

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590977

研究課題名（和文） 再生誘導因子を用いた神経前駆細胞賦活による ALS 治療法の開発

研究課題名（英文） Development a novel therapeutic strategy based on neural stem cells activation in amyotrophic lateral sclerosis using trophic factors

研究代表者

青木 正志（AOKI MASASHI）

東北大学・病院・講師

研究者番号：70302148

研究成果の概要：筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis 以下 ALS）は神経疾患のなかで最も過酷な疾患とされており、早期に病因の解明と有効な治療法の確立が求められている。本研究では ALS 病態下では再生誘導因子は強力な運動ニューロン保護因子として働くだけでなくアストロサイト機能修飾作用とミクログリア活性化抑制作用も合わせもつ細胞外微小環境調整因子として働くことを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症・神経前駆細胞・細胞外微小環境・再生誘導因子・再生医療

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis 以下 ALS）は神経疾患のなかで最も過酷な疾患とされており、早期に病因の解明と有効な治療法の確立が求められている。Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) 遺伝

子が一部の家族性 ALS の原因遺伝子であることが発見されたが、Cu/Zn SOD の異常がなぜ運動ニューロンに選択的な細胞死をもたらすかは依然として不明である。

一方、近年ニューロン、グリア細胞（星状膠細胞、希突起膠細胞）のいずれをも新しく生み出すことができる多分化能と自己複製

能をあわせもつ神経幹細胞が、成体の脳や脊髄実質にも広く存在することが明らかとなった。ALS のような系統的変性疾患に対しても、この内在性神経幹(前駆)細胞を用いた細胞補充療法の開発が期待されている。

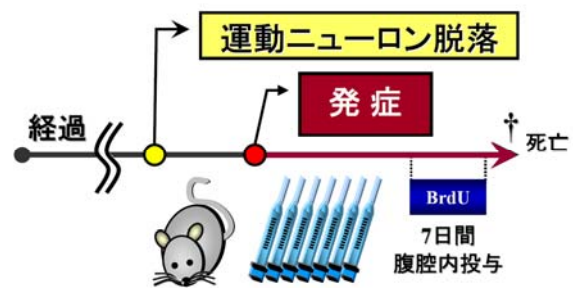
従来の研究で変異 Cu/Zn SOD 遺伝子をマウスに導入することにより運動ニューロン病を非常によく再現できることが明らかにされ ALS の動物モデルとして世界中で使用されている。しかしながらこれまでのトランスジェニックマウスによるモデルでは、薬物の髄腔内投与や脊髄における神経前駆細胞の解析を行うことは非常に困難であった。研究代表者の青木らはこれらの問題を解決するために、世界に先駆けてトランスジェニックラットによる ALS 動物モデルの開発に成功した (J Neurosci, 2001)。従来のマウスと比較して約 20 倍の大きさを持つこのトランスジェニックラットは次世代の ALS 動物モデルとして注目されている。

2. 研究の目的

上記のように Cu/Zn SOD の異常がなぜ運動ニューロンに選択的な細胞死をもたらすかは依然として不明である。本研究ではこの変異 Cu/Zn SOD がもたらす神経変性の過程における内在性の神経幹 (前駆) 細胞の動態に注目し、研究代表者の青木らが開発したトランスジェニックラットによる ALS モデルを用いて ALS 病態下における脊髄神経前駆細胞の増殖と分化、特に「損傷誘導性ニューロン新生 (insult induced neurogenesis)」の有無を検討する。さらには EGF や FGF、HGF などの再生誘導因子を用いた脊髄神経前駆細胞の賦活化による新しい治療法を開発を行う。

3. 研究の方法

(1) ALS ラットモデル脊髄における神経前駆細胞の動態を明らかにするために、ALS ラットに 5-bromodeoxyuridine (BrdU) および幼若で未分化な細胞の nestin, NG2 などのマーカーとの多重染色を用いて脊髄の増殖性細胞を標識をする。そのことにより病態下における脊髄神経前駆細胞の増殖と分化、特に insult induced neurogenesis の有無を検討する (下図に BrdU 投与方法例を示す)。



(2) ALS ラットに EGF や FGF、HGF などの外来性の再生因子投与を行い内在性神経細胞の賦活の試みを行う。これまでの研究で HGF 髄腔内投与により有意に BrdU 陽性細胞の増加が認められたが、EGF+FGF2 投与が内在性神経細胞の増殖促進するかどうかの検討を行う。

(3) さらには外来性の再生因子投与による内在性神経細胞の賦活の試みを行う。(a) 至適用量・投与時期の検討と共に、(b) 他の再生誘導因子や抗軸索伸長阻害因子との組み合わせ投与、(c) グリオーシス抑制因子との組み合わせ投与などを試み、組織修復を行う新規治療法を探索する。

4. 研究成果

(1) ALS ラット発症後においては、いずれも脊髄前角細胞の脱落と同部位に散在するユビキチン陽性の封入体を認めた。より未分化な細胞群として nestin および NG2 (それぞれ未分化神経前駆細胞およびグリア前駆細胞の選択的マーカー) を発現する新生細胞をみると、これも脊髄腹側を中心に有意な増加が認められた。

(2) 対照群に比して EGF+FGF2 投与群では BrdU 陽性の新生細胞が腰髄実質広汎にわたって有意に増加しており、未分化神経前駆細胞やグリア前駆細胞などの増殖促進が明らかとなった(図1)。FGF 受容体はニューロンのみならず中心管周囲上衣層やグリア前駆細胞、アストロサイトに発現が確認され、前角細胞数に両群間の有意差がなかったことから、EGF+FGF2 の前駆細胞への直接効果が示唆された (図2)。

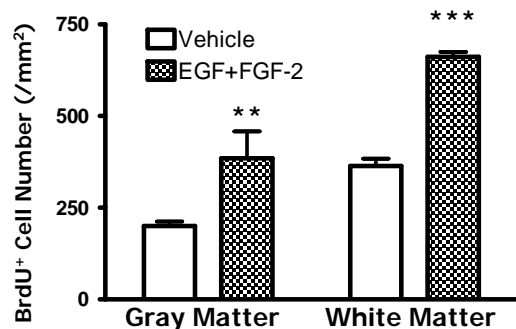
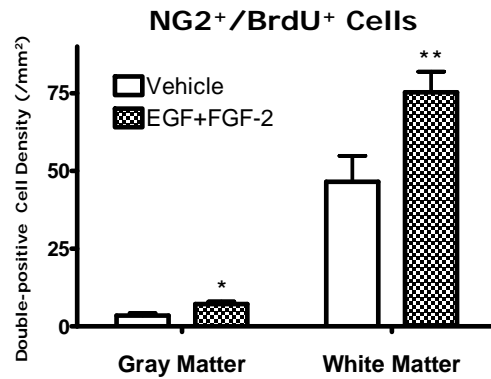


図1. BrdU 陽性細胞密度。灰白質・白質ともに EGF+FGF-2 群で有意な増加を認める (** P<0.01, ***P<0.001)

(3) さらに様々な投与条件で検討した結果、肝細胞増殖因子 (HGF) をはじめとする再生誘導因子は強力な運動ニューロン保護因子であるだけでなくアストロサイト機能修飾作用とミクログリア活性化抑制

図2. NG2/BrdU 二重陽性細胞密度。灰白質・白質ともに EGF+FGF-2 群で有意に高値である (*P<0.05, **P<0.001)。



作用も合わせもつ細胞外微小環境調整因子として働くことを見出した。実際に ALS ラットで内因性 HGF を阻害するとグリア増生と再生阻害因子発現が亢進してしまう知見を得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Sasaki S, Aoki M, Nagai M, Kobayashi M, Itoyama Y: Mitochondrial alterations in transgenic mice with an H46R mutant SOD1 gene, **J Neuropathol Exp Neurol**, 68 (2009) 68:365-373, 査読有
- 2) Tanaka K, Okada Y, ..., Aoki M, Hadano S, Itoyama Y, Ikeda JE (total 14, 11th): The L-745,870 treatment protects from neurodegeneration and delays disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis, **Exp Neurol**, 211 (2008) 378-386, 査読有
- 3) Dadvajantsana B, Aoki M, Warita H, Suzuki N, Itoyama Y: Expression of insulin-like growth factor II receptor in the spinal cord of ALS transgenic rats, **Tohoku J Exp Med**, 214 (2008) 303-310, 査読有
- 4) Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama Y: Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironmental niche for spinal motor neurons in ALS

transgenic rats,

J Neurosci Res, 86 (2008) 2512-2512, 査読有

- 5) Yamashita S, Koyama Y, Katayama T, Taniguchi M, Hitomi J, Kato M, Aoki M, Itoyama Y, Kato S, Tohyama M: An *in vitro* model for Lewy Body-like Hyaline Inclusion/Astrocytic Hyaline Inclusion: Induction by ER stress with an ALS-linked SOD1 Mutation, **PLoS One**, 2 (10) (2007) e1030, 査読有
- 6) Sasaki S, Nagai M, Aoki M, Komori T, Itoyama Y, Iwata M: Motor neuron disease in transgenic mice with an H46R mutant SOD1 gene, **J Neuropathol Exp Neurol**, 66 (2007) 517-524, 査読有
- 7) Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, Warita H, Kato S, Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, Itoyama Y: Intrathecal delivery of HGF from the ALS onset suppresses disease progression in a rat ALS model, **J Neuropathol Exp Neurol**, 66 (2007) 1037-1044, 査読有
- 8) Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada S, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Nitric oxide production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal nitric oxide synthase, **J Clin Invest**, 117 (2007) 2468-2476, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- 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, November 4, 2008, Birmingham, UK
- 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. 19th International Symposium on ALS/MND, November 4, 2008, Birmingham, UK

3) 青木正志、割田 仁、水野秀紀、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、第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 16 日 横浜

4) 水野秀紀、割田 仁、青木正志、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コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの進行性沈着、第 7 回日本再生医療学会総会 2008 年 3 月 13 日 名古屋

[その他]
ホームページ等

<http://neuro.med.tohoku.ac.jp/study.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
青木 正志 (AOKI MASASHI)
東北大学・病院・講師
研究者番号：70302148

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
糸山 泰人 (ITOYAMA YASUTO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30136428