

200834060A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

# 筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発

平成20年度 総括研究報告書

(H20 - 難治 - 一般 - 045)

研究代表者 祖父江 元

(名古屋大学大学院医学系研究科教授)

平成21 (2009) 年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発

研究代表者 祖父江 元…… 1

## II. 研究報告(研究分担者)

1. 孤発性 ALS 線虫モデルの開発 祖父江 元…… 7
2. ALS ラットモデル脊髄における微小血管内皮細胞新生 糸山 泰人…… 11
3. 多能性幹細胞を用いた神経系の再生医学 岡野 栄之…… 15
4. RNA 編集酵素 ADAR2 コンディショナルノックアウトによる  
孤発性 ALS モデルマウスの分子病態解析 郭 伸…… 18
5. 低分子化合物と幹細胞を用いた筋萎縮性側索硬化症の治療法の研究 高橋 良輔…… 21
6. オートファジーによる運動ニューロン疾患の治療法の開発 田中 啓二…… 24
7. カプシド修飾による AAV ベクターの改良 中野 今治…… 28
8. HGF-c-Met system のミクログリアへの機能解析  
-HGF の発症後 ALS 治療適用の至適化をめざして- 船越 洋…… 30
9. 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いた新規免疫療法開発研究 漆谷 真…… 33
10. TDP-43 proteinopathy 細胞モデルの構築 長谷川成人…… 35
11. ALS モデルマウスのグリア細胞における分子病態の解明 山中 宏二…… 38

## III. 研究報告(研究協力者)

12. TAT 蛋白髄腔内投与による ALS モデルマウスへの蛋白治療の試み 阿部 康二…… 41

13. ALS 治療薬：キサンチン脱水素酵素 (XDH) 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 XDH 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 (痛風薬：アロプリノール) との比較	加藤 信介…… 44
14. 孤発性筋萎縮性側索硬化症患者ゲノムの CNV (copy number variation) 解析 (第 2 報)	加藤 丈夫…… 47
15. 変異型 SOD1 による小胞体ストレスへの関与	佐々木秀直…… 49
16. 神経細胞核における TDP-43 の発現レベルは ALS の臨床経過に関与する	佐古田三郎…… 51
17. 家族性 ALS の凝集体形成機構の解明と治療法への応用	谷口 直之…… 53
18. ALS 病態進行遅延を目指した肝細胞増殖因子発現 ポリオウイルスベクターの開発	野本 明男…… 57
19. 変異 TDP-43 による神経細胞死の機序について	水澤 英洋…… 59
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	63
V. ワークショップ・班会議プログラム	71
VI. 研究者一覧	83
VII. 研究成果の刊行物・別刷(別冊)	

# I. 總括研究報告



## 総括研究報告書

# 筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発

研究代表者 祖父江 元

名古屋大学大学院医学系研究科細胞情報医学専攻 脳神経病態制御学講座神経内科学 教授

### 研究要旨

本研究班では、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を克服するため、基礎系、臨床系研究者を結集し集約的な研究の推進体制を構築している。本研究の目標は、病態に関連する新規標的分子の探索同定による病態解明、新規治療法・治療手段の開発、孤発性ALS新規疾患モデルの開発であり、三者の研究を有機的に結合させることによって成果の生産性を向上させた。これらの多岐に渡る研究成果には、分担研究者、研究協力者間の共同研究、情報交換が重要な役割を果たした。今年度は、孤発性ALSの疾患感受性遺伝子の探索の分野では疾患に関わる有意なCNV (copy number variation) を見いだした。ALSの病態解明分野では、オートファジー経路、ミクログリアが関与する自然免疫経路、変異型SOD1による小胞体ストレス、SOD1の凝集体形成機構の観点から新たなALS病態が明らかとなった。また、ALS病態におけるTDP-43の役割解明を目指し、神経細胞核におけるTDP-43の発現レベルと臨床経過の関係を明らかにするとともに、TDP-43 proteinopathy細胞モデルを構築し、変異TDP-43による神経細胞死の機序を検討した。さらに、新規治療薬の開発分野では、HGFがミクログリアへ及ぼす影響を検討し、キサンチン脱水素酵素 (XDH) 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の有効性を証明するとともに、変異SOD1の転写活性を抑制する低分子化合物を数多く同定した。ALS治療に向けたデリバリーシステムの開発では、TAT蛋白髄腔内投与による蛋白治療、カプシド修飾によるAAVベクターの改良、肝細胞増殖因子発現ポリオウイルスベクターの開発を推進した。再生療法・免疫療法の開発分野では、ALSラットモデル脊髄における微小血管内皮細胞新生を検討し、多能性幹細胞を用いた神経系の再生、新規免疫療法開発に取り組んだ。さらに、孤発性ALS疾患モデルの開発では、RNA編集酵素ADAR2コンディショナルノックアウトマウスの分子病態解析と、孤発性ALS線虫モデルの開発、解析を推進した。これらの多岐に渡る研究成果には、分担研究者、研究協力者間の共同研究、情報交換が重要な役割を果たした。

### 研究分担者

糸山 泰人 東北大学大学院医学系研究科神経学講座神経内科学分野教授  
岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学講座教授  
郭 伸 東京大学大学院医学系研究科臨床神経精神医学講座神経内科学分野准教授  
高橋 良輔 京都大学大学院医学研究科脳神経生理学講座臨床神経学分野教授  
田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所所長代行  
中野 今治 自治医科大学内科学講座神経内科部門教授  
船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学講座分子組織再生分野准教授  
漆谷 真 滋賀医科大学分子神経科学研究センター神経遺伝子解析部門助教  
長谷川成人 東京都精神医学研究所分子神経生物学研究チーム副参事研究員  
山中 宏二 理化学研究所脳科学総合研究センターユニットリーダー

## 研究協力者

- 阿部 康二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経病態内科学講座神経内科学分野教授  
加藤 信介 鳥取大学医学部附属脳神経性疾患研究施設脳神経病理部門准教授  
加藤 丈夫 山形大学医学部器病態統御学講座生命情報内科学分野教授  
佐々木秀直 北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野教授  
佐古田三郎 大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学専攻情報統合医学講座神経内科学分野教授  
谷口 直之 大阪大学微生物病研究所疾患糖鎖学（生化学工業）教授  
野本 明男 東京大学大学院医学系研究科微生物学講座教授  
水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経病態学講座神経内科学分野教授

## A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動ニューロンの選択的細胞変性死によって発症後 3-5 年で死に至る神経難病である。ALS に対する有効な治療法は未だ確立しておらず、患者本人のみならず家族や社会にも重大な苦痛と損失を伴う疾患であり、一刻も早い克服が望まれている。本疾患の進行を阻止し有効な治療法の開発に結びつけるためには、基礎・臨床を問わず ALS 研究者を結集し、集約的な研究を推進していく体制を構築する必要がある。

本研究班の目的は、ALS の病態に基づく画期的治療法の開発に向けて、ALS の病態を担う病態関連分子を探索・同定・解析し、これを基に有効な分子標的治療を開発することである。

今年度は、孤発性 ALS の疾患感受性遺伝子の探索の分野では CNV (copy number variation) 解析、ALS の病態解明分野では、オートファジーにおけるオートファゴソーム形成機構、ミクログリアが関与する自然免疫経路、変異型 SOD1 による小胞体ストレス、SOD1 の凝集体形成機構を検討した。また、ALS 病態における TDP-43 の役割解明を目指し、神経細胞核における TDP-43 の発現レベルと臨床経過の関係、TDP-43 proteinopathy 細胞モデルの構築、変異 TDP-43 による神経細胞死の機序についての検討を行った。

さらに、新規治療薬の開発では、HGF がミクログリアへ及ぼす影響を検討し、キサンチン脱水素酵素 (XDH) 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の有効性を検討するとともに、変異 SOD1 の転写活性を抑制する低分子化合物の同定を試みた。ALS 治療に向けたデリバリーシステムの開発では、TAT 蛋白髄腔内投与による

ALS モデルマウスへの蛋白治療、カプシド修飾による AAV ベクターの改良、肝細胞増殖因子発現ポリオウイルスベクターの開発を目的とした。ALS に対する再生療法・免疫療法の開発の分野では、ALS ラットモデル脊髄における微小血管内皮細胞新生を検討し、多能性幹細胞を用いた神経系の再生、新規免疫療法開発に取り組んだ。

孤発性 ALS 疾患モデルの開発では、RNA 編集酵素 ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスの分子病態解析と、孤発性 ALS 線虫モデルの開発、解析を推進した。

## B. 研究方法

研究内容をサブセクション毎に主任および分担研究者の各テーマに沿った独自の研究を進展させつつ情報交換を密に行い、研究組織としての有機的協力を強化した。

### 【孤発性 ALS の疾患感受性遺伝子の探索】

孤発性 ALS の発症や病態に関与する疾患感受性遺伝子を明らかにする目的で、CNV chip によるゲノムワイド解析で有意な差が認められた染色体 A の CNV 領域 B について、孤発性 ALS 83 例および正常対照 100 例の DNA を用い qPCR 法による解析を行った。

### 【ALS の病態解明】

恒常的オートファジーは、細胞の恒常性維持に不可欠であり、その破綻が ALS をはじめとする様々なヒト疾病の発症原因となりうる。そこで、オートファゴソーム形成の起源解明を目的に、Atg8/LC3 タンパク質結合システムに特異的な E2 酵素である Atg3 欠損マウスを作製し、解析を行った。

変異 SOD1 マウスの疾患進行期の脊髄病巣に



おける mRNA 発現プロファイルの網羅的解析により、自然免疫系の受容体の発現亢進を確認した。そこで、自然免疫経路のシグナル伝達に必須の分子である MyD88, Trif ノックアウトマウスと SOD1G93A マウスとの交配実験を行った。

小胞体関連分解 (ERAD) において小胞体から細胞質へ逆行輸送される T 細胞抗原受容体 (TCR  $\alpha$ ) の、小胞体内への蓄積および細胞質での凝集形成への変異型 SOD1 による影響を検討し、ALS 病態における小胞体ストレスの関与を検討した。

Huntingtin, Tau, Amyloid  $\beta$ ,  $\alpha$ -Synuclein などは Transglutaminase (TG) の基質となり、架橋反応により重合体を形成するが、変異型 SOD1 やアポ型 SOD1 が TG の基質になるかどうかは知られていない。そこで、リコンビナント human SOD1 を精製し、TG2 と Ca<sup>2+</sup>存在下でインキュベートし、SOD1 が TG2 の基質になり得るかを検討した。

#### 【ALS 病態における TDP-43 の役割解明】

前頭側頭葉変性症や ALS 患者の脳、脊髄に出現するユビキチン陽性細胞内凝集体の主要構成成分として TDP-43 が同定されたが、ALS の病態に果たす役割は不明である。そこで、孤発型 ALS18 例、ALS1 症例 6 例、変異 SOD1 (G93A) マウスの脊髄について、臨床経過と TDP-43 の発現を含めた病理像を解析した。

また、TDP-43 の種々の部分欠損変異体を培養細胞に発現させ、核移行シグナルについて検討するとともに凝集体形成の条件を探り、TDP-43 proteinopathy 細胞モデルの構築を目指した。

一方、TDP-43 のミスセンス変異である A315T、Q331K2つの変異 TDP-43 の過剰発現および shRNA による内因性 TDP-43 の発現抑制が神経系培養細胞に与える影響を検討した。

#### 【ALS 新規治療薬の開発】

これまで、HGF は、運動ニューロンに対する直接神経栄養作用を介して治療効果を発揮すると考えられてきた。しかし、発症後の ALS 進行には変異 SOD1 発現ミクログリアが寄与することが報告されていることから、HGF のミクログリア細胞に対する作用を評価した。

一方、キサンチン脱水素酵素 (XDH) 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を変異 SOD1 マウスに経口投与し、その効果を種々の運動負荷試験にて検証した。

さらに、変異 SOD1 発現量の抑制による治療法開発を目指した。このため、SOD1 の promoter 制御下に分泌型ルシフェラーゼを発現する培養細胞クローンを樹立し、上清のルシフェラーゼの測定により、変異 SOD1 転写活性を抑える低分子化合物の同定を行った。

#### 【ALS 治療に向けたデリバリーシステムの開発】

HIVI の転写活性化蛋白質である transcriptional activator protein (TAT) に結合した蛋白質は、細胞膜や血液脳関門を通過し、様々な組織、細胞に効率的に取り込まれる。そこで、抗アポトーシス作用をもつ Bcl-XL 蛋白質の 3 つのアミノ酸を置換した FNK 蛋白質に TAT を結合した TAT-FNK を Osmotic minipump を用いた持続髄腔内投与法により、変異 SOD1 マウスに投与し治療効果を確認した。

一方、AAV ベクターによる遺伝子治療の確立を目指し、神経細胞への親和性を持つ Rabies virus の糖タンパク質由来の RVG ペプチドの誘導体を使用して AAV2 および AAV1 ベクターのカプシド蛋白質を化学修飾し、遺伝子導入特性につき検討した。また、ポリオウイルスベクターでは、カプシド蛋白質領域のゲノム部位を欠損させ、その部位に HGF の mRNA を挿入し、感染により子ウイルス粒子が産生されないベクターを使用した。ジシストロニックゲノムとして、第一シストロンから HGF を発現するように設計した。

#### 【ALS に対する再生療法・免疫療法の開発】

ALS における新規治療標的として微小血管系の重要性が注目されている。そこで、変異 SOD1 ラットに BrdU を 1 週間持続投与して新生細胞を標識し、血管壁構成成分について多重蛍光免疫組織化学を行うことにより、新生微小血管内皮細胞を経時的に評価した。さらに HGF 投与による血管新生促進効果を検討した。

一方、マウス ES 細胞から神経系前駆細胞/幹細胞 (NS/PCs) を含むニューロスフェアを誘導し、脊髄損傷モデルマウスに移植し、その効果を検

証した。さらに、ヒト ES 細胞や iPS 細胞からもニューロスフェアを誘導する培養法の開発を行った。

ワクチン療法では、低発現型 SOD1 G93A マウスに対し、大腸菌にて精製した G93A 型変異 SOD1、野生型 SOD1 を非活性のアポ状態で Ribi アジュバントとともに接種し、治療効果を確認するとともに、血清中 IgG サブクラス解析を行った。

#### 【孤発性 ALS 疾患モデルの開発】

孤発性 ALS 患者脊髄で観察される分子動態を反映する疾患モデルとして、ALS 運動ニューロンにおいて神経変性初期から発現低下を示す dynactin-1 の運動ニューロン特異的ノックダウン (KD) 線虫の作成を行ってきた。このモデルを用い、dynactin-1 発現低下による神経変性メカニズムについて、細胞周期関連分子である cyclin C についての検討を行った。

また、もう一つの孤発性 ALS 疾患モデルである、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集を特異的に触媒する ADAR2 の運動ニューロン選択的コンディショナルノックアウト (CKO) マウスにおいて、ALS 脳神経核に見られるような選択的な脆弱性が見られるかどうかを病理学的に検討した。さらに、運動ニューロン死に、GluR2 Q/R 部位以外の ADAR2 により触媒される RNA 編集部位の RNA 編集異常が関与しているかどうかを、ADAR2 活性なしに編集型 GluR2 を発現する GluR-B (R) マウスと ADAR2 CKO マウスの交配により検討した。

#### (倫理面への配慮)

採取した剖検組織等については、遺伝子解析を含む医学研究への利用についてのインフォームド・コンセントを患者および患者家族より得た。剖検組織等のヒト由来試料を用いる研究については名古屋大学をはじめ、各分担研究者が所属する研究施設の倫理委員会から承認を得た。組み替え DNA 実験を行う際には、「遺伝子組み換え生物等の使用などの規制による生物の多様性の確保に関する法律」などに基づき、各研究者が所属する研究施設での組み替え DNA 実験規定に従った。また実験動物の取り扱いについては、カルタヘナ条約および、各研究施設の動物実験指針に基づいた。

ヒト ES 細胞の使用については、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成 19 年 10 月 31 日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。

#### C&D. 研究結果と考察

##### 【孤発性 ALS の疾患感受性遺伝子の探索】

CNV 領域 B の下流領域では、孤発性 ALS と対照でコピー数に有意な差が認められた。この領域は遺伝子 X の 3' 領域から遺伝子 Y の 5' 領域に及び、コピー数の増加は、孤発性 ALS の病因・病態に関与している可能性がある。

##### 【ALS の病態解明】

Atg3 欠損マウスでは、一見正常なオートファゴソーム様構造体が形成できるが、リソソームと癒合したオートリソソームの形成に欠陥が見られた。すなわち、オートファゴソーム形成における複数の段階に障害が生じ、Atg3KO 線維芽細胞 (MEFs) において、長寿命タンパク質の分解は有意に抑制されていた。この Atg3KO マウス・細胞は、オートファゴソームの起源を探る強力なツールとなると考えられた。

SOD1G93A/ MyD88<sup>-/-</sup>, SOD1G93A/ Trif<sup>-/-</sup> の双方において、発症時期の変化は認めないものの、有意な生存期間の短縮が見られた。これにより、ALS モデルにおいて MyD88, Trif のいずれのシグナル伝達を遮断した場合でも自然免疫経路の破綻が生じ、その疾患進行を加速すると考えられた。

プロテアソーム阻害剤である MG132 の存在下では、TCR $\alpha$  の凝集体が出現し、さらに、変異型 SOD1 を発現させると凝集体を形成する細胞数が減少した。ERAD で分解を受ける TCR $\alpha$  が、変異型 SOD1 により小胞体からの逆行輸送が阻害されたために細胞質での凝集体形成が抑制されるものと考えられ、神経毒性の機序に小胞体ストレスが関与することが示唆された。

変異 SOD1 は TG2 の酵素反応によって、Ca<sup>2+</sup> 依存的に共有結合による SOD1 の数-多量体を形成することが確認された。また野生型 SOD1 もアポ型で



あれば基質になることが確認され、ALSにおける凝集体形成機構の解明に進歩をもたらした。

#### 【ALS 病態における TDP-43 の役割解明】

罹病期間が2年半以内と経過の速い SALS 症例では、TDP-43 は核から細胞質へと局在を変える一方、5年以上と経過の緩徐な症例では、神経細胞核における TDP-43 の発現が保たれていた。また、ALS1 患者では C111Y 変異にのみ、TDP-43 陽性の細胞質内封入体を多数認めた。SOD1 G93A マウスにおいても TDP-43 陽性の細胞質内封入体を多数認め、核の TDP-43 発現が高いほど経過が緩徐であった。

TDP-43 proteinopathy 細胞モデルでは、種々の部分欠損変異体の作成により、78-84 残基の配列が、核移行シグナルとして機能することが判明した。この欠損変異体を細胞に発現させ、さらにプロテアソーム阻害処理を行うと、細胞質に凝集体が出現し、抗リン酸化 TDP-43 特異抗体および抗ユビキチン抗体に陽性であった。このモデルは、今後の ALS 研究において重要な役割を果たすものと考えられる。

一方、変異 TDP-43 の過剰発現、内因性 TDP-43 の発現抑制のいずれにおいても、caspase 依存性のアポトーシスが観察された。その細胞死は、野生型 TDP-43 を補うことで回復し、変異 TDP-43 ではその機能が失われていた。これらのことより、神経系培養細胞の細胞死は核内 TDP-43 の loss of function である可能性が推測された。

#### 【ALS 新規治療薬の開発】

初代培養脊髄細胞の中における phospho-c-Met 陽性細胞 (c-Met 活性化型細胞) はミクログリアで免疫染色性が高く、ミクログリアが HGF 標的細胞であることが確認された。ミクログリアは ALS 発症後の病態進行の Key であり、この結果は、HGF の ALS 発症後投与の分子基盤にとって重要であると考えられた。

XDH 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のうち、異なった構造式を有する 2 種類の化合物 (1) および (2) を変異 SOD1 マウスに経口投与したところ、発症遅延、生存延長効果を認めた。さらに、伸張反射試験、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有意な運動能力の改善が得られたことより、有効な ALS 治療薬になりうる可能性が示唆された。

変異 SOD1 発現量の抑制による治療法開発研究では、12,000 種類の低分子化合物のうち、濃度依存性に SOD1 の発現量を減少させる 158 種類の化合物といくつかの既存薬を同定することに成功した。

#### 【ALS 治療に向けたデリバリーシステムの開発】

抗 Bcl-XL 抗体での免疫染色の結果、TAT-FNK は 7 日間の持続脳腔内投与にて、脊髄運動ニューロンに取り込まれていた。28 日間の TAT-FNK の持続脳腔内投与により、発症、生存期間は有意に延長し、clinical score も有意に改善した。Osmotic minipump を用いた持続脳腔内投与法は、TAT 蛋白をマウスの脊髄運動ニューロンに導入する有効な手段であると考えられた。

AAV ベクターにおいて、効率よく RVG 修飾するための諸条件を検討し、カプシドを構成する VP3 蛋白に RVG ペプチドを結合し、線条体内に投与したところ、少数の黒質緻密部神経細胞への逆行性移送が認められた。今後、さらに逆行性輸送の効率を高めることを目標とする。

構築した HGF 発現ポリオウイルスベクターは、感染細胞内で HGF を発現し、その HGF は分泌され細胞外でプロセシされ、HGF 受容体をリン酸化することから明らかとなった。モデルマウスの脊髄に接種した場合も HGF が産生されること明らかとなったが、発症を遅らせるなどの効果は観察できなかった。

#### 【ALS に対する再生療法・免疫療法の開発】

変異 SOD1 ラットにおける微小血管内皮細胞新生のピークは発症早期に認められた。HGF 投与群では対照群に比して腰髄前角の新生血管内皮細胞が有意に増加していた。本研究の進展により、細胞外微小環境、とりわけ neurovascular unit を標的とした病態解明とそれに基づく新たな ALS 治療法、再生誘導療法の開発が期待される。

マウス ES 細胞から誘導した主にニューロンを生み出すニューロスフェアと、ニューロンおよびグリアを生み出す二次ニューロスフェア

を脊髄損傷マウスに移植すると、後者を移植した群において、脊髄の萎縮や脱髄の程度が減少し、さらに運動機能の改善が見られた。また、ヒト ES 細胞由来ニューロスフェアは電気生理学的解析の結果、機能的なニューロンであることが示された。さらに、iPS 細胞からも ES 細胞とほぼ同様の条件でニューロスフェアの形成を行うことができた。

G93A型変異SOD1、野生型SOD1の両ワクチンはG93Aマウスの発症、寿命の延長に有効であったが、野生型SOD1の方がより有効であった。IgGサブクラス解析では、SOD1に対するIgG1は寿命と負の、IgG2bは正の相関を示し、ALSのワクチン療法においてはTh1系の賦活化が効果発現に重要であることが明らかとなった。

#### 【孤発性 ALS 疾患モデルの開発】

dynactin-1 の運動ニューロン特異的 KD 線虫は、進行性の運動機能障害と運動ニューロン変性を示す。患者運動ニューロンで見られる cyclin C の発現増加と核内移行は、この KD 線虫においてもシミュレートされていた。さらに、核移行シグナルを付加した cyclin C を単独で線虫に高発現させると、dynactin-1 KD に類似した表現型が得られ、dynactin-1 発現レベルの低下による神経変性機序の一つとして、細胞周期の deregulation が関与していることが示唆された。

一方、ADAR2 CKO マウスの神経細胞数は、顔面神経核、舌下神経核などにおいて、大径ニューロン主体の減少が見られたが、外眼筋運動神経核の神経細胞数は対照と差がなく、ALS における病変の選択性に一致していた。また、ADAR2 活性なしに編集型 GluR2 を発現する GluR-B (R) マウスと ADAR2 CKO マウスの交配により得られたマウスの表現型、脊髄運動ニューロン数は対照と有意差はなく、ADAR2 CKO マウスの表現型は、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常のみによっていることが明らかとなった。これらのことより、ADAR2 CKO マウスは孤発性 ALS の分子病態を反映する優れたモデルであると考えられた。

## E. 結論

本研究が目的とする ALS の病態に基づく治療

法の確立は今世紀の最も重要な課題の 1 つであり、本疾患に対する有効な治療法の開発は、我々神経疾患の研究に携わる者にとっての使命である。本研究によって新規治療法開発へ向けての ALS の病態解明がさらに進み、新たな分子標的が次々と明らかになった。

また、低分子化合物による治療、さらには将来、重要な治療法になりうる遺伝子治療、再生治療についてもより優れたデリバリーシステムや効率的な再生システムを構築することができた。さらに孤発性 ALS の疾患モデルの開発研究も順調に推進することができた。

本研究班が目指す ALS という難治性疾患に対する分子標的治療の開発は患者や家族にとっても大きな希望をもたらすものである。さらに、運動ニューロンの過酷な変性死の機序解明へ向けてのチャレンジは他の神経変性疾患研究に対しても重要なインパクトを与えると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

1. Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. 11: 251-253, 2008

他の研究発表は別掲

## H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特願2008-101899. 野中隆、新井哲明、秋山治彦、長谷川成人: TDP-43蓄積細胞モデル. 出願人: 財団法人東京都医学研究機構, 出願日: 平成20年4月9日

他の出願・登録状況は研究報告(分担研究)に別掲

## II. 研究報告(研究分担者)



## 孤発性 ALS 線虫モデルの開発

研究分担者：祖父江 元<sup>1)</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学 教授  
研究協力者：和座雅浩<sup>1)</sup> 田中章景<sup>1)</sup> 黄 哲<sup>1)</sup> 蔣 月梅<sup>1)</sup> 勝又竜<sup>1)</sup> 勝野 雅央<sup>1,3)</sup>  
曾根 淳<sup>1)</sup> 飯島雅博<sup>1)</sup> 井口洋平<sup>1)</sup> 山本 正彦<sup>2)</sup>

- 1) 所属 名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学
- 2) 所属 愛知学院大学 心身科学部 健康科学
- 3) 所属 名古屋大学大学院高等研究院

**研究要旨：**我々はこれまでに、孤発性 ALS 患者脊髄より運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成し、dynactin1 の遺伝子発現低下が、神経変性過程の初期より運動ニューロン全般性に生じていることを見出した。さらに培養細胞および線虫モデルにおいて、RNAi による dynactin1 のノックダウンは神経変性を誘発する十分条件であることを証明してきた。孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンでは、dynactin1 の発現低下とともに、細胞周期の deregulation を示唆する cyclin C の顕著な発現増加と核内移行が認められ、この遺伝子発現変化は培養細胞および線虫モデル双方において、dynactin1 のノックダウンにより再現される現象であることが明らかとなった。さらに cyclin C の高発現と核内移行を再現する線虫モデルを作成したところ、dynactin1 ノックダウン線虫と同様の運動ニューロン障害を示唆する表現型を得た。これらのことより、孤発性 ALS における dynactin1 遺伝子発現レベルの低下による神経変性機序のひとつとして、細胞周期の deregulation が関与していることが示唆された。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の約 10% を占める遺伝性 ALS の一部は原因遺伝子が同定され、そのトランスジェニックマウスモデルの作成により病態解明に一定の成果が得られている。しかし、ALS のほとんどを占める孤発性については、現在もその病因は不明のままであり、病態を反映した優れた動物モデルの作成が切望されている。

我々は孤発性 ALS 運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成し、その発現動態や神経変性マーカーとの関係を詳細に検討することにより、dynactin1 の発現低下が神経変性

過程の初期より生じていることを昨年度までに明らかにした。さらに、培養細胞モデル及び線虫モデルにおいて、dynactin1 の選択的な発現量低下は運動ニューロン変性を誘発する十分条件であることを証明した。今年度は、dynactin1 発現量低下による神経変性メカニズムの解明を目指し、特に細胞周期関連因子である cyclin C に注目して解析を行った。

### B. 研究方法

孤発性 ALS 脊髄運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイリングから得られた分子の中で、有意な発現増加を来した遺伝子として、細

胞周期関連因子である cyclin C に着目し、免疫組織染色による cyclin C の発現および局在変化を検証した。

培養細胞モデルとしては、neuroblastoma cell 由来の SH-SY5Y 細胞において siRNA による dynactin1 ノックダウン (KD) を行い、cyclin C の発現、局在変化を蛍光免疫染色により評価した。

dynactin1 KD 線虫モデルは、コリン作動性運動ニューロン特異的なプロモーターである *acr-2* 支配下に、*dnc-1* (ヒト dynactin1 の相同体) shRNA をマイクロインジェクションすることによって作成した。線虫運動ニューロンにおける内因性の *dnc-1* および *cic-1* (ヒト dynactin1 の相同体) の mRNA レベルは whole mount in situ hybridization 法にて評価した。

一方、*dnc-1* KD による cyclin C の局在変化を検証するため、TagRFP を融合した *cic-1* (TagRFP-*cic-1*) を *acr-2* プロモーター下に *dnc-1* shRNA と共発現した。

さらに、核移行シグナル付き GFP を融合した *cic-1* (NLS-GFP-*cic-1*) を単独で高発現させることにより cyclin C の高発現と核局在をシミュレートする線虫モデルの作成を行った。

運動機能の解析は、一定時間内の首振り回数をパラメーターとし、また運動ニューロンの形態変化は蛍光顕微鏡にて評価した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守した。

## C. 研究結果

### 【ALS 患者脊髄における cyclin C の解析】

孤発性 ALS 脊髄運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイリングから得られた cyclin C の免疫染色による追加検証により、孤発性 ALS

残存運動ニューロンにおいては、核成分の顕著な増加が認められ、かつ定量 RT-PCR による検証においても、発現量はコントロールに比して約 4.9 倍の増加を認めることが明らかとなった。

細胞周期の各段階は、種々のサイクリンの発現量が変動することで進行するが、cyclin C の mRNA は G1 期に最大となり、パートナーである CDK3 と協調し、静止期 (G0) からの逸脱に重要な役割を果たすことが知られている (Ren et al, Cell, 2004)。すなわち、本来なら終末分化した G0 期の神経細胞において細胞周期の re-entry が誘発されていることが示唆された。

### 【dynactin1 KD 培養細胞モデルにおける cyclin C の解析】

われわれが構築した SH-SY5Y cells における dynactin1 ノックダウンシステムでは、内因性の dynactin1 発現レベルを、タンパク質レベルにおいてコントロール群の 30-40% にまで抑制することができる。このモデルにおいても、cyclin C は、その発現量が増加するとともに核成分の顕著な増加が認められ、孤発性 ALS に類似した局在変化を再現することができた。定量 RT-PCR による検証においても、cyclin C の mRNA は dynactin1 KD により増加することが明らかとなった。

### 【*dnc-1* KD 線虫モデルにおける cyclin C の解析】

*dnc-1* KD 線虫は、コントロール群 (LacZ KD) に比して、進行性の運動機能障害 (生存率の短縮、首振り回数の低下、水中でのむち打ち回数の低下) を示し、より運動機能障害が重篤な個体において Coiler uncoordinated の表現型が認められる。また、*dnc-1* KD 線虫では、ventral cord の不整化が認められ、運動ニューロン変性を示唆する所見と考えられる。

この *dnc-1* KD モデルにおいて、孤発性 ALS 運動ニューロン、および dynactin1 KD SH-SY5Y 細胞にて再現された cyclin C の発現変化を in

situ hybridization 法で検証した。adult stage のコントロール群 (LacZ KD モデル) の運動ニューロンにおいては、cic-1 (ヒト cyclin C の相同体) の mRNA の発現は抑制されているが、dnc-1 KD モデルでは、cic-1 の mRNA は顕著に増加していた。

dnc-1 KD による cyclin C の局在変化を検証するために共発現した TagRFP-cic-1 は、コントロール群では核外に局在したが、dnc-1 KD モデルでは、一部の運動ニューロンにおいて、核移行が認められた。

さらに、cyclin C の高発現と核局在を線虫で再現するために、NLS-GFP-cic-1 を単独で高発現させると、dnc-1 KD に類似した coiler UNC の表現型と、進行性の首振り回数の低下が認められた。

#### D. 考察

本研究の最も重要な意義は、dynactin1 KD 培養細胞モデルおよび dnc-1 KD 線虫モデルにおいて、孤発性 ALS 運動ニューロンで認められた cyclin C の発現変化を忠実に再現していたことである。

病変部位の神経細胞において、cyclin 等の異常発現が認められることは、アルツハイマー病やパーキンソン病など、他の孤発性神経変性疾患においても報告されている (Ueberham et al, Neurobiol Aging, 2003; Hoglinger et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2007)。また primary neuron などの終末分化した神経細胞においては、細胞周期の正のシグナルが強制的に加わると細胞死が誘発されることが報告されている。しかし、その発症機序、また病態意義やメカニズムは未だ明らかにされていない。

また、cic-1 (cyclin C) の高発現により、dnc-1 KD モデルに類似した表現型を示したことから、孤発性 ALS 運動ニューロンで認められた cyclin C の発現量増加や核移行は単なる二次的な分子

変化ではなく、運動ニューロン変性の原因の一つであることが示唆された。

すなわち、dynactin1 は神経細胞の分化維持に直接的な役割を果たす分子の一つである可能性があり、その発現低下により細胞周期の deregulation が生じ、神経変性を生じている可能性が推定される。

現在我々は、dynactin1 ノックダウンにより誘発される細胞周期異常のメカニズムの解明、およびその下流で誘発される分子変化の同定、および Cre-LoxP システムによる dynactin1 コンディショナルノックアウトマウスの作成を行っている。

#### E. 結論

ALS 患者脊髄運動ニューロンの遺伝子プロファイリングにて同定した選択的な dynactin1 遺伝子発現レベルの低下は、in vitro および in vivo 双方のモデルにおいて、神経細胞の機能障害及び変性を誘発する十分条件であり、かつ孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンにおいて認められる細胞周期関連因子 (cyclin C) の異常発現を忠実に再現した。dynactin1 遺伝子ノックダウンモデルは、孤発性 ALS の少なくとも一部の病態を反映していると予想され、病態解明のための有用な動物モデルとなりうる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Katsuno M, Adachi H, Sobue G. The case for cholesterol. *Nature Med.* in press
2. Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Atsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka



- F, Doyu M, Sobue G. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol*. 65: 140-150, 2009
3. Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: A study with tractography and diffusion-tensor imaging. *Amyotroph Lateral Scler*. in press
4. Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, Sobue G. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse. *Hum Mol Genet*. 18: 898-910, 2009
5. Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G; Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 276: 163-169, 2009
6. Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, Itoyama Y, Sobue G, Okano H. Spatio-Temporal Recapitulation of Central Nervous System Development By Murine ES Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells*. 26: 3068-3098, 2008
7. Takeuchi Y, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Kawashima M, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Walking capacity evaluated by the 6-minute walk test in spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve*. 38: 964-971, 2008
8. Yamamoto M, Tanaka F, Tatsumi H, Sobue G. A strategy for developing effective amyotrophic lateral sclerosis pharmacotherapy: from clinical trials to novel pharmacotherapeutic strategies. *Expert Opin Pharmacother*. 9: 1845-1857, 2008
9. Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Tanaka F, Adachi H, Sobue G. Molecular genetics and biomarkers of polyglutamine diseases. *Curr Mol Med*. 8: 221-234, 2008
10. Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G. CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain*. 131: 229-239, 2008
2. 学会発表
1. 田中章景、和座雅浩、丹羽淳一、祖父江 元. 孤発性 ALS 病態関連分子の探索と疾患モデルの開発. 第 49 回日本神経学会総会シンポジウム 横浜 2008 年 5 月 17 日
2. 和座雅浩、田中章景、蔭 月梅、黄 哲、勝野雅央、足立弘明、山本 正彦、祖父江 元. Dynactin-1 ノックダウン線虫モデルの作成. 第49回日本神経学会総会 横浜 2008年5月16日
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## ALS ラットモデル脊髄における微小血管内皮細胞新生

研究分担者：糸山泰人 東北大学大学院医学系研究科神経内科学・教授  
研究協力者：青木正志，割田 仁，水野秀紀（東北大学神経内科）  
船越 洋，中村敏一（大阪大学分子再生医学）

研究要旨：本研究は ALS の画期的治療となり得る再生誘導療法開発を念頭に、変性脊髄における微小血管新生の役割を明らかにすることを目的とした。ALS ラットモデルを用いて微小血管内皮細胞を経時的に評価すると、運動ニューロン変性部位である脊髄前角で発症早期から有意に新生促進が認められた。しかし、発症後期ではその程度が減じるとともに内皮細胞マーカー陽性面積が有意に減少していた。現在 ALS ラットモデルに肝細胞増殖因子（HGF）を含めた種々の再生誘導因子を投与し、血管新生促進効果を検討中である。ALS における再生誘導療法開発に際し、細胞外微小環境、中でも神経-血管単位（neurovascular unit）が重要な治療標的となる可能性がある。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）は系統的な運動ニューロン変性によって全身の骨格筋に進行性筋萎縮と筋力低下をきたす極めて予後不良な難治性神経疾患である。その約 10% を占める遺伝性 ALS に発見された変異 *Cu/Zn superoxide dismutase*（*SOD1*）遺伝子を過剰発現するマウスモデルは ALS 病態をよく再現することから研究が大きく進展したが、現在もなお病態解明は十分でなく、有効な治療法開発には至っていない。

従来 ALS 研究は運動ニューロン自体の異常に焦点がおかれてきたが、近年 ALS 病態における運動ニューロン死が細胞非自律的（non-cell autonomous）であることを示す報告が複数なされ（Clement, *et al.* Science 2003; Boillee, *et al.* Science 2006）、運動ニューロン周囲の細胞外微小環境（microenvironment）とそれを構成する非ニューロン細胞を対象とした研究の重要性が増している。

近年まで、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）低発現マウスに生じる ALS 同様の遅発性系統的

運動ニューロン変性（Oosthuysen, *et al.* Nat Genet, 2001）や孤発性・家族性 ALS の一部に発見された angiogenin（*ANG*）遺伝子変異（Greenway, *et al.* Nat Genet 2006）の報告等から、低酸素応答性の血管新生因子が ALS 発症に関与する可能性が提示されてきた。さらに最近、マウスの ALS モデルにおいて血液-脊髄関門の障害を示唆する複数の報告（Garbuzova-Davis, *et al.* PLoS ONE 2007; 同. Brain Res 2007; Zhong, *et al.* Nat Neurosci 2008）、そして angiogenin による ALS マウスモデル運動ニューロン保護効果も報告され（Kieran, *et al.* J Neurosci 2008）、ALS 病態における新規治療標的として微小血管系の重要性が注目されている。

このような背景のもと、本研究ではラットの ALS モデル（Nagai, *et al.* J Neurosci 2001）を用い、系統的運動ニューロン変性をきたす脊髄における微小血管新生を *in vivo* で検索した。

### B. 研究方法

実験 1. 東北大学神経内科で系統維持している His46Arg 変異 *SOD1* 遺伝子導入（Tg）ラットの



発症前 (20 週齢)、発症早期 (24 週齢)、発症後期 (28 週齢; 各群 n=4-5) を対象とし、チミンアナログ 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を 1 週間持続投与して新生細胞を標識した。投与終了後 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液による脊髄灌流・浸漬固定後凍結切片を作成、各種細胞選択的マーカーと血管壁構成成分について多重蛍光免疫組織化学を行った。微小血管系の再構築と病態進行との関連を検討するため、共焦点レーザー顕微鏡下に関心領域 (おもな病変部位である脊髄前角) における半定量的解析を行い、対照群 (週齢一致非 Tg ラット) と比較した。画像取得、画像解析・定量、統計学的解析には専用のコンピューターソフトウェアを使用した。

**実験 2.** 次に両後肢に運動麻痺を呈する発症後 Tg ラット (26 週齢) を対象に血管新生促進作用が報告されている肝細胞増殖因子 (HGF) 150  $\mu$ g 投与群 (HGF 群) とリン酸緩衝液のみを投与する対照群 (各群 n=4) に分け、浸透圧ポンプにより腰髄髄腔内に 14 日間持続投与した。当初の 7 日間は上記と同様に BrdU 持続投与を併用して新生細胞を標識した。投与終了日、実験 1 と同様に脊髄灌流固定・浸漬固定後の凍結切片を作成、解析した。

〔倫理面への配慮〕

すべての遺伝子操作は東北大学 DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は同動物実験指針に従った上で動物愛護面に十分配慮しかつ利用動物数を極力減らすように努めた。

### C. 研究結果

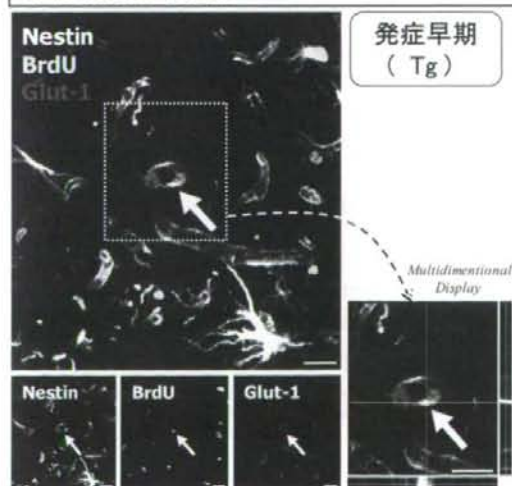
**実験 1.** 対照に比較し Tg ラットでは腰髄前角において、アストログリア増生、前角細胞脱落が有意かつ進行性に認められた。このような病態進行のもと Tg ラットでは新生微小血管内皮細胞の有意な増加を示した ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA with Tukey-Kramer post-hoc test)。微小血管内皮細胞新生のピークは発症早期に認められ、

これら新生血管内皮細胞には同時に nestin などの未成熟細胞マーカーの共局在が確認された (図、矢印)。その一方で、発症後期の Tg ラットでは内皮細胞マーカー陽性の微小血管像が有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。

**実験 2.** 次に発症後 ALS ラットへの HGF 髄腔内投与による微小血管新生促進効果をみると、HGF 投与群では対照群に比して腰髄前角の新生血管内皮細胞が有意に増加していた ( $P < 0.0001$ , t-test)。さらに HGF 投与群では微小血管基底膜成分である laminin 沈着が促進し、血管内皮バリア抗原が有意に増加していた ( $P = 0.0015$ )。また、HGF 投与群腰髄前角の一部の血管壁には活性化型 HGF 受容体 (c-Met) と血管内皮細胞抗原の共局在が確認された。

図. 発症早期の ALS ラットモデル (Tg) 腰髄前角における多重蛍光免疫組織化学. 矢印は nestin, BrdU, Glut-1 三重陽性の新生微小血管内皮細胞を示す。

BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine, Glut-1: glucose transporter-1; Bar: 20  $\mu$ m





#### D. 考察

本研究により、ALS ラットモデル病態下では微小血管系の再構築が生じていることが示された。進行期において血管内皮細胞新生が促進している一方で、発症後期に至ると新生の程度が減じ内皮細胞マーカー陽性の微小血管像が減少していたことから、運動ニューロン変性に関連した微小血管系の障害とそれに対抗する内在性の血管新生機転の存在が示唆される。さらに、神経再生においては血管新生と血管内皮細胞からのシグナル伝達が重要な役割を演じることが知られ、新生微小血管と幼若ニューロンは成長因子や受容体の多くを共有することから(Palmer, *et al.* J Comp Neurol, 2000)、微小血管新生がひとつの内在性再生機転である可能性もある。

今後、本モデル脊髄で微小血管新生を誘導する上流因子、新生微小血管の機能性、病変部位における血管バリア機能障害の有無などを詳細に検索することで、変性病態と血管新生との関連を明らかにしていく必要がある。また、本ALSモデルではすでに HGF 髄腔内投与による運動ニューロン保護効果が分担研究者らによって報告されているが(Ishigaki, *et al.* J Neuropathol Exp Neurol 2007)、今回新たに明らかとなった脊髄における HGF の微小血管新生促進効果についても作用機序の解明とともに、他の血管新生促進・抑制因子との比較検討が ALS 治療法開発において重要と考えられる。

#### E. 結論

運動ニューロンは長大な軸索と大きな細胞体をもつため生理的にもエネルギー消費は極めて大きい。そのエネルギー供給機構として「微小血管-ニューロン/アストログリア」という機能連関、すなわち神経-血管単位 (neurovascular unit) が非常に重要と考えられる。本研究の進展により、細胞外微小環境、とりわけ neurovascular unit を標的とした病態解明とそれに基づく新たな ALS 治療法、再生誘導療法の開

発が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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, 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.
- 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. 同上
  - 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
  - 5) 青木正志, 割田 仁, 石垣あや, 船越 洋, 糸山泰人 内因性肝細胞増殖因子 (HGF) によるALSラット脊髄再生阻害因子発現の抑制 同上
  - 6) 水野秀紀, 割田 仁, 青木正志, 糸山泰人 ALSモデルラットにおけるプロテオグリカン・コア蛋白分子種による発現の差異 同上

#### H. 知的所有権の取得状況

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

## 多能性幹細胞を用いた神経系の再生医学

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

研究要旨：マウス ES 細胞から神経系前駆細胞/幹細胞(NS/PCs)を含むニューロスフェアを誘導し、脊髄損傷モデルマウスに移植したところ、*in vivo* で、ニューロンおよびグリア細胞に分化し、運動機能の回復が見られた。さらに、ヒト ES 細胞や人工多能性幹細胞(iPS 細胞)からもニューロスフェアを誘導し、電気生理学的にも機能的なニューロンが生み出されることを見出した。

### A. 研究目的

これまでの研究で、胚性幹細胞 (ES 細胞) から、様々な時間的・空間的特異性を獲得した神経系前駆細胞/幹細胞(NS/PCs)をニューロスフェアとして誘導する方法を確立してきた。この方法を用いて誘導した、運動ニューロンをも生み出すことのできる NS/PCs を、発症直前の ALS モデルラットの脊髄に移植すると、生着し、*in vivo* でコリン作動性ニューロンに分化したが、十分な生存期間が得られず、機能回復までには至らなかった。

そこで、この ES 細胞由来 NS/PCs を脊髄損傷モデルマウスに移植し、*in vivo* における分化能、および運動機能回復の有無を検討する。さらに、この培養法をヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞に応用し、これらのヒト多能性幹細胞から NS/PCs をニューロスフェアとして誘導する培養法を確立する。

### B. 研究方法

我々はマウス ES 細胞から胚様体(Embryoid Body: EB)を経て、多能性神経幹細胞を含む未分化神経系前駆細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法を確立してきた。この方法を用いて NS/PCs を培養する過程で様々な因子 (Noggin, RA, Shh, Wnt3a, BMP4 など) を作用させることで、NS/PCs の時間的・空間的特異性を制御し、様々な領域で生み出されるニューロンやグリア細胞

の誘導を行うことができる。この培養法では、最初に形成した一次ニューロスフェアからはニューロンのみが生み出され、一方で継代して得られる二次、三次ニューロスフェアからはニューロンのみならずグリア細胞が生み出される。また、EB 形成時に後分化因子であるレチノイン酸(RA)を低濃度で作用させることによ

り、ニューロスフェアの形成効率を上昇させ、さらに後分化させた NS/PCs を誘導することができる。

そこで、脊髄損傷モデルマウス(C57/BL6)を作成し、損傷による炎症が収まり、グリア瘢痕を形成する前の損傷後 9 日目に、低濃度 RA を作用させて作成した、主にニューロンを生み出す一次ニューロスフェア、またニューロンおよびグリア細胞を生み出す二次ニューロスフェアを移植し、細胞の生着について *in vivo* imaging system (IVIS)、分化および動物の運動機能の改善について免疫組織化学、および BBB スコアを用いて評価を行う。

さらに、将来的な再生医療への応用を念頭に置き、ヒト ES 細胞から NS/PCs をニューロスフェアとして誘導する培養法を開発する。まず、マウス ES 細胞で用いた方法をヒト ES 細胞の分化培養系に応用し、EB を介してニューロスフェアの形成を試みる。さらに、最近開発されたヒト人工多能性幹細胞(iPS 細胞)からも同様の手法を用いて NS/PCs (ニューロスフェア) の誘導を行う。

(倫理面への配慮)

動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。また、当研究室におけるヒト ES 細胞の使用については、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成 19 年 10 月 31 日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。

### C. 研究結果

まず、生きたまま移植細胞を可視化するための *in vivo* imaging system (IVIS) を利用するために、改変型の luciferase (CBRLuc) と蛍光タン