

(倫理面への配慮)

本年度の研究は、主としてマウスを用いたインビトロの実験系で行ったので、倫理面への配慮は不要であった。

C. 研究結果

[結果1] 中枢神経系特異的オートファジー欠損マウスの解析。

オートファジーは、発見されてから半世紀を過ぎているが、これまで自己分解によるエネルギー供給が主な役割であり、実際、栄養飢餓などで激しく誘導されることが知られていたが、(飢餓時には他の臓器から栄養素が輸送されてくるので) 飢餓に陥らない脳におけるオートファジーの役割は、全く不明であった。そこで、われわれは、マウスの発生工学的技法を駆使して、中枢神経系(ニューロン) 特異的にオートファジーが欠損マウスするマウスを世界で初めて作出した。その結果、基底レベルで恒常的に起こっているオートファジー(恒常的オートファジー)が神経細胞の恒常性維持に不可欠であり、その欠失が神経変性疾患を引き起こすことを証明した。とくにオートファジーの欠失による神経細胞死においては、軸索のスエリング(膨張)によること、即ち、オルガネラ、とくにミトコンドリアの品質管理の破綻(電子顕微鏡による形態学的解析から)が示唆された。さらに驚いたことに、神経細胞内にはユビキチン陽性タンパク質凝集体(封入体)が光学顕微鏡・電子顕微鏡を用いた免疫組織化学的手法で観察された。この結果は、ユビキチンがオートファジーによるタンパク質分解のシグナルになっている可能性を示唆しており、これまでユビキチンで分解シグナルを付与されたタンパク質はプロテアソームで選択的に分解されると考えられていたので、この新しい概念はユビキチンの世界を喫驚させた。

[結果2] 不良ミトコンドリアの選択的浄化機構(Mitophagy)。

ミトコンドリアは、呼吸鎖(電子伝達系)を通してATPを合成する重要なオルガネラであるが、この反応の過程で電子が漏出し、フリーラジカルが発生する。フリーラジカルは、反応性が高く、DNA、タンパク質、脂質を酸化修飾し機能異常を引き起こす。とくにミトコンドリアの機能破綻は、非分裂細胞である神経細胞には重篤な影響を及ぼす。神経変性におけるParkin(ユビキチンリガーゼをコード)とPINK1(タンパク質リン酸化酵素をコード)の役割を解析するために、ミトコンドリアの品質管理について検討し、以下の結果を得た。□ PINK1は通常(ミトコンドリアが健康である場合)恒常的に分解されていて検出できないが、脱共役剤‘uncoupler’であるCCCP(carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)処理によってミトコンドリアの膜電位を低下させると、損傷ミトコンドリアの外膜に蓄積する、□この蓄積したPINK1が細胞質のParkinを損傷ミトコンドリアに移行させる“リクルート因子”として作用する。これらの結果から、PINK1-Parkin経路がミトコンドリアの障害状態を感知して、損傷したミトコンドリアをオートファジーでクリアランス(浄化)していることが判明した。この選択的なミトコンドリアのクリアランス(浄化)は、mitophagy(ミトファジー)とされている。

[結果3] 封入体形成の分子機構。

オートファジー欠損ニューロンにおいてユビキチン化タンパク質が凝集蓄積することから、オートファジーが選択的にユビキチン化したタンパク質を飲み込んで分解している可能性を示唆された。選択的オートファジーの機構およびその破綻が封入体を形成する機構は、全く不明であった。

われわれは超高感度プロテオミクス法により、オートファジーにより選択的に分解される分子 p62/Sqstm1 を同定した。この分子は C 末端 ubiquitin-associated domain (UBA) を介してユビキチン鎖と結合する。興味深いことに、このタンパク質はアルコール性肝炎やパーキンソン病、ALS などの神経変性疾患の細胞内において検出される封入体の主要構成分子である。オートファジー不能細胞において、p62 は異常蓄積し p62-ユビキチン陽性の封入体を形成した。驚いたことに、Atg7/p62 ダブルノックアウトマウスにおいて封入体形成はほぼ完全に抑制された。このことは、オートファジーによる p62 を介したユビキチン化タンパク質の分解が封入体形成を抑制することを強く示唆している。言い換えれば、p62 はオートファジーの（そしておそらく他のタンパク質分解システムの）破綻によって生じる封入体形成に必須な分子であることが判明したことになり、長い間謎であった細胞内におけるユビキチン陽性封入体形成の分子機構が解明された。これの結果から、細胞内に発生した異常タンパク質の処理においては、これまで知られていた分子シャペロンによる再生、プロテアソームやオートファジーによる分解（クリアランス・細胞内浄化）という手段以外に、p62 依存的に凝集体（封入体）を形成して隔離することが重要な戦略の一つであることが示唆された。

一方、p62 は CCCP 処理によって損傷したミトコンドリアに移行した。この p62 の損傷ミトコンドリアへの移行は、PINK1 と Parkin 依存的であった。他方、このとき p62 の C 末端の UBA ドメインは必須であったが、LC3 との相互作用領域 LRS は不必要であった。p62-欠損 MEFs では、損傷ミトコンドリアの凝集と核近傍への移動は、ほぼ完全に抑制されたが、損傷ミトコンドリアの分解（mitophagy）は全く阻害されなかった。この損傷ミトコンドリアの凝

集には、p62 の N-末端領域の PB1(self-oligomerization) ドメインが必須であった。この結果は、異常ミトコンドリアが封入体に取り込まれる機構とも関連していることを示唆している。

D. 考察

これまでのオートファジーと神経変性疾患に関するわれわれの研究から、以下のことが明らかとなった。① 中枢神経系でオートファジーを欠損させると非分裂細胞であるニューロンの変性が誘発され神経変性疾患を発症する。② オートファジーの欠損ニューロンでは、ユビキチン化タンパク質が異常に蓄積する。③ オートファゴソームの形成に関わる LC3 と相互作用する分子として p62 を同定した。p62 はユビキチン化タンパク質と相互作用できる UBA ドメインを C-末端に持っていることと N-末端側の PB1 ドメインに余って自己凝集できる能力を持っていることでユニーク分子である。④ p62 は、オートファジー経路で分解されることから、ユビキチン化タンパク質をオートファゴソームに運搬するシャトリング機能を有すると推定された。⑤ p62 欠損マウスニューロンでは、オートファジーの欠損で観察されるユビキチン化タンパク質（封入体）の形成が完全に抑制された。この⑥ PINK1 は Parkin を損傷ミトコンドリアへ輸送させるリクルート因子であること、⑦ PINK1 と Parkin によるミトコンドリアの品質管理（PINK1/Parkin による膜電位依存的な Mitophagy）は、非分裂細胞であるニューロンの健康維持に必須であること、が判明した。しかし、本研究には、次のような未解明な課題が山積している。① 膜電位が高い健康なミトコンドリアにおいて PINK1 の分解を触媒しているプロトン（H⁺）勾配依存性の PINK1 分解機構の解明：このシステムがミトコンドリアの健康度をセンス/モニター（感知）していると推定される、②

PINK1 の基質：この分子 (Parkin でない：未発表) のリン酸化が Parkin をサイトゾルから損傷ミトコンドリアへの移行を駆動している、③ Parkin が損傷ミトコンドリアへ移行する分子機構：Parkin のリセプター同定、④ Parkin の基質の同定：Parkin 依存的な mitophagy の分子機構の解明。これらはの研究は、いずれも ALS を含む様々な神経変成疾患の病態発生機序の解明に重要なヒントを与えることが期待される。

E. 結論

選択的オートファジーによるミトコンドリアのクリアランス (浄化：mitophagy) は、非分裂細胞であるニューロンの健康維持に必須である。PINK1・Parkin 系によるミトコンドリアの品質管理の破綻は、神経変性を誘導する。この病態発症機構は、ALS・アルツハイマー病・パーキンソン病・ハンチントン舞踏病などの多くの神経変性疾患の予防・治療法の開発に有効であると結論される。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y.S., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2008) Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J. Biol. Chem.* 283, 22847-22857.

(2) Kimura, Y., Yashiroda, H., Kudo, T., Koitabashi, S., Murata, S., Kakizuka, A., and Tanaka, K. (2009) An inhibitor of deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. *Cell* 137, 549-559.

(3) Saeki, Y., Toh-e, A., Kudo, T., Kawamura, H., and Tanaka, K. (2009) Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. *Cell* 137, 900-913.

(4) Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., and Yamamoto, M. (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12, 213-223.

(5) Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, CA, Sou, Y., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., and Tanaka, K. (2010) PINK1 stabilized by depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol.* 189, 211-221.

(6) Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., Tanaka, K., and Matsuda, N. p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells* 15, 887-900.

(7) Riley, B.E., Kaiser, S.E., Shaler, T.A., Ng, A.C.Y., Hara, T., Hipp, M.S., Lage, K., Xavier, R. J., Ryu, K-Y., Taguchi, K., Yamamoto, M., Tanaka, K., Mizushima, N., Komatsu, M., and Kopito, R.R. (2010) Ubiquitin accumulation in autophagy-deficient mice is dependent on the Nrf2-mediated stress response pathway: a potential role for protein aggregation in autophagic substrate selection. *J. Cell Biol.* 191, 537-552.

- (8) Saeki, Y. and Tanaka, K. (2008) Cell biology: Two hands for degradation. *Nature* 453, 460-461.
- (9) Ichimura, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2008) Selective turnover of p62/a170/Sqstm1 by autophagy. *Autophagy* 4, 1063-1066.
- (10) Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10, 104-115.
- (11) Tanaka, K. (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys Biol Sci* 85, 12-36.
- (12) Yue, Z., Friedman, L., Komatsu, M., and Tanaka, K. (2009) The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochem. Biophys. Acta* 1793, 1496-1507.
- (13) Sakata, E., Saeki, Y., and Tanaka, K. (2009) The proteasome's crown for destruction. *Mol. Cell* 34, 519-520.
- (14) Matsuda, N. and Tanaka, K. (2010) Does impairment of the ubiquitin-proteasome system or the autophagy-lysosome pathway predispose individuals to neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease? *J Alzheimer's Dis.* 19, 1-9.
- (15) Kimura, Y. and Tanaka, K. (2010) Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J. Biochem.* 147, 793-798.
- (Proteolysis and Pathophysiology). 第2回 Diabetes Leading-edge Conference : 静岡県沼津市淡島ホテル (平成20年8月9日) 静岡
- (3) 田中啓二 : 細胞内大規模タンパク質分解システムの作動機構と生理機構. 日本分子生物学会第9回春期シンポジウム (090511-12) 分子生物学の新たな胎動 ~宮崎から黎明の曙光~ (平成21年5月11-12日) 宮崎
- (4) 田中啓二 : オートファジーと神経変性疾患. 第1回 ニューロフォーラム東京、京王プラザホテル (2009年10月1日) 東京
- (5) Keiji Tanaka: "The Role of the PINK1/Parkin Pathway on the Autophagic Clearance of Damaged Mitochondria" in "The 2010 Rappaport Research Institute Ubiquitin Day", Cancer Center, Rappaport Research Institute and Faculty of Medicine, Technion -Israel Institute of Technology, Haifa, March 11, 2010 (Israel)
- (6) Keiji Tanaka: "Autophagic Control of Mitochondrial Homeostasis and Neurodegeneration" [Mechanism underlying the cause of Parkinson's Disease: The functions of Parkin/PINK1] in "Proteolysis and Neurodegeneration: 5th INPROTEOLYSIS meeting", EMBO Workshop, Madrid, 4-7th, May 2010 (Spain)
- (7) Keiji Tanaka: "Impairment of proteolytic homeostasis as cause of neurodegeneration" in S1 JOINT SYMPOSIUM [Key Mechanisms in Neurodegeneration] PRION & ICN Congress in Salzburg 8th September till 15th September 2010 (Austria)

2. 学会発表

- (1) 田中啓二 : Protein Degradation and Neurodegenerative Diseases. Neuroscience 2008 第31回日本神経科学大会. 特別講演。 July 10, 2008 (東京フォーラム) 東京.
- (2) 田中啓二 : タンパク質分解と病態生理学
- (8) Keiji Tanaka: "Autophagy and Parkinson's Disease" in "1st Sino-Japan Autophagy Symposium", Xi'an, 15th October till 17th October 2010 (China)
- (9) Keiji Tanaka: "The PINK1/Parkin pathway controls mitochondrial homeostasis whose

impairment causes Parkinson's disease" in "Global COE International Symposium / Retreat 2010", Awaji Island, November 5th – 6th, 2010 (Japan)

(10) Keiji Tanaka: "Parkinson's disease: a quality control disease of depolarized mitochondria" in "The 1st small Korea/Japan symposium", Seoul, January 27th - 29th, 2011 (Korea)

(11) 田中 啓二 : The Structure and Biological Functions of Proteasomes (+ The Role of PINK1/Parkin in Mitophagy and Parkinson's Disease). 第62回日本細胞生物学会大会 (The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society of Cell Biology) ・ 特別講演 May 20th (Osaka)

(12) 田中 啓二、松田憲之、尾勝圭 : パーキンソン病の分子病態機序のブレイクスルー : Parkin/PINK1の機能“パーキンソン病の分子病態機序”、新世代の神経学—Breakthrough to the NEXT STAGE—、第51回日本神経学会総会 平成22年5月21日 (東京)

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

血管内投与型 AAV ベクターの開発

研究分担者：中野今治（自治医科大学内科学講座神経内科学部門）

研究協力者：村松慎一¹、奈良優子¹、宮内ひとみ¹、綾部啓子¹、滝野直美¹、島崎久仁子²、堀雄一郎³、水上進³、菊地和也³

¹自治医科大学 神経内科学部門、²同 神経脳生理学部門、³大阪大学大学院 工学研究科

研究要旨

血管内投与により広範な中枢神経領域の神経細胞あるいは乏突起膠細胞に治療用遺伝子を効率よく導入可能なアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを開発した。各種の型の AAV のカプシド蛋白とゲノム配列を改変し、神経細胞または乏突起膠細胞特異的プロモーターを搭載したベクターを作製した。また、カプシドを構成する VP3 蛋白に Rabies virus 由来の RVG ペプチドを化学結合した。マウスの血管内に投与した結果、広範な中枢神経領域に遺伝子導入可能であった。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する遺伝子治療への応用を目標として、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの血管内投与により治療用の遺伝子を中枢神経の広範な領域の神経細胞と乏突起膠細胞へ導入する方法を開発する。

B. 研究方法

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを利用した。3型 AAV のゲノム両端の ITR 配列の間に神経細胞特異的あるいはミエリン塩基性蛋白質(MBP)プロモーター、蛍光蛋白質 GFP の cDNA、SV40 poly (A)配列からなる発現カセットを搭載した。野生型の 1、2、8、9 型 AAV を基本として、それらの外被蛋白のアミノ酸配列を改変した数種類の変異型 pseudotype ベクターを作製した。また、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(29 アミノ酸)の誘導体を Fmoc 固相法により化学合成した。この誘導体を使用して GFP を発現する AAV ベクターのカプシド蛋白を化学修飾した。これらのベクターを 6 週齢の C57BL/6J マウスの血管内に投与し 4 週間後に脳組織を免疫組織化学により解析した。

C. 研究結果

神経細胞特異的プロモーターを搭載した改良型 AAV ベクターでは、脳の広範な領域と脊髄の神経細胞で GFP の発現が認められた。脊髄の ChAT 陽性細胞では 20%程度に GFP の発現が得られた。MBP プロモーターを搭載したベクターでは、抗 MBP 抗体あるいは抗 Olig2 抗体に反応する乏突起膠細胞に GFP の発現が認められた。明らかな炎症反応や組織障害は認められなかった。

カプシドを構成する VP3 蛋白に RVG ペプチドを結合したベクターの線条体内投与では、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。四肢の筋肉内投与では脊髄での発現は見られなかった。

D. 考察

これまで、AAV ベクターは、脳内での逆行性輸送および筋肉内投与による末梢神経終末から脊髄への輸送についての報告があるがその効率は高くない。カプシドとゲノムの改変によりこの点を改善できれば新たな治療用遺伝子の応用が可能になる。今回、開発した改良型ベクターでは、血管内投与により広範な脳領域の神経細胞と乏突起膠細胞へ遺伝

子導入が可能であり、臨床応用への期待が持てる。血液脳関門を通過する詳細な機序は不明であるが、炎症反応や組織破壊は認めていない。SOD1 トランスジェニックマウスにおける NG2 細胞の増加など、ALS においても乏突起膠細胞の関与が推察されており、今後、病態解析と遺伝子治療に応用したい。

E. 結論

広範な脳領域の神経細胞と乏突起膠細胞へ容易に遺伝子導入可能な血管内投与型 AAV ベクターを開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Muramatsu S, Asari S, Fujimoto K, Ozawa K, Nakano I: Gene therapy for Parkinson's disease. Strategies for the local production dopamine. *Gene Therapy & Regulation* 5:1-9, 2010.
2. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther*, 18(9):1731-1735, 2010.
3. Muramatsu, S, Okuno T, Suzuki Y, Nakayama T, Kakiuchi T, Takino N, Iida A, Ono F, Terao K, Inoue N, Nakano I, Kondo Y and Tsukada H: Multi-tracer assessment of dopamine function after transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in a primate model of Parkinson's disease. *Synapse*, 63:541-548, 2009.
4. Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N: Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 4:e6318, 2009.
5. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach T.G, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H.: Phosphorylated TDP-43 in fronto temporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*

64: 60-70, 2008.

6. Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Kuroda S, Akiyama H: Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease: a comparative clinicopathological study. *Acta Neuropathol.*115: 561-575, 2008

2. 学会発表

1. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: AADC gene therapy for Parkinson's disease: A phase I study. The Japan society of gene therapy's 16th annual meeting. Utsunomiya, July 1, 2010. (abstract p55)
2. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: Aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease: results from an open-label, phase I trial, The American society of gene therapy (ASGT)'s 12th annual meeting, San Diego, May 29, 2009.
3. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: Phase I trial of AAV vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase for parkinson's disease. The Japan society of gene therapy's 15th annual meeting. Osaka, July 11, 2009.
4. Muramatsu S, Ono F, Takino N, Asari S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Tsukada H, Terao K, Ozawa K, Nakano I: Long-term behavioral recovery in primate model of Parkinson's disease with persistent gene expression of dopamine-synthesizing enzymes. American Society of Gene Therapy 11th Annual Meeting. Boston, May 28-June 1, 2008. (Abstract P.S264) (*Molecular Therapy* 16; Suppl. 1, May 2008)
5. 熱田直樹、祖父江 元、中野今治、青木正志、湯浅龍彦、辻 省次、高野弘基、

林 秀明、梶 龍兒、溝口功一、藤田卓司、小長谷正明、饗場郁子、長谷川一子、谷口 彰、葛原茂樹：多施設共同 ALS 自然歴把握、遺伝子収集システムの構築。第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15 日—17 日（プログラム・抄録集 p. 231）

6. 河又千鶴、森田光哉、中野今治：High-Resolution DNAMelting(HRM)解析を用いた筋萎縮性側索硬化症の SOD1 遺伝子解析。第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15 日—17 日（プログラム・抄録集 p. 289）
7. 新井哲明、長谷川成人、秋山治彦、野中隆、亀谷富由樹、池田研二、近藤宏美、下村洋子、羽賀千恵、土谷邦秋、吉田眞理、橋詰良夫、新里和弘、大島健一、森田光哉、中野今治：患者脳に蓄積した TDP-43 のリン酸化部位に関する検討。第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、2008 年 5 月 20 日—22 日（プログラム・抄録集 p. 77）
8. 新井哲明、長谷川成人、秋山治彦、野中隆、亀谷富由樹、池田研二、近藤宏美、下村洋子、羽賀千恵、土谷邦秋、吉田眞理、橋詰良夫、新里和弘、大島健一、森田光哉、中野今治：神経変性疾患におけるリン酸化 TDP-43 の蓄積。第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、2008 年 5 月 20 日—22 日（プログラム・抄録集 p. 78）
9. 松坂恵介、大田泰徳、藤原雅代、中瀬浩史、中野今治、深山正久、大橋健一：脊髄根に高度のアミロイド沈着を来した孤発性 ALS アミロイドポリニューロパチーの解剖例。第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、2008 年 5 月 20 日—22 日（プログラム・抄録集 p. 136）

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

細胞外微小環境と内在性神経幹/前駆細胞を標的とした ALS 再生誘導療法開発の試み

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（平成 20-21 年度）*
青木正志 東北大学大学院医学系研究科神経内科学 （平成 22 年度）
研究協力者 割田 仁¹⁾、水野秀紀¹⁾、鈴木直輝¹⁾、船越 洋²⁾、中村敏一³⁾
¹⁾ 東北大学神経内科、²⁾ 大阪大学分子再生医学、
³⁾ 大阪大学先端科学イノベーションセンター、* 現 国立精神・神経医療研究センター病院

研究要旨 ALS ラットモデルを用い神経再生に至適な微小環境を形成する重要な因子・微小血管に注目すると、運動ニューロン変性部位である脊髄前角で発症早期にピークを示す血管内皮細胞の新生増加が認められた。そこで、微小血管新生・保護因子（FGF-2, HGF, PDGF-B）を髄腔内持続投与すると、いずれの因子も血管新生促進・保護効果とともに神経保護効果を示した。一方で、内在性再生機転の効果的促進をねらい、増殖因子 EGF/FGF-2 に続いて再生誘導因子 HGF を逐次的に投与すると、同時投与群に比較して過度のグリア新生や再生阻害因子の沈着をより抑制することができ、幼若ニューロンの増加が認められた。再生誘導因子の効果的な逐次投与や移植による細胞補充と微小血管をも標的とした再生許容環境構築を組み合わせることで、効果的な ALS 神経再生戦略の実現が期待される。

A. 研究目的

系統的かつ進行性の運動ニューロン変性を主徴とする筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）は致死的にもかかわらず有効な治療法がなく新規治療法開発が強く求められている。また、早期診断法の確立が不十分な現在、診断時には既に多くの運動ニューロンが機能障害ないし変性脱落に陥っており、これを阻止する神経保護療法と機能再生をめざした神経再生療法の両者の開発が重要課題となっている。

正常成体脊髄にも神経幹（前駆）細胞が存在し潜在的再生能が報告されてきた中で、ALS に対する神経再生療法の開発は画期的治療戦略として注目されている。本研究では我々が開発したラットの ALS モデルを用いて、① 細胞外微小環境の形成に重要な血管因子に着目した微小

血管新生に関する検討、および ② 内在性再生機転を促進する効果的な外来性再生誘導因子の投与方法の検討を行い、画期的治療法の開発へと寄与することを目的とした。

B. 研究方法

以下、His46Arg 変異 *Cu/Zn SOD* 遺伝子導入 (Tg) ラットを本研究対象とした。

研究 1. 血管新生・保護因子による神経保護

まず発症前から発症後期まで 3 病期の Tg ラット腰髄における微小血管系の再構築を検討した。次に発症後 Tg ラット脊髄腔内に 3 種の血管新生・保護因子をそれぞれ 2 週間、皮下浸透圧ポンプを用い持続投与した。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を最初の 7 日間持続投与して新生細胞を標識し、血管新生・保護因子投与終了時の腰髄灌流固定凍結切片で各種選択的マーカーによる多重蛍光免疫組織化学の定量的解析を共焦点

レーザー顕微鏡下に行った。溶媒投与（対照）群と合わせ 4 群間で比較検討した。血管新生・保護因子としては、線維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor-2, FGF-2）、肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor, HGF）、および血小板由来増殖因子（platelet-derived growth factor-B, PDGF-B）を各々用いた。

研究 2. 再生誘導因子の逐次投与による内在性再生機転促進の試み

発症直後から皮下浸透圧ポンプを用い、未成熟な神経前駆細胞を増殖させる目的で上皮細胞増殖因子（EGF）と FGF-2 を最初の 1 週間、ついで過度のグリア新生を抑制し神経新生を促進するため肝細胞増殖因子（HGF）を逐次的に 2 週間、計 3 週間脊髄腔内へ持続投与した（逐次投与群）。BrdU を最初の 7 日間持続投与して新生細胞を標識し、再生誘導因子投与終了時の腰髄灌流固定凍結切片で各種選択的マーカーによる多重蛍光免疫組織化学の定量的解析を共焦点レーザー顕微鏡下に行った。溶媒投与（対照）群、EGF/FGF-2/HGF 三者同時持続投与群（同時投与群）と合わせ 3 群間で比較し統計学的解析を加えた（各群 n=8）。

〔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

研究 1. 非 Tg ラットに比較して Tg ラットでは、腰髄前角細胞脱落やアストログリア増生といった病態進行に並行して、新生微小血管内皮細胞の有意な増加が認められた。発症早期に増加のピークが認められ、発症後期にはその程度を減じていた。また、発症後期 Tg ラット腰髄前角では内皮細胞マーカー陽性の微小血管像が減少し、血清アルブミンや内因性 IgG の沈着が認められた。

この発症早期 Tg ラットに 3 種の異なる血管新生・保護因子を持続投与すると、対照群に比していずれの因子も血管新生促進・保護効果を示すと共に前角細胞脱落を有意に抑制した。

研究 2. 溶媒投与群（対照）に比して、EGF/FGF-2/HGF 同時投与群、EGF/FGF-2→HGF 逐次投与群ともに腰髄前角細胞脱落が有意に抑制された。同時投与群では腰髄腹側で有意にグリア前駆細胞の増殖促進を認めたのに対し、逐次投与群ではグリア前駆細胞の増殖が抑制されていた。新生アストロサイトは逐次投与群でのみ減少し、過度のグリア新生が抑制されていた。これに伴い、逐次投与群ではグリア由来再生阻害因子（コンドロイチン硫酸）沈着が腰髄前角で有意に抑制され、幼若ニューロンマーカー陽性細胞が増加していた。

D. 考察

研究 1.により、本 ALS モデル脊髄では微小血管障害に対する内在性再生機転として血管新生の増加が起きていることが明らかとなった。さらに血管新生促進・保護因子の外来性投与によって神経保護効果が得られることが明らかとなった。すなわち、微小血管内皮細胞あるいは周皮細胞が ALS 病態の新たな治療標的となる可能性が示唆された。

研究 2.により、内在性神経前駆細胞を標的とした外来性の増殖因子 EGF/FGF-2 の投与にひき続き、神経新生促進作用とグリア増生抑制作用を併せもつ HGF を逐次的に投与することで、同時投与より効果的に神経再生を誘導できる可能性が示唆された。単に神経前駆細胞の数を増すだけでなく、過度のグリア新生を抑制し、細胞外微小環境を神経再生許容的なものに誘導する戦略の有効性が示唆された。

E. 結論

ALSにおける神経再生療法開発をめざすにあたっては、神経前駆細胞や神経細胞のみを標的

とするのではなく、それらを取りまく微小環境を再生許容的なものに誘導する戦略が合わせて重要と考えられる。今後、幹細胞生物学の成果を応用し、ALS モデル動物を用いた神経再生研究を進展させることで、画期的治療法の一翼を担う神経再生療法の開発に寄与することが期待される。

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.
- 5) Sasaki S, Aoki M, Nagai M, Kobayashi M, Itoyama Y. Mitochondrial alterations in transgenic mice with an H46R mutant *Cu/Zn superoxide dismutase* gene. **J Neuropathol Exp Neurol** 2009; 68(4): 365-373.
- 6) Suzuki N, Aoki M, Warita H, Kato M, Mizuno H, Shimakura N, Akiyama T, Furuya H, Hokonohara T, Iwaki A, Togashi S, Konno H, Itoyama Y. ALS with FUS mutation in Japan, with early onset, rapid progress and basophilic inclusion. **J Hum Genet**, 2010; 55(4): 252-254.
- 7) Suzuki N, Mizuno H, Warita H, Takeda S, Itoyama Y, Aoki M. Neuronal NOS is dislocated during muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurol Sci**, 2010; 291(1-2): 95-101.
- 8) Hadano S, Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Akatsuka A, Koike M, Aoki M, Uchiyama Y, Itoyama Y, Ikeda JE. Loss of ALS2/Alsin exacerbates motor dysfunction in a SOD1-expressing mouse ALS model by disturbing endolysosomal trafficking. **PLoS One**, 2010; 5(3): 9805.
- 9) Sanagi T, Yuasa S, Nakamura Y, Suzuki E, Aoki M, Warita H, Itoyama Y, Uchino S, Kohsaka S, Ohsawa K. Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurosci Res**, 2010; 88(12): 2736-2746.
- 10) Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Aoki M, Hasegawa M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Occurrence of basophilic inclusions and FUS-immunoreactive neuronal and glial inclusions in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurol Sci**, 2010; 293(1-2): 6-11.
- 11) Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Morita M, Nakano I, Kanai K, Ito S, Ishikawa K, Mizusawa H, Yamamoto T, Tsuji S, Hasegawa K, Shimohata T, Nishizawa M,

Miyajima H, Kanda F, Watanabe Y, Nakashima K, Tsujino A, Yamashita T, Uchino M, Fujimoto Y, Tanaka F, Sobue G; Japan SBMA Interventional Trial for TAP-144-SR (JASMITT) study group. Efficacy and safety of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (JASMITT study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet Neurol**, 2010; 9(9): 875-884.

12) Shimazawa M, Tanaka H, Ito Y, Morimoto N, Tsuruma K, Kadokura M, Tamura S, Inoue T, Yamada M, Takahashi H, Warita H, Aoki M, Hara H. An inducer of VGF protects cells against ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal models of familial ALS. **PLoS One**, 2010; 5(12): e15307.

13) Aoki M, Warita H, Mizuno H, Suzuki N, Yuki S, Itoyama Y. Feasibility study for functional test battery of SOD transgenic rat (H46R) and evaluation of edaravone, a free radical scavenger. **Brain Res**, 2011; Jan 25 [Epub ahead of print].

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

7) 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

8) Suzuki N, Aoki M, Warita H, Takeda S, and Itoyama Y. Dislocation of neuronal nitric oxide synthase contributes to muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis. September 9-12, 2009. 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland.

9) 青木正志, 割田 仁, 糸山泰人. 神経栄養因子によるALSの治療戦略. 2009年5月21日 第50回日本神経学会総会シンポジウム (仙台)

10) 割田 仁, 青木正志, 水野秀紀, 船越 洋, 糸山泰人. 逐次的な再生誘導因子投与によるALSモデルラット脊髄の内在性再生機転促進. 2009年5月20-22日 第50回日本神経学会総会 (仙台)

11) 水野秀紀, 割田 仁, 青木正志, 糸山泰人. ALSモデルラット脊髄活性化アストロサイトにおける再生阻害因子発現. 同上

12) 鈴木直輝, 青木正志, 割田 仁, 水野秀紀, 武田伸一, 糸山泰人. 筋萎縮性側索硬化症マウスに対する一酸化窒素合成酵素阻害剤による治療の検討. 同上

- 13) 割田 仁, 青木正志, 船越 洋, 中村敏一, 糸山泰人. 運動ニューロン変性を示すラットモデル脊髄における微小血管新生. 2009年9月16-18日 Neuroscience 2009 [第32回日本神経科学大会] (名古屋)
- 14) 鈴木直輝, 青木正志, 割田 仁, 加藤昌昭, 水野秀紀, 島倉奈緒子, 秋山徹也, 古谷博和, 銚之原敏博, 岩城明子, 服巻保幸, 富樫慎二, 今野秀彦, 糸山泰人. 若年発症・急速進行・好塩基性封入体を特徴としFUS/TLSに変異を持つ日本人家族性筋萎縮性側索硬化症の3家系. 2009年9月24-26日 日本人類遺伝学会第54回大会 (東京)
- 15) Warita H, Aoki M, Mizuno H, Suzuki N, and Itoyama Y. Angiogenesis in the spinal cord of transgenic rats with motor neuron degeneration. July 17-22, 2010. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy.
- 16) Aoki M, Suzuki N, Warita H, Kato M, Mizuno H, Shimakura N, Akiyama T, Furuya H, Hokonohara T, Iwaki A, Togashi S, Konno H, and Itoyama Y. FALS with FUS mutation in Japan with early onset, rapid progress and basophilic inclusion. July 17-22, 2010. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy.
- 17) Warita H, Aoki M, Mizuno H, Suzuki N, and Itoyama Y. Myogenesis in skeletal muscles with slowly progressive denervation in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. October 12-16, 2010. 15th International Congress of the World Muscle Society, Kumamoto, Japan.
- 18) 割田 仁, 青木正志, 水野秀紀, 鈴木直輝, 船越 洋, 中村敏一, 糸山泰人. 筋萎縮性側索硬化症モデルラット脊髄における微小血管新生. 2010年3月18-19日 第9回日本再生医療学会 (広島)
- 19) 割田 仁, 青木正志, 水野秀紀, 鈴木直輝, 船越 洋, 中村敏一, 糸山泰人. 微小

血管新生促進によるALSモデルラット神経保護の試み. 2010年5月20-22日 第51回日本神経学会総会 (東京)

- 20) 佐柳友規, 大澤圭子, 中村泰子, 鈴木恵里, 青木正志, 割田 仁, 糸山泰人, 内野茂夫, 高坂新一. Involvement of phagocytic microglia in increased vulnerability of motoneurons after facial nerve avulsion in presymptomatic ALS model rats. 2010年9月2-4日 Neuro2010 [第33回日本神経科学大会, 第53回日本神経化学会大会, 第20回日本神経回路学会大会] (神戸)

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

ALS の病態修飾の分子機序解析と再生因子 HGF の治療適用の可能性

研究分担者 准教授・船越 洋¹⁾

¹⁾大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学／分子再生医学

研究協力者 准教授・角山 圭一^{1),2)}、特任研究員・島田（大谷）若菜^{1),3)}、特任教授・中村 敏一³⁾、准教授・加藤 信介⁴⁾、准教授・藤原 範子⁵⁾、教授・谷口 直之⁶⁾、講師・青木 正志⁷⁾、病院長・糸山 泰人⁸⁾、准教授・宮武伸一⁹⁾、Coffin RS¹⁰⁾、講師・水上 浩明¹¹⁾、教授・小澤 敬也¹¹⁾

¹⁾大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学／分子再生医学

²⁾姫路獨協大学 薬学部

³⁾大阪大学先端科学イノベーションセンター

⁴⁾鳥取大学脳研病理、⁵⁾兵庫医科大学学生化学、

⁶⁾大阪大学産業科学研究所疾患糖鎖学

⁷⁾東北大学 神経内科、⁸⁾国立精神神経医療センター病院

⁹⁾大阪医科大学 脳神経外科、¹⁰⁾ロンドン大学

¹¹⁾自治医科大学 分子病態治療研究センター

研究要旨

ALS の原因遺伝子同定が相次いでいるものの、なぜ全身性に原因遺伝子が発現しているのに神経系に表現型が集約されるのか明らかになっておらず、依然有効な治療法は確立されていない。しかも約 90% は原因不明の孤発性 ALS (SALS) 患者である。このため、FALS と SALS に共通の病態 (= 運動ニューロン変性) を標的とし、その抑制をめざす治療法開発に力が入られてきた。しかし、現在まで十分な成果をあげられていない。この理由が長らく不明であったが、そのヒントになる研究成果が発表された。ALS の原因遺伝子の 1 つの *superoxide dismutase 1 (SOD1)* の変異遺伝子を全身に過剰発現するマウスは運動麻痺を発症する。しかし、このマウスのミクログリアにおける変異遺伝子発現を抑制すると、発症後の病態が遅延することが明らかとなった。すなわち、これまで注目されてきた運動ニューロンに加えて周囲の細胞群 (グリア細胞や血管内皮細胞) を合わせて標的とする、治療法開発への突破口となる可能性が示唆される。これらを背景に、本研究では (1) 原因遺伝子が全身に発現しているのに神経が主に変性する (神経以外の組織の回復機序) の解析、(2) ミクログリアによる ALS の病態修飾の分子機序を明らかにすること、(3) 上記解析結果を基盤とした再生因子 HGF の ALS 治療適用へ向けた HGF 供給法の開発の 3 つを目的として研究を進めた。その結果、神経特異的な変性機序の 1 つとして血液脳関門 (B.B.B.) が寄与している可能性が示唆された。SOD1G93A 処理により、ミクログリアの活性マーカーの発現パターンが修飾され、各種サイトカインの発現が修飾されたことから、ミクログリアの変化が運動ニューロン変性の進行に寄与している可能性が明らかとなった。HGF が運動ニューロンに対する強力な細胞保護作用を有することに加えてミクログリアを含む多くの細胞を標的とする多機能性再生因子であることから、HGF による治療法開発が期待される。その供給法としては、現時点では HGF 蛋白質の髄腔内投与法が最適と考えられた。しかし、ウイルスベクターの中では AAV2 と HSV1 に可能性が見いだされた。但し、広い神経系への供給や長期安定供給には今後工夫が必要である。

A. 研究目的

(研究背景)

ALS の原因遺伝子同定が相次いでいるものの、なぜ全身性に原因遺伝子が発現しているのに神経系に表現型が集約されるのか明らかになっておらず、依然有効な治療法は確立されていない。しかも約90%は原因不明の孤発性 ALS (SALS) 患者である。このため、FALS と SALS に共通の病態 (=運動ニューロン変性) を標的とし、その抑制をめざす治療法開発に力が入られてきた。しかし、現在まで十分な成果をあげられていない。この理由が長らく不明であったが、そのヒントになる研究成果が発表された。ALS の原因遺伝子の1つの *superoxide dismutase 1 (SOD1)* の変異遺伝子を全身に過剰発現するマウスは運動麻痺を発症する。しかし、このマウスのミクログリアにおける変異遺伝子発現を抑制すると、発症後の病態が遅延することが明らかとなった。すなわち、これまで注目されてきた運動ニューロンに加えて周囲の細胞群 (グリア細胞や血管内皮細胞) を合わせて標的とする、治療法開発への突破口となる可能性が示唆される。私達は運動ニューロンに対し強い神経保護作用をもつ再生因子 (HGF) が、非運動ニューロンであるグリア細胞 (アストロサイトやオリゴデンドロサイト等) や血管内皮細胞、さらには神経幹細胞にも機能する多機能性分子であることから、HGF が運動ニューロンへの保護効果を示す通常の神経栄養因子に比べて治療に有利である可能性を想定し、ダブルトランスジェニックマウスの手法でそのことを示しつつある。しかし、まだ解析途上であり、また、ヒトへ適用するための HGF の最適な適用方法は明らかになっていない。以上を背景に本研究では以下の3つを目的とした。

(目的)

- (A-1) 全身に発現する変異 SOD1 遺伝子により発現する病態が、なぜ神経系に特に強く出るかその分子機序について解析する。
- (A-2) 非運動ニューロンであるミクログリア細胞の ALS 病態進行への寄与の分子機序について解析する
- (A-3) 再生因子 (HGF) の ALS モデルトランスジェニック動物における病態修飾機序の解明 (運動ニューロンと非運動ニューロンについて) と治療への最適な HGF 適用方法を研究する。

B. 研究方法、結果および考察

(倫理面への配慮)

以下すべての研究についてとして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。

(B-1) 【研究方法】

ALS モデル Tg 動物として Tg-SOD1^{G93A} マウスを使用した。このマウスにおける再生因子の発現を、神経組織、血液中および神経外組織である肝臓で比較した。その発現制御と運動神経と肝臓の病理変化の相関を比較解析した。

【結果および考察】運動神経に著名な神経変性の所見が出る前の時点で、ある再生因子が一過性に Tg-SOD1^{G93A} マウスの血液中で上昇した。この time course と相関して肝臓の病理変化を認めしたが、肝臓は次第に正常組織像へと回復していった。肝臓の回復過程の詳細については鳥取大学の加藤らの報告書を参照。肝臓の組織像の回復時には、血液中の再生因子の上昇は正常レベルにまでもどっていた。一方、神経組織ではこの時期の脊髄におけるレベルは、血液中の上昇を反映していなかった。これらの結果から、

私達は、全身性に発現する変異 SOD1^{G93A} により、一過性に肝臓が病理変化を示すが、これに対応して再生因子が血液中に上昇することで肝臓の回復に寄与する。一方、脳神経系には血液脳関門 (B.B.B.) があるため、血液中に上昇した再生因子が B.B.B. を通過できずに神経系のみが再生因子の恩恵を受けにくい状態にある。さらに病態が進行すると、運動神経に変性が強く起こり、この時期になると神経系において再生因子が局所性に mRNA 上昇を介して誘導されるが、十分量に満たないため、次第に神経変性が進行し、肝臓のように回復できない。この可能性はまだ仮説の段階であるが、現在その証明に向けて研究途上にある。将来このことが確認されたら、血液中に増加する再生因子を神経系に早くから適用することで新しい ALS 治療法開発につながると考えている。私達は、血液中に上昇してくる再生因子の1つを明らかにしたが (未発表)、他にも存在している可能性を想定し研究を継続中である。

(B-2) 【研究方法】

生後2日齢のラット大脳から混合グリア細胞培養を施行し、約2週間後に震盪してマイクログリアを精製した。ラット初代培養マイクログリアに大腸菌の系で調整した Wild-type SOD1 および mutant SOD1^{G93A} を添加して6時間後にマイクログリア細胞から RNA を抽出し、Agilent 2100 バイオアナライザーで Quality 検定後 DNA Array 法にて変動遺伝子の解析を行った。対照としては、溶媒のみを添加した初代培養マイクログリアを用いた。

【結果】

WT SOD1 および mutant SOD1^{G93A} 添加により、多くの factor が発現制御を受けていた。Resting 型マイクログリアの1つの指標とされる P2Y12 については、WT SOD1 で発現が高く、mutant SOD1^{G93A} 添加例では、WT と比較してそのレベルは低い結果であった。また、WT SOD1 添加マイクログリアは、MHCII が高い結果であった。一方、mutant SOD1^{G93A} 添加マイクログリアでは、種々のインターロイキンをはじめとする

inflammatory factors の著しい発現上昇を示した。

【考察】

Mutant SOD1^{G93A} 処理による pure な初代培養マイクログリアに対する遺伝子プロファイリングを施行したことで、種々の因子の発現制御が明らかとなったが、中でも炎症性サイトカインの発現制御が著しかった。これらの結果は、変異 SOD1 がマイクログリアを活性化させると同時に各種サイトカインを産生、放出することで ALS 病態進行過程において cell autonomous な運動ニューロン毒性の修飾に寄与する可能性を支持している。HGF を含む栄養因子が運動ニューロンに対する直接作用に加えて、この系で変異 SOD1 によるマイクログリアの遺伝子発現に修飾を示すかも今後興味深い課題である。

(B-3)

【研究方法】

リコンビナント HGF 蛋白質の髄腔内投与方法の有効性は、すでに東北大学青木らにより明らかになっているため、ウイルスベクターの有用性について以下の方法で検討した。

【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腰髄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。

【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。

【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一つと考えられる。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

要であろう。別の方法としては、HSV1 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、寿命を延長する可能性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、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

ALS では、原因遺伝子が全身に発現しているにもかかわらず、神経に特に病態が強く出る理由は、脳神経系が血液脳関門により血液中の再生因子の供給を受けにくいためである可能性が示唆された。ALS 進行への非運動ニューロンであるミクログリアの寄与について解析を施行した結果、SOD1G93A 負荷によりミクログリアの活性化状態が変化することで各種サイトカイン発現状態が変化し、運動ニューロン変性を修飾する可能性が示唆された。HGF は運動ニューロンに加えてミクログリアを含む多彩な細胞を標的とすることから、ALS への HGF の有用性が期待された。一方、HGF 供給法として各種ウイルスベクター（HSV1, AAV2, AAV4, AAV5）を用いて解析した結果、AAV2 および HSV1 ウイルスベクターが脊髄への一定の HGF 供給に寄与することが明らかになった。しかし、長期間にわたる発現や広範囲の神経系への供給には、更なる検討が必要である。HGF 蛋白質

の持続髄腔内投与法が最適である。今後は HGF 蛋白質髄腔内投与に臨床適用をめざすとともに、最適なウイルスベクター供給についても更なる検討を続けていきたい。

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 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, 194-200, 2009

- ⑦ 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 **J Phys Ther Sci** 21, 141-145, 2009
- ⑧ Suzuki Y, Funakoshi H, Machide M, Matsumoto K and Nakamura T: Regulation of cell migration and cytokine production by HGF-like protein (HLP) / macrophage stimulating protein (MSP) in primary microglia **Biomed Res** 29 (2), 77-84, 2008
- ⑨ Akita H, Takagi N, Ishihara N, Takagi K, Murotomi K, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura K and 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
- ⑩ 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
- ⑪ 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.
- ⑫ 北村和也、中村雅也、岩波明生、船越洋、中村敏一、岡野栄之、戸山芳昭： HGF を用いた脊髄損傷治療戦略-新たな治療法の確立へ向けて. **関節外科** 27 (2) : 37-46,2008

2. 実用新案登録

特記なし。

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。