

A.研究目的

【研究背景】ALS は全身の運動ニューロンが進行性に変性脱落し、運動麻痺により死に至る致死性神経変性疾患で、現時点で有効な治療法がない。

私達は、HGF が ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg; Tg-SOD1^{G93A}) 動物に治療効果を持つことを示してきた (Sun, Funakoshi *et al.*, 2002; Kadoyama, Funakoshi *et al.*, 2007, Kadoyama, Funakoshi *et al.*, 2009)。この際、ALS-Tg への HGF の供給法としては、ALS-Tg と神経特異的 HGF-Tg を交配することで行った。この方法では、ALS-Tg, HGF-Tg, ALS/HGF-Tg, WT の 4 群のマウスができる。私達はこの 4 群のマウスを比較し、詳細に解析したところ、ALS/HGF-Tg では、脊髄と脳幹部（顔面運動神経核・舌下神経核）の両方の神経変性が抑制され、運動機能が改善し、寿命が延長することを見いだした。HGF は生体内に備わる内因性の再生因子であり、実際家族性 ALS (FALS) 患者と孤発性 ALS (SALS) 患者のどちらの脊髄組織においても、HGF とその受容体 c-Met が ALS-Tg と同様に発現制御を受けることが明らかになったことから (Kato, Funakoshi *et al.*, 2003)、HGF の supplementation による ALS 治療が期待される。しかし、患者の神経系に HGF を供給するのに、トランスジェニックの手法は使用できない。私達は、この問題を解決するため、東北大学神経内科青木らと共同研究を続け、HGF 蛋白質の髄腔内持続投与方法が有効であることを明らかにした (Ishigaki, Aoki *et al.*, 2007)

【研究目的】

本研究では、将来単回投与で効果をもつ HGF の供給法を開発するため、各種ウイルスベクターを用い、HGF 供給法としてのベクターと投与方法について検討することを目的とした。

B.研究方法

【各種ウイルスベクター】

- (1) 単純ヘルペス I 型ウイルスベクター (HSV1: Herpes simplex virus_ replication incompetent type)
- (2) アデノ随伴ウイルスベクター (AAV : adeno-associated virus)
 - (a) AAV2
 - (b) AAV4
 - (c) AAV5
- (3) すべての上記ウイルスベクターについて、HGF 発現ベクターとコントロールとして LacZ 遺伝子発現ベクターを作成し用いた。

【ウイルスベクター投与方法】

- (1) ラット脊髄中への単回投与：深麻酔下に脳定位手術器具と微量注入装置を用いて髄腔レベルで脊髄へ直接単回投与した。
- (2) ラット脳脊髄液中への単回投与（髄腔内投与）：深麻酔下に腰部より常法でゆっくりした流速で単回髄腔内投与を施行した。
- (3) どちらの投与も、Evans blue での投与で十分手技に習熟した者が施行した。

【解析方法】

動物を深麻酔下に sacrifice し、脳、脊髄、脳脊髄液を採取した。採取した組織について、β-Gal 染色、HGF の免疫染色、ELISA 法による HGF 蛋白質量の定量を行い、各群で比較解析を行った。一部の動物については、長期発現の評価を行うために用いた。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変動物使用にあたっては、阪大遺伝子組換え実験委員会に申請・承認のもと、また、動物使用にあたっては阪大動物実験委員会に申請・承認のもと、動物愛護に努め、使用動物数の減少に努めた。

C. 研究結果

(1) ウイルスベクター濃度による HGF 蛋白質発現量の比較検討 (各ベクターごとに)

各ウイルスベクターのウイルスタイターを基に最終投与量を変化させた場合の LacZ の発現と HGF の発現を、組織学的に、また、ELISA 法で比較検討した。結果としては、必ずしも投与量を増加したらより高い発現を得られるのではなく、それぞれのベクターに至適投与量があることが明らかとなった。ウイルスベクターごとに最高の発現を得られるウイルスベクター量を決定し、以下の実験にその濃度を用いることとした (Kadoyama, Funakoshi *et al*, *in preparation*)。

(2) 投与方法による HGF 発現の比較 (各ベクターごとに) — 脊髄中レベルに注目して

各ベクターを上記決定した至適量投与後、各発現を β -Gal 染色法、免疫染色法、および ELISA 法で解析した。

① 脊髄中への直接投与方法

HSV1, AAV2, AAV4 いずれのベクターも程度に差があるものの、LacZ および HGF の発現を認めた。局所最大 HGF 発現レベルが高かったのは、AAV2 であった。一方、投与部位からの拡散については、HSV1 が最もよく、次いで AAV2 がいい結果であった。これに対して、我々の条件では AAV5 投与では十分な発現を得られなかった。今後の検討が必要と考えられた。発現細胞は、主に神経細胞であった。

② 髄腔内単回投与方法

上記結果をふまえ、HSV1 および AAV2, AAV4 に焦点をしばり解析を施行した。その結果、特に HSV1 と AAV2 で良好な結果を得た。脊髄局所投与の時と異なり、

HSV1 および AAV2 については比較的脊髄全般にわたって発現を認めた。一方、AAV4 は他の 2 つのベクターに比べると発現レベルが低い傾向を認めた。

(3) 投与方法による HGF 発現の比較 (各ベクターごとに) — 脳内レベルおよび脳脊髄液中レベルに注目して

HSV1 および AAV2, AAV4 について特に詳細に解析をすすめた。その結果、いずれのウイルスベクターを用いた場合も、脊髄レベルと比較して脳内発現レベルが低いこと、さらに脳脊髄中のレベルも十分なレベルには達していなかった。

(4) 発現持続性に注目した解析

発現持続性について評価すると、特に HSV1 の投与例では、約 4 週間程度で発現が低下する傾向があることが明らかとなった。

D. 考察

(1) 各種ウイルスベクターおよびその投与方法について

脊髄への直接投与方法と髄腔内投与方法いずれの方法でも、解析したウイルスベクターの中では HSV1 と AAV2 がラット脊髄への HGF 供給には適していることが示唆された。一方で、脳内レベルはどちらの方法を用いても十分なレベルまで HGF を供給できないことが明らかとなった。脊髄内直接投与と髄腔内投与では、前者が脊髄損傷を惹起することが避けられないことを考慮すると、後者が better と示唆される。しかし、脳内レベルが十分でなかったことは、腰部からの髄腔内投与では、ラット脳内への供給には不十分であるといえる。この解決には、ウイルスベクターのプロモーターを改変して、発現レベルをあげることで、髄液中に於けるウイルスベクター分布が腰部に

くらべて頭蓋内で低いことをカバーする方法と、腰部に加えて脳室内への投与を加える方法が考えられる。今回の結果からは、脳室内のみの投与では逆に ALS の主な症状発現部位である腰部への供給に不利と考えられる。

もう一つ今回明らかになった、ウイルスベクターを用いた HGF 供給法での問題点は、発現期間である。HSV1 を用いた方法では、約4週間程度で発現が低下する傾向が認められたが、ALS が数年という単位で進行する変性疾患であることを考慮すると、発現期間の改善が必要である。解決方法としては、ウイルスベクターの複数回投与方法も考えられるが、免疫の観点からは不利であろう。一方で、ウイルスベクターで用いるプロモーターの改変は有力な方法の1つと考えられる。今回用いた HSV1 ウイルスベクターでは CMV プロモーターを用いたが、このプロモーターは発現レベルを比較的高くできる一方で、ウイルスプロモーターであるために mammalian における長期間にわたる発現には不利であることが知られる。実際、RS Coffin らの検討では、mammalian のプロモーターを用いることで、HSV1 による供給分子の発現期間と細胞特異性の改善が行えることが報告されている。ただし、通常ウイルスプロモーターに比較して mammalian のプロモーターは、発現強度の点では不利である。これらの兼ね合いを考慮して最適な組み合わせを選択する必要がある。別の方法としては、HSV1 ウイルスベクターでは、挿入できる遺伝子サイズがかなり大きい。そこで、IRES 等で tandem に目的遺伝子を挿入する方法や、外因性に制御できる形での stop や致死遺伝子を挿入する等の工夫も可能と考えられ、今後の工夫次第では大きな改善の可能性を残

している。また、AAV2 は、非病原性ウイルスを基盤にしている点や米国で臨床への適用に近づいている背景を考えると、実質性があると言える。しかし、今回の方法ではまだ不十分であることを踏まえ、新たな改善こそが、最適な ALS への HGF 供給法開発には必要である。

(2) 現況の最善の HGF 供給法について

これまでの東北大学神経内科青木、糸山らとの共同研究から、リコンビナント HGF 蛋白質の髄腔内投与により、ALS-Tg ラット (Tg-SOD1^{G93A} ラット) の運動ニューロン死を濃度依存的に抑制し、運動機能を改善し、寿命延長効果を持つことが明らかとなっている (Ishigaki, Aoki et al, 2007)。さらに、発症時からのリコンビナント HGF 蛋白質の髄腔内投与でも運動ニューロン数の低下を抑制し、寿命を延長するようかがあることが明らかとなり、現時点でこの方法が ALS 治療をめざした HGF 供給法として最適であると言える。さらに、HGF 蛋白質の持続髄腔内投与方法には、以下のような大きな利点がある。

- (a) 神経系への限定的供給方法である (全身性の副作用等の心配がいない)
- (b) いつでも開始し、いつでも停止できる。
- (c) 患者1人1人の病態時期や個性にあわせて HGF 蛋白質濃度を個々に調節することが可能である。
- (d) 東北大学、慶應義塾大学、大阪大学／旭川医科大学、クリングルファーマ社の共同ですすめている 霊長類へのリコンビナント HGF 蛋白質の持続髄腔内投与の安全性試験および薬物動態試験が順調にすすんだ。 したがって、HGF 蛋白質の持続髄腔内投与方法こそが、現時点で最善の ALS 治療法であり、今まさにその臨床適用へ直前の段階にあると言える。

(3) 近未来の HGF 供給法の最適化をめざして一方で、持続髄腔内投与法は、感染のリスクが0ではないという点で、また、患者さんの便利性を考えると、単回投与（もしくはできるだけ少ない投与回数）で終了できる方法の開発は、将来的に重要となると考えられる。この開発にはウイルスベクター自体の改変を必要とすることから、今後数年がかりでのプロジェクトとなることが予想される。

E. 結論

各種ウイルスベクター（HSV1, AAV2, AAV4, AAV5）を用いて HGF のラット神経系への供給法としての可能性について解析した。いずれのベクターも脊髄への供給は、一定レベルまで可能であったが、脳脊髄に分布する運動ニューロンへの広い供給には、現方法では不十分であった。現時点での ALS への HGF の供給法としては、HGF 蛋白質の持続髄腔内投与法が最適である。

F. 健康危険情報

特記事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Funakoshi H. and Nakamura T: Hepatocyte growth factor (HGF): Neurotrophic functions and therapeutic implications for neuronal injury/diseases. **Current Signal Transduction Therapy**, 2011, in press.
- ② Kadoyama K, Funakoshi H. et al.: Therapeutic Potential of Hepatocyte Growth Factor for Treating Neurological Diseases **Current Drug Therapy**, 2011, in press.
- ③ Benkhoucha M, Funakoshi H. et al.: Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25⁺Foxp3⁺ regulatory

T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)**, 107(14): 6424-6429, 2010

- ④ Shang J, Funakoshi H. et al.: Strong neurogenesis, angiogenesis and anti-fibrosis of hepatocyte growth factor in rats brain after transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO). **J Neurosci Res**, 89(1), 86-95, 2010.
- ⑤ Shang J, Funakoshi H. et al.: Anti-apoptotic and anti-autophagic effects of GDNF and HGF after transient MCAO in Rats. **J Neurosci Res** 88(10): 2197-2206, 2010
- ⑥ 野間 さつき、船越 洋、中村 敏一：肝細胞増殖因子(HGF) 日本臨床 広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査（第7版）増刊号：121-130, 2010
- ⑦ 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. 95-113, 2010.

2. 学会発表

- ① 船越 洋、中村 敏一、難治性神経疾患に対するHGF の機能—新しい治療法開発をめざして。レドックス生命科学第170委員会第20回研究会。2010. 3.（招待講演）
- ② その他

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

本年度本プロジェクトに関する新規特許出願を行っていない。

2. 実用新案登録

特記なし。

ALS の免疫療法における野生型 SOD1 の応用性について

研究分担者：漆谷 真¹⁾

研究協力者：大野美樹^{1,2)}、竹内成子¹⁾、井戸明美¹⁾、高橋良輔²⁾、

1) 滋賀医科大学・分子神経科学研究センター

2) 京都大学 神経内科

研究要旨

家族性 ALS に関連する変異 SOD1 は 140 種類以上に及び、タンパクミスフォールディングを分子基盤とする多彩なカスケードを経て、運動ニューロン変性を引き起こすが、近年ミスフォールドした野生型 SOD1 は多くの変異 SOD1 と類似の異常な化学物性を示すことが明らかとなっている。我々は昨年度、野生型のアポ型 SOD1 ワクチンが G93A 型 SOD1 トランスジェニックマウスの寿命を有意に延長することを明らかにしたが、本年度は野生型 SOD1 ワクチンが脊髄と末梢の獲得免疫系に及ぼす影響を検討した。SOD1 ワクチン接種群では運動ニューロン周囲に IgG と結合体を形成する C1q の沈着が増強しており、残存運動ニューロン数が生食対照群に比較し優位に高かった。末梢血の解析では、G93A SOD1 ワクチンでは TNF α と IFN γ のタンパク量が野生型 SOD1 ワクチンに比し有意に高く、Th2/Th1 比を示す IgG1/IgG2c 比でも野生型 SOD1 は変異 SOD1 に比し有意に低く、野生型 SOD1 ワクチンでは変異型に比しより Th2 環境が誘導されやすいことが分かった。さらに real-time PCR 解析により脊髄の IL4/TNF α 比と IL4/IFN γ 比がワクチン群で未治療群に比し有意に上昇していた。さらに IFN γ の腹腔内持続投与によって、発症促進の傾向が認められた。以上より、野生型アポワクチンは変異型によらない有望な治療法となる可能性がある。さらに、ワクチンの投与経路やアジュバントの調整によりさらに有効性が高まる可能性がある。我々はさらに変異 SOD1 特異認識モノクローナル抗体である C4F6 の細胞移行性を高めるため C4F6 に TAT を付加し SHSY-5Y 細胞への取り込みと、細胞内変異 SOD1 との結合を確認した。今後髄腔内投与の効果を検討する。

A.研究目的

家族性 ALS に関連する変異 SOD1 は 140 種類以上に及び、タンパクミスフォールディングを分子基盤とする多彩なカスケードを経て、運動ニューロン変性を引き起こすが、近年ミスフォールドした野生型 SOD1 は多くの変異 SOD1 と類似の異常な化学物性を示すことが明らかとなっている。本研究では野生型 SOD1 の免疫療法における応用性を検討するため、変異 SOD1 トランスジェニックマウスに対するワクチンとしての効果とその作用機序を検討し、今後の応用性について検討する。さらに近年孤発性

ALS における SOD1 の関与を示す報告がなされた、本論文で用いられたモノクローナル抗体 C4F6 を用いた抗体療法と抗体修飾によるアクセシビリティの改善を試みた。

B.研究方法

低発現型 G93A SOD1 トランスジェニックマウスに対し、大腸菌で精製した非金属配位状態の野生型 SOD1 と G93A 型 SOD1 をワクチン投与し、発症時期と寿命を調べた。また治療経過中の末梢血の IgG サブクラスの抗体価を ELISA 法で、tumor necrosis factor (TNF), interferon

gamma (IFN γ), interleukin 4 の測定を microbeads 法で行い、脊髄の免疫関連分子の発現について real time PCR と免疫組織科学的解析を行った。次に IFN γ の末梢循環と中枢神経系での作用を調べるため、Alzet ポンプを用いて IFN γ の腹腔内と髄腔内持続投与を行った。

一方、アポ型 G93A 変異 SOD1 を抗原として作製したモノクローナル抗体 C4F6 を発症時期の G93A トランスジェニックマウスに髄腔内投与を行い進行抑制効果について調べ、さらに IgG 重鎖の糖鎖部分に HIV-TAT 配列を付加し、培養細胞 SHY-5Y に対する細胞透過性について検討した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、プロトコールを滋賀医科大学・動物実験委員会の審査をうけ承認された物である。ヒト変異遺伝子を用いているが、特定の個人を同定できる物ではなく、また遺伝子組換え実験のプロトコールは倫理委員会の審査を受け承認されている。

C.研究結果

野生型、変異型 SOD1 ワクチンとも発症時期を有意に遅延させたが、寿命延長効果はむしろ野生型ワクチンで有意差が認められた。SOD1 ワクチン接種群では運動ニューロン周囲に IgG と結合体を形成する C1q の沈着が増強しており、残存運動ニューロン数が生食対照群に比較し優位に高かった。末梢血の解析では、G93A SOD1 ワクチンでは TNF α と IFN γ のタンパク量が野生型 SOD1 ワクチンに比し有意に高く、Th2/Th1 比を示す IgG1/IgG2c 比でも野生型 SOD1 は変異 SOD1 に比し有意に低く、野生型 SOD1 ワクチンでは変異型に比しより Th2 環境が誘導されやすいことが分かった。さらに real-time PCR 解析により脊髄の IL4/TNF α 比と IL4/IFN γ 比がワクチン群で未治療群に比し有意に上昇していた。さらに IFN γ の腹腔内持続投

与によって、発症促進の傾向が認められた。

C4F6 の髄腔内投与は D3H5 や生食対照群に比べ有意に進行を抑制し、その効果は Fc 依存性であった。TAT を付加した C4F6 は SHSY-5Y 細胞内に良好に取り込まれた。さらに EGFP タグを付加した SOD1 を過剰発現させた SHSY-5Y 細胞の細胞内で G93A 型変異 SOD1 とのみ反応し、TAT-IgG が細胞内抗体として作用することを確認した。現在髄腔内投与の効果を検討中である。さらに IgG の低分子化を目指し、ハイブリドーマから IgG 可変領域の長鎖と短鎖の cDNA をクローニングし、さらに TAT と FLAG タグを付加した short chain of Fragment variance (scFv) のコンストラクションを行った。今後組換えタンパク質を精製し、抗体活性を確認する。

D.考察

野生型アポ SOD1 は変異 SOD1 トランスジェニックマウスに対して発症を遅延することによって、寿命を有意に延長した。中枢神経系における抗体産生と Th2 有意の保護的免疫は野生型、変異型 SOD1 ワクチンの両方で認めたが、末梢循環系の TNF α や IFN γ の産生量は変異型で有意に高く、末梢における獲得免疫系の反応がワクチンの効果に影響することが判明した。今後、抗原部位の適切な同定とアジュバントスイッチなどによる Th2 系の誘導を念頭においたワクチン戦略が必要である。また TAT-付加抗体治療は、細胞内タンパク質への抗体療法の可能性を有しており、今後適切な抗体のスクリーニング戦略や低分子化、シグナル付加によりより効果的な治療オプションと成り得る。

E.結論

変異 SOD1 関連の家族性 ALS 患者において野生型 SOD1 を用いた免疫療法は有望であり、今後の抗原やアジュバントの改良により有効性を高める必要がある。

F.健康危険情報

該当無し

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

1. Takeuchi S, Fujiwara N, Ido A, Oono M, Takeuchi Y, Tateno M, Suzuki K, Takahashi R, Tooyama I, Taniguchi N, Julien JP, Urushitani M. Induction of protective immunity by vaccination with wild-type apo SOD1 in the mutant SOD1 transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010, 69, 1044-1056
2. Ezzi SA, Larivière R, Urushitani M, Julien JP. Neuronal overexpression of chromogranin A accelerates disease onset in a mouse model of ALS. *J Neurochem* 2010, 115:1102-1111
3. Urushitani M, Sato T, Bamba H, Hisa Y, Tooyama I. Synergistic effect between proteasome and autophagosome in the clearance of poly-ubiquitinated TDP-43. *J Neurosci Res* 2010, 88:784-797.
4. Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP, Appel SH. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* 2010, 58, 231-43 .
5. Yanagisawa D, Shirai N, Amatsubo T, Taguchi H, Hirao K, Urushitani M, Morikawa S, Inubushi T, Kato M, Kato F, Morino K, Kimura H, Nakano I, Yoshida C, Okada T, Sano M, Wada Y, Wada KN, Yamamoto A, Tooyama I. Relationship between the tautomeric structures of curcumin derivatives and their Abeta-binding activities in the context of therapies for Alzheimer's disease. *Biomaterials.* 2010, 31:4179-4185
6. 漆谷 真. 免疫療法による ALS の分子標的

治療. 医学のあゆみ「ALS Update」 2010, 235; 255-260

7. 漆谷 真. TDP-43 の異所性局在機構. 最新医学「神経変性疾患における TDP-43」 2010, 65; 1588-1596
8. 漆谷 真. 家族性 ALS マウスモデルの免疫療法. 実験医学増刊号「脳神経系の情報伝達と疾患」 2010, 28, 799-807
2. 学会発表
9. 第 107 回関西実験動物研究会; 難病克服への実験動物を用いたアプローチ 招待講演「筋萎縮性側索硬化症研究におけるモデル動物のインパクト」 2010 年 9 月 大津
10. Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会) シンポジウム; 若手研究者が展開する筋萎縮性側索硬化症研究の将来展望 (兼シンポジウムオーガナイザー) 「ALS の免疫療法」 2010 年 9 月 神戸
11. 漆谷 真、佐藤尚志. TDP-43 の異所性局在と ALS の病理現象との関連について」第 51 回 日本神経学会総会 2010 年 5 月 東京
12. 第 22 回日本神経免疫学会 シンポジウム; 神経と免疫のクロストーク 「筋萎縮性側索硬化症の免疫療法について」 2010 年 3 月 東京
13. 第 31 回神経組織培養研究会シンポジウム; 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態生理における TDP-43/FUS 研究 「TDP-43 の異所性局在と凝集体形成の病的意義について」 2010 年 3 月 東京
14. 第 1 回 熊本 ALS フォーラム 特別講演「ALS 治療標的の解明現状について」 2010 年 3 月 熊本

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

該当なし

2.実用新案登録

3.その他

TDP-43 凝集体形成による神経細胞毒性の誘導

研究分担者：長谷川成人（東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム）

研究協力者：山下万貴子¹⁾、野中 隆¹⁾、亀谷富由樹¹⁾、細川雅人²⁾、秋山治彦²⁾

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム

²⁾ 東京都精神医学総合研究所 老年期精神疾患研究チーム

研究要旨

TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症（ALS） および 前頭側頭葉変性症（FTLD-U） に出現するユビキチン陽性細胞内封入体の主要構成成分である。TDP-43 凝集体を形成する細胞モデルを用いて、TDP-43 凝集体形成と神経変性の関係について検討した。その結果、凝集体形成細胞において BrdU の取り込みがほぼ完全に阻害され、RNA ポリメラーゼ II 等の転写因子の凝集体への局在が観察された。TDP-43 凝集体は細胞の増殖阻害や転写制御の異常を引き起こすと考えられる。

A.研究目的

TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) や前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FTLD)患者脳に認められるタウ陰性ユビキチン陽性封入体の主要構成成分として同定された。家族性および孤発性 ALS において TDP-43 の遺伝子変異が多数発見されたことから、ALS における神経変性の実行犯が TDP-43 であることが確実となった。TDP-43 が ALS の分子病態発症機序に基づいた根本治療の中心的ターゲットと言える。一方で、TDP-43 の異常病変は、ALS 患者において、脊髄だけでなく、中枢神経系の広い領域に広がって見られることや、ALS/FTLD 以外の疾患(アルツハイマー病やレビー小体型認知症など)でもかなりの割合において TDP-43 の異常病変が認められることも報告されている。したがって、TDP-43 異常蓄積の制御法を探ることは、ALS はもちろんのこと、TDP-43 の蓄積を伴う各種神経変性疾患の治療法開発においても重要である。昨年まで TDP-43 の核移行シグナル (78-84 残基) およびその類似配列の欠損変異

体を培養細胞に発現させ、さらにプロテアソーム阻害剤処理を行うと、核内あるいは細胞質凝集体が出現すること、TDP-43 の C 末端断片を GFP 融合タンパク質として発現することにより、リン酸化陽性、ユビキチン陽性凝集体が観察されることを報告した。本年度はこれらの細胞モデルを用いて、TDP-43 凝集体形成と神経変性の関係について検討した。

B.研究方法

ヒト神経細胞株 SH-SY5Y に、全長 TDP-43、あるいは患者脳においてその蓄積が確認されている TDP-43 の C 末断片を発現した。遺伝子導入から 3 日後の細胞において、細胞内における TDP-43 の局在や凝集体形成を観察すると共に、BrdU 取り込み能を測定することにより細胞増殖能を評価した。また、subG1 解析により、細胞周期についても検討した。さらに、共焦点レーザー生物顕微鏡にて凝集体と共局在する因子の検索を行った。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は当研究所の専門委員会に遺伝子組換え生物等の使用等に関わる申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

C. 研究結果

全長 TDP-43 を発現した細胞においては、空ベクターを発現したコントロール細胞に比べ、BrdU の取り込みが半分程度まで減少していた。この細胞の細胞周期解析をおこなった結果、G2/M 期において growth arrest が起こっていることが確認された。この結果は、全長 TDP-43 過剰発現細胞では細胞周期の異常が引き起こされ、増殖抑制が誘導されていることを示唆する。一方で、TDP-43 の C 末断片を発現させ、凝集体形成を誘導した細胞においては、BrdU の取り込みがほぼ完全に阻害されていた。すなわち、凝集体形成細胞では細胞増殖が著しく抑制されていることが示された。また、これらの細胞では、遺伝子の転写制御に関与する RNA ポリメラーゼ II やその他いくつかの基本転写因子が凝集体に局在することが観察され、凝集体形成時にそれらが巻き込まれる可能性が示唆された。さらに、実際の患者脳においても同様の現象が観察されるか検討した結果、FTLD の TDP-43 陽性構造物に RNA ポリメラーゼ II が共局在することが確認された。以上の結果より、TDP-43 凝集体の形成は細胞の増殖阻害および転写制御の異常を引き起こすことが明らかとなった。

D. 考察

全長 TDP-43 の過剰発現については、これまでその毒性を示唆する報告もいくつかあったが、細胞周期解析の結果から、G2/M 期において growth arrest を引き起こすことが明らかとなった。TDP-43 を過剰発現する Tg マウスにおい

て、封入体形成があまり見られないにもかかわらず、運動機能の異常を発症すると結果が複数報告されているが、この現象を説明するものかもしれない。また TDP-43 凝集体は、細胞周期へ障害を与えるのではなく、RNA ポリメラーゼ等の転写因子などに影響して、細胞の機能異常を引き起こし、細胞死や変性がおこるものと考えられる。TDP-43 proteinopathy の発症、病態進行に関与すると考えられる。

E. 結論

本研究において使用した TDP-43 蓄積細胞モデルは、異常 TDP-43 が細胞内に凝集するだけでなく、RNA ポリメラーゼ等の基本転写因子に影響を与え、細胞増殖など、基本的な活動に障害を与え、細胞死、変性を導くモデルであることが示された。本モデルを用いることにより、TDP-43 の凝集、蓄積を阻害し、神経変性を阻止する化合物の探索が可能になると期待される。今後、実験動物などを用いて個体への効果を検証していく必要はあるが、本モデルは薬剤探索の最初の評価系として有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem.* 285: 34885-98, 2010.
- 2). Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I. Argyrophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study. *Psychogeriatrics* 10: 69-76, 2010.

- 3). Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Effect of topographical distribution of alpha-synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 120: 789-801, 2010.
 - 4). Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 120: 55-66, 2010.
 - 5). Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H. TDP-43 M337V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Intern Med* 49: 331-4, 2010.
 - 6). Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M. Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding. *J Mol Biol* 395: 445-56, 2010.
 - 7). Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Nonaya M, Fujishiro H, Akiyama H (2010) Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30:170-181
 - 8). 山下万貴子、野中隆、長谷川成人. (2010) TDP-43 凝集体形成阻害化合物の検索 最新医学 65: 1597-1602
 - 9). 野中隆、長谷川成人. (2010) 細胞内 TDP-43 蓄積のメカニズム 最新医学 65: 1572-157
 - 10). 長谷川成人、新井哲明. (2010) TDP-43 蓄積症の発見 最新医学 65:1558-1565
- ## 2.学会発表
- 1). Hasegawa M. Therapeutic approaches targeting tau protein for neurodegenerative diseases. International Seminar Aging, Tau Protein and Dementias at French Embassy, Tokyo [2010/10/20]
 - 2). Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H. Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA[2010/10/06]
 - 3). Masuda M, Taniguchi S, Suzuki N, Hasegawa M. Therapeutic approaches of targeting pathological tau protein for neurodegenerative diseases. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe,Japan [2010/09/03]
 - 4). Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Ikeda K, Akiyama H. Proteomic analyses of TDP-43 proteinopathy. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe,Japan [2010/09/04]
 - 5). 長谷川成人. ALS の分子病態解明と治療に向けて. 日本神経治療学会, シンポジウム 2, 神経治療学のブレークスルー:神経疾患の新規治療, 横浜 [2010/07/21]
 - 6). 長谷川成人. 生化学的方法と神経病理. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, シンポジウム 2 [神経病理の更なる発展に向けて], 東京 [2010/04/24]
 - 7). 長谷川成人. 筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭葉変性症を特徴づける封入体の構成タンパク質、TDP-43. 第 99 回日本病理学会総会, ワークショップ 12「神経変性疾患と封入体」, 東京 [2010/04/29]
 - 8). 長谷川成人. TDP-43 の発見から動物モデルまで. 第 51 回日本神経学会総会, シンポジウム 13「筋萎縮性側索硬化症の病因 TDP-43 および FUS/TLS 研究の最前線」, 東京 [2010/05/22]

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得 特になし
- 2.実用新案登録 特になし
- 3.その他 特になし

ALS における自然免疫経路の関与

研究分担者：山中 宏二（理化学研究所脳科学総合研究センター・チームリーダー）

研究協力者：山下 博史^{1,2)}、渡辺 祥司¹⁾、藤森 典子¹⁾、井口 洋平³⁾、熱田 直樹³⁾、
田中 章景³⁾、祖父江 元³⁾

- 1) 理化学研究所脳科学総合研究センター・運動ニューロン変性研究チーム
- 2) 京都大学医学部神経内科、3) 名古屋大学医学部神経内科

研究要旨：ALS モデルマウスのグリア細胞における分子病態解明の一環として、昨年度に引き続きミクログリアが関与する自然免疫経路の検討を行った。本年度は、孤発性 ALS 頸髄試料における 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。さらに、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 SOD1^{G93A} マウスとの交配実験を行い、TRIF 依存性のシグナル経路抑制により疾患進行の加速がみられ、マウスの生存期間が著しく短縮した。疾患進行の加速はケモカインの発現抑制とよく相関していた。ALS モデルにおいて自然免疫経路の破綻はその疾患進行を加速すると考えられる。

A. 研究目的

ALS モデルマウスにおいてグリア細胞由来の細胞障害性分子の異常放出がみられる原因の一つとして自然免疫経路の活性化が考えられる。自然免疫は病原体の侵入などに対して初期に発動される生体応答であり、マクロファージや樹状細胞に発現する Toll-like 受容体(TLR) を介して病原体の構成成分を認識し、炎症反応や免疫反応が応答される。神経系ではおもにミクログリアに TLR の発現がみられ、感染防御機構に重要な役割を果たしている。変異 SOD1 マウスの病巣では、感染とは関係なく疾患の進行に伴って TLR2 の発現亢進が報告され、ALS 病態における自然免疫経路の関与が示唆されている。そこで、本研究では ALS モデルマウスにおける自然免疫経路を抑制することにより疾患進行への影響とその分子機構の異常を検討する。

B. 研究方法

まず、孤発性 ALS の凍結頸髄試料の DNA マ

イクロアレイによる解析から自然免疫関連分子の発現異常を検討した。さらに ALS モデルである SOD1^{G93A} マウスと Toll-like 受容体を介したシグナル伝達に必須の分子である MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88), TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN β) ノックアウトマウスとの 3 重交配実験を行い、疾患の進行速度や生存期間延長の効果を検討した。MyD88、TRIF のノックアウトマウスとの交配により、すべての TLR シグナル伝達を特異的に抑制することが可能である。

(倫理面への配慮) 本研究におけるヒト由来試料の使用は、名古屋大学および理化学研究所研究倫理委員会において承認されている。

C. 研究結果

孤発性 ALS 脊髄病巣における mRNA の網羅的解析を行った。これらは、すべての細胞群における遺伝子発現の総和であるため、細胞群特異的な遺伝子発現の変化を解析するため、マウ

スにおける細胞群特異的なトランスクリプトームを樹立して解析に用いた。患者脊髄で変動している178個の遺伝子についてマーカーと同様にマウスホモログにおける細胞群別発現量を算出し、その値をもとに主に発現している細胞群別に分類した。その結果、約60%の遺伝子がグリア細胞由来と考えられ、発現上昇遺伝子にはIba-1などのミクログリアマーカーに加えて、自然免疫に関与するToll-like受容体TLR1、2、7、CD14や補体C1qなどの上昇がみられ、自然免疫経路の関与が認められた。

さらに、MyD88⁺、TRIF⁺とSOD1^{G93A}マウスとの3重交配実験を2通り行った。SOD1^{G93A}マウスと比較して、SOD1^{G93A}/MyD88⁺/TRIF⁺およびSOD1^{G93A}/TRIF⁺において罹病期間が約50%短縮し、疾患進行の著しい加速と生存期間の有意な短縮が見られた。

(平均生存期間、SOD1^{G93A}: 162日; SOD1^{G93A}/TRIF⁺: 137日; SOD1^{G93A}/MyD88⁺/TRIF⁺: 137日)。また、SOD1^{G93A}/TRIF⁺およびTRIF⁺の状況下で、MyD88のコピー数は生存期間に影響しないことを確認した。さらに、TRIFを欠失した脊髄病巣ではケモカイン(CCL5、CXCL10)の著しい発現低下を認めた。

D. 考察

MyD88は10種類以上あるTLRのうちTLR3以外のシグナル伝達に関与するが、TRIFはTLR3、4を介したシグナル伝達に関与する。MyD88よりむしろTRIF依存性経路がALSモデルの疾患進行の制御因子の一つである可能性が示唆された。

E. 結論

孤発性ALS病巣のグリア細胞においても、自然免疫経路の賦活が起こっていることが示唆された。また、ALSモデルにおいて自然免疫経路の破綻はその疾患進行を加速すると考えら

れる。今後、これらのマウスの脊髄病巣におけるグリア細胞の活性化の検討や、TRIF欠損とケモカイン発現低下により疾患進行が加速する分子メカニズムの詳細な検討を行い、その分子病態を明らかにする。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Furukawa Y, Kaneko K, Yamanaka K, Nukina N: Mutation-dependent Polymorphism of Cu, Zn-Superoxide Dismutase Aggregates in the Familial Form of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Biol Chem*, 285: 22221-22231, 2010.
2. Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V, Cleveland DW: Misfolded Mutant SOD1 Directly Inhibits VDAC1 Conductance in a Mouse Model of Inherited ALS. *Neuron*, 67: 575-87, 2010.
3. Lasiene J, Yamanaka K. Glial cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Res Int in press*
4. 山中宏二: 神経変性疾患における細胞死研究のパラダイムシフト *実験医学増刊* 28: 1188-94, 2010.
5. 山中宏二、遠藤史人: ALSの病態—非細胞自律性の神経細胞死 *医学のあゆみ* 235: 241-245, 2010.

2. 学会発表

1. 山中宏二: 筋萎縮症側索硬化症と封入体第99回日本病理学会, 東京(2010)
2. Yamanaka, K: Protein degradation in neurodegenerative diseases. *The 87th Japan Physiology Meeting*, Morioka (2010) シンポジウム
3. Yamanaka, K: The role of glial cells in ALS. *Neuro 2010*, Kobe (2010) シンポジウム

4. Yamanaka, K.: Active roles of glial cells in neurodegenerative disease. *International Conference on Systems in Medicine and Biology*, Kharagpur, India (2010) invited lecture

5. 山中宏二: 神経変性疾患における非細胞自律性の神経細胞死. *BMB2010* (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会) 神戸(2010) ワークショップ

6. 渡辺祥司、金子貢巳、山中宏二: *BMB2010*, 神戸 2010.12

7. 山下博史、藤森典子、片岡礼音、山中宏二: 第51回日本神経学会総会, 東京 2010.5.

8. 築地仁美、片岡礼音、山中宏二: RNAフロンティアミーティング2010, 静岡 (2010)

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

Ⅲ. 研究報告(研究協力者)

ALS モデルマウスにおける骨髄移植と顆粒球コロニー刺激因子投与併用効果

研究協力者 阿部 康二 岡山大学医学部神経内科 教授

研究要旨

ALSモデルマウスに野生型マウスの骨髄移植とGCSF投与を併用した場合の効果を検討した。骨髄移植+GCSF併用療法ではvehicle投与群に比べ運動機能低下を有意に遅延し、生存期間を有意に延長した。また、組織学的検討では、骨髄移植+GCSF併用療法群ではvehicle投与群に比べ脊髄前角の運動ニューロン減少が有意に抑制されていた。骨髄移植+GCSF併用療法はALS治療として有用である可能性が示された。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症は運動ニューロンが選択的に変性し、このため筋萎縮・脱力を来し数年の経過で死に至る神経変性疾患である。しかし病態の解明は十分でなく、いまだ有効な治療法はなく、新規治療法の開発が強く求められる。

ALS モデルマウスへの野生型マウスの骨髄移植単独療法、あるいは顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)単独投与は、わずかながらそれぞれ神経保護効果があることが示されている。また、これまで ALS 患者への GCSF 投与も行われているが治療効果は明らかではなかった。今回我々は、ALS モデルマウスに野生型マウス由来骨髄の移植と GCSF 投与を併用した場合の治療効果を検討した。

B.研究方法

G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウス (ALS モデルマウス) を、vehicle 投与群、GFP マウスの骨髄移植単独療法群、GCSF 単独投与群、GFP マウスの骨髄移植+GCSF 投与群の 4 群に分けて治療を行った。骨髄移植は ALS 発症直後である 91 日齢の ALS モデルマウスに行い、ALS モデルマウスに合計 10Gy の放射線照

射を行った後に GFP マウスから採取した野生型 SOD1 骨髄細胞をに静注した。GCSF は骨髄移植翌日より 0.6mg/kg を隔日で 10 回投与した。臨床データとして生存期間と Rotarod test を評価し、組織学検討のため各群 130 日齢に L4 腰髄をサンプリングした (n=5-6)。

(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、利用動物数を極力減らすように努めた。

C.研究結果

ALS モデルマウスへの骨髄移植単独あるいは GCSF 投与単独療法では vehicle 投与群に比べ有意に生存期間は延長しなかったが、骨髄移植+GCSF 併用療法では有意に生存期間を延長した。また骨髄移植+GCSF 併用療法は vehicle 投与群に比べ運動機能低下を有意に遅延した。組織学的検討では、骨髄移植単独あるいは GCSF 投与単独療法群において vehicle 投与群に比べ L4 腰髄前角の運動ニューロン減少が有意に抑制されていたが、骨髄移植+GCSF 併用療法は骨髄移植、GCSF 単独療法群に比べ有意

に運動ニューロン減少を抑制した。また移植された GFP 陽性骨髄細胞は L4 腰髄組織において後角よりも前角において有意に認め、骨髄移植単独療法群よりも骨髄移植＋GCSF 併用療法群において有意に増加していた。GFP 陽性骨髄細胞の多くは Iba-1 陽性であり、PSA-NCAM 陽性細胞も認められた。

D. 考察

骨髄移植と GCSF 投与の併用は、ALS モデルマウスの運動障害進行を遅延し、生存期間を延長した。骨髄移植と GCSF 投与の併用により、脊髄組織において移植された骨髄細胞が有意に増加しており、治療効果発現に関連していることが示唆された。

E. 結論

骨髄移植と GCSF 投与の併用は、ALS モデルマウスの運動障害進行を遅延し、生存期間を延長した。骨髄移植＋GCSF 併用療法は ALS 治療として有用である可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究報告

1. 論文発表

Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R & Kawakami H: Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. Nature 2010, 465, 223-226.

Morimoto N, Nagai M, Miyazaki K, Ohta Y, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Asanuma M & Abe K: Induction of parkinsonism-related proteins in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. J Neurosci Res 2010, 88, 1804-1811.

2. 学会発表

Nobutoshi Morimoto, Kazunori Miyazaki, Tomoko Kurata, Yoshio Ikeda, Tohru Matsuura, Koji Abe Induction of alpha-synuclein, PINK1, DJ-1 in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. 7th Annual Meeting of ASMRM and 10th J-mit (Fukuoka, Japan)

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

キサントニン酸化還元酵素(XOR)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しての ALS 治療薬

研究協力者：加藤 信介 鳥取大学医学部脳神経医科学講座脳病態医科学分野・准教授

共同研究者：加藤 雅子 鳥取大学医学部分子病理学分野

西野 武士 米国カルフォルニア大学生化学分野

研究要旨

キサントニン脱水素酵素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して化合物；2-(3-シアノ-4-イソブトキシフェニル)-4-メチル-5-チアゾールカルボン酸 [2-(3-cyano-4-isobutoxyphenyl)-4-methyl-5-thiazolecarboxylic acid] を、ALS モデル動物である B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur (G1H-G93A トランスジェニックマウス) に、生後80日より5mg/kgを連日経口投与した。プラセボとしては化合物の溶剤であるメチルセルロースを用いた。臨床症候学的結果については、プラセボより、有意な発症遅延効果、生存期間延長効果、病悩期間延長効果を認めた。運動負荷試験の結果については、伸展反射試験・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試験に関して、プラセボより、有意な有効効果を示した時期が必ず存在していた。病理組織学的解析結果では、生後115日齢においてプラセボに比較して有意な残存神経細胞の存在を認めた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（以下、ALS）の新規経口治療薬として、キサントニン酸化還元(XOR)酵素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：2-(3-シアノ-4-イソブトキシフェニル)-4-メチル-5-チアゾールカルボン酸 2-(3-cyano-4-isobutoxyphenyl)-4-methyl-5-thiazolecarboxylic acid が、顕著に優れたALS治療作用を示すことをALS動物モデルにおいて示し、当該化合物を特徴とするALS新規経口治療薬の開発とその基盤研究を研究目的とする。

B. 研究方法

1. 薬剤：

1) XOR 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：TEI-6720: 2-(3-シアノ-4-イソブトキシフェニル)-4-メチル-5-

チアゾールカルボン酸を帝人ファーマーより供与を受けた。

2) XOR 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として、アロプリノールを使用した。

3) プラセボとして、上記薬剤の溶剤としてのメチルセルロースを使用した。

2. 投与方法：化合物およびアロプリノールをメチルセルロース（溶剤）に溶解させ、5mg/kg を1日1回経口的に投与し、プラセボは、メチルセルロースのみを使用した。

3. 実験動物：雄の B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur (G1H-G93A) トランスジェニックマウス、JR2726, Jackson Laboratory, Bar Harbor, 米国) と雄の野生型同腹仔マウスを使用した。

4. マウスの薬剤効果評価：

1) 臨床学的評価は、6段階の症候学的ステージ

検査(0度=正常、1度=不活発性、小刻みなふるえ・尻尾挙上不全・俊敏性の欠如した緩徐歩行・一側性の軽度麻痺のいずれか一つ以上の臨床症状を呈した場合、2度=一側あるいは両側の後肢不完全麻痺を呈するが、前肢は正常、3度=両側後肢高度麻痺を呈するが、前肢はほぼ正常、4度=一側あるいは両側の前肢不完全麻痺を呈し、かつ両側後肢高度麻痺を呈する、5度=高度四肢麻痺を呈しているか、もしくは瀕死状態)と運動負荷試験(伸展反射試験、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)にて評価した。

2) 病理組織学的評価は、脊髄(頸髄、胸髄、腰髄)を検索部位として、終末期と生後115日齢において行った。

[倫理面への配慮]

すべての遺伝子操作は本学遺伝子組換え実験指針に従い、動物実験は本学動物実験委員会指針に従った上に、倫理面及び動物愛護面に配慮し、当該実験を実施した。

C. 研究結果

1. 臨床学的解析結果

1) 症候学的結果：

プラセボ投与実験群における G1H-G93A マウスの発症日は、 99.9 ± 2.4 日、生存期間は、 119.7 ± 3.3 日、病悩期間 20.8 ± 2.3 日であった。プラセボ投与実験群の正常対照である野生型同腹仔マウスでは、全例臨床症候学的評価のステージは全経過を通じて0度であった。化合物投与治療実験群は、プラセボ投与実験群より、発症日を有意に遅延させる発症遅延効果、生存期間を有意に延長させる生存期間延長効果、病悩期間を有意に延長させる病悩期間延長効果 ($P < 0.05$, Kaplan-Meier log-rank test) を認めた。臨床症候学的には、ステージ1度から4度の各項目においてそれぞれ有意差 ($P < 0.05$, ANOVA with Dunnett's multiple comparison test) を持って延長していた。アロプリノール投与実

験群では、プラセボ投与群と比べて臨床症候学的評価の各項目の評価において有意差はなかった。

2) 運動負荷解析結果：

化合物投与治療実験群は、プラセボ投与群に比べて伸展反射試験(105-120日)、傾斜面角度試験(110-130日)、フットプリント試験(105-130日)、ロタロッド試験(105-115日)、ビームバランス試験(105-115日)の各時点の試験で、有意な運動能力の有効性 ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis AVOVA test) が認められた。アロプリノール投与実験群では、プラセボ投与群と比べて5種類すべての運動負荷試験の各試験項目の評価において有意差はなかった。プラセボ投与実験群の正常対照群である野生型同腹仔マウスでは、5種類すべての各運動負荷試験において、それぞれのスコアは全経過を通じて全例スコア=0であった。

2. 病理組織学的解析結果：

生後115日齢における残存脊髄前角細胞数は、プラセボ投与群及びアロプリノール投与群の二群に比べ、治療群において有意に存在していた。プラセボ投与群とアロプリノール投与群の二群間には有意差を認められなかった。終末期における残存脊髄前角細胞数は、プラセボ投与群、治療薬投与群、アロプリノール投与群の三群において有意差を認められなかった。

D. 考察

ALSは、有効な治療法確立が強く希求されている致死的神経変性疾患の代表であり、現在日本では約4,000から5,000人の患者がいると考えられている。尚かつ、本疾患は働き盛りである中年以降に発症する。従って、ALSの新規治療法の開発は、極めて重要である。歴史的には、ALSは1869年にCharcotとJoffroyにより記載された一つの疾患単位である。主に上位運動ニューロンと下位運動ニューロンの両者が障害される進行性の原因不明の疾患であり呼吸筋麻痺により死亡する運動ニューロン疾患として