

平成22年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790603

研究課題名 (和文)

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスに対する運動療法と抗酸化物質の併用治療効果について

研究課題名 (英文)

Combined exercise and antioxidant therapy for amyotrophic lateral sclerosis model mice.

研究代表者

林 祐一 (HAYASHI YUICHI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00392366

研究成果の概要 (和文)：筋萎縮性側索硬化症モデルマウスに対する metallothionein (MT) 組み換えアデノウイルス遺伝子治療は極めて有効で、生存期間延長効果がみられた。

また運動療法に関しては、脊髄前角の運動ニューロンにおいて、MT-I, II, III の誘導を認めた。このことは、運動療法の有用性の科学的なメカニズムの一旦として、MT の関与を示唆するものであった。

研究成果の概要 (英文)：

Adenoviral metallothionein-III (MT-III) gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis model mice is very effective- prolongation of the survival time.

In addition, I revealed that exercise induces MT-I, II, III. This result suggested one of the mechanisms of exercise therapy for ALS mice is associated with induced MT in spinal motor neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

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：ALS、遺伝子治療、抗酸化物質、メタロチオネイン、運動療法

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) はいまだ治療法のない致死性の神経変性疾患の1つであり、有効な治療法を確立させることが急務である。

運動療法については、臨床の現場ではあくまで対症療法との観点からリハビリテーションを行なっている施設が多く、われわれの施設でも同様に一日30分程度のリハビリテーシ

ョンを行なっている。それは残存肢の筋力向上ならびに生活の上での機能障害克服を目指したもので、有益なものであると考えている。

一方、トップアスリートとりわけサッカー選手、野球選手 (Valenti et al, EJM 2005, Chio et al, Brain 2005, Belli et al, Eur J Epidemiol, 2005)、軍人 (Haley, Neurology, 2003) などにおいては、統計学的にALSの発症率は高く、過度な運動、訓練、外傷などにより大量の活性酸素 (ROS) が生じ、運動自体がむしろALSの促進因子との見方もある。積極的なリハビリテーションはむしろ逆に悪影響を与えるのではないかと懸念される。

近年、遺伝性筋萎縮性側索硬化症モデルマウス (SOD-1 G93Aマウス) において一日30分程度の運動療法により進行が10日程度遅延することが言われ始めた (Kirkinezos et al, Ann Neurol 2003)。さらに一日12時間の過度な運動を負荷したとしても症状の増悪はなく、進行はむしろ4日程度遅延し (Leibetanz et al, EJM, 2004)、適度な有酸素運動は無害であり、有益性が上回ると結論づけた。

そのため、我々は、運動療法がなぜ進行遅延できたのかを科学的に解明する必要があり、積極的に臨床応用させる必要があると考えた。

本年になり運動療法の飛躍的な科学的解明があり、SOD-1 G93Aマウス脊髄において、症状発症後には、caspase-3やBaxなどのアポトーシス誘導マーカーが増加しており、運動ニューロンのアポトーシスが促進されていることがわかった。また、そのSOD-1 G93Aマウスに対して、運動療法を行なったところ、NF- κ BやBcl-2活性を増加させ、抗アポトーシス効果を増強し、逆にcaspase-3やBaxなどのアポトーシス誘導マーカーを減少させ、DNAのフラグメンテーションを減少させていることを明らかにした (Song et al, Antioxid Redox Signal, 2006)。また野生型SOD-1を有す

るラットの運動においてROSは増加するものの、急性反応として、NOS、ミトコンドリアSOD、MAPK活性を高め、その結果としてNF- κ B経路が促進していることがつきとめられた (Ji et al, Ann N Y Acad Sci, 2006)。この2つの研究結果を踏まえれば、ROSに対する生体の防御反応の促進が、SOD-1 G93Aマウスの進行遅延に関与したのではないかと考えられる。

これらの先行研究からは、運動療法は科学的根拠のある極めて有効性の高い治療法と考えられるものの、進行遅延が10日程度に留まっているのはなぜかという問題がある。

われわれは、大量のROSは生体防御機構だけでは完全に処理できていないのではないかと仮説を立てた。処理しきれなくなったROSが発症ならびに進行に悪影響を与えているのではないかと考え、未処理のROSの除去が可能であればより高い治療効果が期待できるのではないかと考えた。

そこで、SOD-1 G93Aマウスに適度な運動療法に抗酸化物質を併用することにより、発症、進行の遅延効果があるのかを臨床症状、病理学的、薬理的に解明することを本研究の目的とした。エダラボンをはじめとする抗酸化物質を運動療法に併用し効果を得ることができれば、ALSの有効な治療法となり、現在苦しんでいるALS患者らの福音となるであろうと考えている。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は治療法のない致死性の神経変性疾患の1つで、有効な治療法の確立が急務である。本症に対する運動療法は、臨床現場では、あくまで対症療法の観点から行っており、残存肢の筋力向上と生活上の機能維持をめざしたものである。ALSモデル動物に対しては、近年、運動療法は症状進行

予防に有用であるとの報告がある。一方で、ALS の発症や、過度な運動に伴い、活性酸素が悪影響を与えるとの報告もあり、運動療法に抗酸化物質の投与を加えれば、運動療法よりもさらに、症状進行の予防に有益ではないかと考えた。我々は、適度な運動療法に抗酸化物質を併用することにより、発症、進行遅延効果があるのかを臨床症状、病理学的、薬理的に解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

①運動療法に関する実験 正常マウス (C57BL/6J) をトレッドミル運動させ全脊髄を採取した。まず、マイクロアレー法を行い、30分、2週間の運動を継続した群でそれぞれ有意に変動のある遺伝子を同定する。次に、real-time PCR法を用いて、メタロチオネイン I, II, III の変動の有無を調べた。メタロチオネイン I, II, III の脊髄蛋白の増減を Western blot 法を用いて調べた。その後、腰髄膨大部前角細胞におけるメタロチオネイン I, II, III の免疫染色を行った。

②抗酸化物質 (メタロチオネイン III) に関する実験

ALS モデルマウスに対して発症日を特定した。発症日 21W より、両側大腿前面および後面筋に対して、遺伝子組み換えメタロチオネイン III アデノウイルスを $5\mu\text{l}/\text{site}$ 、マイクロシリンジで筋肉注射を死亡するまで毎週行った。コントロールとして、非接種群および β -galactosidase 組み換えアデノウイルス接種群をおき、死亡日までの生存期間を調べた。

また、アデノウイルスの逆行輸送がおこっているか腰髄膨大部の病理切片を作成し、脊髄前角細胞に対してメタロチオネイン III、 β -gal の染色性が高まっているか免疫染色

し確かめた。

4. 研究成果

メカニズムを解明する目的で、正常モデルマウスに適度な運動をさせた。運動により、脊髄前角において、メタロチオネイン I, II, III の誘導がみられることを発見した

(Hashimoto K, Hayashi Y, Neuroscience 2009)。また、マイクロアレー法により、網羅的に誘導される遺伝子約 30 個を同定した (Hashimoto K, Hayashi Y, J Toxicol Sci 2009)。

②メタロチオネイン組み換えアデノウイルスの接種実験では、有意に生存期間を延長する結果となり、本結果を米国神経学会で報告し、公表のために Ann Neurol に投稿中である。

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 11 件)

1)Hayashi Y, et al. Serial monitoring of basal metabolic rate for therapeutic evaluation in an Isaacs' syndrome patient with chronic fluctuating symptoms. Internal Med 2010; 49: 475-477. (査読有)

2)Hayashi Y, et al. Markedly ring-enhanced optic nerves due to metastasis of signet-ring cell gastric carcinoma. Internal Med 2010; 49: 517 (査読有)

3)Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, et al. High prevalence of autoantibodies against phosphoglycerate mutase 1 in patients with autoimmune central nervous system diseases. J Neuroimmunol 2010; 219: 105-108. (査読有)

- 4) Kimura A, Kanoh Y, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, et al. Antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Neurology* 2010; 1327-1329. (査読有)
- 5) Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, et al. Motor-dominant chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol* 2010; 257:612-619. (査読有)
- 6) Hashimoto K, Hayashi Y, et al. Exercise induces metallothioneins in mouse spinal cord. *Neuroscience* 2009; 163:244-51. (査読有)
- 7) Hashimoto K, Honda A, Hayashi Y, et al. DNA microarray analysis of transcriptional responses of mouse spinal cords to physical exercise. *J Toxicol Sci.* 2009;34:445-48. (査読有)
- 8) Park YE, Hayashi YK, Goto K, Komaki H, Hayashi Y, et al. Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy/lime-girdle muscular dystrophy 1 B. *Neuromuscul Disord* .2009; 19:29-36. (査読有)
- 9) Hayashi Y, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy and CD4+ T-lymphocytopenia in a patient with Sjogren syndrome. *J Neurol Sci.* 2008; 268: 195-98. (査読有)
- 10) Hayashi Y, et al. Selective hypertrophy of cauda equina with idiopathic inflammation. *Muscle Nerve* 2008; 38:1065-69. (査読有)
- 11) Nagasao J, Hayashi Y, et al. Relationship between ribosomal RNA gene transcription activity and motoneuron death. *J Neurosci Res* 2008; 86:435-42. (査読有)
- [学会発表] (計 1 件)
- 1) Hashimoto K, Hayashi Y, Inuzuka T,

Hozumi I. Growth inhibitory factor inhibits the progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 74 Suppl2:A436, 2010 (Canada)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 祐一 (HAYASHI YUICHI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 00392366

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし