

201128007B

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～23年度 総合研究報告書

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

平成24年3月 印刷

目 次

I 研究者一覧

II 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 ----- 1
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. HGF による ALS 治療法の至適化と HGF のもつ生理学的学習能向上活性 ----- 7
旭川医科大学 教育研究推進センター 船越 洋
2. 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 --- 15
慶応義塾大学 医学部生理学 岡野 栄之
慶応義塾大学 医学部整形外科 中村 雅也
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
—非臨床試験、治験薬製造、臨床試験の実施— ----- 19
クリングルファーマ株式会社 事業開発部 安達 喜一

IV 研究成果の刊行に関する一覧 ----- 25

V 研究成果の刊行物 ----- 28

研究者一覧

平成 21 年度

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	東北大学大学院医学系研究科 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

平成 22 年度

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	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	事業開発部長

平成 23 年度

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	旭川医科大学 教育研究推進センター	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	取締役 事業開発部長

総合研究報告書

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。さらに、HGF の臨床試験実施に向けてカナクイザルによる GLP 毒性試験を行い、脊髄腔内投与による HGF の安全性と薬物動態を確認した。また、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。第 I 相臨床試験の準備は、プロトコル開発からプロジェクトマネジメント、モニタリング・監査・統計解析・データマネジメント、治験コーディネーター（CRC）育成に至るまで東北大学トランスレーショナルリサーチ（TR）センターの全面的支援を得て進めた。平成 23 年 6 月に第 I 相臨床試験の治験届を医薬品医療機器総合機構（PMDA）に、同年 7 月に東北大学病院治験審査委員会（IRB）に提出し承認を得た。現在、東北大学病院において第 I 相臨床試験を実施中である。

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 教授

研究分担者：
岡野栄之 慶應義塾大学医学部生理学 教授
船越 洋 大阪大学大学院分子再生医学
准教授（現、旭川医科大学教育研究推進
センター 教授）

中村雅也 慶應義塾大学医学部整形外科
専任講師

安達喜一 クリングルフーマ株式会社
取締役副社長

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 患者に対する第 I 相臨床試験に進む。同時に HGF の治療効果の機序を明らかにする。

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 蛋白の髄腔内投与によっ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。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ことから、ラットおよび霊長類（マーモセット、カニクイザル）に対する髄腔内投与での非臨床試験により、安全性を確認し臨床用量を設定する。その後ヒトでの第 I 相臨床試験を開始する。

1) 霊長類に対する髄腔内投与での安全性試験

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った。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應義塾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た。

上記の結果を受け、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（クリングルファーマ担当、委託先：新日本科学）。すなわち、ヒトリコンビナント HGF 蛋白（3 用量）をカニクイザル（各群雄 4 匹）の脊髄腔内に 4 週間持続投与したときの毒性変化を調べるとともに、4 週間の休薬期間を設けてその回復性について検討した。また、そのときの全身的曝露についても評価した。本試験は、①髄腔内持続投与の安全性と同時に、②髄腔内投与時の薬物動態（HGF の髄腔内分布・排泄経路の確認、全身への移行性など）を確認することを目的とする。

2) q-space imaging による評価法の確立

治療の評価に必要な新たな画像評価法の確立

を目指して基礎研究を行った。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。

（倫理面への配慮）

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。

3) 治験薬製造

ヒトリコンビナント HGF 蛋白製剤としては、すでに臨床試験で使用実績のある静注用製剤があるが、組成の中に髄腔内投与の使用実績がない、あるいは使用実績を超える賦形剤が含まれている。従って、安全性を考慮し、髄腔内投与用に製剤組成を変更することにした。新たに製剤（液剤）化の試作検討を行い、既存の髄注製剤の使用実績を超えない範囲で賦形剤の組成を決定した。第 I 相臨床試験に使用する注射液剤と投与濃度に希釈するための希釈液を、GMP 基準で製造した。また、HGF 製剤の試作品を用いて予備安定性試験を開始した（クリングルファーマ担当、委託先：東洋紡バイオロジックス、東洋紡績）。

4) 第 I 相臨床試験の準備

東北大学 TR センターの全面的支援を得て、第 I 相臨床試験の準備、すなわちプロトコール開発、プロジェクトマネジメント、モニタリング・監査・統計解析・データマネジメント、CRC 育成を行った。また、臨床試験で使用する髄腔内投与のための医療器具を選定した。さらに、臨床試験において必要となるヒト血漿および髄液中の HGF および抗 HGF 抗体の定量検査の委託先、モニタリングおよび監査を担当する開発業務受託機関（CRO）を選定した。

5) 第 I 相臨床試験の実施

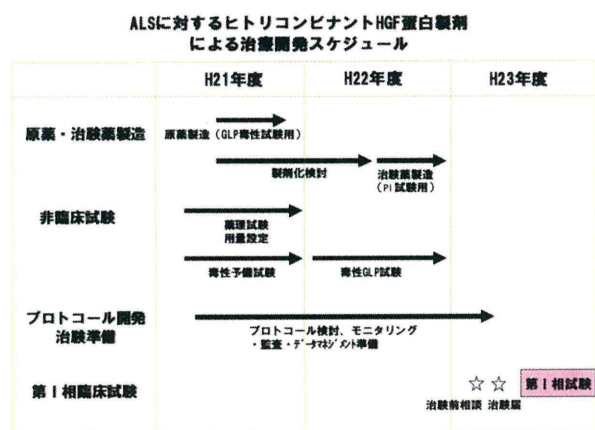
医薬品・医療機器総合機構（PMDA）との対面助言（治験開始前相談）を経て、治験届を PMDA ならびに東北大学病院治験審査委員会（IRB）に提出し、速やかに治験を開始する。

（倫理面への配慮）

全ての治験は治験届の提出および IRB の承認を経てから施行する。

C. 研究結果 および D. 考察

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を下図に示す。



1) 霊長類に対する髄腔内投与での安全性試験

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、慶應義塾大学・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 蛋白を髄腔内に 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（Kitamura et al.

PLoS One 2011）。

上記の結果を受けて、GLP 基準による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（クリングルファーマ担当）。平成 21 年度に施行した予備試験の結果を受け、平成 22 年度に本試験を実施・完了した。投与および休薬期間中、死亡例はみられなかった。また、一般状態、一般症状および神経行動学的機能観察では、いずれの群においても HGF に起因すると考えられる変化は認められなかった。病理組織学的検査では、臨床用量の 60 倍を超える高用量群においても毒性所見は認められなかった。本試験において、①髄腔内持続投与の安全性ならびに、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）を確認することができた。

2) q-space imaging(QSI)による評価法の確立

QSI の代表的なパラメーターである

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 により脊髄内の髄鞘を可視化できることを明らかにした。さらにサル脊髄損傷に対する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。以上のより、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と考えられた。

3) 治験薬製造

第 I 相臨床試験に使用する治験薬（注射液剤）と希釈液を GMP 基準で製造した。製造工程において異常は認められず、製造標準書どおりに製造することができた。製造した注射液剤と希釈液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。また、予備安定性試験によって

治験薬として十分に安定であることが示された。

さらにはこの液剤に変わる新製剤を検討するための原薬を製造した。培養工程および精製工程のいずれにおいても異常は認められず、製造標準書通りに HGF 原薬を製造することができた。製造した HGF 原薬はすべての規格試験に適合した。製造した原薬を用いて新製剤を開発した。新製剤は凍結乾燥製剤であり（下写真）、現行の凍結溶液製剤に比べて扱いやすく、今後の第 II 相試験から使用する予定である。



4) 第 I 相臨床試験の準備

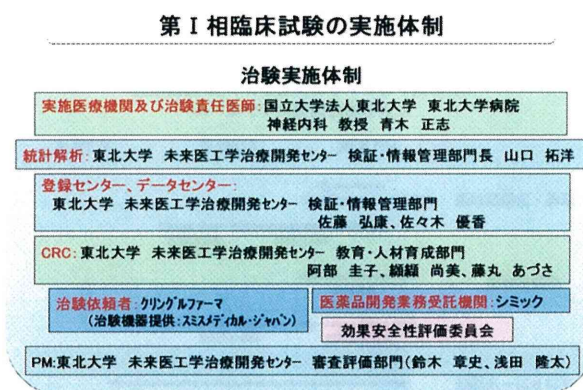
第 I 相臨床試験の準備は、東北大学病院を実施医療機関とし（治験責任医師：神経内科 青木 正志）、東北大学 TR センター（未来医工学治療開発センター）各部門の支援の下で行った。

東北大学 TR センター審査・評価部門と協同し、第 I 相臨床試験のプロトコール、ならびに治験必須文書（治験薬概要書、治験機器概要書、治験実施計画書、患者同意説明文書、症例報告書）および各種手順書を作成した。さらには治験としての安全性や倫理的妥当性を薬事法および GCP に遵守して確保するために、東北大学 TR センター検証・情報管理部門の支援を受けてモニタリング・監査・統計解析・データマネジメントの整備も進めた。また、東北大学 TR センター教育・人材育成部門において CRC の育成を行うと同時に、担当モニター（シミック）を交えての各種手順の確認を行い、GCP に沿った治験実施体制を整えた。全体のプロジェクトマネジメントは東北大学 TR センター審査・評価部門で行うこととした。

一方、臨床試験で使用する投与機器として、

カテーテルと皮下ポートのセットとなっているポータカット II（スミスメディカル）を選定した。ポータカット II を使用することにより、皮下ポートを介して HGF を髄腔内に繰り返し投与することが可能となった。また、臨床試験の薬物動態等の検査施設として新日本科学を、CRO としてシミックを選定した。

以上のように構築した第 I 相臨床試験の実施体制を以下の図に示す。



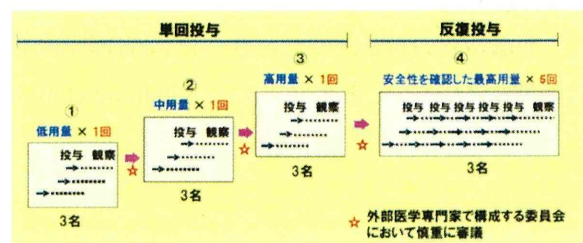
5) 第 I 相臨床試験の実施

上記の準備を経て、平成 23 年 6 月に第 I 相臨床試験の治験届を医薬品医療機器総合機構（PMDA）に、同年 7 月に東北大学病院 IRB に提出し其々承認を得た後、第 I 相臨床試験を開始した。本試験は ALS 患者を対象とし、HGF を髄腔内投与したときの安全性・忍容性および薬物動態を確認することを目的とする。また、本試験はオープンラベルで行い、用量漸増（低、中、高用量）による髄腔内単回投与と、安全性を確認した最高用量での髄腔内反復投与の計 4 群（12 例）の試験である。各群終了時に外部医



第 I 相臨床試験の概要

- デザイン：① 単回投与：3 用量、用量漸増
 ② 反復投与：安全性を確認した最高用量で 5 回投与
 対象：ALS 患者、各群 3 例 X 4 群計 12 例



学専門家で構成する効果安全性評価委員会による臨床評価を行い、安全性には十分配慮して試験を進めることとした。なお、東北大学 TR センター臨床応用部門より、効果安全性評価委員会の委員に加わって頂いた。第 I 相臨床試験の概要を以下に示す。

本試験の対象患者の選択基準は、以下のとおりである。

- ・ ALS の診断基準に該当し発症後 2 年以内
- ・ ALS の重症度分類が 1 もしくは 2
- ・ 年齢が 20 歳以上、65 歳未満
- ・ 投与・観察期間の一定期間の入院が可能
- ・ 治験参加に同意

また、ALS 以外の重篤な疾患がある方、癌あるいは癌の既往のある方、医療機器にアレルギーのある方などは本試験から除外することとした。

本研究において、当初の大きな目標であった第 I 相臨床試験を開始することができた。平成 24 年度以降、投与症例数を重ねて本試験を完了し、HGF の髄腔内投与による安全性・忍容性および薬物動態に関する臨床データを取得する。また、本試験終了後、引き続いて ALS 患者での有効性を確認するための第 II 相臨床試験（いわゆる Proof of Concept 試験；POC 試験）を実施する予定である。第 II 相臨床試験では、HGF を髄腔内に長期投与することを計画している。よって、長期投与の安全性を担保するために、カニクイザルによる慢性毒性試験を GLP 準拠で実施する必要がある。平成 24 年度以降、第 I 相臨床試験と並行して上記非臨床試験、さらには第 II 相臨床試験に用いる治験薬製造を行い、迅速な医薬品開発と第 II 相臨床試験での POC 取得を目指す。

E. 結論

HGF の ALS に対する第 I 相臨床試験を開始するために必要な、非臨床試験および治験薬製造を実施・完了した。東北大学 TR センターの全面的な支援を得て第 I 相臨床試験の準備を行

った。PMDA および治験施設 IRB から治験届の承認を得て、東北大学病院において第 I 相臨床試験を開始した。

F. 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 蛋白を用いた第 1 相試験（治験）JALSA、日本 ALS 協会 82 (2010) 10-2

Kitamura K, Fujiyoshi K, Yamane J, Toyota F, Hikishima K, Nomura T, Funakoshi H, Nakamura T, Aoki M, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury. PLoS One 2011;6(11):e27706.

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 2010 年 10 月 14 日 京都

Konomi T, Nakamura M, Okano H, et al. Myelin map after graded spinal cord injury in adult common marmosets. 40th Annual meeting Neuroscience 2010, San Diego, CA, USA

青木正志、肝細胞増殖因子による ALS に対する新規治療法の開発 第 52 回日本神経学会総会シンポジウム 2011 年 5 月 20 日 名古屋

青木正志、HGF を用いた筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発 第 34 回神経科学会特別企画プログラム 2011 年 9 月 16 日 横浜他

G. 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

東北大学プレスリリース(平成 23 年 7 月 8 日)
「筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する HGF(肝細胞増殖因子)による第 I 相臨床試験の開始について」

分 担 研 究 報 告 書

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

「HGF による ALS 治療法の至適化と HGF のもつ生理的学習能向上活性」

研究分担者：船越 洋	(旭川医科大学 教育研究推進センター)
共同研究者：島田 (大谷) 若菜	(旭川医科大学 教育研究推進センター)
野間 さつき	(旭川医科大学 教育研究推進センター)
金井 将昭	(旭川医科大学 教育研究推進センター)
角山 圭一	(姫路獨協大学 薬学部)
加藤 信介	(鳥取大学 医学部脳神経病理部門)
岡野 栄之	(慶応義塾大学 医学部生理学)
青木 正志	(東北大学 医学部神経内科)
安達 喜一	(クリングルファーマ株式会社)
加藤 貴史	(大阪大学先端科学イノベーションセンター クリングルファーマ再生創薬共同研究部門)
中村 敏一	(大阪大学先端科学イノベーションセンター クリングルファーマ再生創薬共同研究部門)

研究要旨

ALS モデルトランスジェニック動物に対し、HGF 遺伝子および HGF 蛋白質が治療効果を持つことが明らかとなっている。しかし、その至適投与法は未完成であった。また、HGF の作用分子機序解析および脳神経系への HGF 供給が生理的な脳神経機能に与える影響を解析することは、ALS 治療法開発で重要である。本研究の3年間でこれらの観点から研究を進めた。その結果、(1) HGF の至適供給法として(a) リコンビナントヒト HGF (rhHGF) 蛋白質の髄腔内投与(b) rhHGF 蛋白質の皮下投与 (c) 各種ウイルスベクターによる脊髄への直接単回投与および脳脊髄液中への単回供給の比較解析結果、ALS 治療に最適なのは rhHGF 蛋白質の髄腔内持続投与法であることが明らかとなった。(2) HGF の治療効果の作用分子機序解析を行った結果、(a) HGF は直接神経栄養作用 (アポトーシス経路の抑制に加えてオートファジー経路の修飾) を示すことに加えて、グリオシス (アストロサイトとミクログリア) 抑制効果とアストロサイトのグルタミン酸トランスポーターの低下の抑制効果があることが明らかとなった。また、HGF は ALS モデル動物において神経系に機能することに加えて、HGF が ALS 動物の肝臓における病理変化からの回復過程で機能する内因性治療因子として機能することが明らかとなった。(3) rhHGF 蛋白質を長期間脳神経系内に供給した際におこる生理的脳神経機能の修飾作用を予測するため、HGF を脳神経系に高発現させたトランスジェニックマウス (HGF-Tg) の記憶・学習能の修飾効果を解析した。Y-迷路、モーリス水迷路による解析結果 (Visual test, non visual test, transfer test)、HGF はマウスの記憶・学習能を向上させることが明らかとなった。以上から、HGF の脳神経系への長期投与では記憶・学習能について有利に機能することが示唆された。現在、東北大学で ALS 患者に対する HGF 髄腔内投与の Phase I study がすすめられており、成功すれば HGF による画期的 ALS 治療法確立に寄与するものと期待される。(4) HGF は ALS モデル動物に加えて他の神経変性疾患モデルノックイン動物の神経変性も抑制することが明らかとなった。今後、HGF が ALS を中心に、ALS に加えてさらに多くの神経疾患に対する治療薬となることが期待される。

A. 研究目的

- (1) ALS への HGF 治療最適化への基盤研究
rhHGF 蛋白質の髄腔内投与と皮下投与の比較および各種ウイルスベクター投与（脊髄内直接投与・髄腔内投与）を行い HGF の至適投与法を確定する。
- (2) ALS 病態進行過程における HGF の作用分子機序解析：神経系と非神経系の比較解析結果をもとに HGF の作用分子機序を解明する。
- (3) HGF の脳神経系に於ける生理機能の解析—HGF を恒常的に長期間脳神経系に供給した際にも記憶・学習能に対する修飾効果を解析する。
- (4) HGF による各種神経変性疾患に対する一般的な治療法確立に向けて—HGF による ALS 以外の神経変性疾患への適用の可能性の解析—を行う。

(1) ALS への HGF 治療最適化への基盤研究：

HGF の至適投与法として、これまでにトランスジェニック動物を用いた遺伝子導入法と、リコンビナントヒト HGF 蛋白質（rhHGF）の髄腔内投与法の有効性が明らかとなっている。ただし、後者の投与形態は、一般病院のどこでも容易にできる方法とはいえない。一方で、各種神経栄養因子の ALS への治療研究は、ヒトにおいては通常皮下注射の方法がとられており、もし皮下投与法が有効であった場合、臨床上の投与形態としては、髄腔内投与に比べ一般病院での治療に適した投与形態である。しかし、多くの機能蛋白質は血液脳関門（B.B.B.）を通過できないため皮下注射による神経疾患への治療

適用は最近では疑問視されるようになってきている。本研究では、rhHGF の ALS への最適な治療法の確立に向けて、投与形態の最適化をはかるための基盤研究を行うことを目的とした。

(2) ALS 病態進行過程における内因性 HGF の機能解析—神経系と非神経系の比較解析：

ヒト ALS の原因遺伝子である変異型 SOD1 を過剰発現する ALS モデルトランスジェニックマウスおよびラットにおいて、運動神経細胞の変性が進行性であるのに対して、肝臓の病理変化は一過性で ALS の進行過程で回復現象が見られることが明らかとされた（Kato *et al.*）。なぜ、神経は回復しないのに肝臓は回復していくのか、その回復過程に HGF が寄与しているか否か、解析することを目的とした（HGF は神経栄養活性に加えて肝再生因子としての機能も有名である）。

(3) HGF の恒常的脳神経系への供給が、生理的脳神経機能に与える効果についての研究—記憶・学習能について：HGF の機能修飾活性があるか否かについて解析することを目的とした。

(4) HGF による多彩な神経変性疾患に対するユニバーサルな治療法確立に向けて—HGF による ALS 以外の神経変性疾患への適用の可能性の解析—：

ALS に加えて多くの神経変性疾患が知られるが、いずれも根本治療法がない難病である。ALS で得られた知見が他の神経変性疾患にも適用可能か否かを見るため、神経変性疾患の 1 つである「脊髄小脳変性症」に焦点をあて、HGF の治療適用の可能性について検討する

ことを目的とした。

B. 研究方法

(1) ALS モデル動物としては、Tg-SOD1^{H46R} ラット（東北大学神経内科青木教授より供与していただいた）を用いた。この ALS モデルラットは、rhHGF の髄腔内投与による治療効果がすでに明らかになっている Tg-SOD1^{G93A} ラットより、病態進行が緩徐な ALS モデル動物である。Tg-SOD1^{H46R} ラットに対して1ヶ月にわたり rhHGF 蛋白質を皮下投与し、Tg-SOD1^{H46R} ラットの寿命が延長するか否かを解析した。

(2) Tg-SOD1^{G93A} マウス (G1H) とその同腹肢を用い、脊髄と肝臓組織について、HGF、c-Met (HGF 受容体) およびリン酸化 c-Met (活性化型 c-Met) について免疫染色法を用いて解析した。肝臓の病理変化については、H-E 染色法と PAS 染色法を用いた。内因性 HGF の機能を中和するため、抗 HGF 中和抗体を皮下ポンプにて持続投与し解析した。

(3) 神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス (HGF-Tg) (C57BL/6 への backcross を 10 世代以上行ったマウス) と野生型 C57BL/6 マウスで学習能を比較検討した。

- (a) HGF の ELISA 法による解析
- (b) HGF と c-Met (HGF 受容体) の免疫染色法による解析
- (c) リン酸化 c-Met のウェスタンブロット法による c-Met 活性化の解析
- (d) Y-Maze test による解析
- (e) Morris Water Maze test による解析

(f) グルタミン酸受容体のウェスタンブロット法による解析を施行した。

(* 脳神経組織への stereotaxic injection による投与では、BDNF とその受容体 TrkB の様に学習脳を修飾することが報告されている神経栄養因子とその受容体が誘導されることが報告されている。このため、本研究では他の学習能解析モデルと同様、HGF を傷害なしに脳神経系に供給できる HGF 過剰発現マウス = HGF-Tg マウスを用いて解析を進めた)。

(4) 脊髄小脳変性症モデルノックインマウス (SCA-KI) と神経特異的 HGF トランスジェニックマウス (HGF-Tg) を交配し、WT, SCA-KI, HGF-Tg, SCA-KI/HGF-Tg マウスの 4 群を作成し、HGF、c-Met、リン酸化 c-Met (活性化 c-Met) の発現および神経変性を ELISA 法および免疫染色法で評価した。

C. 研究結果

(1) ALS への HGF 治療最適化への基盤研究 (髄腔内投与法 V.S. 皮下投与法の比較) :

Tg-SOD1^{H46R} ラットに、多くの動物疾患モデル動物で有効性が確認されている濃度で rhHGF 蛋白質を投与したところ、vehicle 投与群に比べて寿命延長効果を得られなかった。この結果は、Tg-SOD1^{H46R} ラットに比較して病態進行が早く寿命の短い Tg-SOD1^{G93A} ラットに対して、rhHGF 蛋白質の髄腔内投与で寿命延長効果が得られているのと対照的な結果であった (Funakoshi H, Aoki M *et al.*, in preparation)。

(2) ALS 病態進行過程における内因性 HGF の機能解析—神経系と非神経系の比較解析：

HGF とリン酸化 c-Met (活性化型) の発現を解析した結果、脊髄組織ではリン酸化 c-Met の発現が持続するのに比べて、肝臓ではより早期からリン酸化 c-Met の発現が始まり、次第に免疫染色性が低下し、その後染色性が detect できなくなった。この染色パターンはまさに脊髄の運動神経細胞の変性が持続するのに対して、肝臓組織は一過性病理変化から回復していく経過とよく対応していた。さらに抗 HGF 中和抗体投与で、肝臓組織の病理変化からの回復が遅延した (Ohya-Shimada *et al.*, in preparation)。

(3) HGF の脳神経系に於ける生理機能の解析—HGF を恒常的に長期間脳神経系に供給した際も記憶・学習能に対する修飾効果の解析：

(a) HGF の海馬および大脳皮質における発現

野生型マウスに比較し、HGF-Tg マウス (HGF-Tg (+/-) ヘテロマウスおよび HGF-Tg (+/+) ホモマウスでは、HGF の遺伝子濃度依存的に HGF 蛋白質発現レベルが高いことが ELISA 法および免疫染色法で明らかとなった。

(b) Y-Maze test

Y-Maze test により、HGF-Tg マウスでは野生型マウスより学習能が向上することが明らかとなった。

(c) Morris Water Maze test

Non-visible test により、Morris Water Maze test 上、HGF が生理的な Spatial Working Memory (学習・記憶能) を向上させることが明らかとなった。さらに、Transfer test (Probe test) により、プラットフォームを見えなくした際、その

1 / 4 分画のプール領域の滞在時間が優位に高くなることが明らかとなり、このテストにおいても HGF が生理的学習・記憶能を向上させることが明らかとなった。一方で、Visible test によるプラットフォーム到達時間が HGF-Tg マウスと野生型マウスにおいて差を認めなかったことから、上記学習・記憶能の修飾は、単純な運動機能や目の機能の差に起因している訳ではないことが明らかとなった。

(d) グルタミン酸受容体の発現修飾

HGF-Tg マウスにおいては、海馬におけるグルタミン酸受容体の 1 部のポピュレーションの発現が上昇していることがウェスタンブロット法解析の結果により明らかになった。

以上から、本研究により、HGF の脳神経系における恒常的な発現が生理的学習能の向上作用をもつことが初めて明らかとなった。したがって、HGF の髄腔内投与による ALS 治療時には、記憶・学習能には有利に機能することが示唆された。

(4) HGF による多くの神経変性疾患に対する治療法確立に向けて—HGF による ALS 以外の神経変性疾患への適用の可能性の解析—：

SCA-KI マウスに比較し、SCA-KI/HGF-Tg マウスでは、免疫染色による解析の結果、小脳プルキンエ細胞の変性が抑制されること、さらにプルキンエ細胞の non-cell-autonomous な神経変性に寄与するとされる SCA-KI における Bergmann glia におけるグルタミン酸トランスポーターの発現レベルの低下を抑制する作用があることが明らかとなった (Noma *et al.*, 2012)。

D. 考察

ALS は運動ニューロン特異的な致死性神経変性疾患で、現時点で有効な治療法が確立されていない。私達は、これまでHGF が神経栄養活性に加えて複数の分子機序でALS モデルトランスジェニック動物の脊髓と脳幹部の両方の運動ニューロン死を抑制することで運動機能を改善し、さらに寿命を延長することを明らかにしてきた

(Sun, Funakoshi et al., 2002; Kadoyama, Funakoshi et al., 2007; Kadoyama, Funakoshi et al., 2009)。さらに、家族性ALS

(FALS)に加えて孤発性ALS (SALS) の脊髓組織において、HGF とHGF 受容体

(c-Met) がALS モデルトランスジェニックマウスの時と同様に発現制御をうけることを、免疫組織染色法とWestern Blot 法で

確認した (Kato, Funakoshi et al., 2003)。以上の結果から、HGF-c-Met systemがFALS

とSALS の共通する病態機序に対する内因性のALS 進行抑制メカニズムとして機能していることが示唆された。これらの背景

から、HGF はFALS とSALS の共通する治療因子として期待される。一方で、臨床

でのALS 患者へのHGF の供給には、上記トランスジェニックマウスの手法は非現実的

である。この問題に対して、東北大学神経内科青木、糸山 (現国立精神神経医療センター病院)らにより、リコンビナントHGF

の髄腔内投与がALS 進行の抑制に有用であることが明らかになった (Ishigaki, Aoki et al., 2007)。東北大学との共同研究で、

Ishigaki, AokiらによりHGF 蛋白質の効果がHGF の濃度依存的であること

(dose-dependent)、その効果が発症前投与だけでなく発症時投与でも認められることが明らかとなり、臨床で発症時に病院を受診したときからの治療への適用の有用性が示唆された。

一方で、これまで多くの神経栄養因子のALS 治療では、皮下注射の方法が選択されてきた経緯があり、もし同様の方法が有用であれば、髄腔内投与に比べて手技が容易であり、多くの病院で行える治療法として汎用性が期待できる。本研究により、ALS へのHGF 供給法としては、皮下投与法に比べ、髄腔内投与法が優れていることがALS トランスジェニック動物の解析結果明らかとなった。現在東北大学神経内科青木教授らによりHGF のALS 患者への髄腔内投与のPhase I study が開始されている。本研究結果から、ヒトALS 患者へのrhHGF の投与方法としては、髄腔内投与法が至適であることが明らかとなったことから、rhHGF の髄腔内投与法の安全性がPhase I study で確保されたら、「臨床適用に向け大きな一歩が歩みだせる」と期待された。

HGF とc-Met 受容体は、共に発生過程に加えて成体脳においても発現しているため、HGF-c-Met 系は成体脳神経系に於いても生理的な機能を持っていると考えられる。

したがって、ALS の治療に活性型 rhHGF を投与する際には、HGF のもつ生理的な脳神経機能を修飾する可能性が考えられる。

この点については、慎重な基礎研究が必要と考え、基盤研究を行ってきた。まず、ALS

モデルTg マウスにおいて、運動ニューロンに発現するc-Met は通常チロシンリン酸化

(活性化) されていない。ALS 病態が進行してくるとリン酸化がおこる、さらにここにHGF を過剰発現させるとc-Met のリン酸化される。

一方で、HGF を単純に高発現させたHGF-Tg マウスの運動ニューロンのc-Met はリン酸化が低い。このようなHGF に対するc-Met の応答性の差は、c-Met の細胞内ドメインのセリン残基のリン酸化により調節されていることが明らかとなった

(Kadoyama, Funakoshi et al., 2009)。このようにHGF が成体脳神経系に供給され

ても必ずしも c-Met の活性化はおきないことから、成体は受容体側の調節によりリガンドの応答性を調節する機能があることが明らかとなった。一方で、成体において HGF-c-Met 系は生理的な機能を持つと考えられている。したがって、HGF の脳神経系への供給により、応答可能な状態にある c-Met については HGF に response する可能性が多少あると考えられる。私達はその点を慎重に評価するため、HGF を恒常的に神経系に高発現する神経特異的 HGF-Tg マウスで、記憶・学習能について評価した。その結果、HGF は生理的な記憶・学習能を向上させる機能があることが明らかとなった。私達は、すでに脳神経系への HGF の投与により抗不安作用を示すことを明らかにしている (Akiyoshi et al, 2005)。これらの結果から、HGF の脳神経系への供給では、脳神経系の機能の修飾はわずかであり、記憶・学習能および不安感情という観点での評価でも、脳神経系に有利な作用を示すことが明らかとなった。その意味で、当初心配した生理学的な脳機能に対してマイナスな機能を示す可能性については現時点では否定的である。

また、内因性 HGF が ALS モデル Tg ラットの肝臓の病理変化からの回復現象に寄与していることが明らかとなった。この結果は、HGF を基盤として ALS からの脊髄組織変性からの回復療法を開発できる可能性を示唆する重要知見である。今後より詳細な解析を進めることで、ALS に対する次世代 HGF 治療法開発を目指していきたい。

また、HGF が脊髄小脳変性症に対する有効な治療効果を示すことが明らかとなり、これまで ALS で培った HGF 投与方法をより多くの神経変性疾患治療に生かせる可能性が明らかとなった。近い将来、HGF による広範な神経変性疾患に対する治療法が慎重かつ最速で開発できることが期待される。

E. 結論

HGF の ALS への至適供給法は、リコンビナントヒト蛋白質の髄腔内投与であることが確定した。本研究により、HGF の髄腔内投与による ALS 治療時には、記憶・学習能に有利に機能する可能性が示唆された。いよいよ HGF による ALS 治療への基盤が整ったことになる。現在東北大学で HGF の Phase I study が進められており、慎重かつ迅速な study により近い将来 ALS への日本からの新規治療法開発に成功することが期待される。また、本研究で HGF が他の神経変性疾患モデルノックインマウスに治療効果を示すことが明らかとなったことから、HGF は ALS に加えて他の神経疾患へも治療効果を持つことが期待される。

(倫理面への配慮)

本研究は、動物愛護の精神に基づき 3R に配慮して行った。また、旭川医科大学および大阪大学の遺伝子組換え委員会と動物実験委員会の方針に従い研究が行われた。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Noma S, Ohya-Shimada W, Kanai M, Ueda K, Nakamura T, Funakoshi H. Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7. *Neurosci Res.*, 2012, in press.

Funakoshi H., and Nakamura T.,

- Hepatocyte Growth Factor (HGF): Neurotrophic Functions and Therapeutic Implications for Neuronal Injury/Diseases. *Current Signal Transduction Therapy*. 6, 156-167, 2011.
- Funakoshi H., Kanai M., and Nakamura T. Modulation of Tryptophan Metabolism, promotion of neurogenesis and Alteration of Anxiety-Related Behavior in Tryptophan 2,3-Dioxygenase- Deficient Mice. *International Journal of Tryptophan Research* 4, 7-18, 2011.
- Kadoyama K., Kadoyama K., Funakoshi H., Nakamura T., Sakaeda T. Therapeutic Potential of Hepatocyte Growth Factor for Treating Neurological Diseases. *Current Drug Therapy* 6(3), 7-206, 2011.
- Kitamura K, Fujiyoshi K, Yamane J, Toyota F, Hikishima K, Nomura T, Funakoshi H, Nakamura T, Aoki M, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury. *PLoS One* 6(11), e27706, 2011.
- Shang J, Deguchi K, Ohta Y, Liu N, Zhang X, Tian F, Yamashita T, Ikeda Y, Matsuura T, Funakoshi H, Nakamura T, Abe K. Strong neurogenesis, angiogenesis, synaptogenesis, and antifibrosis of hepatocyte growth factor in rats brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Res*. 89(1), 86-95, 2011.
- Benkhoucha M, Santiago-Rabera ML, Schneitera G, Chofflon M, Funakoshi H, Nakamura T, Lalive PH. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(14), 6424-9, 2010.
- Shang J, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Zhang H, Morimoto N, Liu N, Zhang X, Tian F, Matsuura T, Funakoshi H, Nakamura T, Abe K. Antiapoptotic and antiautophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res*. 88(10):2197-206, 2010.
- 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*, 68 121-130, 2010.
- 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.
- 船越 洋、金井 将昭、中村 敏一. トリプトファン代謝と高次脳機能. *アミノ酸研究* 3(1) 15-19, 2010.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

2.学会発表

省略。

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得
特記なし。
- 2.実用新案登録
特記なし。
- 3.その他
特記なし。

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：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

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研究を行った。サルの正常及び損傷脊髄の 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 の代表的なパラメーターである 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 により脊髄内の髄鞘を可視化できることを明らかにした。さらにサル脊髄損傷に対する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。以上のより、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と考えられた。

A. 研究目的

中枢神経系の外傷や変性疾患では神経細胞の脱落、軸索の途絶、脱髄、その他様々な変化をきたす。しかし、従来の MRI 撮像法では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で開発した (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) サル正常及び損傷脊髄の 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 を用いて撮像し、T2 強調象 (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 頸椎高位に損傷程度の異なる圧挫損傷モデル (15g, 17g, 20g 損傷, 各群 n=2) (Iwanami et al, JNR 2005) を作製し、7T 小動物用 MRI を用いて損傷後 1、3、10 週に QSI を全麻下に撮像した。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、Cage climbing test、24 時間運動量モニタリング、総合運動機能スコアを計測した。その後組織学的評価を行い QSI と比較検討した。

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 9 1 日) 由来