

# AMCoR

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

旭川医科大学研究フォーラム(2018)第18巻:

(L f<; : L

!

!

4) 再生因子 (HGF) を用いた神経難病への治療法開発研究—ポリグルタミン病、脳梗塞を中心として—  
旭川医科大学教育研究推進センター 船越 洋  
【はじめに】

神経疾患は、神経細胞が一旦分化成熟すると分裂・増殖できないため、神経細胞数の減少に直結しやすく、治療に難渋する疾患である。中でもポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脊髄損傷 (SCI)、脳梗塞などの神経難病は治療法が確立しておらず、新しい治療法開発が望まれている。治療法開発の戦略としては、神経難病がいずれも神経細胞の変性脱落を特徴とすることから、従来は神経細胞保護作用を持つ因子による治療法開発に焦点が当てられてきた。例としては NGF を代表とするニューロトロフィンファミリー分子や GDNF ファミリー分子などが挙げられ、神経栄養因子群の動物レベルを含めた具体的活性が証明され注目されてきた<sup>1-4)</sup>。私達はこれらの因子による治療研究に加えて、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-1) による *in vivo* での神経再生に挑戦し、世界で初めて成功した<sup>5)</sup>。一方で、最近になり cell autonomous な神経細胞変性に加えて、non-cell autonomous な神経細胞変性のメカニズムの重要性が認識されるようになってきた<sup>6-7)</sup>。神経難病が神経栄養因子だけでは治療に不十分である可能性を考え、従来の神経細胞にのみ焦点をあてた治療戦略から、周囲のグリア細胞への治療も視野に入れた治療戦略が注目されるようになってきた。

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor : HGF) は、中村敏一らによりラット血液中 (血小板) から精製され、クローニングされた日本オリジナルな増殖因子である<sup>8)</sup>。HGF は、発見の端緒となった初代培養肝細胞への増殖活性を基盤に、肝臓への再生活性の解析が進み、劇症肝炎のモデルにおいても HGF の有用性が実証された<sup>9)</sup>。さらに HGF とその受容体 Met のノックアウト/ノックインマウスの研究や抗体投与実験の結果から、今日 HGF は肝再生の critical 因子として注目されている。HGF はこのような肝細胞への活性に加えて、肺、腎臓、腸管、骨を含む広い範囲の細胞に活性を示し、多くの臓器障害モデルで治療効果を持つことが明らかとなりつつある<sup>8)</sup>。

私達は、中でも HGF が神経細胞、さらにはグリア細胞やその前駆細胞に生理活性を持つことに注目し解析

を進めてきた。グリア細胞を含めた神経系における HGF の活性は、神経難病における神経細胞への cell autonomous な活性に加えた non-cell autonomous な活性にも期待が持てる。

本研究は、これらを背景に、HGF による神経難病への治療法開発を進めることにある<sup>10)</sup>。特に今回は4つの疾患に焦点を当てて研究を進めた。

【結果および考察】

私達は、治療法の確立していないポリグルタミン病を中心に4つの疾患に対して HGF の治療法としての意義を明らかにしていくため、(1) ポリグルタミン病に対しては、脊髄小脳変性症7型 (SCA7)、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) およびハンチントン病のモデルトランスジェニック/ノックインマウスに対する HGF の効果を、ダブルトランスジェニック/ノックインマウスの作出、あるいは HGF を発現する非増殖型ヘルペス I 型ウイルスベクター (HSV1-HGF) を用いた遺伝子治療法のアプローチで解析した。(2) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) については、内因性 HGF の疾患進行抑制意義について解析した。(3) 神経免疫疾患である多発性硬化症モデル動物への HGF の効果の解析とその分子機構解析を行った。(4) 脳梗塞モデルを用いた HGF 治療効果の解析と分子機序解析を施行した。本研究は、動物実験委員会、遺伝子組換え安全委員会および倫理委員会の承認のもと実施した。

1. ホリグルタミン病モデル動物に対する HGF の治療効果

1-1. 脊髄小脳変性症7型 (SCA7) ノックインマウスに対する治療効果

脊髄小脳変性症 (Spinocerebellar ataxia type 7: SCA7) は小脳プルキンエ細胞とバーグマンガリア細胞の変性を特徴とする神経変性疾患である。本研究では、ヒト SCA7 の原因遺伝子である 266 の CAG リピートを持つ ATXN7 遺伝子をノックインした重篤な SCA7 疾患モデル動物である。SCA7 ノックインマウス (以下 SCA7-KI) は Prof. Huda Y. Zoghbi からご供与いただき、卵巣移植法で継代・維持した。SCA7-KI に対する HGF の治療効果は次の方法で解析した。まず神経特異的 HGF 過剰発現マウス (以下 HGF-Tg マウス) と SCA7-KI を交配し、SCA7-KI, HGF-Tg / SCA7-KI, HGF-Tg,

WT マウスを作出し、各群を比較することで SCA7-KI マウスの神経系への HGF 遺伝子の持続発現効果を解析した。その結果、HGF により、SCA7-KI マウスの小脳プルキンエ細胞の神経変性に加えて、パーグマンガリア細胞の変性が抑制され、パーグマンガリア細胞のグルタミン酸受容体の発現レベルが上昇することが明らかとなった。この結果は、HGF が SCA7 に対する cell autonomous (プルキンエ細胞) と non-cell autonomous (パーグマンガリア) の両面で治療効果を示す分子機序を明らかにした意味で意義が大きい<sup>11)</sup>。

### 1-2. 球脊髄性筋萎縮症トランスジェニックマウスに対する治療効果

球脊髄性筋萎縮症 (Spinal and Bulbar Muscular Atrophy: SBMA) は、アンドロゲン受容体 (AR) の CAG リピートの異常伸張により発症する脳や脊髄の一部の運動神経が変性する疾患で、Kennedy-Alter-Sung 症候群と呼ばれることもある。名古屋大学神経内科祖父江教授らとの共同研究として、SBMA-Tg マウスと HGF-Tg マウスを交配し、去勢の有無で、SBMA-Tg マウスへの HGF による治療効果を解析した。その結果、HGF は SBMA トランスジェニックマウスモデルにおいて治療効果を持つことを明らかとした<sup>12)</sup>。

### 1-3. ハンチントン病トランスジェニックマウスに対する治療効果

ハンチントン病は *huntingtin* 遺伝子の CAG リピートの異常伸張により発症する常染色体優性遺伝型を示す遺伝性の神経変性疾患で、舞踏運動などの不随意運動、精神症状、行動異常、認知障害などを臨床像の特徴とする。この遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウス (R6/2-Tg) に HGF 発現非増殖性ヘルペス I 型ウイルスベクター (HSV-1/HGF) もしくはコントロールウイルスベクターをマウス両側線条体に stereotaxic injection したところ、線条体の変性が抑制され、運動機能解析においても Rotorod テストが改善することが明らかとなった (投稿準備中)。

今後、リコンビナント HGF 蛋白質の投与でも同様の結果が得られるかについても、解析を進めていきたい。

## 2. ALS に対する内因性 HGF の進行抑制効果の解析

ALS は運動ニューロンの変性脱落を特徴として運

動麻痺、呼吸、嚥下麻痺により死に至る致死性疾患である。ALS への HGF の治療効果については、私達はこれまで多くの研究成果を報告してきているが、依然内因性 HGF の疾患進行抑制の意義は明らかになっていない<sup>13-19)</sup>。そこで、ALS の内因性 HGF を中和した際の、疾患進行に対する効果を見るため、以下の動物モデルを作出し解析した。ヒトの ALS の原因遺伝子である SOD1<sup>G93A</sup> を過剰発現した SOD1<sup>G93A</sup> トランスジェニックラット (以下 ALS-Tg ラット) の発症時から、抗ラット HGF 抗体を投与した。その結果、ALS-Tg ラットの寿命が短縮することが明らかとなった (船越他、未発表)。このことから、内因性の HGF が ALS-Tg ラットの進行抑制効果をもっており、抗 HGF 抗体によりその活性を中和することで進行が促進したこととなり、内因性 HGF の ALS 進行抑制効果が実証された。したがって、HGF の ALS 患者への投与による治療法は、内因性生理活性物質である HGF の補充療法としての生理的意義をもつことを示す結果となった。

### 3. 多発性硬化症モデル動物への HGF の治療効果とその分子機序解析

私達は、ジュネーブ大学の Lalive PH らとの共同研究で、HGF が EAE を用いた多発性硬化症のモデル動物で治療効果を示すことをすでに明らかにしている<sup>20)</sup>。しかし、その分子機序は、まだ完全に明らかにできていなかった。HGF の臨床適用に向けて薬事承認を得ていくには、分子機序解析は欠かせない。そこで、Lalive PH らとさらに詳細な分子機序解析を進めた。その結果、HGF は自己免疫としての神経炎症に対しては、寛容性樹状細胞 (DC) に誘導されるグルココルチコイド誘導性ロイシンジッパー (GILZ) を介して機能する分子機序が存在することを示した<sup>21,22)</sup>。

### 4. 脳梗塞モデルを用いた HGF 治療効果の解析と分子機序解析

脳梗塞については、脳虚血のモデル動物に対してリコンビナント HGF 蛋白質投与による治療研究に加えて、骨髄幹細胞に HGF 遺伝子を非増殖性ヘルペス I 型ウイルスベクターで導入した場合の効果についても種々の共同研究で解析結果が蓄積してきている<sup>23-28)</sup>。その結果、脳虚血モデルでは、梗塞範囲の縮小効果に加えて、神経新生も増加する効果があることが明らか

となってきた<sup>29)</sup>。一方で、臨床適用を考える上でのタイムウインドウの決定や投与量や経路については、より詳細な研究が欠かせない。特にげっ歯類モデルだけでなく中大動物での解析結果が臨床展開前には欠かせない。これらの方向で研究を進めている。

#### 【まとめ】

本研究により、トランスジェニックマウス、ノックインマウス等を用いることで、SCA7、SMBA、ハンチントン病モデルなどのポリグルタミン病や多発性硬化症モデル動物に対するHGFの治療効果とその分子機序の解析が大幅に進んだ。また、トランスジェニックラットモデルを用いることで、ALS進行抑制に対する内因性HGFの意義が明らかとなった。さらに、本研究期間に、共同研究先である東北大学神経内科青木正志教授らによりALS患者へのPhase II studyが、脊髄損傷については慶應義塾大学生理学岡野教授、同整形外科中村雅也教授らによりPhase I / II studyがスタートした<sup>30-36)</sup>。本学も東北大学におけるALSの疾患レジストリに分担参加している。今後HGFを用いた神経疾患、神経免疫疾患に対する新しい治療法の確立が現実となるようにさらに研究を進展させていきたい。

#### 【謝辞】

橋わたし研究加速ネットワーク事業の被験者リクルート促進事業においては、旭川医科大学第1内科長谷部教授、片山 隆行先生、澤田 潤先生、教育研究推進センター神山特任助教（現AMED出向中）、佐藤幸氏はじめ臨床研究支援センターの皆様には、東北大学青木教授らが進めるALS疾患レジストリの旭川医科大学としての分担疾患レジストリにご協力いただきましたこと重ねて御礼申し上げます。これによりALSのPhase II studyが進むことが期待されます。また、多くの共同研究者の皆様、教育研究推進センターの同僚にこの場を借りまして深謝申し上げます。また、学長裁量経費による「独創性のある生命科学研究費」の助成の機会を与您いただきました吉田学長に深謝申し上げます。

#### 【文献】

1) Funakoshi H, Frisén J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, Persson H. Differential

expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol.* 123 (2), 455-65, 1993.

2) Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H, Ibáñez CF. Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science.* 268 (5216), 1495-9, 1995.

3) Trupp M, Rydén M, Jörnvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibáñez CF. Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol.* 130 (1), 137-48, 1995.

4) Trupp M, Rydén M, Jörnvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibáñez CF. Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Cell Biol.* 130 (1), 137-48, 1995.

5) Funakoshi H, Risling M, Carlstedt T, Lendahl U, Timmusk T, Metsis M, Yamamoto Y, Ibáñez CF. Targeted expression of a multifunctional chimeric neurotrophin in the lesioned sciatic nerve accelerates regeneration of sensory and motor axons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (9), 5269-74, 1998.

6) Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol.* 187 (6), 761-72, 2009.

7) Custer SK, Garden GA, Gill N, Rueb U, Libby RT, Schultz C, Guyenet SJ, Deller T, Westrum LE, Sopher BL, La Spada AR. Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nat Neurosci.* 9 (10), 1302-11, 2006.

8) Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clin Chim Acta.* 327 (1-2), 1-23, 2003.

9) Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology.* 30 (1), 151-9, 1999.

- 10) **Funakoshi H**, Nakamura T. Hepatocyte Growth Factor (HGF): Neurotrophic Functions and Therapeutic Implications for Neuronal Injury/Diseases. *Current Signal Transduction Therapy*, 2011, 6, 156-167. ([http://www.asahikawa-med.ac.jp/arec/funakoshis\\_lab/Funakoshi%20CSTT\\_156-167.pdf](http://www.asahikawa-med.ac.jp/arec/funakoshis_lab/Funakoshi%20CSTT_156-167.pdf))
- 11) Noma S, Ohya-Shimada W, Kanai M, Ueda K, Nakamura T, **Funakoshi H**. Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7. *Neurosci Res.* 73 (2), 115-21, 2012.
- 12) Ding Y, Adachi H, Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, **Funakoshi H**, Nakamura T, Sobue G. Overexpression of hepatocyte growth factor in SBMA model mice has an additive effect on combination therapy with castration. *Biochem Biophys Res Commun.* 468 (4), 677-83, 2015.
- 13) 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.* 22 (15), 6537-48, 2002 (\* These authors contributed equally to this work).
- 14) **Nerve growth factor invigorates mice with Lou Gehrig's disease**, Sci. Aging Knowl. Environ., (Science SAGE KE) Vol. 2002, Issue 32, p. nw113 (<http://sageke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sageke;2002/32/nw113>)
- 15) Kato S, **Funakoshi H**, Nakamura T, Kato M, Nakano I, Hirano A, Ohama E. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. *Acta Neuropathol.* 106 (2), 112-20, 2003.
- 16) Kadoyama K, **Funakoshi H**, Ohya W, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) attenuates gliosis and motoneuronal degeneration in the brainstem motor nuclei of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Res.* 59 (4), 446-56, 2007.
- 17) Kadoyama K, **Funakoshi H**, Ohya-Shimada W, Nakamura T, Matsumoto K, Matsuyama S, Nakamura T. Disease-dependent reciprocal phosphorylation of serine and tyrosine residues of c-Met/HGF receptor contributes disease retardation of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Res.* 65 (2), 194-200, 2009.
- 18) 船越 洋、中村 敏一. ALS に対する再生医療の開発- 再生誘導因子 HGF を用いた神経再生. *臨床神経.* 52 (11) : 942, 2012.
- 19) 読売新聞 1 面記事 ([http://www.asahikawa-med.ac.jp/arec/funakoshis\\_lab/yomiuri\\_np.pdf](http://www.asahikawa-med.ac.jp/arec/funakoshis_lab/yomiuri_np.pdf))
- 20) Benkhoucha M, Santiago-Raber ML, Schneiter G, Chofflon M, **Funakoshi H**, Nakamura T, Lalive PH. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (14), 6424-9, 2010.
- 21) Benkhoucha M, Molnarfi N, Dunand-Sauthier I, Merkler D, Schneiter G, Bruscoli S, Riccardi C, Tabata Y, **Funakoshi H**, Nakamura T, Reith W, Santiago-Raber ML, Lalive PH. Hepatocyte growth factor limits autoimmune neuroinflammation via glucocorticoid-induced leucine zipper expression in dendritic cells. *J Immunol.* 193 (6), 2743-52, 2014.
- 22) Molnarfi N, Benkhoucha M, **Funakoshi H**, Nakamura T, Lalive PH. Hepatocyte growth factor: A regulator of inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2 (4), 275-300, 2015.
- 23) Niimura M, Takagi N, Takagi K, Mizutani R, Ishihara N, Matsumoto K, **Funakoshi H**, Nakamura T, Takeo S. Prevention of apoptosis-inducing factor translocation is a possible mechanism for protective effects of hepatocyte growth factor against neuronal cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26 (11), 1354-65, 2006.
- 24) Date I, Takagi N, Takagi K, Tanonaka K, **Funakoshi H**, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S. Hepatocyte growth factor attenuates cerebral ischemia-induced increase in permeability of the blood-brain barrier and decreases in expression of tight junctional proteins in cerebral vessels. *Neurosci Lett.* 407 (2), 141-5, 2006.
- 25) Niimura M, Takagi N, Takagi K, **Funakoshi H**, Nakamura T, Takeo S. Effects of hepatocyte growth factor on phosphorylation of extracellular signal-

- regulated kinase and hippocampal cell death in rats with transient forebrain ischemia. **Eur J Pharmacol.** 535 (1-3), 114-24, 2006.
- 26) Niimura M, Takagi N, Takagi K, Mizutani R, Tanonaka K, **Funakoshi H**, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S. The protective effect of hepatocyte growth factor against cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia is related to the improvement of apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 level and inhibition of NADPH oxidase activity. **Neurosci Lett.** 407 (2), 136-40, 2006.
- 27) Zhao MZ, Nonoguchi N, Ikeda N, Watanabe T, Furutama D, Miyazawa D, **Funakoshi H**, Kajimoto Y, Nakamura T, Dezawa M, Shibata MA, Otsuki Y, Coffin RS, Liu WD, Kuroiwa T, Miyatake S. Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector. **J Cereb Blood Flow Metab.** 26 (9), 1176-88, 2006.
- 28) Shang J, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Zhang H, Morimoto N, Liu N, Zhang X, Tian F, Matsuura T, **Funakoshi H**, Nakamura T, Abe K. Antiapoptotic and antiautophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats. **J Neurosci Res.** 88 (10), 2197-206, 2010.
- 29) Shang J, Deguchi K, Ohta Y, Liu N, Zhang X, Tian F, Yamashita T, Ikeda Y, Matsuura T, **Funakoshi H**, Nakamura T, Abe K. Strong neurogenesis, angiogenesis, synaptogenesis, and antifibrosis of hepatocyte growth factor in rats brain after transient middle cerebral artery occlusion. **J Neurosci Res.** 89 (1), 86-95, 2011.
- 30) Matsumoto K, **Funakoshi H**, Takahashi H, Sakai K. HGF-Met Pathway in Regeneration and Drug Discovery. **Biomedicines.** 2 (4), 275-300, 2014.
- 31) [http://www.med.tohoku.ac.jp/uploads/tohokuuniv-press20110707\(HP\).pdf](http://www.med.tohoku.ac.jp/uploads/tohokuuniv-press20110707(HP).pdf)
- 32) <http://www.kringle-pharma.com/pdf/20111024.pdf>
- 33) <http://www.kringle-pharma.com/pdf/20110708.pdf>
- 34) <http://www.kringle-pharma.com/pdf/20140616.pdf>
- 35) [http://www.hosp.tohoku.ac.jp/wp-content/uploads/2016/05/tohokuuniv-press20160513\\_02\\_tuh.pdf](http://www.hosp.tohoku.ac.jp/wp-content/uploads/2016/05/tohokuuniv-press20160513_02_tuh.pdf)
- 36) [http://www.asahikawa-med.ac.jp/arec/funakoshis\\_laboresearch2.html](http://www.asahikawa-med.ac.jp/arec/funakoshis_laboresearch2.html)