髄腔内に持続投与した。コントロールとしては同量の正常ウサギ IgG を投与した (各群 n=5)。ラットは注意深く連日観察し発症日 (四肢のいずれかに筋力低下が明らかとなった日)、死亡日 (筋力低下により立ち直り反射が得られなくなった日) を特定した。今回の病理学的検討には、死亡時の腰髄灌流固定凍結切片を用いた。

さらには同抗ラット HGF 特異抗体 2 週間投与で、腰髄灌流固定凍結切片を作製して、前角細胞数および病理像の確認を行った。また蛍光免疫組織化学にて、リン酸化 Akt、リン酸化 c-Met の発現とグリア細胞、ユビキチン (Ub) 陽性像について半定量的に解析した。

### 研究 2

本研究グループによるこれまでの研究により私たちが開発した ALS トランスジェニックラットに対するリコンビナント HGF (rhHGF) 蛋白髄腔内投与にて臨床的にも病理学的にも有効性が明らかになった。多くの神経栄養因子のなかでもこの様に変異 Cu/Zn SOD 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を開始した。その後にヒトへの臨床試験を計画している。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る。

なお、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努めた。

## C. 研究結果

### 研究 1

トランスジェニックラット腰髄では正常同腹仔に比して内因性 HGF の誘導が発症前 (約 14 週齢) より認められた (図 1)。

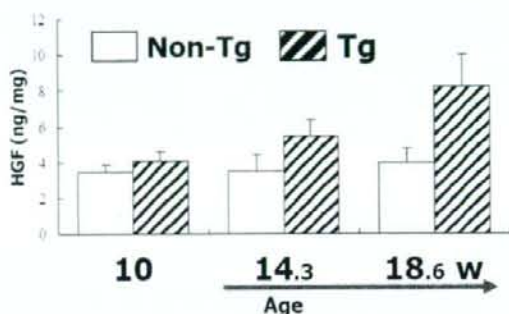


図 1. トランスジェニックラットでは発症前の運動ニューロン脱落開始時期 (約 14 週齢) より、内因性ラット HGF が脊髄に誘導されてくる (ELISA 法)。

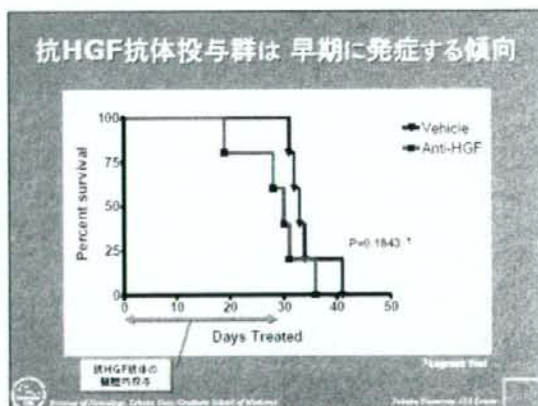


図 2. 抗 HGF 抗体投与群は、より早期に発症する傾向を認めた (P=0.1843)。

コントロール群に比して抗 HGF 抗体投与群で

は、より早期に発症する傾向 ( $P=0.1843$ , 図 2) を認めた。

さらにはコントロール群に比して抗 HGF 抗体投与群では有意に速い進行を認めた ( $P=0.0299$ , 図 3)。

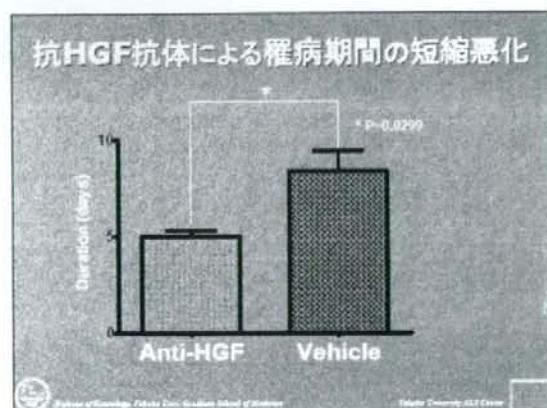


図 3. 罹病期間は抗 HGF 抗体投与群で有意に短縮悪化していた ( $P=0.0299$ )。

抗 HGF 抗体投与群の死亡時病理学的所見では、脊髄前角ニューロンの著明な脱落と著しいミクログリア、アストロサイト増生を認め、コントロール群と同様であった。

投与 2 週間での検討では、コントロール群に比し、抗 HGF 抗体投与群の腰髄前角では前角細胞脱落の促進傾向に加え、リン酸化 Akt 陽性細胞の有意な減少とミクログリア、アストログリア、Ub 陽性凝集体の有意な増加を認めた。リン酸化 c-Met は残存前角細胞と活性化アストログリアの一部に共陽性像を認めた。

## 研究 2

マーモセットによる脊髄損傷モデルに対して rhHGF の髄腔内持続投与を行った。400 $\mu$ g の rhHGF を髄腔内に 4 週間持続投与したところ (実薬群;  $n=6$ , 対照群;  $n=5$ ), rhHGF 投与群で上肢筋力の有意な回復を認め、MRI でも病巣面積の縮小が確認された。12 週の観察期間では安全性にも問題はない。損傷後 12 週までの間、異常行動ならびに MRI 像における腫瘍形成は一切認められなかった。したがって今のところ

安全性での問題点は認めていないと考えている。

## D. 考察

本 ALS モデルラットにおいて運動ニューロン脱落とともに誘導されてくる内因性のラット HGF を抗 HGF 抗体の髄腔内投与によって中和すると、病態が悪化することが明らかとなった。すなわち、抗 HGF 抗体投与は ALS 様病態の進行を促進したと考えられた。このことから、HGF が ALS 様病態の進行を遅らせている重要な生理的抑制因子であることが示唆される。

Kato らは、変異 Cu/Zn SOD 関連家族性 ALS だけでなくヒト孤発性 ALS においても剖検脊髄の残存運動ニューロンに HGF とその受容体 c-Met の発現を報告しており、ヒト ALS における HGF の重要性を示唆している<sup>4</sup>。本研究からも内因性 HGF-c-Met 機構が ALS 様病態の進行を抑制する重要な因子である可能性が示唆された。

以上より、外来性 HGF の供給は生理的な HGF の病態進行抑制作用を強化するという点でヒト ALS に対する理論的かつ有力な新規治療法になり得ると考えられる。

rhHGF 蛋白による ALS 治療については、これまでの研究成果より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を開始した。その後ヒトへの臨床試験を計画している。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る。

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 の治験を進めることを確認した。平成 21 年度中の治験届けの提出を目指しており、現在、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している (図 4)。さらには HGF による ALS 治療はわが国発の 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。

(参考)ヒトリコンピナントHGF蛋白製剤  
開発スケジュール

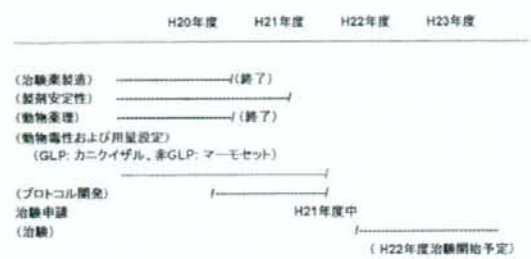


図 4. ヒトリコンピナント HGF 蛋白製剤の開発

### E. 結論

HGF は ALS 様病態の進行抑制因子として重要な生理的意義をもっている可能性が示唆された。外来性 HGF の供給は ALS の新しい治療法を開発する上で理論的かつ有力な戦略として期待できる。

ヒトリコンピナント HGF 蛋白による 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 の試験に進めることを確認している。

### 文献

1. Sun W and Funakoshi H, et al.: 6537-6548, 2002.
2. Ishigaki A, et al.: *in submission*,
3. Nagai M, et al.: J Neurosci, 9246-9256, 2001.
4. Kato S, et al.: Acta Neuropathol, 112-120, 2003.

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

- 1) Kato M, Kato S, Abe Y, Nishino T, Ohama E, Aoki M, et al. 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.

- 2) Koyama S, Arawaka S, Chang-Hong R, Wada M, Kawanami T, Kurita K, et al. 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.
- 3) Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, et al. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. **J Neurosci Res** 2006; 83: 119-33.
- 4) 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.
- 6) Takahashi T, Aoki M, Imai T, Yoshioka M, Konno H, Higano S, et al. A case of dysferlinopathy presenting choreic movements. **Mov Disord** 2006; 21: 1513-5.
- 7) Hirano M, Yamamoto A, Mori T, Lan Li, Iwamoto T, Aoki M, Shimada K, Furiya Y, Kariya S, Asai H, Yasui A, Nishiwaki T, Imoto K, Kobayashi N, Kiriyama T, Nagata T, Konishi N, Itoyama Y, Ueno S. DNA single strand break repair is impaired in aprataxin-related ataxia. **Ann Neurol** 2007; 61: 162-74
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.

- 11) 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.
- 12) 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** 2008; 86(11): 2512-2523.
- 13) Tanaka K, Okada Y, Kanno T, Otomo A, Yanagisawa Y, Shouguchi-Miyata J, Suga E, Kohiki E, Onoe K, Osuga H, Aoki M, Hadano S, Itoyama Y, Ikeda JE. A dopamine receptor antagonist L-745,870 suppresses microglia activation in spinal cord and mitigates the progression in ALS model mice. **Exp Neurol** 2008; 211(2): 378-386.
- 14) Dagvajantsan B, Aoki M, Warita H, Suzuki N, Itoyama Y. Up-regulation of insulin-like growth factor-II receptor in reactive astrocytes in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis transgenic rats. **Tohoku J Exp Med** 2008; 214(4): 303-310.
- 15) Takahashi Y, Seki N, Ishiura H, Mitsui J, Matsukawa T, Kishino A, Onodera O, Aoki M, Shimozawa N, Murayama S, Itoyama Y, Suzuki Y, Sobue G, Nishizawa M, Goto J, Tsuji S. Development of a high-throughput microarray-based resequencing system for neurological disorders and its application to molecular genetics of amyotrophic lateral sclerosis. **Arch Neurol** 2008; 65(10): 1326-1332.

## 2. 学会発表

- 1) Aoki M, Ishigaki A, Nagai M, Warita H, Kato S,

Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, Itoyama Y. Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor at the onset of paralysis slows disease progression in a rat of ALS. 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, Japan, 30 November - 2 December, 2006

- 2) Warita H, Aoki M, Nagai M, Ishizaki A, Mizuno H, Funakoshi H, Itoyama Y. Intrathecal infusion of antihepatocyte growth factor antibody exacerbates disease progression in a rat model of ALS. 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, Japan, 30 November - 2 December, 2006
- 3) Aoki M, Warita H, Mizuno H, Yuki S, Takahashi I, and Itoyama Y. Effects of Edaravone, a free radical scavenger approved in Japan for indications of acute ischemic stroke, in a transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. 19th International Symposium on ALS/MND, Birmingham, UK. November 3-5, 2008.
- 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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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