

## 筋萎縮性側索硬化症の病態解明と治療戦略

永井 真貴子, 西山 和利

北里大学医学部神経内科学

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は球麻痺・四肢の筋萎縮と呼吸筋麻痺のため死に至る運動神経変性疾患である。ALSの発症原因は、臨床症状の個人差が大きいことから複数の病因が関与する可能性がある。ALS患者の5~10%は家族歴を伴うが、家族性ALSの原因遺伝子としてsuperoxide dismutase 1 (SOD1) が同定され、これがbreakthroughとなり異常遺伝子を導入した細胞・動物モデルを用いた研究が進んだ。また運動ニューロンに出現する封入体の主要成分としてTAR DNA binding protein of 43kD (TDP-43) が同定され、孤発性ALSの発症機序の解明につながると期待される。治療については多くの治験薬が現在も進行中で、幹細胞を用いた中枢神経系への再生医療の開発が試みられている。

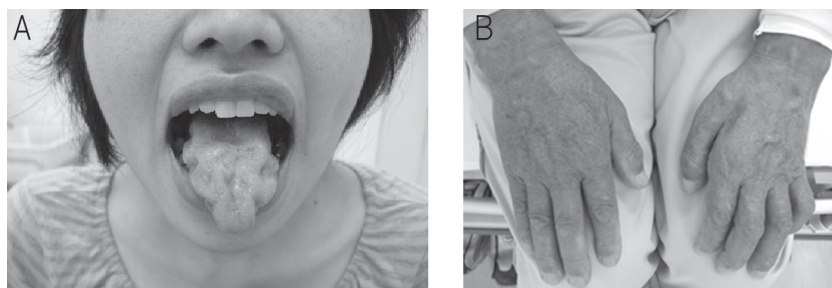
**Key words:** 筋萎縮性側索硬化症, SOD1, モデルマウス, TDP-43, 幹細胞移植

### はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位および下位運動ニューロンの障害により球麻痺、四肢の筋萎縮を来し、嚥下障害あるいは呼吸筋麻痺のため死に至る神経変性疾患である。典型的な経過は、一側上肢あるいは下肢の遠位の筋力低下に始まり、深部腱反射は亢進、経過中に構音・嚥下障害が出現して3~5年の経過で筋萎縮が全身性に進行する (Figure 1) が、ALSの臨床症状は個人差が大きい。経過年数も1年ほどで急速に進行する例から、10年近く呼吸障害が生じない例がある。また、症状が典型的でない症例もしばしば認められ、上位あるいは下位運動ニューロン徴候のどちらかが明らかでない例や、両側上肢近位側の筋萎縮で発症す

る、あるいは体幹の筋萎縮急速に進行し呼吸障害で発症する症例がある。孤発性ALSの発症原因は未だ明らかにされていないが、臨床症状の個人差からは複数の病因が関与している可能性が考えられる。

ALS患者の5~10%は家族歴を伴い、家族性ALSの原因遺伝子の同定からその遺伝子がコードする蛋白質の機能を解析し、あるいは異常遺伝子を導入した細胞・動物モデルを解析することで運動ニューロン障害の原因を突き止めようとする研究が行われてきた。ALSにおいてこれまで同定された遺伝子異常をTable 1にまとめた。また、病理学的には残存する運動ニューロンの細胞質にユビキチン陽性封入体の出現が特徴とされてきたが、2006年にこの封入体の主要構成成分としてTAR DNA-binding protein of 43kD (TDP-43) が同定さ



A. Photograph of the ALS patient with tongue atrophy

B. Photograph of the ALS patient with left interossei dorsales muscle atrophy

**Figure 1.** Muscular atrophy of ALS patients

れ、孤発性ALSの発症機序の解明につながると期待される。

治療についての現状はRiluzoleが唯一延命効果の確認された薬である。ALSモデル動物の研究に基づいて現在も多くの特効薬が試みられている。また、実験動物レベルの研究であるが、幹細胞を用いた中枢神経系への再生医療の開発が試みられている。

## Superoxide dismutase 1 (SOD1) の同定とその後の研究

1993年に家族性ALSの原因遺伝子としてSOD1遺伝子の異常が報告され<sup>1</sup>, 家族性ALSの20%がこの遺伝子の変異により生じることが分かる<sup>2</sup>と、これが大きな手掛かりとなって、分子生物学的手法を用いたALSの研究がさかんに行われるようになった。SOD1遺伝子は約12kbで、5つのexonからなり、153のアミノ酸に翻訳される。SOD1蛋白は、スーパーオキシド( $\cdot O_2^-$ )を過酸化水素と酸素に変える反応( $2 \cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ )を触媒する酵素でフリーラジカルスカベンジャーとして作用する。遺伝子の発見当初は、そのSOD1蛋白の機能から、遺伝子異常によりSOD1蛋白の機能が失われること(loss of function)が運動ニューロン障害の原因と考えられた。しかし、遺伝子変異のほとんどが点変異すなわち「1塩基置換による1アミノ酸の異常」であり(153アミノ酸のうち実に109以上に変異が報告され

ている)、遺伝子変異によって酵素活性は失われない場合が多い。言い換えればSOD1蛋白のどの部位に変異が起こっても(酵素の活性部位でなくても)運動ニューロン障害を起こすことが分かった。このため現在では、新たに遺伝子変異を持ったSOD1蛋白が神経毒性を持つと考えられている(gain of toxic function)。興味深い点は、Figure 2Aに示すように変異毎に経過年数が異なることが知られており、変異SOD1蛋白の構造と何らかの関連があると考えられている。

変異SOD1(G93A, G37R, G85R, H46R)遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス<sup>3,4</sup>がALS様の症状を発症するため、今日までALSモデル動物として原因究明および治療の開発に広く用いられてきた。例えばH46R変異を導入したALSマウスは生後4か月を過ぎると下肢の麻痺を生じ、約1か月の経過で四肢の筋萎縮が進行し死に至る。マウスの脊髄は大変細いため細胞移植実験などの研究を行うのには適さない。このためH46R変異およびG93A変異SOD1を導入したALSラットが開発された<sup>5</sup>。ALSラットは髄腔内への治療薬の投与実験<sup>6</sup>や脊髄への幹細胞移植<sup>7,8</sup>などの研究に使用されている。H46R変異導入ALSラットの症状もマウスと同様に生後4か月を過ぎると下肢の麻痺を生じ、約1か月の経過で四肢の筋萎縮が進行し死に至る(Figure 2B, C)。G93A変異を導入したラットの方が発症は早く、経過も短い傾向があった。病理学的には運動ニューロンが進行性に脱落し、変性した運動ニューロンにはユビキチ

Table 1. Genetics of ALS and ALS-D

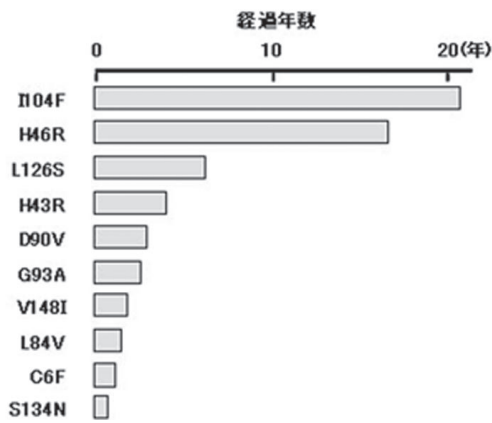
Gene locus	Chromosomal locus	Gene	Inheritance	Dementia
ALS1	21q22	Superoxide dismutase 1 (SOD1)	AD	-
ALS2	2q33	Alsin (ALS2)	AR	-
ALS3	18q21	Unknown	AD	-
ALS4	9q34	Senataxin (SETX)	AD	-
ALS5	15q15-21	Unknown	AR	-
ALS6	16q11.2	Fused in sarcoma/translocated in liposarcoma (FUS/TLS)	AD	-
ALS7	20p13	Unknown	AD	-
ALS8	20q13.3	Vesicle associated membrane protein-associated protein B (VAPB)	AD	-
ALS9	14q11.2	Angiogenin (ANG)	AD	-
ALS10	1p36.2	TAR DNA binding protein (TARDBP)	AD	+
ALS11	6q21	FIG4	AD	-
ALS12	10p13	Optineurin (OPTN)	AR/AD	-
ALS13	12q24.12	Ataxin-2 (ATXN2)	AD	-
ALS14	9p13	Vasolin-containing protein (VCP)	AD	+
ALS15	Xp11.21	Ubiquitin 2 (UBQLN2)	AD	+
ALS16	9p13.3	Sigma nonopioid intracellular receptor 1 (SIGMAR1)	AR	-
ALS17	3p11.2	Chromatin-modifying protein 2B (CHMP2B)	AD	+
	12q24	D-Amino acid oxidase (DAO)	AD	-
	2p13.1	Dynactin 1 (DCTN1)	AD	-
	9p21.2	C9ORF72	AD	+

AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive

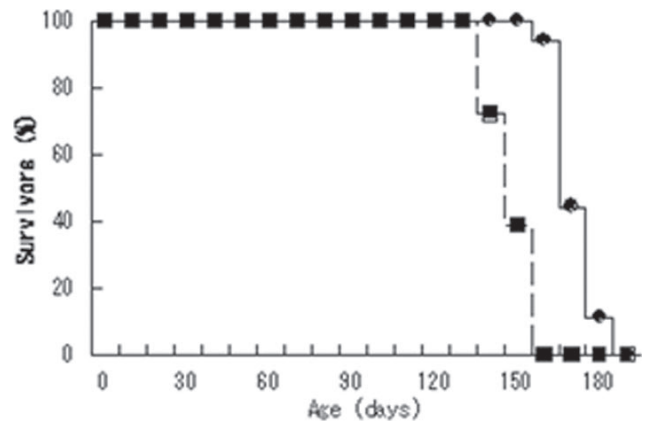
ン陽性封入体が出現し、その周囲にグリアの増生が起こる (Figure 2D)。

ALSモデル動物を用いた研究から運動ニューロン死についていくつかのメカニズムが明らかとなっている。変異SOD1がミトコンドリア膜あるいはミトコンドリア内に蓄積するために傷害されcytochrome cといったアポトーシス因子を放出しアポトーシスを引き起こすというミトコンドリア障害説<sup>10</sup>、変異SOD1タンパクがミスフォールディングを起こして凝集あるいは小胞体

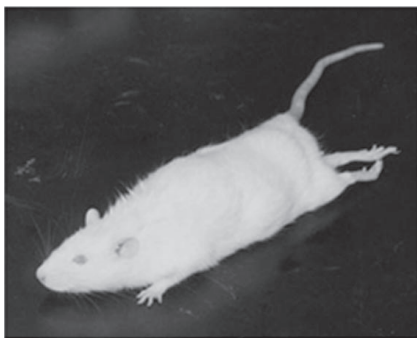
(ER)に蓄積し、ERストレスにより細胞死が起こる<sup>11</sup>、酸化ストレス、軸索輸送障害、oxidative神経の興奮毒性、神経栄養因子の欠如、mutant SOD1の細胞外毒性などである。さらに近年運動ニューロン障害のメカニズムの一つとしてニューロンと周囲のグリア細胞との相互関係が注目を集めている。ALS患者の剖検脊髄において、グリア細胞の増生があることは知られていたが、ALSモデルマウスを用いて、発症前から脊髄病巣の運動ニューロン周囲にグリア細胞の増生が認められ



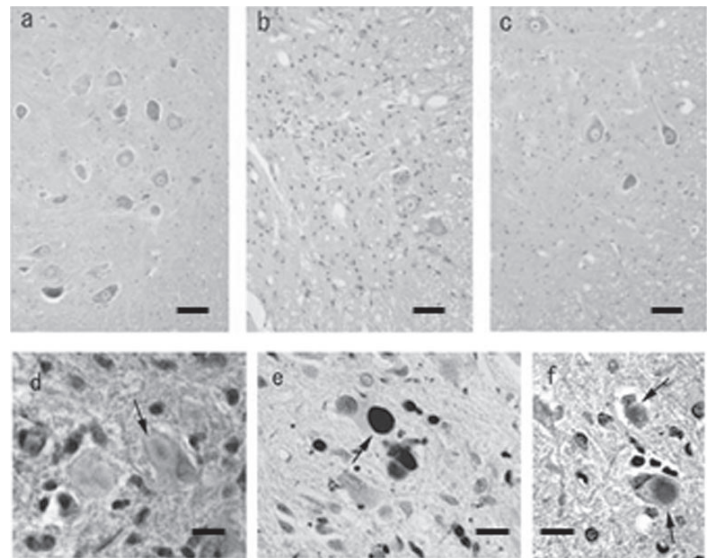
A. Relationship between SOD1 mutation and clinical course



B. Kaplan-Meier curves illustrating the ages of onset (dashed line with black squares) and death (solid line with black dots for the H46R transgenic rat)



C. An affected transgenic rat demonstrates hindlimb weakness and abnormal posturing with segmental spasticity of the tail.



D. Major histopathological findings in the transgenic rats

a-c, Ventral horns of the lumbar spinal cord from a 6-month-old normal littermate (a), a G93A transgenic rat at 4.5 months (b) and an H46R transgenic rat at 6 months (c). Sections were stained with hematoxylin and eosin. d-f, Lewy body-like cytoplasmic inclusions (arrows) in motor neurons (d,e) and astrocytes (f). Sections were stained with hematoxylin and eosin (d), immunostained with anti-ubiquitin antibody (e) and anti-GFAP antibody (f). Scale bars: a-c, 50  $\mu$ m; d-f, 20  $\mu$ m.

Figure 2. SOD1 gain of toxicity and SOD1 transgenic rat



ていることが分かり、脊髄前角のミクログリアが産生するNADPH oxidaseが運動ニューロン傷害に関与していることが示された<sup>12</sup>。また、正常の運動ニューロンと変異SOD1を導入したアストロサイトを持つキメラマウスの研究<sup>13</sup>や変異SOD1の発現をグリア細胞から除去したトランスジェニックマウスの研究<sup>14</sup>から、グリア細胞を正常化することで運動ニューロン死が遅延されることが示された。さらに正常の運動ニューロンを変異SOD1遺伝子発現アストロサイトと共培養することにより運動ニューロン死が引き起こされることを明らかにした (Figure 3)<sup>15</sup>。ALSにおける運動ニューロン死のメカニズムが明らかにされることによって治療へのステップが進むと期待される。

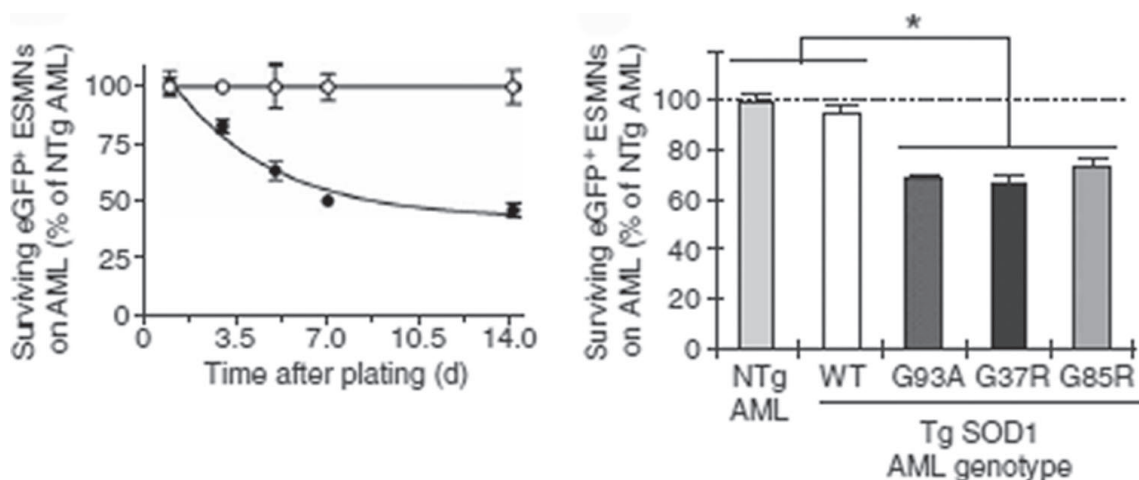
ALSモデル動物は治療の開発研究にも用いられてきた。神経栄養因子など神経保護薬の開発などにおいてもモデル動物は欠かせないものであるが、変異SOD1トランスジェニックマウスの開発以前はALSの適切なモデルがなかったのである。最近東北大学でALS患者に対しhepatocyte growth factor (HGF) の髄腔内投与による治験が開始されたが、これもALSラットにおけるHGF髄腔内投与<sup>6</sup>の研究を経て行われたものである。

SOD1遺伝子以外にもTable 1に示したようにALS原因遺伝子が続々と同定されている。機能が十分に分かっていない遺伝子もあるが、DNA修復・複製、転写、RNAプロセッシングに関与する遺伝子 (SETX<sup>16</sup>, FUS<sup>17</sup>, TDP-43<sup>18</sup>), ER-ゴルジ体輸送 (VAPB<sup>19</sup>)・エンドゾームトランスゴルジ逆行性輸送 (FIG4<sup>20</sup>) など細胞内輸送や軸索輸送 (DCTN1<sup>21</sup>) に関与する遺伝子が同定されており、運動ニューロンの機能異常を考える上で重要である。

## ALSと血管新生因子

神経細胞は非分裂細胞であり、加齢に伴いフリーラジカルによる細胞障害が予想される。生体内での酸素の欠乏が起こると、細胞はvascular endothelial growth factor (VEGF) のプロモータにhypoxia inducible factor (HIF) が結合しVEGF mRNAの合成が誘導され、血流の改善を行い酸素の供給を復活させることが知られているが、このHIF結合部位をノックアウトしたマウスを作製したところ、偶然運動ニューロン障害を呈することが示された<sup>22</sup>。続いてALS患者と健常者との遺伝子の比較を行ったところ、孤発例を含めたALSの多くの症例でVEGFプロモータのHIF結合部位の遺伝子異常は認められなかったが、VEGFのプロモータ領域の遺伝子変異(一塩基変異多型)が認められ、ALSのリスクを高まると報告されている<sup>23</sup>。またALS患者群では血漿中のVEGFのレベルが、コントロール群と比較して50%減少していることも確認された。その後、北欧の家族性および孤発性ALSでangiogenin (ANG) のミスセンス変異が報告された<sup>24</sup>。その後イタリアの大規模な遺伝子検査の結果、数多くの異なったANG遺伝子異常が認められた。ANGはVEGFと同様に虚血の際に誘導されて血管新生を司る因子であり、また*in vitro*では運動ニューロンの生存を促進する神経保護因子としての機能を持つことが示されている。

ALSは加齢に伴い発症リスクが高まる神経疾患の一つで、組織の虚血とALSの発症の関係は興味深い課題の一つである。ALSモデルマウスにおいてVEGFを発現するレンチウイルスベクターを投与すると、寿命が30%延長したという研究成果<sup>25</sup>がありALS患者において治験が試みられている。ALS患者において組換えヒト



A. The decay in numbers of ES cell-derived MN (ESMN) plated on G93A-astrocytes (AML) is greater than that of ESMNs on control-astrocytes (NTgAML).

B. At 7 days after plating, there are consistently fewer ESMNs in G93A, G37R and G85R-astrocytes cocultures than in NTgAML cocultures.

Figure 3. Marked toxicity of mutated SOD1-expressing astrocytes to motor neurons

アデノウイルスによる低酸素誘導因子 (VEGF, ANG) を発現させる神経栄養因子の治験が行われている。方法は、VEGFとANGのcDNAをアデノウイルスベクターに組み込み、このウイルスを患者の筋肉内に注射投与する(僧帽筋、三角筋、大腿四頭筋に4週間おき計2年間投与)。ウイルスは筋肉から神経軸索を經由して逆行性に脊髄運動ニューロンまで到達し、VEGFとANG蛋白が運動ニューロン内で産生されるはずである。組換えアデノウイルス薬の安全性明らかな副作用は無かった。すべての症例でALSは進行したが治療群では肺活量 (VLC) とALS Functional Rating Scale改訂版 (ALSFRS-R) の評価点における悪化の速度が緩やかであった<sup>26</sup>。遺伝子治療ではないが、現在ベルギーで(2008年12月から2010年3月まで) 脳定位固定手術により脳室内にVEGFを持続投与する臨床研究が行われている。

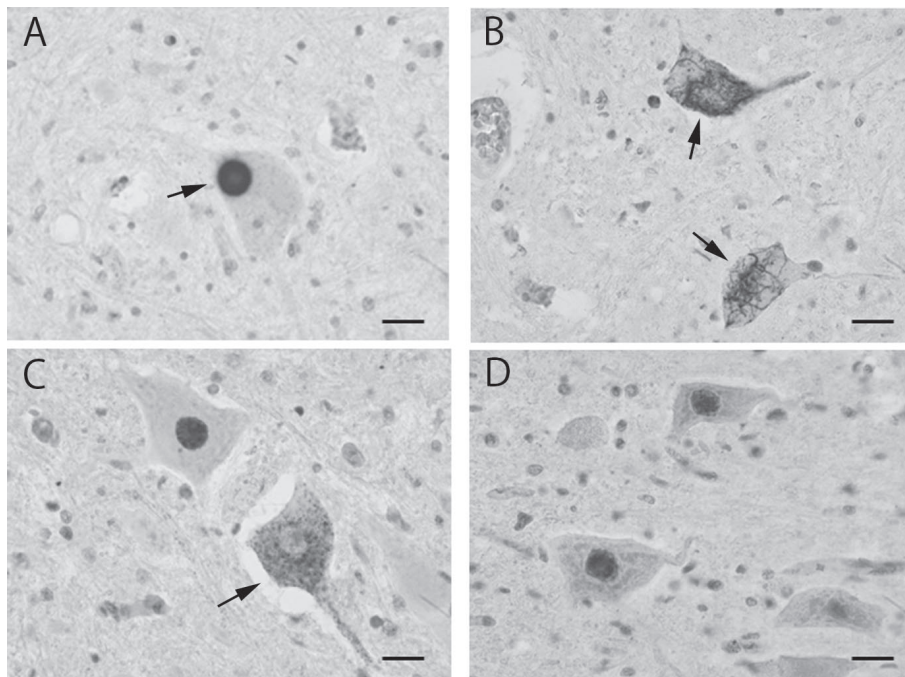
### TAR DNA binding protein of 43kD (TARDBP, TDP-43)

ALS患者は認知症を伴うことは稀であるとされ、認知障害とALSの合併症例はALS with dementia (ALS-D)あるいは三山型と呼ばれてきた<sup>27</sup>。近年の神経心理学的研究では認知症を伴わないALSにおいても前頭葉の機能低下が指摘されており、ALS患者の詳細な検討を行うと効率に認知障害を含む高次機能障害を来すこと

が分かってきた。また、Table 1に示すような認知症を伴う家族性ALSの原因遺伝子では、患者が認知症を来す場合と運動ニューロン障害を来す場合があり、ALSの臨床症状は運動ニューロン障害が顕著ではあるが、病理学的には運動ニューロン特異的ではなく、他の神経細胞においても異常があることが示唆される<sup>28-31</sup>。

2006年、ユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症 (FTLD-U)、ALS-DあるいはALSにおいて認められる封入体の主要成分としてTDP-43が同定された<sup>32,33</sup>。TDP-43は1995年にHIV-1遺伝子の末端反復配列に結合し転写を抑制する因子として同定された遺伝子<sup>34</sup>で、細胞核に局在してpre-mRNAのスプライシング調節やmRNAの輸送に関与している。孤発性ALSの病理では、残存運動ニューロンの細胞質に局在を変え、封入体を形成する(球状のLewy-body-like hyaline inclusion; Figure 4A, 糸くず状のskein-like inclusion; Figure 4B, 細胞質に点状に散在することもある; Figure 4C)。孤発性ALSにおいて発見された新たな手がかりであり(ALSの病理学上のマーカーとしてプニナ小体が有名だが、プニナ小体は構成蛋白の詳細が明らかでない)、その後TDP-43遺伝子の変異が家族性ALSで報告された<sup>18</sup>ため、分子生物学的手法が行使して一気に研究が進んだ。

TDP-43遺伝子は6個のexonからなり、414アミノ酸に翻訳される。RNA認識モチーフを持つ不均一核内リボ



A-C. Motor neurons in ALS spinal cords. A. Lewy-body-like cytoplasmic inclusions (A) and skein-like inclusion (B) were immunostained using anti-TDP-43 antibody. C. In the spinal cord from ALS patients, a morbid cell (TDP-43 localized in cytoplasm) was mixed with a cell normal at a glance (TDP-43 localized in nucleus). D. Control motor neurons. Scale bars: 20  $\mu$ m.

Figure 4. Immunohistochemistry of ALS spinal cords



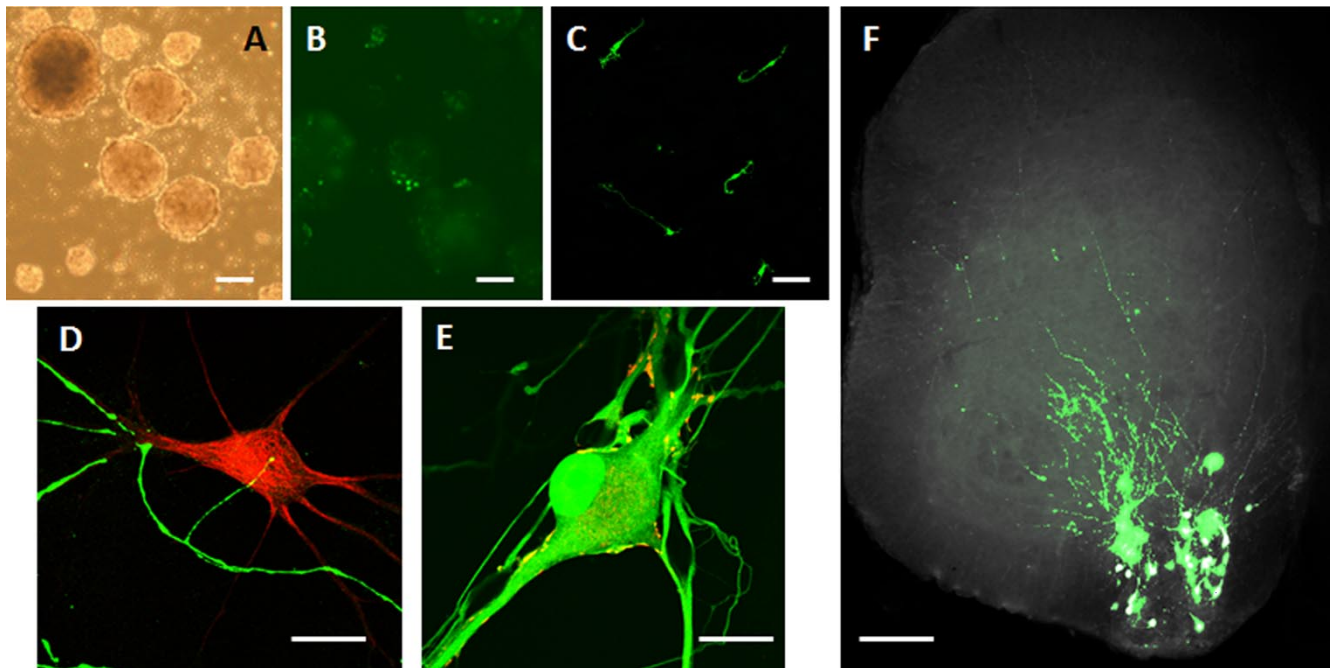
核酸蛋白 (hnRNP) の1種でこのRNA認識モチーフを介してRNAあるいはDNAに結合する。Exon 6はTDP-43のグリシンに富む領域で他のhnRNPと結合する部位と推定されている。家族性ALS (ALS10) の遺伝子変異はほとんどミスセンス変異で変異部位はexon 6に集中している<sup>35</sup>。また核移行シグナル (NLS) を持ち、正常のTDP-43は核に局在するが、ALSでは、細胞質に局在を変えて蓄積し、この細胞質TDP-43はリン酸化、断片化されている (C末端側断片) ことが分かった<sup>36</sup>。細胞実験ではNLSを欠くコンストラクトを発現させるとTDP-43は細胞質に局在して細胞死が誘発され、C末断片コンストラクトを導入するとTDP-43凝集体を形成した<sup>37</sup>。さらにTDP-43導入トランスジェニックマウスがプリオン、Thy-1などの神経特異的プロモータを用いて作製されている。野生型あるいは変異型TDP-43を発現させたトランスジェニックマウスでは発現量依存的に運動障害や生存期間の短縮が示されている<sup>38-40</sup>。CaMKIIプロモータを用いて大脳皮質にTDP-43を発現させたトランスジェニックマウスでは学習障害と進行性の運動障害が認められた<sup>41</sup>。病理学的にはヒトALS患者で認められるTDP-43の異常局在や細胞内封入体はあまり認められないが、タンパクの解析ではTDP-43のC末端断片化が認められている。また、興味深いことにアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた脊髄でのTDP-43過剰発現モデルでは、ラットではTDP-43の細胞内封入体は認めら

れないがカニクイザルではヒトと同じような病理像が認められたと報告されている<sup>42</sup>。

### 幹細胞の発生分化と神経疾患への治療応用

ALSの治療についてはRiluzoleが唯一延命効果を持つ薬として認可されている<sup>43</sup>が症状の改善が期待できる治療は残念ながらない。このため、実験動物レベルの研究であるが、幹細胞を用いた中枢神経系への再生医療の開発が試みられている。

幹細胞は自己複製能を持ち、かつ様々な細胞への分化能を持った細胞と定義される。幹細胞は、胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES細胞) と体性幹細胞、Yamanakaらにより人工的に作製されiPS細胞<sup>44</sup>がある。ES細胞はある培養条件下で未分化な状態を保持しながら半永久的に自己複製ができ、生殖細胞を含むあらゆる種類の細胞に分化できる全能性 (totipotency) を持つ。体性幹細胞は組織特異的な幹細胞で、固有の系列への分化能を持ち、造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、などが知られている。造血幹細胞、骨髄間葉幹細胞においてはその組織を構成する細胞以外 (骨格筋細胞・中枢神経細胞<sup>45</sup>) への細胞への分化、すなわち可塑性 (plasticity) が報告され、臨床応用の面で注目されている。中枢神経系においては、従来、成熟した中枢神経は再生しないと考えられていたが、脳や脊髄の特定



**A, B.** Motor neuron specific marker (green) was expressed in embryoid bodies exposed RA and SHH. **C.** Embryonic stem cell-derived motor neurons (ESMNs) at 1 day after plated on the astrocytes. **D, E.** ESMNs (green) at 14 days after plated on the astrocytes extended long processes and made the synapse formation with other neurons (red). **F.** ESMNs grafted at lumbar level of the rat's spinal cord survived and extended processes. Scale bars: **A-C,** 200  $\mu\text{m}$ ; **D-E,** 20  $\mu\text{m}$ ; **F,** 100  $\mu\text{m}$ .

**Figure 5.** Embryonic stem cell-derived motor neurons

の部位に神経幹細胞が存在することが知られてきた。また、ある種のアストロサイト (multipotent astrocytic stem cell) やオリゴデンドロサイト前駆細胞がある条件下では神経幹細胞となり(脱分化)、ニューロンおよびグリア細胞を生み出すことが分かっている(分化転換)<sup>46,47</sup>。

ES細胞は、浮遊培養すると凝集して初期胚に似た胚様体 (Figure 5A) を形成する。Bainらはこの胚様体にレチノイン酸 (retinoic acid, RA) を作用させると神経系細胞への分化誘導が促進されることを報告した<sup>48</sup>。神経系の発生の段階では様々なシグナルが促進的に、あるいは抑制的に、ニューロンのタイプを決めていることが解明され、これに基づいて*in vitro*でも培地にシグナル因子を添加することでES細胞を特定のタイプのニューロンに分化誘導できるようになってきた。例えば脊髄運動ニューロンの発生は、外胚葉の細胞はニューロンとしての性質を骨形成因子 (BMP), Fibroblast growth factor (FGF), Wntシグナルによって獲得し、この神経前駆細胞がRAなどのシグナルを受けて長軸方向の性質が決定され、腹側にある脊索などから分泌されるソニック・ヘッジホッグ (Sonic hedgehog, SHH) の濃度勾配に伴って前後方向のニューロンの性質が決定し、腹側に運動神経が分化誘導されることが分かっている<sup>49</sup>。2002年、Wichterlらはこの発生過程で必要な因子であるRAとSHHを加えて培養することによりES細胞から運動ニューロンを高率に分化誘導することに成功し、*in vitro*で生体内の脊髄運動ニューロンの発生過程を再現した (Figure 5B, C)<sup>50</sup>。この細胞を培養したアストロサイト上で培養すると、運動神経細胞のマーカであるコリンアセチルトランスフェラーゼを発現し、軸索を伸長し、他のニューロンとシナプスを形成する様子が観察される (Figure 5D, E)。この運動ニューロンに分化誘導された細胞をラット脊髄前角に移植すると脊髄に生着し軸索をのばす様子が観察される (Figure 5F)。運動ニューロンが機能するためには、運動ニューロンが脊髄に生着しシナプスを形成するだけでなく、軸索を伸長させ目的の筋と回路を形成する必要があるし、また周囲のニューロンとのネットワーク再構築も必要となる。

ALSは治療法が確立していない難病であるため再生医療には大きな期待が寄せられている。このため再生治療は安全性など検討すべき課題を抱えているものの、急速にトライアルが進められている印象がある。ALSにおける実験動物への外来細胞の移植の研究は、ヒト奇形腫の細胞株である (NTera2/D1) をALSのモデルマウス脊髄に移植し、発症遅延と生存延長をみた報告がある<sup>51</sup>。またSindbisウィルスで脊髄運動ニューロンを傷害したラットにES細胞から作製した胚様体を

移植したところラットの後肢麻痺が改善し<sup>52</sup>、さらに分化誘導した運動ニューロンを移植したところ、細胞は生着し前根内に軸索を伸ばしたことが報告された<sup>53</sup>。神経幹細胞を正常あるいは外傷モデル、ALSモデルラットの脊髄へ移植するとホストの運動ニューロンとシナプスと形成したと報告されている<sup>8,54</sup>。中国などで幹細胞をALS患者の脳脊髄液へ注入投与されている他、現在アメリカ合衆国でALS患者の脊髄に直接神経幹細胞を移植するPhase I研究が進行中である。(i) 移植された運動ニューロンが脊髄への生着するのか、(ii) ホスト運動ニューロンの神経回路が再構築されるのか、(iii) ホスト神経細胞に対する保護効果があるのかについて検討される予定である。

## まとめ

ALSの病態解明はSOD1遺伝子の発見から家族性ALSの遺伝子の研究を中心に行われてきた。DNA複製から蛋白の合成・輸送、蛋白分解、あるいはエネルギー産生に関わるミトコンドリア・血管新生因子と言った多くの因子が運動ニューロンの変性に関わっていることが明らかになり、運動ニューロン障害の機序の解明が進んだ。しかしALSの90%以上は孤発性であり、治療を考える上では孤発性ALSの研究が今後はさらに追求されることが必要である。その点ではTDP-43の発見は大きな転機であり原因究明から治療法の開発につながるものと予想される。また、加齢に伴い発症リスクが高まる神経変性疾患として酸化ストレス、組織の虚血や環境要因などの研究も同時に勧められるべきであるし、また本稿では触れなかったが運動ニューロン障害に対するグルタミン毒性<sup>55-57</sup>など孤発性ALSで指摘されている要因についても今後さらに研究の進展が期待される。

再生医療については、従来再生しないと考えられていた中枢神経系に神経幹細胞が存在することが分かり、またこれを分離培養してニューロンを分化誘導できるようになった。また幹細胞 (ES細胞, iPS細胞) を維持培養し、ニューロンを分化誘導できるようになり、さらに骨髄細胞などから分化転換によりニューロンが誘導される可能性も示されている。しかし、ヒトへの応用を考えた場合、培養で誘導されたニューロンが組織のニューロンと同等の機能を果たし、組織内でネットワークを作るには至っておらず、また長期的に移植細胞が癌化する可能性や、移植細胞がもたらす免疫学的反応について検討する必要がある。現時点では安全性や有効性の検討を十分行われないうまま、臨床応用が加速している懸念があり、注意を要する。

## 文 献

1. 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.
2. Cleveland DW. From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron* 1999; 24: 515-20.
3. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994; 264: 1772-5.
4. Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, et al. Transgenic mice expressing an H46R mutant of human Cu/Zn superoxide dismutase. Molecular mechanism and therapeutics of amyotrophic lateral sclerosis. Ed by Abe K. Elsevier; Amsterdam: 2001; 273-9.
5. 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: 9246-54.
6. Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, et al. Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor from amyotrophic lateral sclerosis onset suppresses disease progression in rat amyotrophic lateral sclerosis model. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 1037-44.
7. Lopez-Gonzalez R, Kunckles P, Velasco I. Transient recovery in a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of motor neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2009; 18: 1171-81.
8. Xu L, Ryugo DK, Pongstaporn T, et al. Human neural stem cell grafts in the spinal cord of SOD1 transgenic rats: differentiation and structural integration into the segmental motor circuitry. *J Comp Neurol* 2009; 514: 297-309.
9. Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1046-57.
10. Shi P, Gal J, Kwinter DM, et al. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Acta* 2010; 1802: 45-51.
11. Kikuchi H, Almer G, Nagai M, et al. Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 6025-30.
12. Wu DC, Re DB, Nagai M, et al. The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12132-7.
13. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003; 302:113-7.
14. Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, et al. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2008; 11: 251-3.
15. Nagai M, Re DB, Nagata T, et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 2007; 10: 615-22.
16. Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1128-35.
17. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009; 323:1205-8.
18. Sreedharan J, Blaiv IP, Tripathi VB, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008; 319: 1668-72.
19. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 822-31.
20. Chow CY, Landers JE, Bergren SK, et al. Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 85-8.
21. LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, et al. Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 2002; 34: 715-27.
22. Oosthuysen B, MoonsL, Storkebaum E, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001; 28: 131-8.
23. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003; 34: 383-94.
24. Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, et al. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2006; 38: 411-3.
25. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 2004; 429: 413-7.
26. Zavalishin IA, Bochkov NP, Suslina ZA, et al. Gene therapy of amyotrophic lateral sclerosis. *Bull Exp Biol Med* 2008; 145: 483-6.
27. Mitsuyama Y. Presenile dementia with motor neuron disease. *Dementia* 1993; 4: 137-42.
28. Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 2010; 68: 857-64.
29. Parkinson N, Ince PG, Smith MO, et al. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 2006; 67: 1074-7.
30. Renton AE, Majounie E, Waite A, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72: 257-68.
31. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72: 245-56.
32. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 602-11.
33. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130-3.
34. Ou SH, Wu F, HarrichD, et al. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol* 1995; 69: 3584-96.
35. Pesiridis GS, LeeVM, Trojanowski JQ. Mutations in TDP-43 link glycine-rich domain functions to amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 2009; 18: R156-62.
36. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008; 64: 60-70.
37. Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, et al. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J Cell Sci* 2008; 121: 3778-85.



38. Stallings NR, Puttapparthi K, Luther CM, et al. Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiol Dis* 2010; 40: 404-14.
39. Shan X, Chiang PM, Price DL, et al. Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 16325-30.
40. Wils H, Kleinberger G, Janssens J, et al. TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 3858-63.
41. Tsai KJ, Yang CH, Fang YH, et al. Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTLN-U. *J Exp Med* 2010; 207: 1661-73.
42. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, et al. Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* 2012; 135: 833-46.
43. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 1994; 330: 585-91.
44. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
45. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-9.
46. Doetsch F, Caille I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999; 97: 703-16.
47. Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 2000; 289: 1754-7.
48. Bain G, Kitchens D, Yao M et al. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995; 168 : 342-57.
49. Briscoe J, Ericson J. Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11 (1):43-9.
50. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002; 110: 385-97.
51. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Milliken M, et al. Positive effect of transplantation of hNT neurons (NTERA 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2002; 174: 169-80.
52. Kerr DA, Llado J, Shablott MJ, et al. Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J Neurosci* 2003; 23: 5131-40.
53. Harper JM, Krishnan C, Darman JS, et al. Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 7123-8.
54. Yan J, Xu L, Welsh AM, et al. Extensive neuronal differentiation of human neural stem cell grafts in adult rat spinal cord. *PLoS Med* 2007; 4: e39.
55. Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1990; 28: 18-25.
56. Lin CL, Bristol LA, Jin L, et al. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 1998; 20: 589-602.
57. Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 2004; 427: 801.

## The pathogenesis of ALS and stem cell therapy

Makiko Nagai, Kazutoshi Nishiyama

Department of Neurology, Kitasato University School of Medicine

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by upper and lower motor neuron dysfunction resulting in rapidly progressive paralysis and death from respiratory failure. 5-10% of cases are familial, and superoxide dismutase 1 (SOD1) was the first identified causative gene of ALS. To identify the mutant SOD1 gain of function, models have been created in rodents and have led to the identification of ALS-causing mechanisms, including mitochondrial dysfunction, protein misfolding, oxidative damage, axonal transport impairment, neurotrophic factor deficiency, and altered glial cell function. The effects of oxidative stress within non-dividing cells such as neurons may be cumulative, and cellular injury by free radical species is a potential cause of the age-related deterioration in ALS. Chronic ischemia due to insufficient vascular endothelial growth factor (VEGF) may put motor neurons at risk of late-onset neurodegeneration. TAR DNA binding protein of 43kD (TDP-43) was found to be a major component of ubiquitin-positive inclusions in the neurons in sporadic ALS. TDP-43 is recognized as a key protein to understand the neuronal death. Effective treatments are urgently needed for ALS. Stem cell technologies represent a promising approach for treating ALS and the first phase I safety trial of direct intraspinal transplantation of neural stem cells into ALS patients is currently in progress in USA.

**Key words:** ALS, SOD1, transgenic mouse, TDP-43, stem cell therapy