

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

医科学応用研究財団研究報告 (2003.01) 20巻:195～196.

生活習慣病における医学,薬学の萌芽的研究
神経変性疾患に対するHGF遺伝子の長期効果の解析
—新しい治療法開発に向けて—
ダブルトランスジェニックマウスの作成と解析

船越 洋, 中村敏一

神経変性疾患に対するHGF遺伝子の長期効果の解析 —新しい治療法開発に向けて：ダブルトランスジェニックマウスの作成と解析

大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学講座分子組織再生分野 助教授 船越 洋
大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学講座分子組織再生分野 教授 中村 敏一

1. 研究の概要

アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 等は進行性神経変性疾患であり、現時点で有効な治療法はない。肝細胞増殖因子 (HGF) は、はじめ肝細胞増殖の本体として、培養肝細胞の増殖活性を基に精製・クローニングされた (Nakamura et al., BBRC 1984; Nakamura et al., Nature 1989)。その後HGFは多くの細胞を標的とし、増殖・分化・細胞遊走促進・血管新生促進等の多彩な機能を担うことが明らかとなった。HGFは、中でも神経細胞に関しても強力な栄養活性を持つことが明らかとなっている。本研究では、HGFの活性の中でも神経栄養活性に注目し、神経変性疾患に対するHGFの機能を①初代神経細胞培養系を用いる方法と、②神経および筋肉特異的HGF発現Transgenic miceを作成し、これと神経変性疾患モデルマウスを交配することで、HGF遺伝子を疾患マウスの神経細胞もしくは筋肉に供給しその効果を解析した。その結果、アルツハイマー病と密接に関係するアミロイド β およびグルタミン酸依存性の初代培養神経細胞死をHGFが濃度依存性に阻止すること、また、HGF遺伝子をALS-model transgenic miceの神経に特異的に供給すると、運動神経細胞死が抑制され、さらに一ヶ月にわたった寿命延長効果を持つことを明らかとした。その作用メカニズムの解析結果、HGFはいわゆる従来の神経栄養因子に知られるニューロンへの直接神経栄養作用に加えて、アストロサイトに作用しグルタミン酸毒性を緩和するHGF独自の作用をもつことを示唆した。

2. 研究経過および成果

1. はじめに

近年の家族性神経変性疾患の原因遺伝子研究のめざましい進歩とは裏腹に、神経変性疾患に対する治療法の開発は依然取り残された重大課題である。神経細胞はそれ自身増殖できないこと、また生後のneurogenesisもわずかである。

したがって大量の神経細胞死がおこる神経変性疾患の進行阻止には、神経細胞死そのものの阻止と、残存神経による神経ネットワークの再構築が必要かつ効果的な戦略となる。私達は、神経細胞の生存促進活性と神経突起伸長活性が非常に強い新しい神経栄養因子 (HGF) に着目し、以下の2つのアプローチを用いて神経変性疾患におけるHGFの機能解析を開始した。本研究では、そのうちこれまでに得られた成果を報告する。

2. 方法及び結果

(1) 初代神経細胞系を用いた神経変性疾患をmimicする条件でのHGFの神経細胞死に対する抑制効果の解析。

(a) アミロイド $A\beta$ による神経毒性 (b) グルタミン酸神経毒性に対するHGFの細胞死阻止作用について初代培養神経細胞を用いて解析した結果、HGFは濃度依存性に神経細胞死を抑制することが明らかとなった。Transwellを用いて神経細胞とアストロサイトをupper wellとlower wellに分けて共培養した系の解析結果、HGFは神経細胞単独に作用して神経毒性を抑制することに加えて、グルタミン酸投与時アストロサイトと共存すると、HGFは、神経細胞におけるBclXL発現を早期から誘導かつ長期間にわたりそのレベルを維持し、神経生存作用促進に働く間接作用をもつことを明らかとした。

(2) 神経特異的HGF発現トランスジェニックマウス (HGF-Tg) の樹立

まずHGF遺伝子を神経細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス (HGF-Tg) を作成した。そしてHGF遺伝子が神経特異的に発現することを確認した。さらにこのマウスのHGF発現を蛋白質レベルで評価すると (ELISA法)、HGFは神経組織で生後発現が増えその後成体になるまでそのレベルが維持されることが明らかとなった。また、ニューロン数および筋肉湿重量がHGF-Tgにおいて発生過程で修飾されないこと

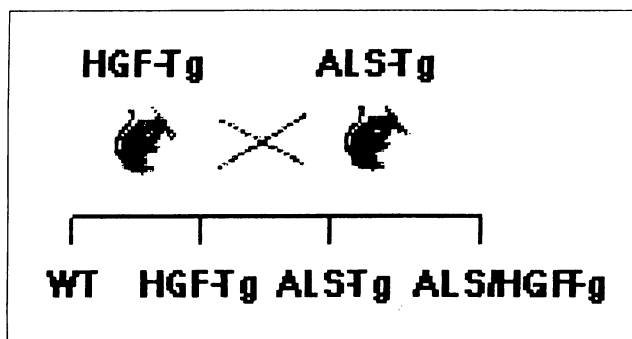


図1 ALSモデルマウス (ALS-Tg) とHGF-Tg交配によるダブルトランスジェニックマウス作成のアプローチ

が明らかとなった。

(3) 筋萎縮性側索硬化症モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) の神経細胞にHGF遺伝子を供給した際の効果の解析。ALSモデルマウスの神経細胞に直接長期間にわたってHGF遺伝子を供給するためにALSモデルマウスとHGF-Tgのダブルトランスジェニックマウス (ALS/HGF-Tg) を作成し、運動ニューロン死、軸索変性、運動機能および軸索変性について解析した。

図1にダブルトランスジェニックマウスの作成アプローチを示す。ALS/HGF-TgのコントロールとしてALSモデルマウス (ALS-Tg) に加えて、野生型 (WT) およびHGF-Tgを用いた。WTとHGF-Tgの間に運動ニューロン数に差はなく、ALS/HGF-Tgでは、ALS-Tgに認める運動ニューロン数の減少がよく阻止されていた。さらにALS/HGF-Tgでは軸索変性や運動機能低下が改善され、寿命が大幅に延長することが明らかとなった。その作用メカニズムとしては、運動ニューロンにALS病態中期おこるカスパーゼ-1の誘導を抑制した。加えて、アストロサイト (運動ニューロンへ伸長している足部を介して) に作用してグルタミン酸毒性を間接的に緩和してい

る可能性が示唆された。

4. まとめ

本研究では、ダブルトランスジェニックマウスのアプローチにより、ALSモデルマウスの神経細胞に特異的にHGF遺伝子を供給した効果を解析した。その結果、これまで有効な治療法がないと考えられていたALSにHGF遺伝子を供給することで、運動ニューロン死を抑制し寿命延長効果が得られることを明らかとした。この効果は従来神経栄養因子に知られるニューロンへの直接作用に加え、HGF独自のアストロサイトへの効果によることが明らかとなった。

参考文献

- 1) 船越 洋, 中村敏一: 神経栄養因子による神経難病治療の可能性"現代医療, 特集21世紀の新しい治療医学, vol. 34, No. 1, pp. 245-253, 2001.
- 2) 中村健二, 船越 洋, 中村敏一: 神経再生因子としてのHGF. 脳の科学, 特集号, 2002, in press.
- 3) K. Nakamura, H. Funakoshi, et al, Molecular cloning of a mouse scavenger receptor with C-type lectin (SRCL) (1), a novel member of the scavenger receptor family, *Biochim Biophys Acta.* 1522 (1), 53-58 (2001).
- 4) H. Funakoshi, T. Nakamura: Identification of HGF-like protein as a novel neurotrophic factor for avian dorsal root ganglion sensory neurons, *Biochem Biophys Res Commun.* 283 (3), 606-612, 2001.
- 5) K. Nakamura, H. Funakoshi, et al., Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family, *Biochem Biophys Res Commun.* 280 (4), 1028-1035, 2001.
- 6) W. Sun, H. Funakoshi, T. Nakamura: Localization and functional role of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-met in the rat developing cerebral cortex. *Mol Brain Res.* ;103 (1-2) :36-48, 2002.
- 7) W. Sun, H. Funakoshi, T. Nakamura, Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J. Neurosci.* 22 (15), 6537-6538, 2002.
- 8) YA Kishi, H. Funakoshi, et al, Molecular cloning, expression and partial characterization of Xksy, Xenopus member of the Sky family of receptor tyrosine kinases. *Gene.* 288 (1-2) :29-40, 2002.
- 9) H. Funakoshi, et al, Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 68 (2) :150-60, 2002.
- 10) H. Funakoshi, T. Nakamura, Hepatocyte growth factor (HGF) : from diagnosis to clinical applications, *Clinica Chimica Acta*, 2002, in press.