

# AMCoR

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

現代医療 (2002.01) 34巻1号:245～253.

【21世紀の新しい治療医学】  
脳神経領域  
神経栄養因子による神経難病治療の可能性

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

船越 洋, 中村 敏一\*

大阪大学大学院医学系研究科 未来医療開発専攻 組織再生医学講座分子組織再生分野 (\*教授)

## はじめに

神経疾患、なかでも21世紀に治療法開発が急がれる神経変性疾患は、神経軸索の変性と神経細胞死を特徴とする疾患である。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)やハンチントン舞踏病などの神経変性疾患の病因に対する解析の最近の著しい進歩とは裏腹に、効果的治療法の開発は依然未解決の問題である。

神経細胞はごく一部の例外を除き、一旦成熟すると二度と分裂増殖しない。したがって、これらの疾患ではいかに神経細胞死およびその軸索変性を抑え、残存神経細胞による神経ネットワークの再編成を行うかが神経変性疾患の必須かつ根本戦略といえる。この両者の機能を担おうとするのが神経栄養因子による治療である。

本稿では、最初に神経栄養因子の概説を、ついで神経栄養因子の神経変性疾患への適用の潜在的可能性、最後に神経栄養因子の神経変性疾患へのアプローチ(とくに内因性神経栄養因子に加え新しい可能性として人工神経栄養因子による治療法開発の可能性)の順で記載する。

## 神経栄養因子の歴史

神経栄養因子の中で初めて同定されたのが神経成長因子(Nerve Growth Factor: NGF)で、後にこの発見者Levi-Montartiniがノーベル賞を受賞した。この因子は胎仔に腫瘍細胞を移植すると、そこに向かって神経突起伸長がみられること(神経突起伸長活性)、また移植側の神経節のサイズが大きくなることから発見され精製された。NGFは後にファミリーを形成することが明らかとなる。2番目のファミリー因子である脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)はブタの脳から神経栄養活性を基にNGFとは独立に精製されたが、クローニングされてみると両者はアミノ酸で約50%相同性があり、ファミリー分子であることが明らかとなった。以後両者との相同性からニューロトロフィン-3(neurotrophin-3; NT-3)、ニューロトロフィン-4/5(neurotrophin-4/5; NT-4)、ニューロトロフィン-6(neurotrophin-6; NT-6)およびニューロトロフィン-7(neurotrophin-7; NT-7)がクローニングされた。ニューロトロフィンファミリーはヘパリン硫酸に結合しない栄養因子に分類さ

表 1. 各種神経栄養因子

## (I) ニューロトロフィンファミリー

- 神経成長因子：nerve growth factor (NGF)\*†  
 脳由来神経栄養因子：brain-derived neurotrophic factor (BDNF)\*†  
 ニューロトロフィン-3：neurotrophin-3 (NT-3)\*†  
 ニューロトロフィン-4：neurotrophin-4/5 (NT-4/5)\*†  
 ニューロトロフィン-6：neurotrophin-6 (NT-6) (魚類のみ)  
 ニューロトロフィン-7：neurotrophin-7 (NT-7) (魚類のみ)

(I') システインリッチ神経栄養因子：cystein-rich neurotrophic factor (CRNF) (へビ)\*

(II) TGF- $\beta$ スーパーファミリー

## (1) GDNF ファミリー

- グリア細胞由来神経栄養因子：glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)\*†  
 ナーチュリン：neurturin (NTN)\*†  
 パーセフィン：persephin\*†  
 アルテミン：artemin\*

(2) TGF $\beta$  ファミリー

- 腫瘍化促進因子- $\beta_1$ ：TGF- $\beta_1$   
 腫瘍化促進因子- $\beta_2$ ：TGF- $\beta_2$ \*  
 腫瘍化促進因子- $\beta_3$ ：TGF- $\beta_3$ \*

## (3) BMP ファミリー

- 骨成長因子-2：Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)\*

## (III) HGF ファミリー

- 肝細胞増殖因子：hepatocyte growth factor (HGF)\*†  
 HLP：HGF-like protein (HLP/MSP)\*†  
 リバーチン：livertin(カエルのみ)

## (IV) CNTF, CT-1, IL-6 スーパーファミリー

- 毛様体神経節由来神経栄養因子：Ciliary-derived Neurotrophic Factor (CNTF)\*†  
 コリン作動性因子：cholinergic differentiation factor (CDF/LIF)\*  
 カルディオトロフィン-1：cardiotrophin-1 (CT-1)\*

## (V) FGF ファミリー

- 塩基性繊維芽細胞成長因子：basic fibroblast growth factor (bFGF)\*†  
 繊維芽細胞成長因子-5：fibroblast growth factor-5 (FGF-5)\*  
 繊維芽細胞成長因子-20：fibroblast growth factor-20 (FGF-20)\*†

## (VI) IGF ファミリー

- インスリン様成長因子-1：insulin-like growth factor-1 (IGF-1)\*†  
 インスリン様成長因子-2：insulin-like growth factor-2 (IGF-2)

ニューロトロフィンはその代表であり、ほかにGDNFや新規神経栄養因子としてのHGF、そのファミリー分子(HLP)が注目されている。

\*：in vitro で神経栄養活性の報告があるもの。†：in vivo で神経栄養活性の報告があるもの。‡：ニューロトロフィンの共通受容体であるp75LNTFRと結合するが、ニューロトロフィンと構造を異にする新規神経栄養因子。

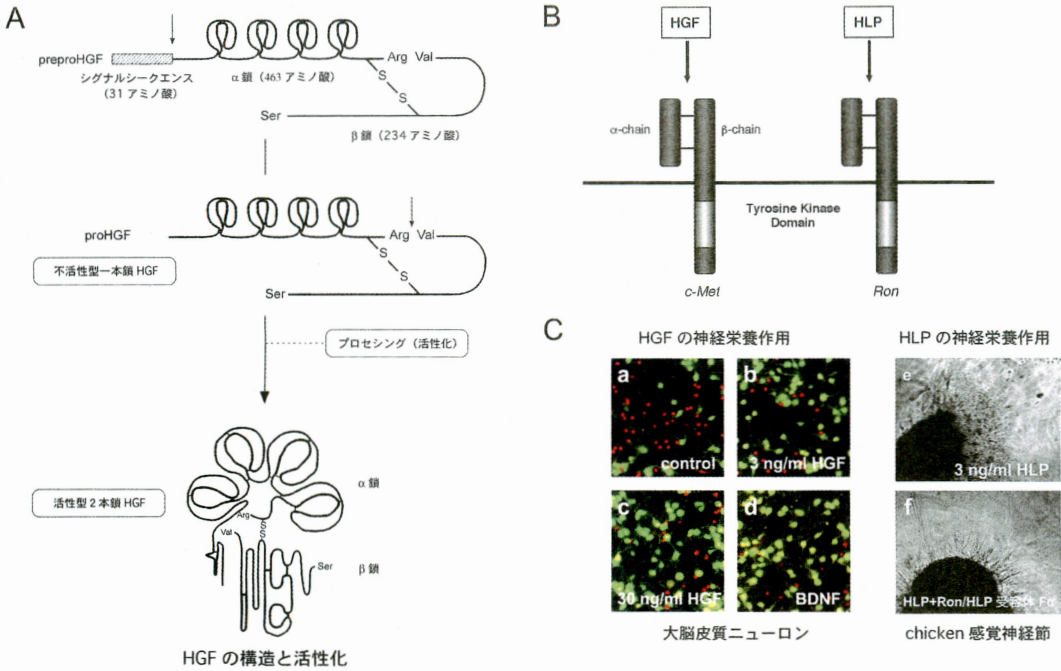


図 1. HGF とそのファミリー分子 HGF-like protein (HLP) の構造, 受容体特異性と神経栄養作用

A: HGF の構造と活性化. HGF の活性化には Val-Arg 間の切断による 2 本鎖へのプロセシングが必要である. B: リガンド-受容体対応関係. HGF は c-Met, HLP は Ron を特異的受容体とする. C: HGF および HLP の神経栄養作用の例. HGF は血清除去による大脳皮質ニューロン死をよく抑制する. 緑; 生細胞 (FDA で染色), 赤; 死細胞 (PI で染色). 一方, HLP は鶏感覚神経節の神経突起伸長および運動能を促進し, Ron-Fc はその作用を阻止する.

れるのに, NT-6 は NGF の一部に陽性電荷のアミノ酸配列が挿入され, ヘパリン硫酸結合能を持つことを特徴とする点で注目されたが, 同様の構造を持つ NT-7 と同様魚類でのみ同定されている. ニューロトロフィンは発生過程で神経生存促進, 神経突起伸長促進作用を示すことに加え, 神経損傷時, さらに成体においてもそのリモデリングに機能する<sup>1)</sup>. とくに神経栄養因子は, 神経疾患治療の鍵となる神経生存促進作用, 神経突起伸長促進作用を持つために神経疾患における不可逆性神経細胞死の阻止作用や神経ネットワークの再構築過程において寄与できると期待されているが, その可能性が最初に示唆されたのもニューロトロフィンであ

る. その際ニューロトロフィンの各ファミリー分子は, 特異的受容体である Trk 受容体 (TrkA, TrkB および TrkC) と結合することで細胞内にシグナル伝達し, その機能を発揮する. すなわち, どの Trk 受容体が細胞に発現しているかで各ニューロトロフィンの標的細胞が決まっている. しかし, 神経系におけるすべての細胞にいずれかの Trk 受容体が発現しているわけではない. したがって, Trk 受容体の発現していない細胞では, 何らかの他の栄養因子が機能を担っていることになる. ニューロトロフィンファミリー以外にも, これまでにいくつもの神経栄養因子が同定され, TGFβ スーパーファミリー, なかでも GDNF ファミリーや HGF ファ

ミリー、CNTFファミリー、FGFファミリーなどが同定されている(表1)。この中で、HGFファミリーは新しい神経栄養活性を持つ多機能性因子として注目されている。以下、日本で発見されたHGFを例に、神経栄養作用について概説する。

### HGFファミリーの神経栄養作用

HGF ははじめ肝細胞増殖活性をもとに培養肝細胞から精製・クローニングされたが<sup>2)</sup>、その後の研究の発展結果、HGFは非常に多くの細胞を標的細胞とする多機能性因子であることが明らかとなってきた。神経以外の機能については他の総説に譲り<sup>3)</sup>、ここでは神経栄養活性に焦点を絞り述べたい。

#### 1. HGFファミリーおよびその受容体の構造(図1)

HGF ははじめ preproHGF として一本鎖の形で合成され、プロセッシングにより Val と Arg の間で切断され、四つのクリングル構造を持つ  $\alpha$  鎖と、セリンプロテアーゼ様構造をとる  $\beta$  鎖(酵素活性を欠如)からなる二本鎖 HGF として活性型の立体構造を構成する(図1A)。この活性化は u-PA や HGF activator などの分子により起こる。HGFファミリー分子としては HGF-like protein(HLP)が唯一同定されている(カエルでは Livertin が同定されている)。HLP も HGF 同様  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖からなるヘテロダイマー構造をとる。また、HGF および HLP は各々チロシンキナーゼ型受容体である c-Met および Ron を特異的受容体とする(図1B)。

#### 2. HGFファミリーの神経栄養作用

HGF は、1995年に海馬ニューロンに対して、その後中脳ドーパミン作動性ニューロンをはじめとして多くのニューロンに対し、神経生存促進作用、神経突起伸長作用および運動促進作用を持つことが明らかとなった。一方、HLP は2001年に感覚ニューロンおよび運動ニューロ

表 2. HGF および HLP の標的神経細胞

標的神経細胞	HGF	HLP
大脳皮質ニューロン	○#	N.D.
海馬ニューロン	○	N.D.
中脳ドーパミン作動性ニューロン	○	N.D.
小脳顆粒細胞	○	N.D.
運動ニューロン	○#	○
感覚ニューロン	○*	○*
交感ニューロン	○*	N.D.
交感神経芽細胞	○	N.D.
副交感ニューロン	○*	N.D.

HGF は、大脳皮質、海馬、中脳ドーパミン作動性や運動ニューロンなど難治性神経疾患であるアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)に重要なニューロンを標的細胞としている。

○：神経栄養作用を認めるもの。N.D.：not determined。#：他の神経栄養因子との協調作用が認められるもの(大脳皮質ニューロンの協調作用については未発表)。\*：極微量の他の神経栄養因子存在条件で強い神経栄養作用を示すもの。

ン(舌下神経)に対し神経栄養活性を持つことが明らかとなっている<sup>4,5)</sup>(図1D)。HGF はとくに難治性神経変性疾患で、重要な神経細胞に対し神経栄養作用を示す点で注目されている(表2)。

#### 3. HGF の持つ潜在的神経疾患治療への適用性

HGF は表2に示すような *in vitro* に対する神経栄養活性に加え、*in vivo* 神経疾患モデルにおいても強力な神経栄養活性を示すことが明らかとなっている<sup>6)</sup>。とくに脳虚血における遅発性神経細胞死(海馬や大脳皮質)や舌下神経切断モデルにおける運動ニューロンにおける ChAT 活性低下の抑制等があるが、ここでは最近明らかとなった筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルトランスジェニックマウスに対する

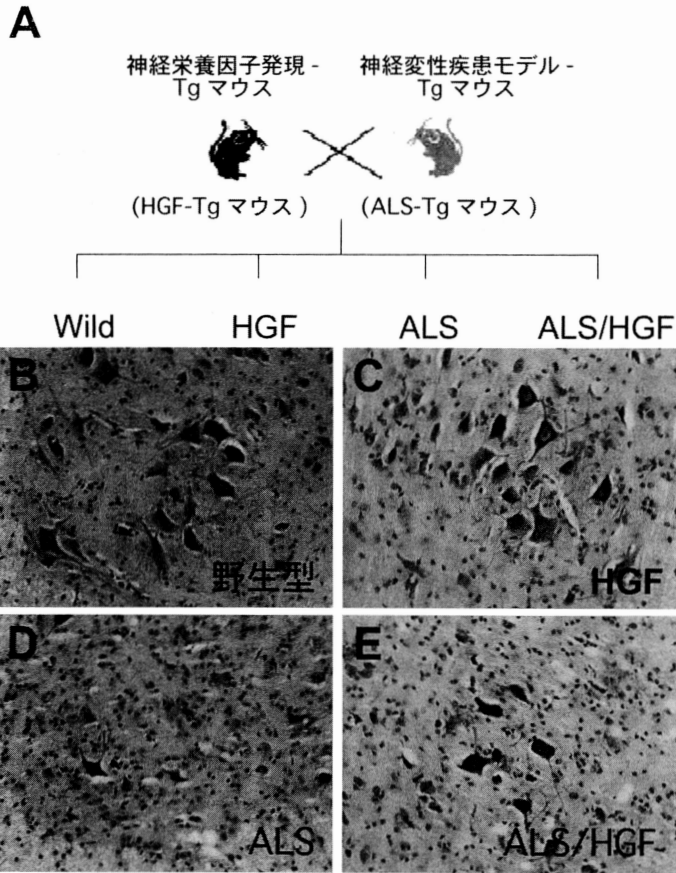


図 2. 神経変性疾患に対する神経栄養因子の機能解析のアプローチ (HGF の例)

A: 家族性神経変性疾患の原因遺伝子を遺伝子導入した神経変性疾患モデル Tg マウスに対する神経栄養因子の解析. 変性疾患であるためヒトの病態を反映するモデル Tg マウスも進行が遅く, 神経栄養因子の機能解析は難しいとされてきたが, 神経栄養因子を特異的部位に発現する Tg マウスを作成し, これと神経変性疾患モデルマウスを交配することで, 神経栄養因子を長期間モデルマウスの目的細胞に発現させることができる. この方法により家族性神経変性疾患を反映するモデルでの機能解析が可能である. B~E, 各マウスの脊髄運動ニューロンの Cresylviolet 染色像. ALS-Tg マウスでは運動ニューロン数が大幅に減少するが, HGF を遺伝子導入した ALS/HGF マウスでは運動ニューロン数がよく保たれている.

HGF の効果について紹介する (図 2A). ALS は, 家族性のものについては原因変異遺伝子 (SOD-1) が特定され, これを発現するトランスジェニック (Tg) マウスが作成されたことで, 理

論上治療法の真の効果を判定できるモデルができたことになる. 一方, これらのマウスはヒトと同様長期間を経て病態が完成するため, 潜在的治療分子を血液脳関門の問題なく長期間神経

表 3. HGF の作用が期待される潜在的神経・筋疾患

神経・筋疾患	標的細胞
脳梗塞	大脳皮質, 海馬ニューロンおよび血管内皮細胞
アルツハイマー病	大脳皮質, 海馬ニューロンおよび血管内皮細胞
パーキンソン病	中脳ドーパミン作動性ニューロン
筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	運動ニューロン, アストロサイト
脊髄損傷	運動および感覚ニューロン
脊柱管狭窄症	運動, 感覚ニューロンおよび血管内皮細胞
末梢神経炎・障害	感覚, 交感および副交感ニューロン
進行性筋ジストロフィー症	筋原性細胞, 筋衛星細胞 (筋芽細胞)

表 4. 潜在的神経栄養因子標的疾患と神経栄養因子

神経栄養因子治療の 標的神経疾患	候補となっている神経栄養因子
アルツハイマー病	Neurotrophins (NGF, BDNF), HGF
パーキンソン病	GDNF, HGF, FGF-20
筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	HGF, GDNF
ハンチントン舞踏病	Neurotrophins (BDNF, NT-3, NT-4/5), GDNF family (GDNF, Neurturin)
脳梗塞	HGF family (HGF), IGF-1, CNTF
脊髄損傷	NT-3, HGF family (HGF, HLP)
末梢神経炎	Neurotrophins (NGF, NT-3), HGF family (HGF, HLP)

細胞に供給する必要がある点で実際には容易でなく、より短期間で病態が完成する運動ニューロン病モデル動物で効果の判定がされてきた。我々は、HGF を神経特異的に発現する Tg マウスを作成し、これと変異 SOD-1 を発現する ALS-Tg マウスを交配することで、HGF 遺伝子を ALS-Tg マウスの神経に直接長期間発現させた際の効果を解析した。その結果 HGF の遺伝子供給により、ALS-Tg マウスの運動ニューロン死がよく阻止され、寿命延長効果を持つことが明らかとなった(図 2B~E)。これまでのところ、既知の神経栄養因子での ALS-Tg マウ

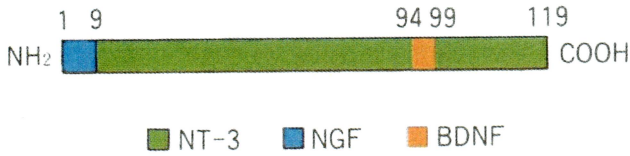
スへの効果の唯一の報告となる。また、脳虚血については遺伝子治療の可能性も示唆されている。HGF の潜在的神経疾患への適用性は表 3 にまとめた。

#### 神経栄養因子の神経疾患に対する

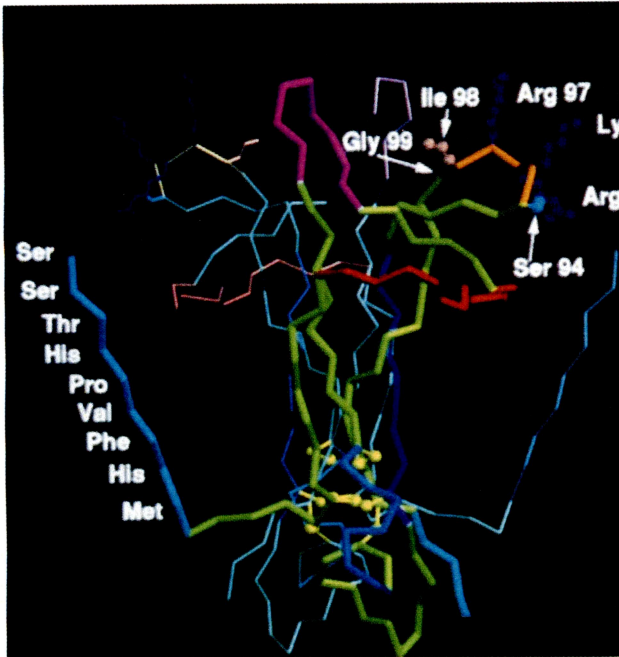
##### 潜在的適用性

神経栄養因子の神経疾患への適用疾患を表 4 にまとめた。ニューロトロフィンをはじめとする神経栄養因子は、多くの神経疾患への適用性が期待されている。とくに脳虚血に対する効果は、増加する脳梗塞や TIA などの新しい治療法

### A 人工神経栄養因子 (pan-neurotrophin-1)



### B



pan-neurotrophin-1 の2量体立体構造モデル

### C

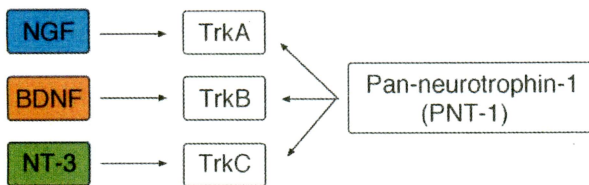


図 3. ニューロトロフィンを基盤とした人工神経栄養因子(pan-neurotrophin)

A: 人工神経栄養因子(pan-neurotrophin)は、ニューロトロフィンのうちNT-3を基盤とし、N末端をNGFのそれと、可変領域VをBDNFのそれと入れ替えた人工キメラ分子。B: pan-neurotrophin 2量体のモデル立体構造。N末端が両側に開きTrkAと結合するのを助けられていると考えられる。C: pan-neurotrophinの受容体特異性。Pan-neurotrophinはNGF、BDNF、NT-3の特異的受容体であるTrkA、TrkBおよびTrkCすべてに結合、活性化することができる。



として期待できる。また、難治性神経変性疾患は現時点では有効な治療法がなく、神経栄養因子治療に対する期待は世界的にも大きい。その背景として ALS に対してはアデノウイルスを用いたニューロトロフィンと CNTF のコンビネーションによる運動ニューロン疾患への遺伝子治療の適用性が Pmn マウスで示されている<sup>7)</sup>。また、薬剤性パーキンソン病モデルや薬剤性ハンチントン舞踏病モデルマウスに対しても、神経栄養因子(ニューロトロフィンや GDNF ファミリー分子)が神経細胞死阻止作用を持つことが報告されている<sup>8-10)</sup>。さらに、Lenti ウイルスを用いた遺伝子治療法を用いてパーキンソン病のモデルサル(MPTP モデル)への GDNF の効果が報告され、中脳ドーパミン作動性ニューロン死を抑制するだけでなく、ドーパミン量の低下をよく抑制することが報告された<sup>11)</sup>。これらを背景に神経栄養因子治療が期待されている。

#### 今後の展開

これまでの薬剤性神経変性疾患モデルに対する神経栄養因子の効果が詳細に解析されてきたが、一方、より臨床に近い家族性神経変性疾患モデル Tg マウスにおける神経栄養因子の治療効果の報告例はない。この意味で新しい神経栄養因子としての HGF が ALS モデル Tg マウスに効果を示したことは、家族性神経変性疾患への神経栄養因子治療の可能性を開いた点で意義が大きい(HGF がなぜそれだけ効果があるかについては別の機会に述べたい)。今後アルツハイマー病 Tg マウス(変異 APP, presenilin-1 & 2)に対する効果、家族性パーキンソン病の原因遺伝子である変異  $\alpha$ -synuclein や変異 Parkin 発現 Tg マウスが作成され、これらに対する効果やポリグルタミン病モデル Tg マウスへの神経栄養因子の治療効果が判定できれば、神経栄養因子の適用疾患の拡大とそれらの疾患への実用化の可能性が大きく前進することとな

ろう。また、その効果的供給法の開発も重要な課題である。

一方、新しい試みとして人工神経栄養因子治療の可能性を我々は期待している。たとえば末梢神経は、NGF, BDNF および NT-3 応答感覚、運動ニューロンの混合神経で、一つのニューロトロフィンでこれらすべての神経再生を期待することは難しい。この問題に対して、NT-3 を骨格としその一部を NGF および BDNF と置換することで NGF, BDNF および NT-3 すべての活性を持ったキメラ分子(pan-neurotrophin)(図 3)が、実際末梢神経損傷モデルで感覚、運動神経の再生を促進できることを示した<sup>12)</sup>。この際、受容体の内因性の発現調節により、pan-neurotrophin が適切な神経に適切な作用時間に機能できることになる。今後このようなアプローチによる人工神経栄養因子の開発も進むことと期待される。我々は HGF を基盤とした第二世代の人工神経栄養因子開発にも着手している<sup>13)</sup>。

#### おわりに

神経栄養因子は、神経疾患の根本である不可逆性神経細胞死の阻止作用に加え、神経ネットワークの再編成や神経機能の活性化などにより、新しい神経疾患治療分子として今後臨床応用されていくことと期待される。

#### 文 献

- 1) Funakoshi H *et al* : Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 268 : 1495, 1995.
- 2) 中村敏一 監 : 「HGF の分子医学」メディカルレビュー社, 2000.
- 3) Nakamura T *et al* : Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342 : 440, 1989.
- 4) Funakoshi H *et al* : Identification of HGF-like protein as a novel neurotrophic factor for avian dorsal root ganglion sensory neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 283 :

- 606, 2001.
- 5) Stella MC *et al* : Macrophage stimulating protein is a novel neurotrophic factor. *Mol Biol Cell* **12** : 1341, 2001.
  - 6) 船越 洋, 松本 邦夫, 中村 敏一 : 神経栄養因子研究の新しい展開 ; HGF の神経疾患治療への展望. *神経研究の進歩* **44** : 414, 2000.
  - 7) Haase G *et al* : Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat Med* **3** : 429, 1997.
  - 8) Lindsay RM *et al* : The therapeutic potential of neurotrophic factors in the treatment of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **124** : 103, 1993.
  - 9) Perez-Navarro E *et al* : Intrastratial grafting of a GDNF-producing cell line protects striatonigral neurons from quinolinic acid excitotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci* **11** : 241, 1999.
  - 10) Perez-Navarro E *et al* : Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurochem* **75** : 2190, 2000.
  - 11) Kordower JH *et al* : Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* **290** : 767, 2000.
  - 12) Funakoshi H *et al* : Targeted expression of a multifunctional chimeric neurotrophin in the lesioned sciatic nerve accelerates regeneration of sensory and motor axons. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 5269, 1998.
  - 13) 船越 洋ほか : ニューロサイエンスの研究法 キメラタンパク作成法と利用. *脳の科学* **21** : 537, 1999.