

研究種目：若手研究（B）  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20790609  
研究課題名（和文）ALS 脊髄運動ニューロン保護における微小血管新生の役割に関する研究  
研究課題名（英文）A possible role of angiogenesis in the spinal cord microvasculature for spinal motor neuroprotection in ALS  
研究代表者  
割田 仁（WARITA HITOSHI）  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：30400245

## 研究成果の概要（和文）：

運動ニューロンの進行性変性を特徴とする筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデル動物の病変部位における微小血管新生に注目した。ALSモデル動物の脊髄前角では運動ニューロン変性とともにも微小血管新生の有意な亢進が生じていた。発症後の早期より血管新生促進因子を投与すると微小血管新生が促進され、運動ニューロン保護、グリオシス抑制が明らかとなった。本研究により、運動ニューロン周囲の微小血管系がALS病態において重要な治療標的となる可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is characterized by adult-onset progressive motor neuron degeneration. Recently, disruption of blood-spinal cord barrier has been reported in several lines of transgenic ALS mice. Here, we examined possible microvascular regeneration in an ALS rat model. After the onset of motor neuron disease, multiple immunohistochemistry revealed a significant proliferation of microvascular endothelial cells. Moreover, intrathecal infusion of an angiogenic factor significantly promoted the angiogenesis and protected motor neurons in symptomatic ALS rats. Therefore, microvasculature may be considered as a potential therapeutic target for ALS.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：神経変性，再生，血管新生

### 1. 研究開始当初の背景

ALS は系統的な運動ニューロン変性によって全身の骨格筋萎縮と筋力低下が進行する、きわめて予後不良な神経変性疾患であり、病態解明と治療法確立が強く求められている。その大半は孤発性ながら、約 10%を占める遺伝性 ALS において 1993 年 Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) 遺伝子の優性変異が発見された。変異 *SOD1* を過剰発現するマウスモデルは ALS 病態をよく再現することから研究が大きく進展したが、現在もなお病態解明は十分でない。

従来 ALS 研究は運動ニューロン自体の異常に焦点がおかれてきた。ところが野生型 *SOD1* と変異 *SOD1* のキメラマウスの知見から、ALS 病態における運動ニューロン死が細胞非自律的 (non-cell autonomous) との報告がなされた (Clement, *et al.* Science 2003)。さらに最近、グリア細胞が ALS の病態進行を規定するという報告があったことから (Boillee, *et al.* Science 2006)、運動ニューロン周囲の細胞外微小環境 (microenvironment) が積極的に病態形成に関与している可能性が示され、非ニューロン細胞を含めた病態に研究の焦点が移りつつある。

近年、血管内皮成長因子 (VEGF) や angiogenin (ANG) といった低酸素応答性の「血管新生因子」の異常が ALS 発症と関連することが報告され、ALS 病態における神経変

性と血管新生 (angiogenesis) の関連が注目されている。実際、VEGF 低発現マウスは ALS 同様の系統的運動ニューロン変性を呈し (Oosthuysen, *et al.* Nat Genet, 2001)、VEGF 低発現につながるハプロタイプとヒト ALS 発症の関連も報告されている。また、孤発性・家族性 ALS の一部には *ANG* 遺伝子変異が発見されている (Greenway, *et al.* Nat Genet 2006)。

### 2. 研究の目的

上述のような背景のもと、本研究はラットの ALS モデル (Nagai, *et al.* J Neurosci, 2001) を用い、系統的運動ニューロン変性をきたす脊髄における微小血管新生を *in vivo* で検索し、運動ニューロン保護におけるその役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

変異 *SOD1* 遺伝子導入 (Tg) ラットの発症前 (20 週齢)、発症早期 (24 週齢)、発症後期 (28 週齢; 各群 n=4-5) を対象とし、チミンアナログ 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を 1 週間持続投与して新生細胞を標識した。投与終了後 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液による脊髄灌流・浸漬固定後凍結切片を作成、各種細胞選択的マーカーと血管壁構成成分について多重蛍光免疫組織化学を行った。微小血管系の再構築と病態進行との関連を検討するため、共焦点レーザ

一顕微鏡下に関心領域（おもな病変部位である脊髄前角）における半定量的解析を行い、対照群（週齢一致非 Tg ラット）と比較した。画像取得、画像解析・定量、統計学的解析には専用のコンピューターソフトウェアを使用した。

次に両後肢に運動麻痺を呈する発症後 Tg ラット（26 週齢）を対象に血管新生促進作用が報告されている肝細胞増殖因子（HGF）150  $\mu$ g 投与群（HGF 群）とリン酸緩衝液のみを投与する対照群（vehicle 群）に分け、浸透圧ポンプにより腰髄髄腔内に 14 日間持続投与した（各群 n=4）。当初の 7 日間は上記と同様に BrdU 持続投与を併用して新生細胞を標識した。投与終了日、上記同様に脊髄灌流固定・浸漬固定後の凍結切片を作成、解析した。

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、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十分配慮しかつ利用動物数を極力減らすように努めた。

#### 4. 研究成果

対照に比較し Tg ラットでは腰髄前角において、アストログリア増生、前角細胞脱落が有意かつ進行性に認められた。このような病態進行のもと Tg ラットでは新生微小血管内皮細胞の有意な増加を示した（ $p < 0.05$ , one-way ANOVA with Tukey-Kramer post-hoc test）。これら新生血管内皮細胞には同時に nestin などの未成熟細胞マーカーの共局在が確認された。

次に発症後 ALS ラットへの HGF 髄腔内投与による微小血管新生促進効果をみると、HGF 投与群では対照群に比して腰髄前角の新生

血管内皮細胞が有意に増加していた（ $P < 0.0001$ , *t*-test）。さらに HGF 投与群では血管内皮バリア抗原が有意に増加していた（ $P = 0.0015$ ）。また、HGF 投与群腰髄前角の一部の血管壁には活性型 HGF 受容体（c-Met）と血管内皮細胞抗原の共局在が確認された。

本研究により、ALS ラットモデル病態下では微小血管系の再構築が生じていることが示された。近年、変異 *SOD1*-Tg マウス・ラットでは微小血管障害、とくに血液・脊髄関門の障害が複数報告されていることを考慮すると、運動ニューロン変性と関連した微小血管系の障害、それに対抗する内在性の血管新生機転の存在が示唆される。また、血管新生促進因子として HGF を投与した研究結果からは、微小血管新生・安定化促進因子が ALS のような神経変性病態において新たな治療戦略となる可能性が示唆され、期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 4 件）

- 1) Suzuki N, Aoki M, Warita H, *et al.* FALS 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）
- 2) Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama Y. Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironment of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis transgenic rats. *J Neurosci Res* 2008; 86(11): 2512-2523. （査読あり）
- 3) 割田 仁, 水野秀紀, 青木正志, 糸山泰

人. ALSの神経再生医療 Clinical Neuroscience 2008; 26(3): 303-336. (査読なし)

4) 青木正志, 割田 仁, 水野秀紀, 糸山泰人.

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する神経再生誘導の試み 再生医療 2008; 7(4): 366-370. (査読なし)

[学会発表] (計8件)

1) 割田 仁, 青木正志, 水野秀紀, 鈴木直輝, 船越 洋, 中村敏一, 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微小血管新生.

第9回日本再生医療学会, 2010年3月18-19日, 広島.

2) Warita H, Aoki M, Mizuno H, Itoyama Y. Endothelial Proliferation in the spinal cord microvasculature of ALS transgenic rats.

20th International Symposium on ALS/MND, December 8-10, 2009, Berlin, Germany.

3) 割田 仁, 青木正志, 船越 洋ら. 運動ニューロン変性を示すラットモデル脊髄における微小血管新生.

Neuroscience 2009 [第32回日本神経科学大会], 2009年9月16-18日, 名古屋.

4) 青木正志, 割田 仁, 糸山泰人. 神経栄養因子によるALSの治療戦略

第50回日本神経学会総会(シンポジウム), 2009年5月20-22日, 仙台.

5) 水野秀紀, 割田 仁, 青木正志ら. ALSモデルラット脊髄活性化アストロサイトにおける再生阻害因子発現

第50回日本神経学会総会, 2009年5月

20-22日, 仙台.

6) 割田 仁, 青木正志, 水野秀紀ら. 逐次的な再生誘導因子投与によるALSモデルラット脊髄の内在性再生機転促進.

第50回日本神経学会総会, 2009年5月20-22日, 仙台.

7) Aoki M, Warita H, Mizuno H, *et al.* 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 3-5, 2008, Birmingham, UK.

8) Warita H, Mizuno H, Aoki M, 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 3-5, 2008, Birmingham, UK.

[図書] (計0件)

[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

割田 仁 (WARITA HITOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 30400245