

<シンポジウム 7-1>ALS の研究・治療はどこまできたか

## SOD1 遺伝子変異と ALS

青木 正志 割田 仁 糸山 泰人

(臨床神経, 48 : 966-969, 2008)

Key words : 筋萎縮性側索硬化症, 肝細胞増殖因子, 遺伝子変異, SOD1, トランスジェニックラット

### はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は現在までに有効な治療薬や治療法がほとんどないため, 神経疾患のなかでもっとも過酷な疾患とされ, 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。遺伝学的解析法の進歩により, 1993 年に家族性 ALS においてその一部の原因遺伝子が Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) であることが明らかになり<sup>1)2)</sup>, さらにこの SOD1 遺伝子の突然変異をマウスに導入することにより, ヒト ALS の病態を非常に良く再現することに成功した。SOD1 遺伝子変異による家族性 ALS の発症メカニズムはまだ十分には解明されていないが, 変異による SOD 活性の低下が直接の原因ではなく, 変異 SOD1 が新たに獲得した “gain of toxic function” によるものと考えられている。最近ではこの運動ニューロン変性の過程における運動ニューロンのみならず, アストロサイトやマイクログリアの重要な役割が漆谷真 (現, 滋賀医大)<sup>3)</sup>や山中宏二 (現, 理研 BSI)<sup>4)5)</sup>らにより報告され注目されている。

### SOD1 遺伝子異常にともなう家族性 ALS

東北大学ではこれまでに, 常染色体優性遺伝形式がうたがわれる日本人の家族性 ALS 27 家系の解析をおこない, その 56% にあたる 15 家系において 12 種類の遺伝子変異 (いずれも点突然変異) を同定している。集計年度の違いがあるが, 厚生労働省の特定疾患対策研究事業の報告書によれば, 名古屋大学では 21 家系中 11 家系に, 新潟大学では 20 家系中 8 家系に SOD1 遺伝子変異を同定しており, わが国での頻度は米国での 20% より高い可能性がある。

同じ SOD1 遺伝子の異常であっても, たとえば 46 番 His が Arg への変異 (H46R) は点突然変異が SOD1 の活性中心にあるのにもかかわらず, 非常に緩徐な進行を示し, 平均罹病期間は約 17 年であった<sup>1)6)</sup>。またすべての患者において左下肢からの発症がみられている。その一方, 84 番 Leu が Val への変異 (L84V) では例外なく急速な進行で上肢からの発症であった<sup>7)</sup>。これまでの症例による臨床型の検討により, 各点突

然変異によりおよその罹病期間が決まることが明らかになった。

従来から家族性 ALS 一般に指摘されてきたことではあるが, 孤発性 ALS に比較して, SOD1 遺伝子変異をともなう家族性 ALS では下肢からの発症が多いことが確認された。また, 必ずしも上位運動ニューロン徴候をともなわない症例も存在する。さらには SOD1 変異の種類により ALS の発症後の経過はまったく異なることが明らかになったが, 上記で示したように各点突然変異によりおよその罹病期間が決まっている。

### トランスジェニックラットによる新しい ALS モデル

ALS のモデル動物としては従来マウスがもちいられてきたが, とくに病態の首座である脊髄の解析には, その個体の大きさによる研究上の様々な制約があった。東北大学では動物モデルにおける脊髄や脊髄腔に対する治療的なアプローチを可能とするために, 世界にさきがけて変異 SOD1 導入トランスジェニックラットによる ALS モデルの作製に成功した<sup>8)</sup>。ALS ラットは従来のマウスに比較して約 20 倍の大きさを持つために, 脳脊髄液 (髄液) の採取および解析ならびに薬剤や遺伝子治療用のベクターの髄腔内投与がきわめて容易である。将来的な遺伝子治療をふくめた新しい治療法開発のために非常に有用なモデルとなることが期待される。

### ALS ラットにおける神経前駆細胞の解析

新しいラットによる ALS モデルはプロモデオキシウリジン (BrdU) を投与して脊髄の増殖性細胞を標識することが可能であり, 再生医療の開発を念頭に内在性神経前駆細胞の解析を開始した。これまでの解析では ALS ラットでは運動ニューロン脱落前より有意に脊髄神経前駆細胞が増殖していたが, その多くはグリア系細胞に分化していることが示された。その一方で nestin 陽性細胞が中心管上衣層と白質にみとめられ, BrdU/nestin 二重陽性かつ GFAP 陰性細胞も確認され, より未分化な段階の細胞の存在が示唆された。このような未分化な細胞をうまく分化誘導し, 組織修復に役立てる方法

を探っていくことが新規治療法につながる可能性があると考えて研究を進めている。

### 肝細胞増殖因子 (HGF) の髄腔内持続投与による新しい治療法の開発

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor : HGF) はわが国でクローニングされた新しい増殖因子である。HGF は海馬、大脳皮質、運動、感覚、小脳顆粒細胞などの神経細胞に対しても神経栄養因子として作用することが明らかになったが、中でも HGF の培養運動ニューロンに対する神経生存促進活性は非常に強力である。その活性は既知の運動神経栄養因子の中でも強力とされ ALS に対する治験がおこなわれたグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) や脳由来神経栄養因子 (BDNF) にまったくひけをとらないとされる。さらに大阪大学の船越 洋らは遺伝子工学的に導入された HGF の ALS マウスにおける有効性を示し、ALS の新しい治療薬として注目されている<sup>9)</sup>。

上述のように ALS に対する治療法の開発のために、東北大学神経内科ではトランスジェニックラットによる ALS モデルの開発に成功した<sup>8)</sup>。この ALS ラットに対して浸透圧ポンプをもちいてヒト型リコンビナント HGF 蛋白の髄腔内への持続投与 (Fig. 1) を行ったところ、発症期からの投与開始でも罹病期間の有意な延長をみとめた<sup>10)</sup>。Fig. 2 は HGF 投与群および対象群の経過を示す。平均発症は HGF 投与群が

126.8±13.1 日、対照群が 126.3±13.8 日 ( $p=0.6346$ ) と有意差はみとめない。一方で平均死亡は HGF 投与群が 154.3±16.4 日、対照群が 143.25±17.0 日 ( $p=0.0135$ ) と HGF 投与群が対照群より有意に遅延している。発症から死亡までの平均罹病期間が、HGF 投与群が 27.5±11.1 日間、対照群が 16.9±8.17 日間と、HGF 投与群では対照群の 62.7% の増大を示し、発症期からの投与によっても HGF がトランスジェニックラットの罹病期間を大幅に延長させ、ALS 病態の進行を遅らせるこ

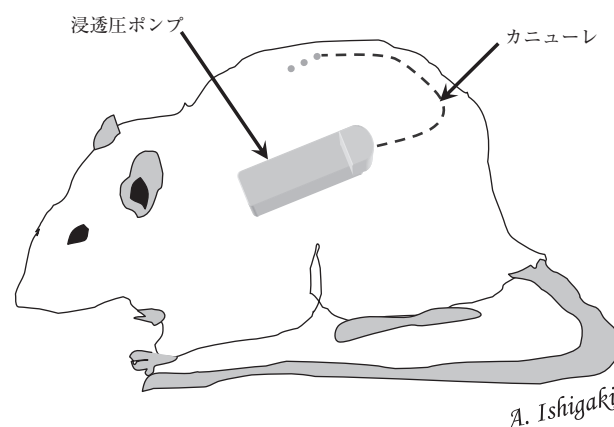


Fig. 1 ALS ラットに対するヒト型リコンビナント HGF 蛋白の髄腔内継続投与  
腰椎レベルから髄腔内にカニューレを留置し、浸透圧ポンプを用いることにより HGF の持続投与が可能である。

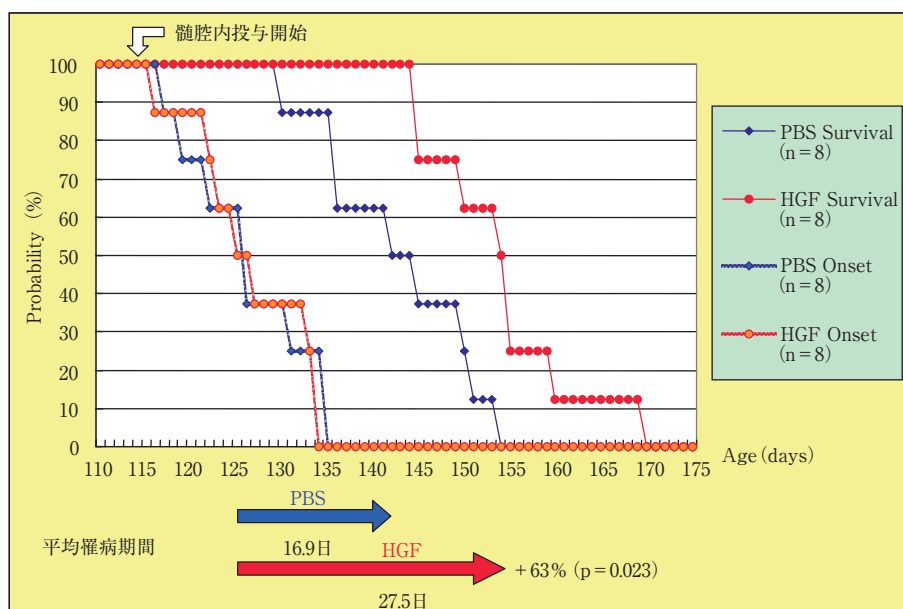


Fig. 2 発症期からのヒト型リコンビナント HGF 蛋白持続投与による ALS 進行抑制効果<sup>10)</sup>  
赤線はヒト型リコンビナント HGF 蛋白投与群、青線は生理食塩水 (PBS) 投与 (対照) 群を示す。平均発症は HGF 投与群と対照群では有意差は認められなかった。平均死亡は HGF 投与群が 154.3±16.4 日、対照群が 143.25±17.0 日 ( $p=0.0135$ ) と HGF 投与群が対照群より有意に遅延した。発症から死亡までの平均罹病期間が、HGF 投与群が 27.5±11.1 日間、対照群が 16.9±8.17 日間と、HGF 投与群では対照群の 62.7% の増大を示し、発症期からの投与によっても HGF が ALS ラットの罹病期間を大幅に延長させることが示された。

とが示された。

HGF の作用機序を明らかにするために抗体をもちいた免疫組織化学にて検討したところ、活性型の HGF 受容体であるリン酸化 c-Met は HGF 投与群のほうが強く染色された。その一方で活性型 caspase-3 および活性型 caspase-9 は対照群のほうが強く染色され HGF 投与群では抑制されていた。このことはウエスタンブロットでも確認されている。HGF 投与による病態進行抑制の機序としては caspase カスケードの主な実行因子とされている、caspase-3, 9 の抑制効果をもとめたことから caspase カスケードそのもの、あるいはその上流の細胞死機序を抑制すると推定された。また同時に EAAT2 が発現増加し XIAP が保持されていたことから、細胞保護機能の維持・増強が示され、またアストロサイトなどの神経細胞以外の神経組織構成細胞にも HGF が作用することが示された<sup>10)</sup>。

現在クリンゲルファーマ社によって GMP 基準を満たすヒト型リコンビナント HGF の産生も開始され、慶応大学との共同研究で霊長類(マーマセツ)をもちいて HGF の髄腔内投与の安全性を確認するとともに臨床用量の設定の実験をおこなっている。その後臨床試験(治験)をおこなう予定である。

### おわりに

これまでに ALS に対しては様々な神経栄養因子が治療薬の候補として臨床治験がおこなわれたがいずれも失敗に終わっている。この結果の解釈は慎重であるべきで、果たして十分量の薬剤が運動ニューロンへ到達しているかを検証する必要がある。ALS の病態の首座である脊髄の運動ニューロンに対して効率良く薬剤を供給する手段として髄腔内投与はすぐれており、ALS ラットではこのルートによる薬剤投与が可能である。さらには ALS ラットはわが国で開発され、特許を申請済みである。HGF の特許とあわせてわが国で ALS に対する創薬が可能であり、是非、私たちの手で臨床開発を進めたいと考えている。

### 文 献

- 1) Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y, et al: Mild ALS in Japan associated with novel SOD mutation [published erratum appears in *Nature Genet.* 1994; 6: 225]. *Nature Genet* 1993; 5: 323—324
- 2) Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al: Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362: 59—62
- 3) Urushitani M, Sik A, Sakurai T, et al: Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neurosci* 2005; 9: 108—118
- 4) Boillée S, Yamanaka K, Lobsigier CS, et al: Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006; 312: 1389—1392
- 5) Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, et al: Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neurosci* 2008; 11: 251—253
- 6) Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y, et al: Familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Japan associated with H46R mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene: a possible new subtype of familial ALS. *J Neurol Sci* 1994; 126: 77—83
- 7) Aoki M, Abe K, Houi K, et al: Variance of age at onset in a Japanese family with amyotrophic lateral sclerosis associated with a novel Cu/Zn superoxide dismutase mutation. *Ann Neurol* 1995; 37: 676—679
- 8) Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, et al: Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci* 2001; 21: 9246—9254
- 9) Sun W, Funakoshi H, Nakamura T: Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci* 2002; 22: 6537—6548
- 10) Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, et al: Intrathecal delivery of HGF from the ALS onset suppresses disease progression in a rat ALS model. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 1037—1044

**Abstract****Amyotrophic lateral sclerosis with the SOD1 mutations**

Masashi Aoki, M.D., Ph.D., Hitoshi Warita, M.D., Ph.D. and Yasuto Itoyama, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Tohoku University School of Medicine  
Tohoku University Hospital ALS Center

Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) have been linked to some familial cases of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In familial ALS kinders with mutations in the SOD1 gene, the age of onset of weakness varies greatly but the duration of illness appears to be characteristic to each mutation. For example, in patients with the L84V mutation, the average life expectancy is less than 1.5 year after the onset of symptoms, whereas patients harboring the H46R mutation have an average life expectancy of 18 years after the disease onset. In view of the evidence supporting the idea that familial ALS variants of SOD1 enzymes acquire toxic properties, the variations in the duration of illness in the different kinders might arise because each mutation imparts different degrees of toxicity to the mutant protein.

We developed rats that express a human SOD1 transgene with two different ALS-associated mutations (G93A and H46R) develop striking motor neuron degeneration and paralysis. The larger size of this rat model as compared with the ALS mice will facilitate studies involving manipulations of spinal fluid (implantation of intrathecal catheters for chronic therapeutic studies; CSF sampling) and spinal cord (e.g., direct administration of viral- and cell-mediated therapies).

Hepatocyte growth factor (HGF) is one of the most potent survival-promoting factors for motor neurons. To examine its both protective effect on motor neurons and therapeutic potential, we administered human recombinant HGF (hrHGF) by continuous intrathecal delivery to G93A transgenic (Tg) rats at onset of paralysis for 4 weeks. Intrathecal administration of hrHGF attenuates motor neuron degeneration and prolonged the duration of the disease by 63%. Our results indicated the therapeutic efficacy of continuous intrathecal administration of hrHGF in Tg rats. The results should prompt further clinical trials in ALS using continuous intrathecal administration of hrHGF.

(Clin Neurol, 48: 966—969, 2008)

**Key words:** amyotrophic lateral sclerosis, hepatocyte growth factor, mutation, SOD1, transgenic rat

---