

201024054A

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22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23年3月 印刷



# 目 次

## I. 研究者一覧

## II. 総括研究報告書

東北大学大学院医学系研究科神経内科 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 青木 正志

### 2. HGFのALSへの至適供給法の検討 - 皮下注射と髄腔内投与との比較検討 -

旭川医科大学医学部脳機能医工学研究センター  
大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学 船越 洋

### 3. QSIによる新たな画像評価法の確立

慶應義塾大学医学部整形外科 中村 雅也  
慶應義塾大学医学部生理学 岡野 栄之

### 4. - 臨床試験実施に向けての研究 -

1) カニクイザルによるGLP毒性試験、2) 治験薬製造、3) プロトコール作成

クリングルファーマ株式会社 安達 喜一

## IV. 研究成果の刊行に関する一覧

研 究 者 一 覽

## 研究者一覧

研究代表者	青木正志	東北大学大学院医学系研究科神経内科	教授
研究分担者	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/ 旭川医科大学脳機能医工学研究センター	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	事業開発部長



総 括 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

研究代表者 青木正志 東北大学大学院医学系研究科神経内科

**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・ラットの両者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。ALS を対象とする HGF の臨床試験実施に向けて、本年度は次の3項目を達成した。1) カニクイザルによる GLP 毒性試験（本試験）を行い、脊髄腔内投与による HGF の安全性を確認した。2) 脊髄腔内投与用の製剤化検討を行い、第 I 相臨床試験で用いる治験薬を製造した。3) 東北大学 TR センターと協議を重ね、第 I 相臨床試験のプロトコールを作成した。

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た。脊髄のq-space imaging (QSI) 撮像による評価法の検討し、髄鞘可視化技術であるMyelin mapを用いて損傷脊髄内の残余髄鞘面積を評価することに成功した。さらには効率的な投与法の開発に向けてのALSモデル動物を用いた基礎研究も継続している。

研究代表者：青木正志

東北大学大学院医学系研究科神経内科

研究分担者：割田 仁<sup>1</sup>、鈴木直輝<sup>1</sup>、船越 洋

<sup>2</sup>、中村雅也<sup>3</sup>、岡野栄之<sup>4</sup>、安達喜一<sup>5</sup>

<sup>1</sup> 東北大学大学院医学系研究科神経内科

<sup>2</sup> 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

<sup>3</sup> 慶應義塾大学医学部整形外科

<sup>4</sup> 慶應義塾大学医学部生理学

<sup>5</sup> クリングルファーマ

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)に対してわが

### 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。

上記の結果を受け、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た。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）の確認をすることが目的である。

### 2) 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。

### 3) HGF の ALS への至適供給法の検討—皮下注射と髄腔内投与の比較検討

神経栄養因子の ALS 患者への臨床治験で用いられてきた皮下注射で HGF を供給することが可能であれば、髄腔内投与より容易である。そこで、本研究では、HGF の ALS 患者への供給法の至適

化を計る目的で、皮下注射により HGF を供給した場合、髄腔内投与と比較し、ALS モデル動物の寿命に対する治療効果が同様に得られるかを検討した。

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

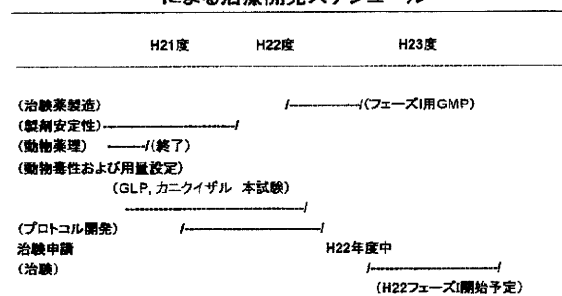
### 1) 霊長類に対する髄腔内投与での安全試験

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 $\mu$ 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。さらには病理学的にも問題がないことを確認した。

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

ALS に対するヒトリコンビナント HGF 蛋白製剤による治療開発スケジュール



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た。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)の確認をすることが目的である。平成21年度に施行した予備試験の結果を受け、平成22年度には本試験を行い、それが終了した。臨床へ進むために問題となるような、明らかな毒性などを認めないことが確認できた(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 のプロトコルがほぼ完成した。この過程では、開発業務受託機関(CRO)であるシミック株式会社のレビューを受けている。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た。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 と担当モニター(シミック)による手順の確認も行った。

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。MRI は非侵襲的に生体内部構造を観察できる方法であるが、従来の T1/T2 強調像のみから脊髄損傷の重症度や機能的予後を正確に予測することは困難であった。脊髄損傷による軸索の断裂や神経細胞死、それに続いて起こる脱髄、空洞やグリア瘢痕形成等の変化のうち、残余髄鞘面積が運動機能と相関があることを既に我々は報告した(Iwanami et al. JNR 2005)。今回の髄鞘可視化技術である Myelin map を用いて損傷脊髄内の残余髄鞘面積を評価することに成功した。

## 3) HGF の ALS への至適供給法の検討—皮下注射と髄腔内投与の比較検討

発症時から HGF 蛋白質(他の動物モデルで実績のある HGF 濃度)を連日皮下注射しても、ALS モデル動物の寿命を延長できないことが明らかとなった。髄腔内投与法は、(1) 神経系

内へ限局して HGF を供給できること、(2) いつでも開始、終止が可能なこと (3) 患者にあわせて濃度調節が可能なこと (4) リコンビナント HGF 蛋白質の霊長類での髄腔内投与の安全性試験と薬物動態試験が本年度順調に進んだ。以上から、従来多くの神経栄養因子供給法として試みられてきた皮下注射法は、髄腔内投与法と異なり ALS に対する HGF の供給法としては不適であることが明らかとなった。ALS 治療法としては、HGF の髄腔内療法が有用である。

## E. 結論

HGF の ALS に対する第 I 相臨床試験を開始するための要件である 3 項目、1) カニクイザルによる GLP 毒性試験、2) 治験薬製造、3) プロトコル作成を達成した。今後、第 I 相臨床試験の準備を加速し、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

青木正志、割田 仁、糸山泰人、ALS に対するヒト型組み換え HGF 蛋白質を用いた第 1 相試験(治験) JALSA、日本 ALS 協会 82 (2010) 10-2 他

### 2. 学会発表

青木正志、割田 仁、鈴木直輝、水野秀紀、船越洋、中村雅也、岡野栄之、糸山泰人 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 第 55 回日本人類遺伝学会 2010 年 10 月 27-30 日 大宮

許斐 恒彦、藤吉 兼浩、疋島 啓吾、岡野 栄之、戸山 芳昭、中村 雅也

in vivo QSI を用いた霊長類脊髄損傷モデルにおける損傷強度別経時的 Myelin map 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、日本 2010 年 10 月 14 日

## 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

研究代表者 青木正志 東北大学大学院医学系研究科神経内科

**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治験前相談が終了し、平成23年度にフェーズ1の治験を開始する方向で協議中である。

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をほぼ完成させ、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た。

研究分担者：青木正志

東北大学大学院医学系研究科神経内科教授

研究協力者：割田 仁<sup>1</sup>、鈴木直輝<sup>1</sup>、船越 洋<sup>2</sup>、中村雅也<sup>3</sup>、岡野栄之<sup>4</sup>

<sup>1</sup>東北大学大学院医学系研究科神経内科

<sup>2</sup>大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

<sup>3</sup>慶應義塾大学医学部整形外科

<sup>4</sup>慶應義塾大学医学部生理学

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。その後に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 $\mu$ 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。さらには病理学的にも問題がないことを確認した。

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た。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）の確認をすることが目的である。平成 21 年度に施行した予備試験の結果を受け、平成 22 年度には本試験を行い、それが終了した。臨床へ進むために問題となるような、明らかな毒性などを認めないことが確認できた（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 のプロトコルがほぼ完成した。この過程では、開発業務受託機関（CRO）であるシミック株式会社のレビューを受けている。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た。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 と担当モニター（シミック）による手順の確認も行った。

## E. 結論

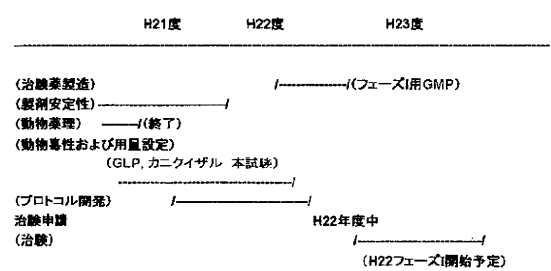
GLP 基準を満たしたヒトリコンビナント HGF 蛋白のカニクイザルに対する髄腔内投与による安全性試験が終了し、フェーズ I のプロトコルもほぼ完成した。平成 22 年度中の治験届けの提出を目指している。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

青木正志、割田 仁、糸山泰人、ALS に対するヒ

ALSに対するヒトリコンビナントHGF蛋白製剤による治療開発スケジュール



ト型組み換え HGF 蛋白を用いた第 1 相試験(治験)

JALSA、日本 ALS 協会 82 (2010) 10-2

## 2. 学会発表

青木正志、割田 仁、鈴木直輝、水野秀紀、船越洋、中村雅也、岡野栄之、糸山泰人 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 第 55 回日本人類遺伝学会 2010 年 10 月 27-30 日 大宮

## 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

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」に関する研究

—HGF の ALS への至適供給法の検討—皮下注射と髄腔内投与の比較検討

研究分担者： 船越 洋（旭川医科大学医学部脳機能医工学研究センター  
／大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学（分子再生医学））  
共同研究者： 角山 圭一（姫路獨協大学薬学部／大阪大学大学院医学系  
研究科ウイルス学（分子再生医学））  
島田（大谷）若菜（大阪大学先端科学イノベーションセン  
ター／大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学（分子再  
生医学））  
中村 敏一（大阪大学先端科学イノベーションセンター）  
青木 正志（東北大学医学部神経内科）  
糸山 泰人（国立精神・神経医療研究センター病院）  
岡野 栄之（慶応義塾大学医学部生理学）  
中村 雅也（慶応義塾大学医学部整形外科）  
戸山 芳昭（慶応義塾大学医学部整形外科）  
安達 喜一（クリングルファーマ株式会社）

研究要旨

ALS は、脊髄から脳幹部までの広い範囲の運動ニューロン細胞が次第に変性し、運動麻痺をきたす致死性の神経変性疾患である。現時点で有効な治療法が明らかとなっていない。私達は、ダブルトランスジェニックマウスの手法で肝細胞増殖因子（HGF）を ALS モデルトランスジェニックマウス（TG-SOD1<sup>G93A</sup> MICE）の神経系に持続的に発現させると、運動ニューロン死が抑制されたことにより運動機能が改善し、ALS の進行が抑制され、寿命が延長することを見いだした（SUN, FUNAKOSHI & NAKAMURA, 2002）。しかし、ヒト ALS 患者にこの方法は適用できない。東北大学青木・糸山らによりリコンビナント HGF 蛋白質の髄腔内持続投与により、ALS モデルトランスジェニックラット（TG-SOD1<sup>G93A</sup> RAT）の運動機能を改善し寿命を延長できることが明らかとなった（ISHIGAKI, AOKI ET AL., 2007）。さらに HGF の濃度依存的効果も明らかとなった。これらの効果は、HGF の運動ニューロンに対する直接神経栄養作用に加えて、他の神経栄養に比べて HGF のもつ多彩な作用（グリア細胞や血管内非細胞等）が貢献していると示唆される。一方で、神経栄養因子の ALS 患者への臨床治験で用いられてきた皮下注射で HGF を供給できたら、髄腔内投与より容易である。そこで、本研究では、HGF の ALS 患者への供給法の至適化を計る目的で、皮下注射により HGF を供給した場合、髄腔内投与と比較し、ALS モデル動物の寿命に対する治療効果が同様に得られるかを検討した。その結果、発症時から HGF 蛋白質（他の動物モデルで実績のある HGF 濃度）を連日皮



直接作用分子機序として、これまで報告してきた抗アポトーシス作用とは独立にオートファジーを修飾できるかについて評価する。

## B. 研究方法

### 【リコンビナント HGF 蛋白質および ALS モデル動物】

- (A) リコンビナント HGF 蛋白質：5 残基欠失型ヒトリコンビナント HGF 蛋白質を使用した。
- (B) ALS のモデル動物：東北大学神経内科青木らの開発した ALS モデルトランスジェニックラット (TG-SOD1<sup>H46R</sup> RAT) を使用した。

### 【HGF 蛋白質の皮下注射による治療解析方法】

TG-SOD1<sup>H46R</sup> RAT の発症時期に、HGF 蛋白質の皮下注射を開始し、その後死亡する迄連日 HGF 蛋白質を投与した。使用濃度は当研究室で多数の動物モデルで有効性が確立している濃度とした。コントロールとして生理食塩水を使用した。投与後、死亡もしくは動物が死亡に準ずる病態を示したところを死亡日として評価した。

### 【ALS モデルトランスジェニックマウスに対する HGF のオートファジー修飾作用の解析】

ALS モデルトランスジェニック動物としては、TG-SOD1<sup>G93A</sup> MICE を用いた。HGF 供給方法としては、長期間神経系に安定して HGF を供給できることが確認できている神経特異的 HGF-Tg マウスと TG-SOD1<sup>G93A</sup> (ALS-Tg MICE) のダブルトランスジェニックマウスを作成し、得られた 4 群 (ALS-Tg, HGF-Tg, ALS/HGF-Tg MICE, 野生型同腹仔) を比較解析した。各群の動物を深麻酔下に SACRIFICE し、脊髄

をアルコール固定した後パラフィン包埋を施行し、パラフィン切片を作成した。常法で脱パラフィン操作後、得られた切片を常法で脱パラフィン操作を行った後、免疫染色法によりオートファジーについて評価した。

(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) HGF 蛋白質の皮下注射の ALS モデルトランスジェニックラットの病態修飾効果 HGF 蛋白質の皮下注射の効果を評価する目的で、東北大学神経内科青木らが開発した ALS モデルトランスジェニックラット (TG-SOD1<sup>H46R</sup> RAT) に発症時期から HGF 蛋白質を連日皮下注射した。このモデル動物は、髄腔内投与による治療効果の実績のある TG-SOD1<sup>G93A</sup> RAT に比較してより病態進行が MILD であることから、HGF 蛋白質の皮下投与による治療効果が見やすい実験動物と期待された。HGF 蛋白質の投与濃度は、当研究室で複数の疾患動物モデルで実績のある濃度とした。その結果、HGF 蛋白質の皮下注射における投与群は、コントロール群と比較して運動麻痺の改善を認めなかった。さらに寿命についても評価した。その結果、HGF 蛋白質の皮下注射連日投与においては、コントロールと比較し、有意な寿命延長効果を認めなかった。
- (2) オートファジーに対する HGF の効果 ALS-Tg MICE (TG-SOD1<sup>G93A</sup> MICE) と

SHANG, FUNAKOSHI ET AL., 2011;  
MIYAZAWA, FUNAKOSHI ET AL.,  
UNPUBLISHED DATA)。実際、私達の ALS-Tg  
と HGF-Tg とのダブル Tg マウスの解析結  
果から、HGF の作用分子機序としては運動  
ニューロンに対する作用に加えて、グリオ  
ーシス (アストロサイトーシス、ミクログ  
リオシス) の抑制、アストロサイトの機  
能改善作用があることが明らかとなった。  
私達はこれに加えて、脳虚血のモデルに対  
する岡山大学との共同研究で、HGF の機能  
として、(A) 神経細胞保護作用に加えて、(B)  
神経新生促進作用、(C) 神経突起再生伸長作  
用、(D) 抗繊維化作用 (E) 血管新生作用を  
もつことを明らかとした。特に(B)~(E)の機  
能に関しては、神経栄養因子の代表格の1  
つである GLIAL CELL LINE-DERIVED  
NEUROTROPHIC FACTOR (GDNF) に対して  
HGF が大きな優位性をもつことが立証され  
た (SHANG, FUNAKOSHI ET AL., 2011)。し  
たがって、ALS の病態改善に対して、HGF  
が他の神経栄養因子に優位性を持つことが  
期待される。

## (2) アポトーシス v.s. オートファジー

ALS における運動ニューロン変性に  
CASPASE 群が重要な寄与をし、CASPASE  
INHIBITOR 治療が、ALS-Tg マウスの進行  
を抑制することが報告されて以来、ALS 進  
行に対するアポトーシスの重要性が認識さ  
れ、抗アポトーシスに力が入られてきた。  
この点で HGF は運動ニューロンにおける  
活性化 CASPASE 群の誘導を抑制することを  
報告してきた (SUN, FUNAKOSHI ET AL.,  
2002; KADAYAMA, FUNAKOSHI ET AL.,  
2007)。

これとは別に、オートファジーの重要分  
子 ATG5 の神経特異的ノックアウトマウス  
が作製されると神経変性がおこることか  
ら、アポトーシスに加えて神経変性疾患に  
おけるオートファジーの重要性が認識され

てきている。ALS-Tg マウスにおけるオート  
ファジーの修飾が MORIMOTO らにより  
2007 年に報告されている。一方本年度の研  
究から、HGF が ALS-Tg マウスのオートフ  
ァジーを修飾することが明らかとなった  
( KADAYAMA, FUNAKOSHI ET AL.,  
UNPUBLISHED DATA)。現在さらに詳細な解  
析を継続しているが、オートファジーの観  
点からも作用する HGF は、CASPASE  
INHIBITOR に比較して優位性を持つことが  
明らかになった。

## (3) 投与法の検討：髄腔内投与と皮下注 射の比較

脳神経系には、血液脳関門  
(BLOOD-BRAIN BARRIER: B.B.B.) が存在  
するため、全身血液中のサイズの大きな分  
子の供給では、脳神経系に供給 (到達) で  
きない。多くの神経栄養活性を持つ分子は  
サイズが B.B.B. を通過するには十分小さく  
なく、全身血液中への供給では脳神経系に  
充分量供給できないことが危惧される。し  
かし、従来神経栄養作用を持つ分子の多く  
は、ALS 治療に向け皮下注射により患者に  
投与されてきた。これは、皮下注射でも皮  
膚から神経終末を介して神経内を逆行性に  
神経細胞体まで供給できることを期待した  
可能性もあるが、運動ニューロンへの供給  
には有利とは言いがたい。東北大学神経内  
科青木 (現東北大学教授)、糸山 (現国立精  
神神経医療センター病院病院長) らにより、  
髄腔内投与により脊髄に充分量の HGF 蛋  
白質を供給でき、濃度依存的に ALS-Tg ラ  
ットの運動ニューロンの細胞死を抑制し、  
寿命を延長することが明らかとなった  
(ISHIGAKI, AOKI ET AL., 2007)。この共同研  
究で特に発症時投与で治療効果を持つこと  
が明らかになった点は特筆すべき点であ  
る。このことから、臨床においても発症時  
投与による治療効果が期待される。

## (4) 霊長類に対するリコンビナント HGF

(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。

### 3.その他



**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： 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教授  
                  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

MRIは非侵襲的に生体内部構造を観察できる方法であるが、従来のT1/T2強調像のみから脊髄損傷の重症度や機能的予後を正確に予測することは困難であった。脊髄損傷による軸索の断裂や神経細胞死、それに続いて起こる脱髄、空洞やグリア瘢痕形成等の変化のうち、残余髄鞘面積が運動機能と相関があることを既に我々は報告した（Iwanami et al. JNR 2005）。今回の髄鞘可視化技術であるMyelin mapを用いて損傷脊髄内の残余髄鞘面積を評価することに成功した。この方法を用いることにより、損傷後急性期に正確な脊髄損傷の予後予測が可能となり、脊髄損傷後の重症度判定における強力な評価法となりうると考えている。

### A. 研究目的

q-space imaging (QSI)は拡散MRIによって組織の制限構造を検出する方法であり、数 $\mu\text{m}$ の単位で組織の情報を検出することが可能である（Callaghan et al. 1990）。我々はQSIを応用し脊髄の中で最も強い制限構造である髄鞘に特化したMyelin mapを開発し、その有用性を報告してきた。本研究の目的はMyelin mapを用いて損傷後の脊髄の変化を描出し運動機能との相関を検討し、脊髄損傷の機能的予後予測が可能であるかを検証することである。

### B. 研究方法

コモンマーモセットの第5頸椎高位に損傷程度の異なる圧挫損傷モデル（15g, 17g, 20g 損傷, 各群 n=2）を作製し、7T小動物用MRI (Bruker biospin) を用いて損傷後1、3、10週にQSIを全麻下に撮像した。QSIの解析と表示は計算機処理ソフトIDL (ITT) を用い、組織の拡散変位分布より得た情報からMyelin mapを構築した。運動機能評価としてBar Grip test（握力）、Cage climbing test（ケージ登坂能力）、3D motor activity（24時間運動量）、MIKY運動機能スコア（総合運動機能）を計測した。その後髄鞘染色であるLuxol Fast Blue (LFB) 染色とHE染色による組織学的評価を行った。Myelin mapとLFB染色像の定量的解析にはImage J (ver. 1.43) を用いて、両者を比較検討した。

### C. 研究結果

#### 1) T2強調画像とMyelin mapの経時的変化

従来のT2強調画像では、損傷後の髄内高信号により浮腫や炎症、低信号により出血をとらえることができる。しかし、機能的予後に大きな影響を与える髄鞘に関する情報は全くとらえることはできない。一方、myelin mapでは損傷後急性期より残存髄鞘を

描出しており、損傷のていどの違いにより、残存髄鞘面積も異なっていた。Myelin mapの利点は動物をいかせたまま経時の変化をとらえられる点である。15gと17g損傷群では損傷後1週で損傷部脊髄の辺縁に残存する髄鞘をmyelin mapは描出していたが、20g損傷群ではほとんど残存する髄鞘はみられなかった。損傷程度の異なる脊髄損傷モデルにおいて、髄鞘面積は経時的に減少していたが、その程度は損傷の程度が強くなるに従って顕著に減少していた(図1)。

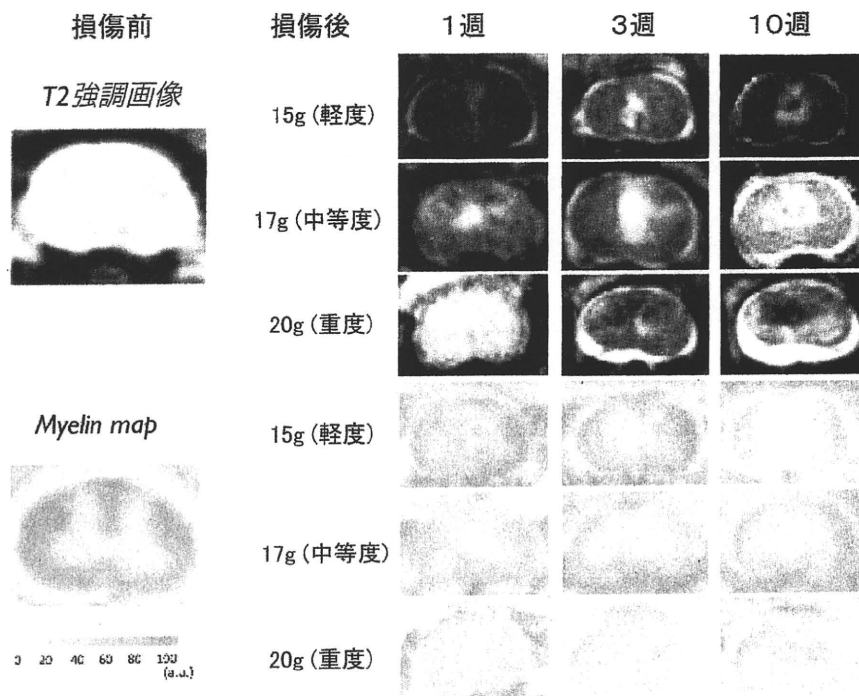


図1 T2強調画像とMyelin mapの経時的变化

## 2) Myelin map と組織所見との比較

損傷程度の異なる脊髄損傷モデルを組織学的に検討すると、既に我々が報告したように損傷程度が強くなるに従って、損傷部空洞は増大し、残余髄鞘面積とCAMK2a陽性皮質脊髄路繊維は減少した。LFB染色像とmyelin mapを比較すると両者は非常に酷似していた。

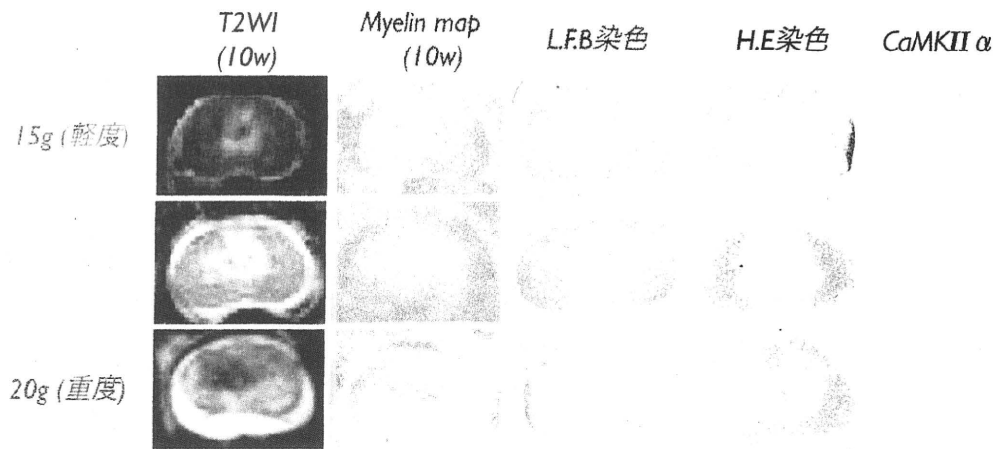


図2 Myelin map(10w)と組織所見との比較

### 3) Myelin map と L F B 染色による髄鞘の定量的評価

損傷後10週におけるMyelin mapとLFB髄鞘染色による残余髄鞘面積を定量的に評価した。myelin mapによる経時的評価では、15gと17g損傷群では1週の時点での減少は軽度で、その後3週にかけても減少の程度は軽度であったが、10週にはかけて遅発性に減少していた。一方20g損傷群では損傷後1週の時点でかなり減少し、3週まではほぼ変化はみられなかったが、10週には顕著な減少がみられた。3群間で統計学的に有意差がみられた。10週に時点におけるLFB染色との比較でも3群間に有意差がみられ、myelin mapの結果をよく一致していた(図3)。

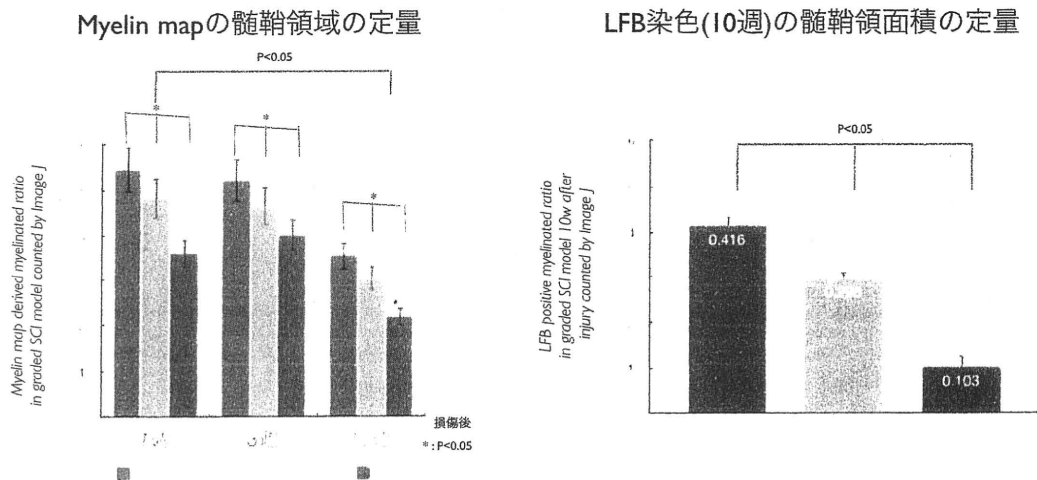


図3 Myelin mapとLFB染色による髄鞘の定量的評価