

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月11日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591070

研究課題名（和文） 外来性再生誘導因子による運動ニューロン再生促進環境の誘導

研究課題名（英文） Induction of regenerative microenvironment around spinal motor neurons by exogenous factors

研究代表者

青木 正志（AOKI MASASHI）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70302148

研究成果の概要（和文）：

運動ニューロン変性が進行する筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデルラット脊髄では、不十分ながら再生反応が認められる。未熟な神経前駆細胞の増殖を促す再生誘導因子の後に、神経新生を誘導しやすい因子に切りかえて投与すると、グリア新生や再生阻害因子の沈着を抑制でき幼若ニューロンの増加が認められた。一方、微小血管新生因子の単独投与を行うと血管新生促進効果とともに神経保護効果が得られた。効果的な神経再生誘導には、再生阻害因子を抑制するためにグリア新生を適度に抑制し、かつ微小血管を新生し保護する環境誘導戦略が重要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset neurodegenerative disease characterized by selective loss of motor neurons. As compared with vehicle-treated ALS rats, a sequential intrathecal infusion of FGF-2 and EGF followed by hepatocyte growth factor (HGF) resulted in increased neuroblastic cells in the spinal cord of ALS rats, even after the onset of motor neuron disease. It was accompanied by significant suppression of gliogenesis and deposition of chondroitin sulfate. Moreover, angiogenic factors such as FGF-2 and HGF revealed significant neuroprotective effects in ALS rats. Therefore, motor neuron-surrounding microenvironment may be a potential therapeutic target in the future development of regenerative therapy for ALS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経内科学

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，脳神経疾患，再生医学

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 (*SOD1*) 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。この変異 *SOD1* を過剰発現するマウスモデルは ALS の臨床症状と神経病理所見をよく再現することから運動ニューロン変性のメカニズムについて数多くの知見が得られている。一方で、いったん損なわれた運動神経系をいかに再構築するかという再生研究はまだ発展途上にある。

2. 研究の目的

本研究ではこの変異 *SOD1* 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、本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(変異 *SOD1* 遺伝子導入ラット, 以下 ALS ラット; Nagai M, *et al.* J Neurosci, 2001) を用い、ALS 病態下における脊髄神経前駆細胞の増殖と分化、すなわち内在性再生機転に注目した。さらに、内在性の神経幹(前駆)細胞だけでなく、変性する運動ニューロン周囲の微小環境(microenvironment)にも着目し、これらの環境を構成するグリア細胞、細胞外マトリックスに存在する再生阻害因子、血管因子などをも標的にして再生誘導因子をどのように投与することで効果的な内在性再生機転促進が図れるかを解明する。

3. 研究の方法

(1) 再生促進環境をめざした再生誘導因子の順次的投与

発症後の ALS ラット(24-25 週齢)を対象とし(各群 n=4-5)、以下の 3 群間での比較検討を行った。

① 代表的な神経幹(前駆)細胞の増殖因子

である上皮細胞増殖因子(Epidermal Growth Factor, 以下 EGF)と塩基性線維芽細胞増殖因子(Fibroblast Growth Factor, 以下 FGF-2)を初めの一週間髄腔内投与、ついでニューロン新生促進・グリア増生抑制・神経保護作用を併せもつ肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor, 以下 HGF)を 2 週間髄腔内に持続投与(順次投与群)

② EGF/FGF-2/HGF 三者を同時に 3 週間髄腔内投与(同時投与群)

③ 溶媒であるリン酸緩衝液(phosphate-buffered saline, 以下 PBS)のみ 3 週間髄腔内投与(対照群)

チミジンアナログであるブロモデオキシウリジン(5-bromo-2'-deoxyuridine, 以下 BrdU)をいずれの群にも持続投与して新生細胞を標識し、再生誘導因子投与終了後の腰髄灌流固定凍結切片で各種細胞選択的マーカーと BrdU との多重蛍光免疫組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡下で定量的に解析した。

(2) 再生促進環境をめざした血管新生・保護因子の持続投与

発症後(25-26 週齢)の ALS ラット髄腔内に微小血管新生効果と微小血管保護効果が知られる FGF-2、HGF、PDGF をそれぞれ単独で 2 週間持続投与し、溶媒(PBS)投与群と合わせ(1)と同様な方法で血管内皮細胞新生と神経変性抑制効果(神経保護効果)について比較検討した。

なお、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、動物実験は同動物実験施設実験指針に従った上で動物実験施設愛護面に十分配慮し、利用動物実験数を極力減らすように努めた。

4. 研究成果

(1) 再生誘導因子の同時投与群・順次投与群においては、腰髄の前角細胞(運動ニューロン)脱落が有意に抑制された(それぞれ

P<0.01・P<0.001)。同時投与群でのみ新生細胞密度が全体として有意に増大し (P<0.01)、グリア前駆細胞の増殖も有意に促進 (P<0.001) されていたのに対し、順次投与群ではこれが抑制されていた (P<0.05)。さらに、この順次投与群では新生アストロサイトが他の 2 群より有意に抑制されており (P<0.001)、結果として順次投与群のみで再生阻害因子コンドロイチン硫酸の沈着が抑制されていた (P<0.001)。

また、幼若ニューロンの選択的マーカーであるポリシアル酸化神経系細胞接着因子 (PSA-NCAM) 陽性ニューロンが、同時投与群・順次投与群の腰髄前角で有意に増加していた (それぞれ P<0.01・P<0.001)。ニューロン新生増加の有無については現在なお検討中である。

(2) FGF-2, HGF, PDGF 投与群ともに腰髄前角では微小血管密度が有意に増加し (P<0.0001)、新生血管内皮細胞密度も増加傾向で、とりわけ HGF 投与群で有意な血管新生促進を認めた (P<0.0001)。また、HGF 投与群でのみ血管内皮バリア抗原陽性像が有意に保持され (P<0.001)、前角細胞脱落も抑制されていた (P<0.0001)。

以上 (1)・(2) の結果より、不十分ながら ALS 病態下でも存在が示唆される内在性再生能を促進する戦略として、神経幹 (前駆) 細胞と周囲の微小環境の両者を標的とした外来性再生誘導因子の髄腔内持続投与が有力な一つの方法である可能性が示された。

神経幹 (前駆) 細胞の増殖因子である EGF/FGF-2 は一方で後期ニューロン新生を抑制することから、長期にわたる EGF/FGF-2 投与はかえってグリア新生有意の再生効果をもたらしてしまう。そこでニューロン新生が促進されやすいように再生誘導因子の選択と適切な組合せ投与・タイミングが必要となる。実際、本研究により EGF/FGF-2 を投与後に HGF に切り替え順次的に投与することで、同時投与より望ましい再生誘導効果を得ることができた。

今後、ニューロン新生効果に着目してより詳細な検討を進め、神経幹 (前駆) 細胞と周囲の微小環境の両者を標的とした効果的な内在性再生能の促進戦略を開発していくことが重要と考えられ、研究の進展が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) 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; 1382: 321-325. (査読あり)

(2) 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. (査読あり)

(3) 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. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Warita H, Mizuno H, Suzuki N, Itoyama Y, Aoki M. Adult skeletal myogenesis in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. 9th Annual Meeting of the Interantional Society for Stem Cell Research. June 15-18, 2011, Toronto, Canada.

(2) Aoki M, Suzuki N, Warita H, Kato M,

Mizuno H, Shimakura N, Akiyama T, Furuya H, Hokonohara T, Iwaki A, Togashi S, Konno H, Itoyama Y. FALS with FUS mutation in Japan with early onset, rapid progress and basophilic inclusion. 2th International Congress on Neuromuscular Diseases. June 17-22, 2010, Naples, Italy.

(3) Warita H, Aoki M, Mizuno H, Suzuki N, Itoyama Y. Angiogenesis in the spinal cord of transgenic rats with motor neuron degeneration. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases. June 17-22, 2010, Naples, Italy.

[その他]

ホームページ等

<http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 正志 (AOKI MASASHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 70302148