

200936273A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

肝細胞増殖因子による
筋萎縮性側索硬化症に対する
新規治療法の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 青木正志 / 東北大学病院神経内科
平成22年3月 印刷

目 次

I. 研究者一覧

II. 総括研究報告書

東北大学病院神経内科

青木 正志

III. 分担研究報告書

1. 肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発

東北大学大学院医学系研究科神経内科

糸山 泰人

2. HGFはALSモデルトランスジェニック動物の進行過程におこるオートファジーを修飾する

大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

船越 洋

3. 肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発

慶應義塾大学医学部整形外科

中村 雅也

4. GMP基準によるHGF原薬の製造

クリングルファーマ株式会社

安達 喜一

研 究 者 一 覽

**肝細胞増殖因子による
筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発**

研 究 者 一 覧

研究代表者	青木正志	東北大学病院神経内科	講 師
研究分担者	糸山泰人	東北大学大学院神経内科	教 授
	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
	中村雅也	慶応義塾大学医学部整形外科	専任講師
	安達喜一	クリングルファーマ株式会社	取締役副社長

総括研究報告書

研究期間

平成21年10月1日～平成22年3月31日

肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発

研究代表者 青木正志 東北大学病院神経内科

研究要旨 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は既に報告している。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。臨床試験のために霊長類であるマーモセットを用いてHGFの髄腔内投与による副作用を検証すると共に臨床用量の設定を行った。同時に非臨床試験に使用するHGF原薬をGMP基準で製造し、すべての規格に適合したヒトリコンビナントHGF蛋白の原薬を製造した。このGMP基準の原薬を用いGLP基準でカニクイザルに髄腔内持続投与を行い、安全性（毒性）および薬物動態を確認している。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。本研究では上記の安全性および薬物動態試験の結果を基にALS患者に対する臨床試験としてリコンビナントHGF蛋白の髄腔内持続投与を行う。そのためのプロトコル開発に着手し、さらには治験として安全性や倫理的妥当性を薬事法およびGCPに従って確保するために、モニタリング・監査・データマネジメントの整備も進めている。脊髄のq-space imaging（QSI）撮像による評価法の検討も開始した。さらには効率的な投与法の開発に向けてのALSモデルトランスジェニック動物も用いた基礎研究も継続している。

研究代表者：青木正志

東北大学病院神経内科講師

研究分担者：糸山泰人¹、割田 仁¹、鈴木直輝¹、船越 洋²、中村雅也³、岡野栄之⁴

¹東北大学大学院医学系研究科神経内科

²大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

³慶應義塾大学医学部整形外科

⁴慶應義塾大学医学部生理学

進行性の運動ニューロンの選択的細胞死を惹起する筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対して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、以下HGF）を用いた治療法の臨床応用を目的にしている。すでにALSラットに対してヒトリコンビナントHGF蛋白の髄腔内持続投与で有効性を示したので、霊長類を用いてHGFの髄腔内投与による安全性を検証すると共に臨床用量の設定を行う。その結果を元に、ALS患者に対する治験フェーズ1に進む。同時にHGFの治療効果の機序を明らかにする。

A. 研究目的

B. 研究方法

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 ラットに対するリコンビナント HGF 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 SOD1 トランスジェニック動物による ALS モデルに対して明確な治療効果を示したものは少なく、この有効性を ALS 患者に臨床応用する意義と必要性がある。しかも、臨床応用の最も可能性の高いルートとしての髄腔内投与での効果が ALS ラットで確認されたので、ラットおよび霊長類（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予定している。

1) 霊長類に対する髄腔内投与での安全試験

マーモセットを用いて HGF の髄腔内投与による副作用を検証すると共に臨床用量の設定を行う。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。

2) 非臨床試験に使用する HGF 原薬を GMP 基準での製造

非臨床試験（GLP 試験）としてカニクイザルに HGF を髄腔内投与し、その安全性を確認する必要がある。この GLP 試験に供給するため、組換え HGF 蛋白質の原薬を GMP 品質で製造した。

3) 治験に関するプロトコルの作成および QSI による新たな画像評価法の確立

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フェーズ I のプロトコルの作成を行う。脊髄の q-space imaging（以下 QSI）撮像による評価法の検討も行う。

4) 効率的な投与方法の開発に向けての ALS モデルトランスジェニック動物を用いた基礎研究
特にオートファジーに焦点をあてて、ALS 病態進行過程における HGF によるオートファジーの修飾の有無について解析を行う。

なお、すべての遺伝子操作は本学および共同研究施設の 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 および D. 考察

1) 霊長類に対する髄腔内投与での安全試験

東北大学においてはマウスおよびラット（コントロールおよび ALS ラット）に対して、実験動物中央研究所においてはマーモセットによる脊髄損傷モデルに対してヒトリコンビナント HGF 蛋白の髄腔内持続投与を行った。

マーモセット脊髄損傷モデルに対する投与では 400 μ g のヒトリコンビナント HGF 蛋白髄腔内に 4 週間持続投与したところ（実薬群；n=6、対照群；n=5）、ヒトリコンビナント HGF 蛋白投与群で上肢筋力の有意な回復および機能スコアの有意な改善を認めた。7テスラ MRI による脊髄の評価でも病巣面積の有意な縮小が確認された。一方で、12 週の観察期間において、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。

2) 非臨床試験に使用する HGF 原薬を GMP 基準での製造

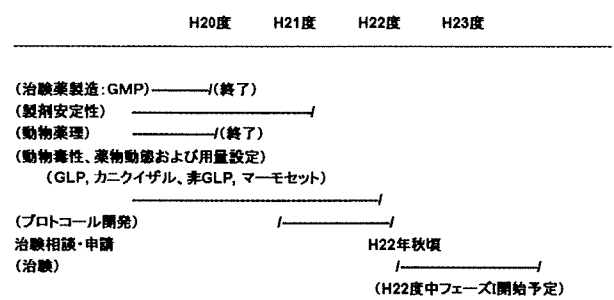
培養工程では順調に細胞は増殖し、予定通り 600L 規模まで拡大することができた。生産培養においても異常は認められず、回収した培養液を精製工程に移管することができた。精製工程においても異常は認められず、製造標準書通りに製造することができた。

製造した HGF 原薬について規格試験を実施したところ、すべての規格に適合し、出荷可否判定において合格と判定された。

この原薬を用いて GLP 基準による安全性試験を行っている。この試験においては①髄腔内持続投与の安全性試験と同時に②髄腔内投与時の薬物動態の確認（HGF の髄腔内分布・排泄経

路の確認、全身への移行性など)の確認をしており、本試験に向けての予備試験まで終了した(新日本科学安全性研究所)。

ALSに対するリコンビナントHGF蛋白製剤による治療開発スケジュール



3) 治験に関するプロトコルの作成および QSI による新たな画像評価法の確立

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フェーズ I のプロトコルの検討を開始した。さらにはさらには治験として安全性や倫理的妥当性を薬事法および GCP に従って確保するために、モニタリング・監査・データマネジメントの整備も進めている。また、トランスレーショナル・リサーチコーディネーター TRC を新たに雇用して、試験に向けて養成を開始した。

新たな画像評価法の確立を目指して基礎的研究を行った。サル の 正常 及び 損傷 脊髄 の QSI を撮像し、組織学的所見との比較検討を行った。QSI の 3 つの代表的なパラメーターである displacement、zero displacement、kurtosis のうち、displacement map は脊髄内の構造物の大きさを反映しており前角部神経細胞(運動ニューロン)を可視化できる可能性が示唆された。また、kurtosis から我々が独自に構築した myelin map は脊髄内の髄鞘を可視化できる可能性がある。さらに、サル脊髄損傷に対するサル胎児由来神経幹細胞移植を行い、脊髄内の再髄鞘化が促進されることを myelin map 及び組織学的に捕らえることに成功した。これらの結果は、HGF を用いた中枢神経再生の臨床研究における新たな画像評価法として QSI が有力なツールとなりうる可能性を示唆していると考えている。

4) 効率的な投与方法の開発に向けての ALS モデルトランスジェニック動物を用いた基礎研究 オートファジーは gain-of-function 型の変異 SOD1 の clearance に寄与している可能性があることから、オートファジーの修飾による治療戦略に大きな期待が寄せられている。ヒト G93A-SOD1 を発現する ALS モデルトランスジェニックマウスの病態進行過程において、オートファジーが運動ニューロンに加えて小型細胞神経組織の変性過程で亢進すること、HGF はその過程でオートファジーを修飾する機能を持つことが明らかとなった。HGF はオートファジー修飾の観点からも ALS 進行阻止に貢献する可能性が示唆された。

E. 結論

GLP 基準を満たしたヒトリコンビナント HGF 蛋白のカニクイザルに対する髄腔内投与による安全性試験は順調に進行しており、これが終了次第、平成 22 年度中の治験届けの提出を目指している。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takagi T, Nakamura M, Yamada M, Hikishima K, Momoshima S, Fujiyoshi K, Okano JH, Toyama Y, Okano H. Visualizing for Peripheral Nerve Degeneration and Regeneration: Monitoring with Diffusion Tensor Tractography. *Neuroimage* 44: 884-892, 2009

Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Nagoshi N, Kitamura K, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Katoh H, Okada S, Shibata S, Matsuzaki Y, Toh S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Roles of ES Cell-Derived Gliogenic Neural Stem/Progenitor Cells in Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *PLoS ONE* 4:

2. 学会発表

Warita H, Aoki M, Mizuno H, and Itoyama Y. Endothelial proliferation in the spinal cord microvasculature of ALS transgenic rats. December 8-10, 2009. 20th International Symposium on ALS/MND, Berlin, Germany 他

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

分 担 研 究 報 告 書

肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発

研究分担者 糸山泰人 東北大学病院神経内科

研究要旨 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は既に報告している。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、臨床試験のために霊長類であるマーモセットを用いてHGFの髄腔内投与による副作用を検証すると共に臨床用量の設定を行った。同時にGLP基準でカニクイザルに髄腔内持続投与を行い、安全性（毒性）および薬物動態を確認している。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。

本研究では上記の安全性および薬物動態試験の結果を基にALS患者に対する臨床試験としてリコンビナントHGF蛋白の髄腔内持続投与を行う。そのためのプロトコール開発に着手し、さらには治験として安全性や倫理的妥当性を薬事法およびGCPに従って確保するために、モニタリング・監査・データマネジメントの整備も進めている。

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教授

研究協力者：青木正志¹、割田 仁¹、鈴木直輝

¹、船越 洋²、中村雅也³、岡野栄之⁴

¹ 東北大学大学院医学系研究科神経内科

² 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

³ 慶應義塾大学医学部整形外科

⁴ 慶應義塾大学医学部生理学

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、以下 HGF）を用いた治療法の臨床応用を目的にしている。すでに ALS ラットに対してヒトリコンビナント HGF 蛋白の髄腔内持続投与で有効性を示したので、霊長類を用いて HGF の髄腔内投与による安全性を検証すると共に臨床用量の設定を行う。その結果を元に、ALS 患者に対する治験フェーズ1に進む。同時に HGF の治療効果の機序を明らかにする。

A. 研究目的

進行性の運動ニューロンの選択的細胞死を惹起する筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対してわ

B. 研究方法

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 ラットに対するリコ

ンビナント HGF 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、ラットおよび霊長類（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予定している。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つつ利用動物数を極力減らすように努めた。

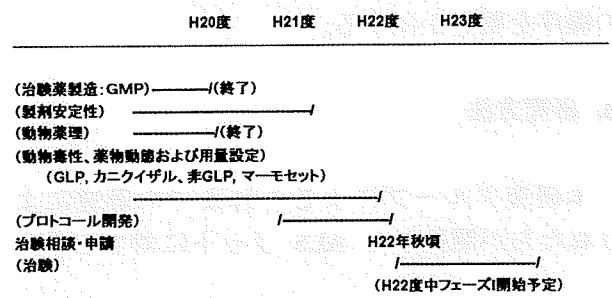
C. 研究結果 および D. 考察

1) 霊長類に対する髄腔内投与での安全試験

東北大学においてはマウスおよびラット（コントロールおよび ALS ラット）に対して、実験動物中央研究所においてはマーモセットによる脊髄損傷モデルに対してヒトリコンビナント HGF 蛋白の髄腔内持続投与を行った。

マーモセット脊髄損傷モデルに対する投与では 400 μ g のヒトリコンビナント HGF 蛋白髄腔内に 4 週間持続投与したところ（実薬群；n=6, 対照群；n=5），ヒトリコンビナント HGF 蛋白

ALS に対するリコンビナント HGF 蛋白製剤による治療開発スケジュール



投与群で上肢筋力の有意な回復および機能スコアの有意な改善を認めた。7テスラ MRI による脊髄の評価でも病巣面積の有意な縮小が確認された。一方で、12 週の観察期間において、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。

上記の結果を受けて、治験に必要な GMP 基準を満たしたヒトリコンビナント HGF 蛋白製剤を生産し（クリングルファーマ担当）、GLP 基準を満たしたカニクイザルに対する髄腔内投与による安全性試験を行っている。この試験においては①髄腔内持続投与の安全性試験と同時に②髄腔内投与時の薬物動態の確認（HGF の髄腔内分布・排泄経路の確認、全身への移行性など）の確認をしており、本試験に向けての予備試験まで終了した（新日本科学安全性研究所）。

2) 治験に関するプロトコルの作成

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フェーズ I のプロトコルの検討を開始した。さらにはさらには治験として安全性や倫理的妥当性を薬事法および GCP に従って確保するために、モニタリング・監査・データマネジメントの整備も進めている。また、トランスレーショナル・リサーチコーディネーター TRC を新たに雇用して、試験に向けて養成を開始した。

E. 結論

GLP 基準を満たしたヒトリコンビナント HGF 蛋白のカニクイザルに対する髄腔内投与による安全性試験は順調に進行しており、これが終了次第、平成 22 年度中の治験届けの提出を目指している。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- 1) Warita H, Aoki M, Mizuno H, and Itoyama Y. Endothelial proliferation in the spinal cord microvasculature of ALS transgenic rats. December 8-10, 2009. 20th International Symposium on ALS/MND, Berlin, Germany

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

「HGF はALSモデルトランスジェニック動物の進行過程におこる オートファジーを修飾する」

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・准教授

共同研究者：角山 圭一 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学／姫路獨協
薬科大学

島田(大谷) 若菜 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

青木 正志 東北大学医学系研究科神経内科学

糸山 泰人 東北大学医学系研究科神経内科学

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：ヒト変異 SOD1 を発現する ALS モデルトランスジェニック動物は、脊髄および脳幹部の運動ニューロンが持続的・進行性に変性・脱落する。この病態進行過程でオートファジーが亢進し、この変化が病態に重要な寄与をしている可能性が示唆されている。オートファジーは gain-of-function 型の変異 SOD1 の clearance に寄与している可能性があることから、オートファジーの修飾による治療戦略に期待が寄せられているが、ALS に対するオートファジー修飾による治療法開発には至っていない。一方で、HGF を供給すると ALS モデルトランスジェニック動物の病態進行が遅延し、運動機能の改善および寿命の延長効果が得られる。本研究では、オートファジーに焦点をあてて、ALS 病態進行過程における HGF によるオートファジーの修飾の有無について解析した。その結果、ALS モデルトランスジェニックマウスでは、運動ニューロンに加えてグリア系細胞においてもオートファジーが促進していた。これに対して神経特異的 HGF と ALS モデルトランスジェニックマウスを交配して作製したダブルトランスジェニックマウスでは、ALS モデルトランスジェニックマウスに比較すると、オートファジーが修飾されていた。以上から、HGF は ALS に対しては、オートファジーの観点からも病態を修飾しうることが明らかとなった。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの進行性変性・脱落による運動機能不全により呼吸・嚥下筋障害がおこり最終的に死亡する最も悲惨な神経変性疾患の1つで、現時点で有効な治療法は開発されていない。家族性 ALS（FALS:約 10%を占める）と孤発性 ALS（SALS:約 90%を占める）に分類される。家族性 ALS（FALS）の発症

機序の1つに SOD1 の遺伝子変異があげられる。このモデル動物として、ヒトで認められる SOD1 の変異遺伝子(G93A-SOD1)を過剰発現するトランスジェニックマウスが知られる（ALS-Tg マウス）。この ALS モデルトランスジェニック動物は、脊髄および脳幹部の運動ニューロンが持続的・進行性に変性・脱落するが、この病態進行過程でオートファジーが亢進し、この変化が病態

に重要な寄与をしている可能性が示唆されている。オートファジーは gain-of-function 型の変異 SOD1 の clearance に寄与している可能性があることから、オートファジーの修飾による治療戦略に大きな期待が寄せられている。しかし、ALS に対するオートファジー修飾による治療法は未開拓の段階である。

一方で、私達は多機能性増殖因子である肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) が、運動ニューロンに対する強力な神経栄養活性をもつことから、HGF による ALS の病態進行阻止、改善効果について検討してきた。HGF を遺伝子工学的あるいは蛋白質工学的に供給すると、ALS モデルトランスジェニック動物の病態進行が遅延し、運動機能の改善および寿命の延長効果が得られることを示してきた (Sun, Funakoshi et al., 2002; Kadoyama, Funakoshi et al., 2007; Ishigaki, Aoki et al., 2007; Kadoyama, Funakoshi et al., 2009)。これらの解析から、HGF は運動ニューロンに対する直接的神経栄養作用を示すことに加えて、グリア細胞の中でもアストロサイトおよびミクログリアのグリオーシスを抑制し、さらにはアストロサイトの機能改善効果 (グルタミン酸トランスポーター EAAT2/GLT-1) を示すことを報告し、現在 ALS への臨床適用を目指し、安全性試験および Pharmacokinetics 解析の最終段階を実施中である。HGF は、Bcl ファミリー分子の誘導・維持作用を持つことから、アポトーシスに加えてオートファジーを修飾する作用が示唆される。もし、修飾できることが明らかになると、HGF はこの観点からも ALS 治療に有利となる。さらにオートファジーの修飾は、一旦発症した病態を改善する効果 (reverse 作用) が期待できるため、その意義は大きい。

本研究では、

- (I) ALS 病態進行下でみられるオートファジーの細胞種の解析
- (II) HGF が ALS 病態下におけるオートファジーの変化を修飾しうるか

の 2 点を明らかにすることを目的とし、解析を進めた。

B. 研究方法

- (1) ALS モデル動物としてヒト G93A-SOD1 を発現するトランスジェニックマウス (ALS-Tg) を用いた。さらにこのマウスと神経特異的に HGF を発現するトランスジェニックマウス (HGF-Tg) を交配することで、以下の 4 つの群を作成した。ALS-Tg、HGF-Tg、ALS-Tg と HGF-Tg のダブルトランスジェニックマウス (ALS/HGF) および同一年齢の野生型同腹仔 (WT-Littermate: WT)。
- (2) 病理組織学的解析: 動物を深麻酔後、脳および脊髄を採取した。採取した脳・脊髄組織はアルコール希釈系列で 4 °C において固定後、キシレン処理を行い、ホルマリン包埋を施行した。パラフィン切片を作成後、Cresyl violet 染色、H-E 染色および各種免疫染色を行った。1 次抗体としては、NeuN 抗体 (神経細胞のマーカー)、Tubulin β III 抗体 (神経細胞のマーカー)、GFAP 抗体 (アストロサイトのマーカー)、IbaI 抗体 (ミクログリアのマーカー)、抗 c-Met (HGF 受容体) 抗体、抗 LC3 抗体、抗 p62 抗体、抗ユビキチン抗体を用いた。蛍光ラベルした 2 次抗体と反応後、共焦点蛍光顕微鏡を用いて可視化した。

C. 研究結果

- (1) ALS-Tg マウスにおけるオートファジーの組織学的評価: ALS 進行過程でのオートファジーの修飾を解析するため、ALS-Tg

マウスのパラフィン切片を用いた病理組織学的解析の結果 (Cresyl violet 染色や各種免疫染色等) を施行した。そのコントロールとして同年齢の野生型同腹仔を用いた。その結果、ALS-Tg マウスの脊髄および脳幹運動ニューロンは、経時的に死細胞数が増え、回復することはなかった。各種免疫染色の結果、運動ニューロン変性時期には運動ニューロンにおいてオートファジーが亢進することが明らかとなった。興味深いことに、この時期において、運動ニューロン以外の小型細胞についてもオートファジーの亢進がおこることが明らかとなった。

(2) HGF による ALS のオートファジーの修飾効果-HGF による ALS の修飾効果を解析するため、各種免疫染色法を用いて ALS/HGF-Tg マウスと ALS-Tg マウスでオートファジーについて評価した。さらに、コントロールとして野生型同腹仔および HGF-Tg マウスを用いた。その結果、脊髄および脳幹部運動ニューロンでは進行性に運動ニューロンの変性脱落が進行するのに対して、ALS/HGF-Tg マウスにおいては、運動ニューロンの変性が大幅に抑制されていた。この時期のオートファジーを免疫組織学的に解析すると、上記記載の ALS-Tg マウスにおけるオートファジーが ALS/HGF-Tg マウスで大きく修飾されていた。その効果は、運動ニューロンに加えてその周囲小型細胞にも及んでいた。

D. 考察

オートファジーは、プロテオソーム系と並んで蛋白質を分解するための critical な内在性機構の 1 つで、生体のホメオスタシス維持に必須であると同時に、神経変性疾患を含む神経難病における病因変異遺伝子の蓄積を clearance することに寄与すると期待されることから、発症後の病態進行抑制はもとより、一旦進行した病態からの回

復に有用な分子機序として期待されている。実際例えばオートファジーの系で重要な分子群 (ATG5 および ATG7) のノックアウトマウスでは、ATG5 や ATG7 の欠損に起因するオートファジーの低下により、神経変性が顕著におこることが証明され、神経変性疾患の病態進行への修飾機序の 1 つとして同定されている。本研究では、ALS-Tg マウスの解析結果から、(I) ALS 進行過程では、運動ニューロンに加えて、他の小型細胞においてもオートファジーが変化することが明らかとなった。(II) ダブルトランスジェニックマウス (ALS/HGF-Tg マウス) と ALS-Tg マウスの比較解析から、オートファジーの変化が、HGF の供給で大きく修飾されることが明らかとなった。さらにその修飾効果は、運動ニューロンにとどまらず、小型細胞にも及んでいた。このことは、HGF の供給で一旦進行した mutant SOD1 の蓄積を clearance する方向に向けることができる可能性を示唆している。では、いつから HGF を供給するとその効果があるのか、また、どの時期までその効果が期待できるのか? これらの点については今後詳細に解析する必要がある。そのため、私達はこれまで解析に用いていた ALS-Tg マウスモデルに加えて、東北大学青木先生、糸山教授らにより開発された ALS-Tg ラットを用いることにより、臨床に近い髄腔内投与経路で HGF を供給した際のオートファジー修飾効果を詳細に解析していく予定でいる。HGF はこれまで、発症前からの投与に加えて発症時の投与 (髄腔内 recombinant HGF 蛋白質時速投与) で運動ニューロン変性抑制効果と ALS-Tg 動物の寿命延長効果が明らかとなっている。サルでの安全性試験と薬物動態試験の最終結果がでたら、神経疾患への臨床適用をできたらと考える研究を進めている。今後オートファジーの修飾の観点からも十分検討して HGF 投与プロトコルの最終決定に役立てたい。そ

して、世界初の実際有効な ALS 進行抑制療法を日本から発信していきたい。そして、その後の次世代治療（一旦進行した病態からの回復療法）の開発の基盤として、オートファジーおよびプロテオソーム系による clearance 機構の解析を進めていきたい。東北大学神経内科青木正志先生、糸山教授および慶応義塾大学生理学岡野栄之教授、同整形外科中村雅也先生、戸山芳昭教授らとの密な協力・連携を基盤に、一日も早い ALS への HGF による新しい治療法を日本はもとより世界に発信できる日を願っている。

E. 結論

ヒト G93A-SOD1 を発現する ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg マウス) の病態進行過程において、オートファジーが運動ニューロンに加えて小型細胞神経組織の変性過程で亢進すること、HGF はその過程でオートファジーを修飾する機能を持つことが明らかとなった。HGF はオートファジー修飾の観点からも ALS 進行阻止に貢献する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kadoyama K, Funakoshi H, Ohya-Shimada W, Nakamura T, Matsumoto K, Matsuyama S, Nakamura T. Disease-dependent reciprocal phosphorylation of serine and tyrosine residues of c-Met/HGF receptor contributes disease retardation of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Res.* 65(2): 194-200, 2009.
- (2) 1: Kanai M, Nakamura T, 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.* 64(1): 111-7, 2009.

(3) Hocking JC, Hehr CL, Bertolesi G, Funakoshi H, Nakamura T, McFarlane S. LIMK1 acts downstream of BMP signaling in developing retinal ganglion cell axons but not dendrites. *Dev Biol.* 330(2): 273-85, 2009.

(4) Kanai M, Funakoshi H, Takahashi H, Hayakawa T, Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Mol Brain.* 2(1): 8, 2009.

(5) Tanaka, S., Miyata, T., Fujita, T., Kawahara, E., Tachino, K., Funakoshi, H., Nakamura, T. Differing responses of satellite cell activity to exercise training in rat skeletal muscle. *Neurosci. Res.* 65 (2), 194-200, 2009.

(6) 船越 洋、神経栄養因子・再生因子による神経疾患の疾患進行・再生の分子機構の解析と適用、*ブレインサイエンス・レビュー* 2010、in press.

(7) 野間 さつき、船越 洋、中村 敏一、肝細胞増殖因子 (HGF) : HGF levels in serum, cerebrospinal fluid, joint fluid, tissues and various diseases. *日本臨床*, in press.

2. 学会発表

島田 (大谷) 若菜、船越 洋、加藤 信介、加藤 雅子、中村 敏一、HGF のエンドクリン性供給は、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスでおこる肝臓病理学的変化からの回復に寄与する。第 82 回日本生化学会大会 (神戸) (日本生化学会大会優秀プレゼンテーション賞受賞)

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

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書**

「肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発」

研究分担者： 中村 雅也 慶應義塾大学医学部整形外科専任講師

研究要旨

本研究では、肝細胞増殖因子を用いた中枢神経再生の新規治療法を確立するうえで必要不可欠な新たな画像評価法の確立を目指して基礎的研究を行った。サル normally 及び損傷脊髄の q-space imaging (以下 QSI) を撮像し、組織学的所見との比較検討を行った。QSI の 3 つの代表的なパラメーターである displacement、zero displacement、kurtosis のうち、displacement map は脊髄内の構造物の大きさを反映しており前角部神経細胞を可視化できる可能性が示唆された。また、kurtosis から我々が独自に構築した myelin map は脊髄内の髄鞘を可視化できる可能性がある。さらに、サル脊髄損傷に対するサル胎児由来神経幹細胞移植を行い、脊髄内の再髄鞘化が促進されることを myelin map 及び組織学的に捕らえることに成功した。これらの結果は、肝細胞増殖因子を用いた中枢神経再生の臨床研究における新たな画像評価法として QSI が有力なツールとなりうる可能性を示唆していると考えている。

A. 研究目的

MRI は非侵襲的に生体内部構造を観察できる有用な手段であり、その有用性について異論の余地はない。損傷後脊髄では神経細胞の脱落、軸索の途絶、脱髄、その他様々な変化が生じる。従来の T1、T2 強調像は損傷の程度と局在を鋭敏に描出し、拡散 MRI のひとつである拡散テンソル tractography (DTT) は損傷脊髄における軸索の途絶を可視化できる (Fujiyoshi et al, JN 2008)。しかし、高磁場における T1、T2 強調像や DTT を用いても、神経細胞の脱落や髄鞘に関する特異的な情報を得ることは困難であった。そこでわれわれは水分子の拡散の制限に着目した解析法である q-space imaging (以下 QSI) を応用し、強い制限構造である髄鞘の可視化法を独自に開発した (これを Myelin map と命名した)。本研究の目的は、Myelin map が脊髄損傷における髄鞘の可視化法として有用であることを、サル脊髄損傷モデルを用いて検証することである。

B. 研究方法

- 1) サル正常脊髄の QSI: 成体コモンマーモセットの正常頸髄を 7 テスラ小動物用 MRI (Bruker biospin) を用いて撮像し、T2 強調像 (以下 T2WI)、QSI を構築した。その解析および表示には計算機処理ソフト IDL (ITT) を用いた。QSI の解析には 3 つの代表的なパラメーターである displacement、zero displacement、kurtosis を用いた。撮像後、頸髄を固定し電子顕微組織所見と比較検討を行った。
- 2) サル損傷脊髄の QSI: コモンマーモセットの第 5 頸椎高位に脊髄圧挫損傷を作製した (Iwanami et al, JNR 2005) (損傷群 n=5)。対照として外科的手技を加えない動物を使用した (対照群 n=3)。損傷後 3 日、2、4、10 週に全麻下で MRI を撮像した。撮像後各時点において、経心臓的灌流固定を行い組織学的に検討した。拡散計測には QSI を使用し、その解析および表示には計算機処理ソフト IDL (ITT) を用いた。QSI

の3つの代表的なパラメーターである displacement、zero displacement、kurtosis を用いて損傷脊髄を解析した。組織学的検討は髄鞘染色である LFB(Luxiol Fast Blue) 染色と HE 染色を行った。Myelin map により得られた QSI 画像と LFB 染色の顕微鏡写真を MCID (Micro Computer Imagng Device; Amersham Bioscience Corp., Pscataway, NJ) に取り込み、それぞれの画像を細分化したうえで myelin positive area を算出し回帰分析を行った。

3) サル損傷脊髄に対するサル胎児由来神経幹細胞移植後の QSI : コモンマーモセットの第5頸椎高位に脊髄圧挫損傷を作製し、損傷後9日にサル胎児(胎齢91日)由来神経幹細胞移植(細胞数 1×10^6 個)を損傷部に行った。損傷後10週まで QSI を全麻下で撮像した。QSI の評価は displacement、zero displacement、kurtosis を用いて行い、その後灌流固定し組織学的検討を行った。

C. 研究結果

1) 正常サル脊髄の QSI

生きているサルの脊髄の明瞭な QSI の描出に成功した。displacement、zero displacement、kurtosis の各パラメーターを検討した結果、displacement map の信号強度は組織の大きさを反映し、Kurtosis の信号は組織の密度を反映していることが明らかとなった(図1)。

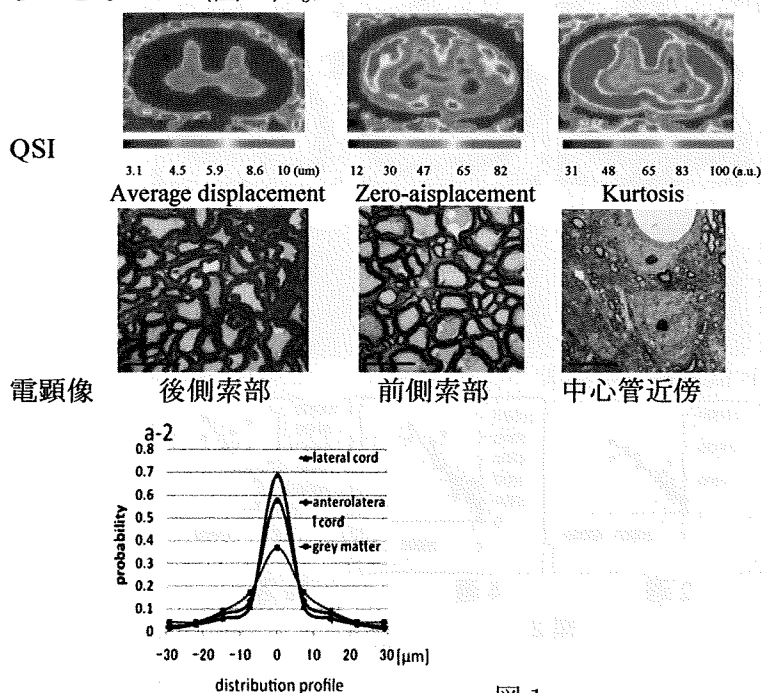
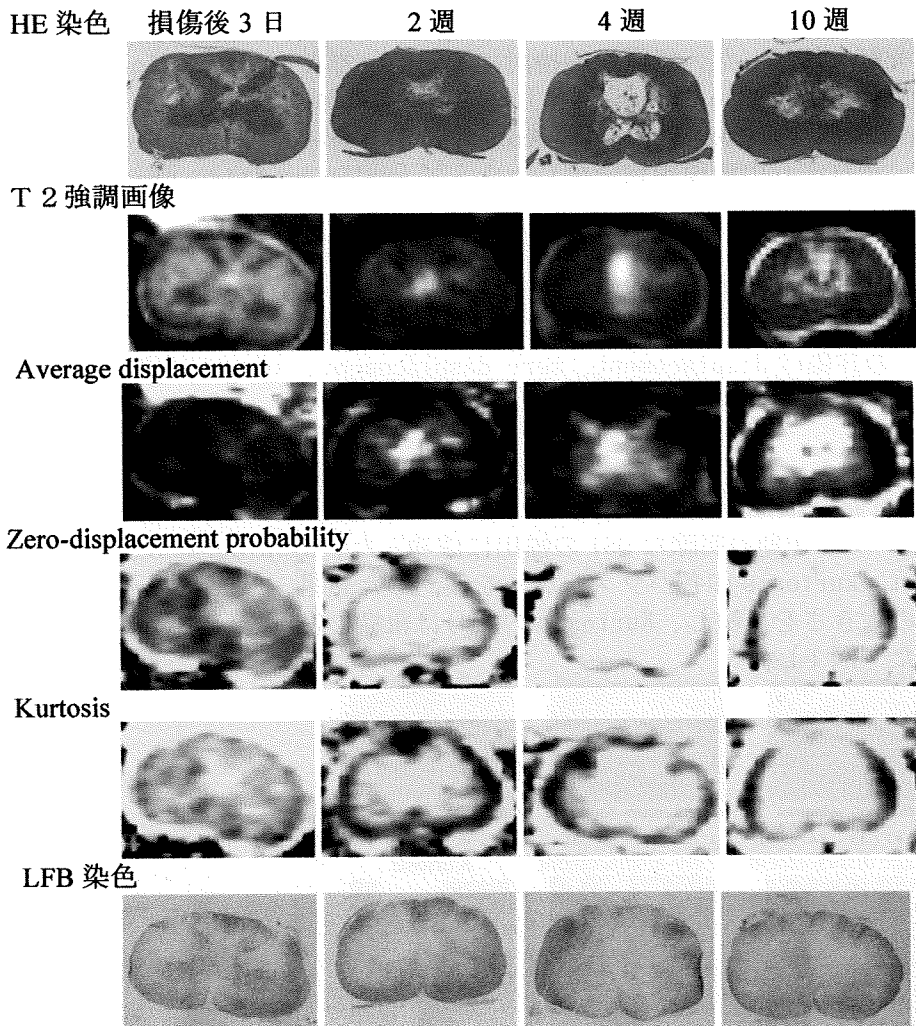


図 1

2) サル損傷脊髄の QSI

3つのパラメーターに用いた損傷脊髄内の信号値を算出し、LFB染色による残存髄鞘面積との比較検討の結果、従来の T2WI ではとらえることができなかった組織学的な変化を displacement map, kurtosis は反映していた。特に Kurtosis は損傷後3日、2、4、10週いずれの時点においても、脊髄内の残存脱髄を鋭敏に反映することが分かった。(図2)



残存髓鞘面積と Kurtosis 信号値との相関

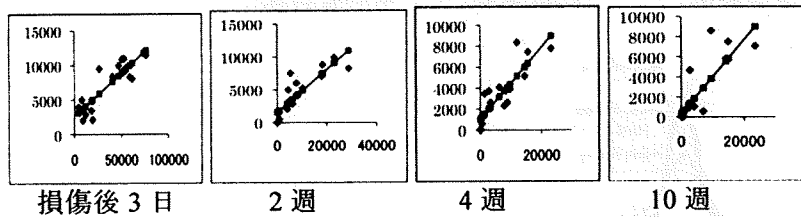


図 2

次に同一個体において脊髄損傷後の脊髄内信号強度の経時的な変化を検討し、損傷後白質内の髓鞘と kurtosis の信号値を応用し独自に開発した Myelin map は、LFB 染色で明らかにされた髓鞘領域を明瞭に示しており、強い相関を示していた。これらの結果は、Kurtosis から構築した myelin map により、生きたままの状態で脊髄内の髓鞘を可視化できる可能性を示唆するものと考えている。(図 3)