

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文名：逆行性軸索輸送を用いた Bcl-2 発現による ALS

モデルマウスの運動神経変性に対する治療効果

(Effect on motor neuron survival in mutant SOD1
transgenic mice by Bcl-2 expression using
retrograde axonal transport of adenoviral vectors)

著者名： 山下 賢

Satoshi Yamashita

指導教官名：神経内科学教授

内野 誠

審査委員名：小児発達学担当教授

三池 輝久

小児科学担当教授

遠藤 文夫

分子遺伝学担当教授

森 正敬

臓器形成学担当教授

山村 研一

2003 年 3 月

目 次

1. 要 旨	1
2. 発表論文リスト	4
3. 謝辞	5
4. 略語一覧	6
5. 研究の背景と目的	7
5-(1) 筋萎縮性側索硬化症と Cu/Zn superoxide dismutase の変異	7
5-(2) 変異 SOD1 による運動ニューロン変性の機序	8
5-(3) 現行の筋萎縮性側索硬化症の治療と治療の流れ	10
5-(4) 遺伝子治療の歴史的背景	11
5-(5) アデノウイルスベクター	13
5-(6) 中枢神経疾患の遺伝子治療とアデノウイルスベクターの逆行性軸索輸 送	14
5-(7) 本研究の目的	15
6. 実験方法	16
6-(1) Adv の作製	16
6-(2) 培養細胞	16
6-(3) COS7 細胞と初代神経細胞への遺伝子導入	17
6-(4) ウェスタンブロット法による Bcl-2 および cre 検出	17
6-(5) マウス舌筋への Adv の注入と切片の作製	18
6-(6) 免疫組織科学および免疫蛍光染色	18
6-(7) 組織切片における Bcl-2 DNA 断片の検出	19
6-(8) 組織切片における in situ hybridization による LacZ mRNA の検出	19
6-(9) β -gal 陽性ニューロンの定量的評価	20
6-(10) 初代神経細胞の生存性評価	20
6-(11) ヒト Bcl-2 による G93A マウス治療効果	21
6-(12) 免疫組織化学による評価	21
6-(13) 各マウスの残存運動ニューロンの定量的評価	21
7. 実験結果	23
7-(1) 舌下神経核における β -gal 活性および LacZ mRNA の検出	23

7-(2)	AdLacZ 由来の LacZ 遺伝子発現の時間的経過.....	24
7-(3)	AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 感染による COS7 および初代神経細胞における Bcl-2 の過剰発現.....	24
7-(4)	Bcl-2 過剰発現による staurosporine 誘導アポトーシスに対する変異 SOD1 陽性神経細胞防御効果	25
7-(5)	変異 SOD1 マウスの舌筋および舌下神経核における Bcl-2 遺伝子発現	26
7-(6)	変異 SOD1 マウスの舌下神経核における Bcl-2 遺伝子発現の時間的経過.....	26
7-(7)	Bcl-2 遺伝子発現による変異 SOD1 マウスの舌下神経核の運動ニューロン変性に対する防御効果	27
8.	考察.....	29
9.	結語.....	33
10.	図表およびその説明	34
図 1	ヒト正常 SOD1 のアミノ酸配列とドメイン, モチーフおよびアミノ酸変異部位.	34
図 2	SOD1 の構造.	35
図 3	変異 SOD1 による運動ニューロン死の機序仮説.	36
表 1	ALS 治療進歩の現状.	37
図 4.	脳幹部組織化学および <i>in situ</i> hybridization.....	38
図 5.	脳幹部舌下神経核の β -gal 陽性細胞の時間的経過.	40
図 6.	Bcl-2 分子スイッチを含む Adv (AxCALNLBcl-2) と cre recombinase を発現する Adv (AxCANCre) の構造, および cre-loxP システムによる外来性 Bcl-2 の活性化方法.	41
図 7.	COS7 細胞での Bcl-2 発現	42
図 8.	初代神経細胞における Bcl-2 の免疫蛍光染色.	44
図 9.	Bcl-2 発現初代神経細胞の抗アポトーシス効果.....	45
図 10.	変異 SOD1 マウスの舌筋および舌下神経核における Bcl-2 遺伝子発現.	47
図 11.	舌筋および脳幹部での cre-loxP 組み換え後の 290-bp の Bcl-2 DNA フラグメントの検出.	48
図 12.	変異 SOD1 マウスの舌下神経核における Bcl-2 遺伝子発現の経時変	

化.....	49
図 13. 脳幹部での cre-loxP 組み換え後の 290-bp の Bcl-2 DNA フラグメントの検出.	51
図 14. 25 週齢のそれぞれのグループのマウスの延髄舌下神経核の代表的顕微鏡所見.	52
図 15. 25 週齢の各群のマウスの延髄舌下神経核の神経数の定量的比較. .	53
11. 参考文献.....	54

1. 要 旨

LacZ 遺伝子を有する複製能力欠損アデノウイルスベクター(AdLacZ)と Bcl-2 遺伝子を発現するアデノウイルスベクターが逆行性軸索輸送により, 93 グリシンがアラニンに置換した変異ヒト Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1)トランスジェニックマウス (G93A マウス) の運動ニューロンに遺伝子発現することを発見した. 種々の週齢の G93A マウスと正常対照マウスの舌筋内に AdLacZ を注入すると, 舌下神経核において高度に遺伝子発現し, 発現遺伝子の時間的経過は両マウスともほぼ同様であり, 遺伝子発現の挙動・消長に差異を認めなかった. 続いて, アデノウイルスベクターを用いた cre-loxP 組み換えによりヒト Bcl-2 を発現する分子スイッチを利用して, COS7 細胞と変異 SOD1 遺伝子を有する初代神経細胞での遺伝子発現を検討した. Bcl-2 の発現カセットを有するアデノウイルスベクター (AxCALNLBcl-2) と, cre recombinase を発現するアデノウイルスベクター (AxCANCre) を共感染させると, 両細胞において Bcl-2 の過剰発現がみられ, staurosporine によって誘導されたアポトーシスから神経細胞が防御された. G93A マウスと正常対照マウスの舌筋内に AxCALNLBcl-2 に続いて AxCANCre を注入すると, Bcl-2 は注入部位である舌筋線維とともに脳幹部の舌下神経核にも検出され, AxCALNLBcl-2 と AxCANCre が逆行性に輸送され, 舌下神経核において cre recombinase により Bcl-2 が発現したことが示された. そこでこのシステムを用いて, G93A マウスの運動ニューロン変性におよぼす外来性 Bcl-2 の効果について検討した. 10 週齢の G93A マウスの舌筋内に AxCALNLBcl-2 に続いて AxCANCre を注入すると, Bcl-2 は G93A マウスの舌下神経核に少なくとも注入 8 週間まで検出された. さらに G93A マウスが症候を呈する, 25 週齢時の各マウスの舌下神経核における運動ニューロンの形態学的変化について観察した. 両ベクターを注入した G93A マウスの運動ニューロンの数は, AxCALNLBcl-2 のみを注入したマウスや未注入マウスと比較すると, 有意に残存していた. さらに両ベクターを注入した G93A マウスの舌下神経核では, 空胞変性や反応性アストロサイトの増生も明らかに減弱していた. これらのシステムによって導入されたヒト Bcl-2 の発現は, G93A マウスの運動ニューロン変性に対して, 防御的效果を有することが示された.

Summary

We investigated genes expression by retrograde axonal transport of replication-defective adenoviruses carrying genes for LacZ (AdLacZ) and Bcl-2 in motor neurons of transgenic mice expressing mutant human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) gene containing a substitution of alanine for glycine at position 93(G93A mice). We found that intramuscular injection of AdLacZ into the tongue of G93A mice and their wild-type littermates at various ages results in high expression of the transgene and similar time course of expression in hypoglossal cranial nerve nuclei, suggesting no difference in the behavior of the transgene expression between the two groups. Subsequently, we employed a molecular switching cassette for Bcl-2 designed to express Bcl-2 by cre-loxP recombination using adenoviral vectors, and examined in COS7 cells and primary neuronal cells with the mutant SOD1 gene. The overexpression of Bcl-2 in both cells and the neuronal protection against staurosporine-induced apoptosis were observed, after dual infection of adenoviral vectors with cassette for Bcl-2 (AxCALNLBcl-2) and cre recombinase (AxCANCre). After inoculation of AxCALNLBcl-2 followed by AxCANCre into the tongue of both G93A mice and wild-type littermates, Bcl-2 was detected in both the injection site and the hypoglossal nuclei of brainstems, suggesting the result of retrograde transport of AxCALNLBcl-2 and AxCANCre and expression of Bcl-2 by cre recombinase in the hypoglossal nuclei. Next, we investigated the effect of exogenous Bcl-2 on motor neurons in G93A mice, using AxCALNLBcl-2 and AxCANCre. Bcl-2 had been detected in the hypoglossal nuclei of G93A mice for at least 8 weeks after inoculation with AxCANCre following AxCALNLBcl-2 into the tongue of 10-week-old G93A mice. We examined the morphological changes of motor neurons in the hypoglossal nuclei of each mouse at 25 weeks of ages, at which time the G93A mice manifested signs. We found that the number of motor neurons was significantly higher in the G93A mice with both vectors than in those with AxCALNLBcl-2 alone or without inoculation.

Further, we observed obvious reduction of vacuole formations and reactive astrocytes in and around the hypoglossal nuclei of G93A mice with both vectors. These results suggest that expression of Bcl-2 introduced by our system has a protective effect on degeneration of motor neurons in G93A mice.

Keywords: adenovirus; cre-loxP recombination; Bcl-2; retrograde transport; mutant SOD1 transgenic mouse; protective effect on motor neurons

2. 発表論文リスト

1. Satoshi Yamashita, Shuji Mita, Toshiyuki Arima, Yasushi Maeda, En Kimura, Yasuto Nishida, Tatsufumi Murakami, Haruo Okado, and Makoto Uchino. Bcl-2 expression by retrograde transport of adenoviral vectors with Cre-loxP recombination system in motor neurons of mutant SOD1 transgenic mice. *Gene Therapy* 8, 977-986, 2001.
2. Satoshi Yamashita, Shuji Mita, Shinsuke Kato, Haruo Okado, Eisaku Ohama, and Makoto Uchino. Effect on motor neuron survival in mutant SOD1 (G93A) transgenic mice by Bcl-2 expression using retrograde axonal transport of adenoviral vectors. *Neuroscience Letters* 328,289-293, 2002.
3. En Kimura, Yasushi Maeda, Toshiyuki Arima, Yasuto Nishida, Satoshi Yamashita, Akio Hara, Eiichiro Uyama, Shuji Mita, and Makoto Uchino. Efficient repetitive gene delivery to skeletal muscle using recombinant adenovirus vector containing the Coxsackievirus and adenovirus receptor cDNA. *Gene Therapy* 8, 20-27, 2001.
4. Yasuto Nishida, Yasushi Maeda, Akio Hara, Toshiyuki Arima, En Kimura, Satoshi Yamashita, Eiichiro Uyama, Shuji Mita, and Makoto Uchino. Adenovirus-Mediated Murine Interferon- γ Receptor Transfer Enhances the Efficacy of IFN- γ in Vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 1042-1047, 2002.

3. 謝辞

本研究を行うにあたり、素晴らしい研究環境を整えていただき、かつ終始あたたかく全般的に御指導下さいました熊本大学大学院医学研究科神経内科学・内野誠教授に深く感謝を申し上げます。

また生命科学に対する姿勢から基本的な技術面に至るまで、全ての面で常にご指導いただきました熊本大学医学部附属病院神経内科・箕田修治講師（現国立療養所再春荘病院・内科医長）に深謝いたします。

日夜ご協力いただき、励まして下さいました熊本大学附属病院神経内科・前田寧先生、木村円先生、有馬寿之先生、西田泰斗先生、内田友二大学院生に心から感謝いたします。

本研究にあたりご高配いただき、かつ有益なご助言を下さいました熊本大学医学部附属病院神経内科・宇山英一郎博士、村上龍文博士（現川崎医科大学神経内科・助教授）、および同研究室の皆様にご深く感謝いたします。

本研究は実験動物の尊い生命の犠牲の賜物であります。

平成 14 年 12 月

山下 賢

4. 略語一覽

SOD1; Cu/Zn superoxide dismutase

ALS ; amyotrophic lateral sclerosis

SALS ; sporadic ALS

FALS ; familial ALS

NF ; neurofilament

EAAT2 ; excitatory amino acid transporter 2

ONOO⁻ ; peroxynitrite

CCS ; copper chaperone for SOD1

BDNF ; brain-derived neurotrophic factor

CNTF ; ciliary neurotrophic factor

Adv; adenovirus vector

DMEM; Dulbecco's modified essential medium

HBSS ; Hank's balanced salt solution

HEK-293; Human Embryonic Kidney-293 cell

HVJ-liposome; Hemagglutinating virus of Japan - liposome

NGS; normal goat serum

PBS; phosphate-buffer saline

PFA ; paraformaldehyde

pfu; plaque forming unit

MOI ; multiplicities of infection

X-gal; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside

STS ; staurosporine

5. 研究の背景と目的

5-(1) 筋萎縮性側索硬化症と Cu/Zn superoxide dismutase の変異

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は大脳運動皮質錐体細胞から脊髄に至る上位運動ニューロンおよび脊髄前角細胞から筋に至る下位運動ニューロンが選択的に障害される進行性神経変性疾患である。有病率は 10 万人につき 2~7 人とされている。1869 年に Charcot が ALS の疾患概念を確立して以来、神経生理学および病理学的手法を中心に研究が進められてきたが、その発症機構は明確でなく、治療法も確立されていなかった。

ALS 患者の 90-95% は孤発性 (SALS) であるが、5-10% の患者は家族性 ALS (FALS) と考えられている。近年の分子遺伝学の進歩により、家族性 ALS 遺伝子座が次々と明らかにされ、現在では優性遺伝形式をとる 3 種類の ALS (Rosen *et al.*, 1993; Chance *et al.*, 1998)、および劣性遺伝形式をとる 2 種類の ALS (Hentati *et al.*, 1998; Hadano *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001) の遺伝子座が決定されている。さらに、neurofilament (NF) 遺伝子 (Al-Chalabi *et al.*, 1999) あるいは glutamate transporter (EAAT2) 遺伝子 (Lin *et al.*, 1998) の異常が ALS に関与していることも明らかにされつつある。これらのことは、ALS の発症には多様な因子が関与して決定されていることを示唆している。

1993 年、Rosen らによって常染色体優性遺伝形式をとる家族性 ALS の原因遺伝子の一つとして Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) の突然変異が発見された (Rosen *et al.*, 1993)。さらに、トランスジェニックマウスの作製技術の進歩にともなって、1994 年 Gurney らが変異ヒト SOD1 遺伝子のトランスジェニックマウスの作製に成功し、そのマウスは ALS の表現型をとることから、臨床と直結した ALS のモデルマウスが確立された (Gurney *et al.*, 1994)。

変異ヒト SOD1 トランスジェニックマウスの病理所見は変異型によって異なるが、前角細胞の減少と前根萎縮、残存運動ニューロン軸索内の抗ヒト SOD1 抗体、抗ユビキチン抗体陽性の封入体、ミトコンドリアや小胞体の空胞変性などが共通してみられる (Dal Canto and Gurney, 1994)。また前角細胞以外にも脳幹運動核、前索、側索、さらに後索にも変性がみられる。Gly93Ala の変異を有する SOD1 トランスジェニックマウス (G93A マウス) の初発症状は、生後 4-6 ヶ月に、後肢の活動時振戦と筋力低下で、次第に筋萎縮が著明となってくる。後肢は安静時に屈曲位を示すが、動作開始に際して伸展位をとるため、

引きずり足歩行となる。発症後数週間で一肢ないし複数肢が完全麻痺に陥り、さらに進行すると摂食や飲水が不能となる。これらの臨床症状は導入遺伝子のコピー数に依存して重症化し、発症時期が早まり進行速度が増す結果、生存期間も短縮する、と報告されている(Dal Canto and Gurney, 1994)。

5-(2) 変異 SOD1 による運動ニューロン変性の機序

SOD1 は全身の細胞の細胞質にびまん性に発現する酵素であり、 O_2^- を過酸化水素と酸素に変換する反応を触媒する。ALS 患者において、これまでに弧発例も含めて 80 を超える変異型の報告があり (図 1), そのほとんどは点突然変異によるアミノ酸置換であるが、フレームシフトや 2 塩基欠失による異常蛋白生成がみられる家系もある。以前は SOD1 の機能不全により活性酸素が蓄積することによって運動ニューロンが傷害されると考えられていたが、ALS 様の表現型をとる変異ヒト SOD1 トランスジェニックマウスでは SOD1 活性が高いこと(Gurney *et al.*, 1994), 変異 SOD1 を有する患者で活性が保持されているタイプが存在すること(Radunovic and Leigh, 1996), また SOD1 のノックアウトマウスでは症状を呈さないこと(Reaume *et al.*, 1996)から、SOD1 の loss of function 仮説は否定されている。むしろ最近では、変異 SOD1 タンパクが何らかの毒性を獲得することによって運動ニューロン死が起こるという gain of function 仮説が支持されている。変異 SOD1 に伴う家族性 ALS は、ALS 全体の数%に過ぎないが、そのトランスジェニックマウスがヒト ALS と類似の症状や病理変化を呈することから、変異 SOD1 に伴う家族性 ALS の病態解明および治療法開発は弧発性 ALS の病態・治療研究にも応用されると考えられる。

SOD1 はホモ 2 量体であり、単体では 8 本の β 鎖と 3 つのループからなる β -barrel 構造を構成している (図 2)。活性中心には、 Cu^{2+} と Zn^{2+} がヒスチジン残基と配位結合している。疎水性アミノ酸は立体構造の内部に埋め込まれており、正常では高い親水性を有する。主なモチーフとしては、 β シート、ループ、金属配位部位、2 量体形成部位などがあるが、これまでに報告されている変異はいずれの領域にもみられることから、変異部位のみから運動ニューロン変性のメカニズムを説明するのは困難である。これまで提唱されている変異 SOD1 による運動ニューロン死の機序 (図 3) としては、アポトーシス仮説、活性酸素仮説、銅毒性仮説、グルタミン酸仮説、軸索輸送障害説、異常封入体・凝集体説、ミトコンドリア機能異常説などがあげられるが、いずれも決定的な

ものではない。

①アポトーシス仮説：変異 SOD1 トランスジェニックマウスの運動ニューロン死にアポトーシスが関与しており，発症前にカスパー 1，発症前後にカスパー 3 が活性化されることが報告されている(Li *et al.*, 2000). また SOD1 活性を欠損させた酵母に変異 SOD1 を発現させると，酵素活性は正常で表現型も野生型に回復したのに対して，同様の処理をした哺乳類神経細胞では，野生型はアポトーシスを阻害したが，変異型ではアポトーシスを促進した(Rabizadeh *et al.*, 1995). 変異 SOD1 を発現させると，培養脊髄運動神経細胞の細胞質には TUNEL 法でアポトーシスを示す異常凝集物が観察されたが，脊髄後根神経節や海馬の培養神経細胞には観察されなかった(Durham *et al.*, 1997), などの実験結果より，アポトーシスがとくに運動ニューロン死の下流において関与している可能性が考えられている。

②活性酸素仮説： O_2^- は一酸化窒素(NO)に対する結合能が強く，強力な神経毒である peroxynitrite(ONOO⁻)を形成する可能性がある。ONOO⁻は，SOD1 の活性部位で Cu と反応し，nitronium-like intermediate($NO_2^+-OCuSOD$)を形成し，これはタンパク質をチロシン残基上でニトロ化することによってチロシンのリン酸化を阻害する。チロシンのリン酸化は細胞周期やホルモン反応のシグナルを調節するので，この調節機構が障害されると細胞死に至る。実際，ALS 患者の下位運動ニューロンでは，ニトロチロシンの免疫反応が増加しており(Abe *et al.*, 1995), ONOO⁻を介したチロシン残基のニトロ化が ALS の病因に関与すると推定されている。また G93A マウスの脊髄と大脳皮質において，ONOO⁻を介したニトロ化のマーカーである 3- nitrotyrosine が増加していることが報告されている(Ferrante *et al.*, 1997)。

③銅毒性仮説：変異 SOD1 は活性中心の Cu の配位結合が不安定なため，細胞質中に遊離された Cu が， H_2O_2 から hydroxyl radical を産生する Fenton 反応を触媒することによって，free radical の産生が増強すると考えられている。1998 年に SOD1 の活性中心に Cu を運ぶシャペロンとして copper chaperone for SOD1 (CCS)がクローニングされ(Casareno *et al.*, 1998), SOD1 の活性中心への Cu の輸送を阻害することによって変異 SOD1 の毒性を抑制できるのではないかという仮説に基づいて，CCS ノックアウトマウスと変異 SOD1 トランスジェニックマウスの交配実験がなされたが，症状の有意な改善は得られなかった(Subramaniam *et al.*, 2002)。

④グルタミン酸仮説：Gly85Arg の変異を有する SOD1 トランスジェニックマウス (G85R マウス) は、低レベルの発現でも生後 8 ヶ月頃に急激に進行する ALS 様症状を発症するが、SOD1 抗体とユビキチンで染色されるグリア細胞内封入体を認め、その脊髄ではグルタミン酸トランスポーターである EAAT2 の発現が低下していた(Bruijn *et al.*, 1997). G93A マウスでは、グルタミン酸放出抑制薬であるリルゾールが有効であった(Gurney *et al.*, 1996; Gurney *et al.*, 1998).

⑤軸索輸送障害説：ALS 患者の運動ニューロン軸索では NF を含む軸索腫大がみられ、変異 SOD1 トランスジェニックマウスでは、発症前から遅い軸索輸送(Williamson and Cleveland, 1999)および早い軸索輸送(Warita *et al.*, 1999)が障害されているとの報告がある。しかし、変異 SOD1 によって軸索輸送が障害される機序については明らかではない。

⑥異常封入体・凝集体説：変異 SOD1 タンパク質はユビキチン-プロテアソーム系によって分解されると考えられているが、変異 SOD1 遺伝子を導入した細胞にプロテアソーム阻害薬を付加すると、核周囲にアグレスーム (aggresome)と呼ばれる凝集体が形成され、ヒト SOD1 抗体によって免疫染色される(Johnston *et al.*, 2000). この凝集体中には高分子のタンパク質が取り込まれていると報告されており、これらが運動ニューロンに蓄積することによって変性を生じるという仮説が提唱されている。

5-(3) 現行の筋萎縮性側索硬化症の治療と治療の流れ (表 1)

既述のように ALS の原因は、一部の家族性 ALS を除き、そのほとんどがまだ分かっていない。そのため ALS 患者に対する治療薬は皆無といってよい状況であったが、ALS における運動ニューロンの変性、死滅の機序にグルタミン酸塩の異常機能亢進が関与しているという原因仮説に基づいて、グルタミン酸放出抑制薬であるリルゾールが登場した。ALS におけるリルゾールの効果は、2つの臨床試験によって延命効果のあることが示され(Bensimon *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1996), 薬剤投与の初期 (6-15 ヶ月) あるいは疾患初期に効果があると考えられているが、現実にはリルゾールの効果は乏しく、さらなる効果を求めて治療研究が世界中で精力的に行われている。

以前は適切な疾患モデルが存在しなかったため、培養細胞に対する薬理効果、マウスやラットの脊髄前根引き抜き損傷による運動ニューロン死に対する効果

からの判定であったが、現在では変異ヒト SOD1 トランスジェニックマウスの登場によって、治療方法の開発が飛躍的に進んだ。活性酸素除去薬である N-アセチル-L-システインやミトコンドリア調節作用をもつクレアチン、Cu キレート薬である D-ペニシラミン、また NOS 阻害薬などで発症時期の延長や延命効果が報告されており (Hottinger *et al.*, 1997; Klivenyi *et al.*, 1999; Andreassen *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2002), 一部は臨床治験まで到達している。さらに臨床応用という観点からはほど遠いが、変異ヒト SOD1 トランスジェニックマウスとの交配実験から生存期間の延長効果が確認されたマウスとして、抗アポトーシス作用を有する Bcl-2 を過剰発現するマウス (Kostic *et al.*, 1997) や変異カスパー 1 を過剰発現するドミナントネガティブマウス (Friedlander *et al.*, 1997) も報告されている。また他の ALS のモデルマウスである wobbler マウスや pmn マウスでは、脳由来神経栄養因子 (BDNF) (Mitsumoto *et al.*, 1994; Haase *et al.*, 1997), 毛様体神経栄養因子 (CNTF) (Mitsumoto *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 1995) などの神経栄養因子が有効であり、米国において臨床治験も進行中である。これらの結果は、ウイルスベクターなどを用いた遺伝子治療に臨床応用できる可能性を示唆する。現時点での臨床治験では次々と無効の判定が下っているが、近年の ALS 研究の進歩は目覚ましく、研究成果の臨床応用がますます期待される。

5-(4) 遺伝子治療の歴史的背景

現在の、遺伝子治療の概念は Tatum (1966), Lederberg (1968) によって初めて提唱されたが、In vivo での直接的遺伝子導入法の最初の臨床応用例は、1920 年代から始まった従来からのワクチンの使用であったといえる。その後直接的にはバクテリオファージの注入による細菌感染の治療の試みが 1926 年になされている。さらに、直接ポリヌクレオチドを導入する試みがなされた。その後プラスミド発現ベクターやリポーター遺伝子、in situ 検出系の改良によって、in vivo での直接的遺伝子導入が試されるようになった。1983 年にプラスミド中にラットのプレプロインスリン遺伝子を含む大きなリポソームをラットに頸静脈投与した報告があり (Nicolau *et al.*, 1983), この投与により血糖は最大 30% 下がり、血中インスリン値は 50% まで増加した。他の初期の研究には、リン酸カルシウム沈殿したポリオーマウイルス DNA をマウスの肝臓と脾臓にヒアロニダーゼとコラゲナーゼとともに導入するもの (Dubensky *et al.*,

1984)や同様にポリオーマウイルス DNA とプロテオリポソームを導入するものがあり、またクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT), B型肝炎ウイルス表面抗原, ヒト成長ホルモン, もしくはマウスプレプロインスリン遺伝子を含むリン酸カルシウム沈殿プラスミドを腹腔内に投与するといった実験も行われた(Benvenisty and Reshef, 1986).

ヒト遺伝子治療の最初の試みとして, 1960年代の終わりころに Rogers は, ショープパピローマウイルスがアルギナーゼ遺伝子を含んでいるという研究結果をもとにアルギナーゼ欠損症の患者にこのウイルスを投与した(Rogers, 1971)が, 同症の3人の兄弟のアルギニンレベルにはなんら影響を及ぼさないという結果に終わった. 1980年, Cline は β グロビン遺伝子をヒト骨髄細胞に導入しイスラエルとイタリアの2人の女性のサラセミア患者に移植を行ったが効果は得られていない. 基礎研究が不十分であり, また大学(UCLA)の倫理委員会で承認が得られなかったためにエルサレムとナポリで見切り発車的に遺伝子治療実験を始めており, 自然科学的面と方法論の両面から激しい非難を受けた. このことをうけて米国では遺伝子治療を行うためのガイドラインの整備が進み, NIH は今後すべてのヒト遺伝子治療の治験は, Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) (組み換え DNA 諮問委員会)で承認されなければならないと定めた (~1996年5月). また1985年にヒトの遺伝子治療のガイドラインを定めその後技術進歩に合わせたびたび改定されている.

RACの承認を得て米国で最初の遺伝子治療が行われたのは1990年になってからであった. NIHのBlaeseらは遺伝子マーキングの技術を応用して, 単一遺伝子欠損の免疫不全症であるADA欠損症でADA補充療法で効果が見られない患児の治療のために, 本人のリンパ球に *ex vivo* でADA遺伝子を組み込んだレトロウイルスを感染させ, 繰り返して患児の静脈内に投与する方法をとった. この方法は極めて有効であった(Blaese *et al.*, 1995)ために, それ以後遺伝子治療の臨床試験が加速した. 当初は遺伝子治療のターゲットは単一遺伝子の異常による遺伝病であったが, そのアイディアは, 他の分野(分子遺伝学, 免疫学, 腫瘍学など)の研究結果を応用するかたちで, 癌や後天性免疫不全症候群(AIDS), 動脈硬化症, 糖尿病, 高血圧などへと広がりを見せている.

遺伝子治療のストラテジーとして, 考えられているのは, 1) 遺伝子異常を有する細胞の修復; 異常遺伝子を正常遺伝子と置換, 正常遺伝子の付加, 異常遺伝子の発現を押さえる遺伝子の付加, 2) 細胞の特定機能の増強; リンパ球

の抗腫瘍免疫能の増強など， 3) 細胞への新しい機能の賦与；癌細胞への co-stimulatory 分子遺伝子の導入による癌ワクチンの強化，線維芽細胞への凝固因子遺伝子の導入など，である。

5-(5) アデノウイルスベクター

Adv は現在もっとも研究されている遺伝子導入ベクターであり臨床応用範囲も広い。ヒトアデノウイルスは 1953 年に初めて発見されて以来これまでに 47 種の異なった血清型が同定され，A～F の 6 つのグループに分類される。アデノウイルスは一般的に，眼組織，気道，消化管などの分化した上皮細胞に感染する。血清型によって組織特異性や毒性に違いがある。C 亜型の Ad2 と Ad5 は軽微な呼吸器感染症を引き起こすことが知られており，生化学的かつ遺伝学的に最もよく調べられている。アデノウイルスは約 36kb の線状二本鎖 DNA からなる中心を持つ複雑な非エンベロープ 20 面体カプシド蛋白からなる。

アデノウイルスは理論的には比較的大きな外来の DNA 断片を運ぶことが可能なゲノムを持っているので，比較的早期から遺伝子導入ベクターとして興味を持たれ，1977 年に Graham らによって Ad5 の E1 領域を発現する細胞株 (293) ができると，ヘルパーウイルスを用いずに簡便に組み換えアデノウイルスを構築することができるようになった(Graham *et al.*, 1977)。さらに齋藤らは，組換え体作成時のアデノウイルス遺伝子として，ウイルス遺伝子に結合しウイルス複製の際プライマーとして働く末端蛋白 (terminal protein; TP) とアデノウイルスゲノム DNA の複合体を用いることで，従来の方法より効率的にかつ親ウイルスの出現がほとんどみられない方法 (COS-TPC 法)を開発した (Miyake *et al.*, 1996)。本邦で用いられている第 1 世代 Adv はほとんどがこの方法で作成されており，我々が用いた Adv もこれにしたがった。

Adv の特徴として， 1) 比較的簡便に高い力価のウイルスストックが得られやすい 2) 非分裂細胞にも効率良く遺伝子導入が可能であり，肺，肝臓，腸管，心臓，骨格筋，脳・中枢神経系に遺伝子導入を試みたデータがある。 3) 宿主染色体に組み込まれないため宿主の遺伝子発現に影響をあたえない，またレトロウイルスにみられるポジションエフェクトがみられない。などの点あげられる。 4) しかしながら当初期待されていた非分裂細胞における長期的発現はみられなかった。この原因として宿主の免疫反応を惹起することや導入遺伝子のプロモーター活性が低下するなどいくつかの問題が考えられている。

アデノウイルスに対する宿主免疫反応は、カプシド蛋白に対する中和抗体（液性免疫）の出現と感染細胞がウイルス由来の蛋白質を発現することに対する細胞性免疫反応に大別される。これを解決する方法としては、免疫抑制剤 (Lochmuller *et al.*, 1996) や、CTLA4Ig (Schowalter *et al.*, 1997) との共投与で一定の効果が見られた報告や血清型の異なるアデノウイルスを元にベクターを作成した報告 (Parks *et al.*, 1999) があり、またアデノウイルスゲノムの DNA をほとんど欠いた gutless Adv はアデノウイルス由来の蛋白質を発現しないために第一世代のベクターに比べ細胞性免疫反応が少ないといわれている。

以上のように解決すべき問題は多々あるものの、現在いくつかの疾患の治療へ向けて臨床試験が行われている。特に悪性腫瘍の治療に用いる場合は上記の問題は重要ではないとされ、我が国においても 1998 年から p53 遺伝子を載せた Adv が非小細胞肺癌に対する遺伝子治療の臨床試験に用いられている。またバクテリオファージの cre-loxP 系を利用し cre recombinase を発現する 293 細胞とパッケージングシグナル配列 (ψ) を loxP で挟み込んだヘルパーウイルスを用いて、両端の繰り返し配列 (ITR) とパッケージングシグナル配列 (ψ) を除くすべてのアデノウイルスゲノムを欠く新世代アデノウイルス (gutless Adv) の作成も進んでいる (Parks *et al.*, 1996)。

5-(6) 中枢神経疾患の遺伝子治療とアデノウイルスベクターの逆行性軸索輸送

多くの遺伝性中枢神経疾患における遺伝子異常が近年解明されるに従って、これらの遺伝性疾患に対する有効な治療法の一つとして、遺伝子治療の可能性が提唱されつつある。また遺伝子治療は、脳血管障害や神経変性疾患のような後天性神経障害の治療としても、重要な役割を担うものと考えられている。しかしながら中枢神経疾患の遺伝子治療の臨床応用には、導入遺伝子発現の安定性、制御性、さらにベクターおよび発現遺伝子の安全性などの面で明らかな制限がある。加えて、末梢での遺伝子治療と異なって、分裂後の細胞であり、細胞の種類や神経回路などの不均一性、導入ルート of の制限などの中枢神経ならではの問題点が存在する (Costantini *et al.*, 2000)。

現在、脳への遺伝子導入経路として、種々のベクターや細胞を使用して局所的にもしくは全体的に遺伝子を導入するいくつかの方法が検討されている。動物実験での脳への遺伝子導入の多くは、脳内へ複製能力欠損ベクターを直接的にステレオタキシクに注入する方法である。この方法では、ベクターや他の

形態の DNA は注入部位に近接する細胞のみに取り込まれ、わずかに拡散する程度である。そこでより多くの他の脳領域に安全にベクターを輸送する方法として、注入部位への神経投射内で、ベクターを順行性もしくは逆行性に輸送する方法が検討されている。逆行性軸索輸送は以前、血液脳関門外に突起が伸長している運動ニューロンを含む神経細胞へ、関門を越えることが困難な分子量の大きいタンパクを導入する際に使用されていた(Broadwell and Brightman, 1976; Fabian and Petroff, 1987)。Ghadge らは、複製能力欠損アデノウイルスベクターをマウス骨格筋線維内に注入し、逆行性軸索輸送を介して支配する中枢神経のニューロンに遺伝子を導入できることを報告した(Ghadge *et al.*, 1995)。さらに Warita らは、変異 SOD1 トランスジェニックマウスと正常対照マウスについて、マーカー遺伝子である LacZ 遺伝子を有するアデノウイルスベクターを上腕骨格筋に注入することによって、いずれのマウスの頸髄前角細胞にも LacZ 遺伝子が発現していることを明らかにした(Warita *et al.*, 1998)。

5-(7) 本研究の目的

本稿では、ALS のモデルマウスとして確立し、病態解明および治療法開発に利用されている変異ヒト SOD1 トランスジェニックマウス (G93A マウス) について、正常対照マウスと同様に、舌筋を含む骨格筋にアデノウイルスベクターを注入後、逆行性軸索輸送によって運動ニューロンに遺伝子(LacZ 遺伝子)を導入することが可能かどうか検討する。つづいて、変異 SOD1 が運動ニューロン変性を引き起こす機序の一つとして考えられているアポトーシスを抑制する抗アポトーシス因子である Bcl-2 を、G93A マウスの運動ニューロンに導入する方法として、アデノウイルスベクターの逆行性軸索輸送と cre-loxP 組み換えを応用した新たな方法について論じる。さらにこのシステムを用いて運動ニューロンに導入したヒト Bcl-2 が、実際に形態学的に G93A マウスの舌下神経における運動ニューロン変性を防御し、空胞変性や反応性アストロサイトの増生を阻害することを報告し、これらの結果をもとに運動ニューロンが疾患発症において一次的な標的であり、アストロサイトの反応はそれに続く二次的な現象である可能性を考察する。

6. 実験方法

6-(1) Adv の作製

今回の実験に用いた Adv は COS-TPC 法(Miyake *et al.*, 1996)により E1 と E3 の一部を欠く 5 型アデノウイルスを元に作製した。AdCMVLacZ は, human cytomegarovirus immediate early gene promoter/enhancer (CMVP) によって大腸菌の β -galactosidase (LacZ) 遺伝子を発現させる構造, AxCANCre は CAG promoter によって cre recombinase 遺伝子を発現させる構造を含ませて作製した。また AxCALNLBcl-2 は CAG promoter によってヒト Bcl-2 の分子スイッチを発現させる構造を含ませて作製し, ヒト Bcl-2 cDNA は, SJ Korsmeyer 博士(Harvard Medical School, Boston, MA, USA) より供与していただいた。それぞれ COS-TPC 法に従って del-327TPC と上記の構造を持つ発現ベクターを HEK-293 に co-transfection し plaque を回収した後, 3回の plaque purification を行った。大量のウイルス精製ストックを得るために HEK-293 に感染させ 48 時間後に回収し, CsCl gradient centrifugation にて精製・濃縮を行った。10mM Tris pH8.0, 1mM MgCl₂, 10% グリセロール溶液で 48 時間透析し-80℃にストックした。HEK-293 を用いてプラークアッセイを行い力価のチェックを行った。またいずれのウイルスストックでも複製可能なアデノウイルスの混入は検出されなかった。

6-(2) 培養細胞

ヒト胎芽腎臓(Human Embryonic Kidney; HEK) 由来の HEK-293 細胞, サル腎臓細胞由来の COS7 細胞は, 10%ウシ胎仔血清 (fetal calf serum ; FCS, JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) および 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin (SIGMA CHEMICAL, St. Louis, MO, USA) を添加した Dulbecco's modified essential medium (DMEM, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) で維持培養した。これらの細胞は 5% CO₂, 37℃の条件で培養した。初代培養神経細胞は 18 日齢の G93A マウス胎仔より作製した。胎仔は氷冷した calcium/magnesium-free Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco-BRL)内に保存し, ジェノタイプ検索の後, 変異 SOD1 遺伝子を有する胎仔大脳皮質を破碎し, 0.25% トリプシンを含む calcium/magnesium-free HBSS 内で 37℃, 15 分間消化した。攪拌を繰り返し行った後, 細胞は poly-L-

ornithine (SIGMA CHEMICAL)でコートした 60-mm dish (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) に 1.6×10^6 cells の密度で, 5% CO₂, 37°Cの条件で培養した. 培地は B27 supplement (Gibco-BRL) , 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin を含む DMEM/F-12 (Gibco-BRL) を用いた. グリア細胞の増生を抑制するために, 10 μ M cytosine arabinoside (SIGMA CHEMICAL)を培養 4 日目に添加した.

6-(3) COS7 細胞と初代神経細胞への遺伝子導入

4 chamber glass slides (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)上で培養した細胞は種々の MOI で AxCALNLBcl-2 および AxCANCre を 2 時間, 37°Cの条件で感染させた. 48 時間後 COS7 細胞と初代神経細胞は 4% paraformaldehyde(PFA)にて固定し, PBS で 3 回洗浄後, 10% 正常ヤギ血清 (normal goat serum) と 0.1% Triton-X を含む PBS で 30 分間ブロッキングした. その後細胞は, 100 倍希釈した抗ヒト Bcl-2 モノクローナル抗体 (Dako)および 100 倍希釈した MAP-2 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)と反応させ, それぞれ 200 倍希釈の FITC 標識抗マウス IgG 抗体 および 500 倍希釈の Cy3 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)を用いて, 共焦点レーザー顕微鏡 (LSM410, Carl Zeiss microscopy, Jena, Germany) で観察した.

6-(4) ウェスタンブロット法による Bcl-2 および cre 検出

COS7 細胞は種々の MOI で AxCALNLBcl-2 および AxCANCre を 1 時間, 37°Cの条件で感染させ, 48 時間培養した. これらのサンプルは 100 μ l の lysis buffer [2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 4 mM EDTA, 40 mM Tris HCl (pH 6.8), 0.24 M glycine, 40% glycerine, and 0.001% bromophenol blue (pH 8.5)]に溶解し, 5 分間ボイルした後, 5 μ l の lysate を 15% SDS-PAGE ゲルにて, 30 mA, 3 時間電気泳動した. その後ニトロセルロースメンブレン (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)にトランスファーし, 5%スキムミルクで 4°C, 一晩ブロッキングし, 常温で 1 時間一次抗体と反応させた. メンブレンは TTBS [20 mM Tris HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20]にて 3 回洗浄した後, 常温で 30 分間二次抗体と反応させ, 再び TBS [20 mM Tris HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl]で洗浄した. メンブレンは, enhanced

chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia Biotech)のプロトコールに従って検出した。一次抗体は500倍希釈抗ヒト Bcl-2 モノクローナル抗体(Dako), 1000倍希釈抗 cre recombinase モノクローナル抗体(BAbCO, Richmond, CA, USA)および1000倍希釈抗マウス β -アクチンモノクローナル抗体 (SIGMA CHEMICAL)を用いた。二次抗体には, peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。フィルムは EPSON GT-9000 スキャナーにてスキャンし, バンドのシグナル強度は NIH Image 1.60 ソフトを用いて定量化した。

6-(5) マウス舌筋への Adv の注入と切片の作製

変異ヒト SOD1 (G93A) 遺伝子を多コピー (25 コピー以上) 有するトランスジェニックマウス[B6SJL-TgN (SOD1-G93A)1Gur](Gurney *et al.*, 1994) (G93A マウス) と正常対照マウスは Jackson Laboratory 社 (Bar Harbor, ME, USA) より購入し, 病原物質の存在しない 1 気圧の環境下で飼育した。選択的交配は, B6SJL F1 hybrids の hemizygous state において変異ヒト SOD1 (G93A) 遺伝子を維持した。ゲノム DNA は, マウス尾生検組織より抽出した。変異 SOD1 のジェノタイプ分析は Rosen ら(Rosen *et al.*, 1993)によって報告されているプライマーをもちいた PCR によって行った。G93A マウスと正常対照コントロールマウスは, 種々の週齢 (G93A マウスでは 7 日, 14 日, 16 週, 20 週および 35 週齢, 正常コントロールマウスでは 7 日, 14 日, 16 週, 20 週, 24 週および 35 週齢) で AdLacZ の接種に用いた。AdLacZ の注入は, それぞれのマウスの舌筋にステレオタキシクに注入された。注入点として舌の中央もしくは右側を選択した。約 $0.5-1.0 \times 10^{11}$ p.f.u./ml の AdLacZ をハミルトンシリンジ (the Gastight Highperformance Syringe; Hamilton, Reno, NV, USA) を用いて $5-10 \mu\text{l}$ ずつ各グループ 3-7 匹のマウスの舌筋に注入した。Bcl-2 の実験では, 2 もしくは 7 週齢の G93A マウスと正常コントロールマウスに約 $0.5-1.0 \times 10^{11}$ p.f.u./ml の AxCALNLBcl-2 を, さらに翌日 (AxCALNLBcl-2 の接種 24 時間後), $1.0-2.0 \times 10^{10}$ p.f.u./ml の AxCANCre をそれぞれ $5-10 \mu\text{l}$ ずつ舌のほぼ中央同一部位に注入した。

6-(6) 免疫組織科学および免疫蛍光染色

AdLacZ 注入マウスは 2-5 日, 1, 2 および 4 週後に, また AxCALNLBcl-

2 および AxCANCre 注入マウスは 2 日後に屠殺し, phosphate buffered saline (PBS), さらに 4%パラフォルムアルデヒド (PFA) で還流固定した. 舌および脳は切除後, 4°C, 6-12 時間, 4%PFA 中で再固定し, その後 30%ショ糖液中に一晩浸し, OCT コンパウンドに封埋後, -80°C で保存した. 舌および脳幹部切片はまず X-gal 染色を行い, その後ヘマトキシリンエオジン (H&E) 染色を行った. 免疫蛍光染色では, ブロッキングキット(ScyTeK, West Logan, UT, USA)にてブロッキング後, 抗ヒト Bcl-2 モノクローナル抗体(1:40 希釈) (Dako, Glostrup, Denmark)および FITC 標識抗マウス IgG 抗体(1:200 希釈) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)を用いて染色した.

6-(7) 組織切片における Bcl-2DNA 断片の検出

Bcl-2 免疫染色後の脳幹部および舌筋切片は, エッペンドルフチューブ内に剥離し, DNA を抽出するために, 55°C, 2 時間, 100 μ l の lysis buffer [10 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% Tween-20, 0.1 mg proteinase K] 中で処理し, 10 分間ポイルした. 10 μ l の上清を, 5'-CTGCTAACCATGTTCATGCC-3' と 5'-CCCTCTGCGACAGCTTATAA-3' のプライマーを用いて PCR を行い, 脳幹部および舌筋組織内の組み替え Bcl-2 を検出した. 50 μ l の PCR 反応液の組成は, 200 μ M dNTP, 1.0 μ M ずつのプライマー, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂ および 2.5 U の Taq polymerase であった. 45 サイクル(94°C1 分, 52°C1 分, 72°C1 分)の反応後, PCR 産物は 1.2%アガロースゲルで電気泳動し, 0.4 N NaOH および 1.5 M NaCl 中でナイロンメンブレンフィルター(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)にトランスファーした. メンブレンは UV クロスリンク後, アルカリフォスファターゼ(AP)標識した Bcl-2 プローブを用いて, 55°C, 一晩ハイブリダイゼーションを行った. メンブレンは一次洗浄バッファー[2 M 尿素, 0.1% SDS, 50 mM Na phosphate (pH 7.0), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.2%ブロッキング剤]で洗浄後, さらに二次洗浄バッファー[50 mM Tris HCl (pH 10.0), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂]で洗浄し, CDP-Star chemiluminescent detection kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)を用いて, Bcl-2 のバンドを検出した.

6-(8) 組織切片における in situ hybridization による LacZ mRNA の検出
RNA プローブとして CMV-LacZ フラグメントを含む pBCKS+/- (pBC LacZ)

を用いた。LacZ mRNA のセンスおよびアンチセンスプローブを得るために、pBC LacZ は Kpn I もしくは Not I を用いて直鎖化し、T7 もしくは T3 RNA polymerase を用いて転写し、ジゴキシゲニン(DIG) UTP (Boehinger Mannheim, Mannheim, Germany)を用いて標識した。DIG 標識した LacZ RNA プローブはマニュアルに従って作製し、脳幹部切片における LacZ mRNA を検出するための in situ hybridization に使用した。また陰性対照としてアンチセンス Neo RNA プローブを用いた。

In situ hybridization は、以前の報告に準じて(Mita *et al.*, 1989; Mita *et al.*, 1998), ポリ-L-リシンでコートしたスライドガラス上に作製した 30 μ m の厚さのマウス脳幹部切片を使用し、4% PFA で固定後、2XSSC (0.3 M NaCl, 0.03 M Na-citrate)にて 2 回洗浄した。その後切片は常温で 10 分間、proteinase K (5 μ g/ml)で処理し、さらに 2XSSC で洗浄後、1 時間プレハイブリダイゼーションバッファーと反応させた。DIG 標識した LacZ RNA のセンスおよびアンチセンスプローブと、アンチセンス Neo RNA プローブは、終濃度が 200 ng/ml になるように 10% dextran sulfate を含むハイブリダイゼーションバッファー内に混入し、切片上に重層し、42°C, 18 時間、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、組織標本は 2XSSC で常温、1 時間洗浄し、非結合 RNA プローブを除去するために、RNase (30 μ g/ml)で処理した。RNase 処理後、スライドガラスは常温で 2XSSC で洗浄し、さらに 50°C, 1 時間、0.1XSSC で洗浄した。その後常温で 45 分間ブロッキングし、AP 標識抗 DIG 抗体を用いて、NBT/BCIP にて検出した。

6-(9) β -gal 陽性ニューロンの定量的評価

AdLacZ 舌筋注入後 1, 2 および 4 週後の 17-28 週齢の G93A マウスおよび正常対照マウスの脳幹部舌下神経核における β -gal 陽性細胞を計測した。AdLacZ 注入後 1, 2 および 4 週後の G93A マウスおよび正常対照マウスを、それぞれ 3-7 匹用い、もっともシグナルの強い 2 連続脳幹部切片における β -gal 陽性ニューロンの数を計測した。

6-(10) 初代神経細胞の生存性評価

初代神経細胞は 4 日間培養後、AxCALNLBcl-2 および AxCANCre を感染させ、さらに 24 時間後、staurosporine (STS)を添加した。Bcl-2 遺伝子発現

が変異 SOD1 を有する細胞の生存性に影響するかどうか、STS 添加後、propidium iodide (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA)を用いて評価した。24 時間後、アポトーシス細胞はクロマチンの濃縮を伴う赤色の核染色を呈し、one-way analysis of variance (ANOVA) および Fisher's protected least significant difference test を用いて、統計学的に比較した。

6-(11) ヒト Bcl-2 による G93A マウス治療効果

10 週齢の G93A マウスおよび正常対照マウスは、sodium pentobarbital の腹腔内注入によって麻酔後、約 $0.5-1.0 \times 10^{11}$ p.f.u./ml の AxCALNLBcl-2 を、さらに AxCALNLBcl-2 の接種 3 日後に $1.0-2.0 \times 10^{10}$ p.f.u./ml の AxCANCre をそれぞれ $5-10 \mu\text{l}$ ずつ舌のほぼ中央同一部位に注入した。すべての動物実験は熊本大学附属動物実験施設において熊本大学動物実験指針に沿って行われた。

6-(12) 免疫組織化学による評価

AxCALNLBcl-2 さらに AxCANCre を舌筋に注入した 10 週齢の G93A マウスは、2, 4, 8 および 15 週後に屠殺し、PBS, さらに 4%PFA で還流固定した。舌および脳は切除後、 4°C , 6-12 時間、4%PFA 中で再固定し、その後 30% ショ糖液中に一晩浸漬し、OCT コンパウンドに封埋後、 -80°C で保存するか、もしくはパラフィンに封埋した。6 μm の切片は Kluver-Barrera 染色を行った。glial fibrillary acidic protein (GFAP)の免疫染色では、6 μm の切片は抗 GFAP ウサギポリクローナル抗体(1:800 希釈) (Dako, Glostrup, Denmark) およびビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体(1:200 希釈)を使用し、Vector 社 (Burlingame, CA, USA)の ABC staining kit を用いて検出した。Bcl-2 の免疫染色では、30 μm の切片はブロッキングキット(ScyTeK, West Logan, UT, USA)にてブロッキング後、抗ヒト Bcl-2 モノクローナル抗体(1:40 希釈) (Dako) および FITC 標識抗マウス IgG 抗体(1:200 希釈) (Jackson ImmunoResearch Laboratories)を用いて染色した。

6-(13) 各マウスの残存運動ニューロンの定量的評価

AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 注入 15 週後の G93A マウス、AxCALNLBcl-2 のみ注入 15 週後の G93A マウス、未注入 G93A マウスおよ

び正常対照マウスはそれぞれ 3 匹ずつ使用し，明瞭な核および核小体を有する大型の運動ニューロンのみを，Kluver-Barrera 染色された 16 スライス of 脳幹部切片について計測した．これらを one-factor analysis of variance および Fisher' s protected least significant difference test を用いて，統計学的に比較した．

7. 実験結果

7-(1) 舌下神経核における β -gal 活性および LacZ mRNA の検出

われわれは初めに以前の報告に従って(Dal Canto and Gurney, 1994), 正常対照マウスと同様, 症候を呈する以前の G93A マウス (14 週齢未満) および発症した G93A マウス (16 および 20 週齢) について舌下神経核における β -gal 活性を観察した. β -gal 活性は, 舌筋に AdLacZ を注入後 2-7 日後に観察した全ての週齢の G93A マウスおよび正常対照マウスの延髄舌下神経核において検出された(図 4a-c). 舌筋中央に AdLacZ を注入すると両側の舌下神経核に β -gal 活性を検出し(図 4a), 舌筋の右側に注入すると主に右側の舌下神経核に β -gal 活性を認めた(図 4b). 注入後 2 日後では, それぞれの舌下神経核のニューロンは神経細胞体および神経突起に β -gal 活性を認めた. またいくつかの切片では, 舌下神経核のニューロンに加えて, 舌下神経核の神経根にも X-gal 染色を示した(図 4a). 本実験に用いた 16 および 20 週齢の G93A マウスは臨床症候も病理変化も呈していないので, 次に発症し, 臨床症候を呈している 37 週齢の G93A マウスについて, 正常対照マウスと同様, AdLacZ を注入 2 週後の β -gal 活性を観察した. 正常対照マウスと同様, 37 週齢の G93A マウス(図 4d)においても舌下神経核に β -gal 活性を認めたが, 若年マウス(図 4 a-c)に比較して β -gal 陽性細胞の数およびシグナルの強度は減弱していた. 37 週齢の G93A マウスの脳幹部の病理変化は, 軽度の運動ニューロンの消失と空胞変性を示した. われわれは G93A マウスと正常対照マウスの X-gal 染色の差異についても検討したが, 観察した期間内ではいかなる週齢においても有意差を見出さなかった.

われわれは PCR サザンプロット法を用いて脳幹部切片内における AdLacZ DNA を検出したため(data not shown), 次に in situ hybridization 法を用いて, 単一細胞レベルで正常対照マウスの脳幹部切片における AdLacZ 由来の LacZ mRNA を検出できるかどうか検討した. 舌下神経核の右側に β -gal 活性を検出した 2 切片の間の切片を使用した. In situ hybridization では, アンチセンス LacZ RNA プローブを用いた場合, 右側の舌下神経核のいくつかの運動ニューロンに強い LacZ mRNA のシグナルを検出した(図 4 e). 左側の舌下神経核や舌下神経核以外のニューロンにもかすかにシグナルを認めたが, バックグラウンドと考えられた. このハイブリダイゼーションの特異性は, センス

LacZ RNA プローブ (図 4f), RNase 処理を行ったアンチセンス LacZ RNA プローブ, もしくはアンチセンス Neo RNA プローブ(data not shown)を用いてハイブリダイゼーションを行った切片ではほとんどシグナルを見出さなかったことから確認された。

7-(2) AdLacZ 由来の LacZ 遺伝子発現の時間的経過

次にわれわれは逆行性軸索輸送によって運動ニューロンに導入された遺伝子の発現期間について検討した。AdLacZ を舌筋注入後 1, 2, および 4 週後の, 17-28 週齢の G93A マウスおよび正常対照マウスの脳幹部舌下神経核の β -gal 活性を観察した(図 4g-j)。 β -gal 活性は観察した全てのマウスの舌下神経核に検出したが, 注入後経時的に有意に減少していた (図 5)。また注入 2 週間後では, 一部舌下神経の外側にも β -gal 活性を認め(図 4j), β -gal 酵素蛋白の舌下神経核神経細胞体からの漏出が示唆された。AdLacZ を注入した舌筋では筋線維の変性と共に, 著明な炎症細胞浸潤を認めたが, 脳幹部切片では炎症所見はみられなかった。

7-(3) AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 感染による COS7 および初代神経細胞における Bcl-2 の過剰発現

Bcl-2 の分子スイッチを含む Adv (AxCALNLBcl-2)は, 図 6(Sato *et al.*, 1998)に示すように, cre recombinase 遺伝子を含む Adv (AxCANCre)が充分量の cre recombinase を発現すると Bcl-2 を発現するように設計されている。このシステムを用いて, われわれはまず様々な MOI で AxCALNLBcl-2 と AxCANCre を COS7 細胞に感染させて, Bcl-2 の発現を確認した。ウェスタンブロット法および免疫蛍光染色法では, cre recombinase が発現しているときのみ外来性の Bcl-2 を検出した(図 7a, b, d)。本実験で使用した抗ヒト Bcl-2 モノクローナル抗体は, 外来性のヒト Bcl-2 に対して強く反応する一方, COS7 細胞の内在性の Bcl-2 に対してもわずかに交叉反応を示した(図 7a-c, e)。デンストメトリーを用いて, 外来性および内在性の Bcl-2 のバンド強度を定量的に比較すると, 内在性の Bcl-2 に対して約 9 倍の外来性の Bcl-2 の発現を確認した(図 7a)。免疫蛍光染色でも, 外来性の Bcl-2 シグナルに比較してごくわずかの内在性の Bcl-2 シグナルが検出されたが, 内在性の Bcl-2 はほとんど無視できる程度であった(図 7a-c, e)。

次に G93A マウス由来の初代神経細胞において、AxCALNLBcl-2 と AxCANCre を感染させた時の Bcl-2 発現を確認した。初代神経細胞作製のために、18 日齢の G93A マウス胎仔を使用し、PCR を用いて変異 SOD1 遺伝子を有する胎仔を選出した(図 8f)。本実験で使用した初代神経細胞のほとんどは microtubule-associated protein 2 (MAP-2) に反応性を示し、培養細胞の主要な構成成分がニューロンであることが確認された。AxCALNLBcl-2 が 50 MOI、AxCANCre が 1 MOI の条件下で感染後、Bcl-2 蛋白はほとんど全ての神経細胞に検出された(図 8a-c)。使用した抗ヒト Bcl-2 抗体は、図 7 に示すように他の種の内在性 Bcl-2 に交叉反応を示すが、50 MOI の AxCALNLBcl-2 のみを感染させた培養細胞(図 8d)や、未感染の細胞(図 8e)ではごくわずかの Bcl-2 シグナルを検出するのみであり、明らかに外来性のヒト Bcl-2 とは区別が可能であった。

7-(4) Bcl-2 過剰発現による staurosporine 誘導アポトーシスに対する変異 SOD1 陽性神経細胞防御効果

このシステムによって導入した Bcl-2 の過剰発現がアポトーシス刺激に対して細胞を防御しうるかどうか検討するために、G93A マウス由来の初代神経細胞に AxCALNLBcl-2 および AxCANCre を感染させ、アポトーシスを誘導する STS を付加して、細胞の生存性を評価した。AxCALNLBcl-2 および AxCANCre を感染させた変異 SOD1 遺伝子を有する初代神経細胞に、 $1\mu\text{M}$ の STS を添加した。24 時間後 propidium iodide 染色を行い、蛍光顕微鏡下で赤色の核染色とクロマチンの濃縮の両方を呈したアポトーシス細胞を観察した(図 9a-f, 矢印)。一定の領域を観察し生存している細胞を計測したところ、50 MOI の AxCALNLBcl-2 および 1 MOI の AxCANCre を感染させた神経細胞では、AxCALNLBcl-2 も AxCANCre も感染させていない細胞と比較して、有意な (52.8%, $P<0.001$) 生存細胞の残存を認めた(図 9g)。5MOI の AxCALNLBcl-2 および 0.1 MOI の AxCANCre を感染させた神経細胞では、アポトーシスを誘導する STS に対して神経細胞を防御するには Bcl-2 の発現が不十分であったと考えられた。すなわち、このシステムによって導入された Bcl-2 の過剰発現によって、STS によって誘導されるアポトーシスから神経細胞が防御されたことが示された。

7-(5) 変異 SOD1 マウスの舌筋および舌下神経核における Bcl-2 遺伝子発現

G93A マウスおよび正常対照マウスの舌筋に AxCALNLBcl-2 に続いて AxCANCre を注入すると、逆行性軸索輸送によって Adv が舌下神経核に輸送されるかどうか、また舌下神経核において Bcl-2 遺伝子が発現するかどうか検討した。この実験で AxCANCre は、AxCALNLBcl-2 注入 24 時間後に舌の同一部位に注入した。G93A マウス(図 10a)も正常対照マウスも、注入部位である舌筋線維に Bcl-2 を検出したが、ある程度びまん性に分布していた。Bcl-2 は、舌筋に AxCALNLBcl-2 に続いて AxCANCre を注入後、G93A マウス(図 10c, e)および正常対照マウス(図 10d)の脳幹部舌下神経核に検出された。舌および脳幹部切片では、AxCALNLBcl-2 のみを舌筋に注入した場合(図 10b, g)や未注入の場合(図 10h)もわずかに抗ヒト Bcl-2 抗体に対するシグナルを検出したが、おそらく非特異的もしくは内在性 Bcl-2 に対するシグナルと考えられ、明らかに外来性ヒト Bcl-2 と区別された。Adv 注入後いずれのグループのマウスも脳幹部には炎症所見を認めなかった。

舌下神経核に検出した Bcl-2 蛋白が AxCALNLBcl-2 および AxCANCre が逆行性軸索輸送されて舌下神経核で発現したのか、もしくは両ベクターを注入した舌筋内で産生された Bcl-2 蛋白そのものが逆行性軸索輸送されたのか明らかにするために、PCR およびサザンプロット法を用いて、cre-loxP 組み換え後の Bcl-2 DNA フラグメントを検出した。AxCANCre 由来の cre recombinase が、図 6 に示される 1 組の loxP 領域の間に存在するスタッファー領域を切除した時の Bcl-2 DNA を増幅可能なプライマーを設計した。Bcl-2 DNA フラグメントは、AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 舌筋注入後の G93A マウス(図 11, レーン 1, 4)および正常対照マウス(data not shown)の舌筋および脳幹部組織中で増幅された。

7-(6) 変異 SOD1 マウスの舌下神経核における Bcl-2 遺伝子発現の時間的経過

次にこのシステムによって逆行性に運動ニューロンに導入された Bcl-2 遺伝子の発現の時間的経過を観察した。10 週齢の G93A マウスの舌筋に AxCALNLBcl-2 に続いて AxCANCre を注入すると、G93A マウスの延髄舌下神経核に、少なくとも 8 週間の観察期間中、未接種正常対照マウスと比較して、有意に Bcl-2 を検出した(図 12a-c, g)。両ベクター注入 15 週後の G93A マウス

の舌下神経核にもわずかにBcl-2陽性ニューロンを検出したが、その数は未接種正常対照マウスと比較して統計学的有意差を認めなかった(図 12d)。AxCALNLBcl-2のみを舌筋に注入したマウス(図 12e)やベクター未注入マウス(図 12f)の脳幹部切片にも、抗ヒトBcl-2抗体に対してわずかにシグナルを検出したが、既述の様に、内因性Bcl-2を反映しているものと考えられた。すなわち、Bcl-2陽性ニューロンの数は明らかに経時的に減少し、内因性Bcl-2のベースラインまで低下した(図 12g)。次にこの観察期間中、舌下神経核内に外来性Bcl-2遺伝子が存在するかどうか検討するために、PCRサザンブロット法を用いて、cre-loxP組み換え後の290-bpのBcl-2 DNAフラグメントを検出した。今回観察したAxCALNLBcl-2に続いてAxCANCreを注入したいずれの週のG93Aマウスの脳幹部においても290-bpのBcl-2 DNAフラグメントの増幅が確認された(図 13)。また舌筋にAdvを注入したいずれの週のマウスの脳幹部にも炎症所見を認めなかった。

7-(7) Bcl-2 遺伝子発現による変異 SOD1 マウスの舌下神経核の運動ニューロン変性に対する防御効果

このシステムにより運動ニューロンに導入した Bcl-2 によって、G93A マウスの運動ニューロンの変性を防御することが可能かどうか検討した。症候が著明となる 25 週齢時の G93A マウスについて観察した。AxCALNLBcl-2 および AxCANCre を注入した G93A マウスの舌下神経核(図 14a)では、AxCALNLBcl-2 のみを注入したマウスの舌下神経核(図 14b)や 未注入マウスの舌下神経核(図 14c)と比較して、より多くの運動ニューロンが保存されていた。Dal Canto ら(Dal Canto and Gurney, 1994)が報告している G93A マウスの病理変化と同様に、AxCALNLBcl-2 のみを注入したマウスの舌下神経核や 未注入マウスの舌下神経核では、神経細胞体およびニューロピル周囲に著明な空胞変性が観察された。未注入 G93A マウスの舌下神経核では、運動ニューロンはほとんど萎縮していたが、両ベクターを注入したマウスでは、ニューロピル周囲にわずかに空胞を認めるのみであった。さらに、GFAP 染色で観察されるように、未注入 G93A マウスの脳幹部切片では反応性アストロサイトの増生を認めたが(図 14f)、両ベクターを注入したマウスでは、明らかに反応性アストロサイトの増生が減弱していた(図 14e)。運動ニューロンに対する外来性 Bcl-2 の効果を統計学的に評価するために、各群のマウスの舌下神経核を含

む脳幹部切片 16 枚について、明瞭な核と核小体を有する大型運動ニューロンの数を測定した。AxCALNLBcl-2 および AxCANCre を注入した G93A マウスの運動ニューロンの数は、AxCALNLBcl-2 のみを注入したマウスや未注入マウスの運動ニューロンの数に比較して、有意に残存していた(図 15)。両ベクターを注入した G93A マウス、AxCALNLBcl-2 のみを注入した G93A マウスおよび未注入 G93A マウスの残存した運動ニューロンの、正常対照マウスの運動ニューロンに対する割合は、それぞれ 90.5 %、41.0 %および 15.9 %であった。AxCALNLBcl-2 のみを注入した G93A マウスの運動ニューロンの数は、未注入 G93A マウスの運動ニューロンよりわずかに多かったが、統計学的に有意差を認めなかった。

8. 考察

本研究において、われわれは正常対照マウスと同様、G93A マウスの運動ニューロンにおいても Adv の逆行性軸索輸送によって遺伝子(LacZ 遺伝子)発現することを報告した。つづいて、Adv の逆行性軸索輸送と cre-loxP 組み換えを用いて、in vitro および in vivo で、G93A マウスの運動ニューロンに外来性 Bcl-2 を導入する新たな方法を確立した。さらにこのシステムを用いて運動ニューロンに導入した Bcl-2 が、実際に形態学的に G93A マウスの舌下神経における運動ニューロン変性を防御し、空胞変性や反応性アストロサイトの増生を阻害したことを報告した。

ALS は通常中年以降に発症する疾患であるので、われわれははじめにいかなる週齢においても Adv が逆行性に輸送されるのかどうか解明しようと試みた。Adv の逆行性軸索輸送は両マウスにおいて 37 週齢時でも観察され、Adv は罹患した運動ニューロンでさえも逆行性に輸送されることが示された。また正常対照マウスと G93A マウスの β -gal 活性の違いについても検討したが、観察したいかなるステージにおいても両者に明らかな差を認めなかった。Warita らは、AdLacZ を上腕骨格筋に注入後 X-gal 染色を行うことによって、27 週齢の G93A マウス 1 匹の頸髄運動ニューロンにわずかに AdLacZ が輸送されたと報告している(Warita *et al.*, 1998)。

運動ニューロンに限局した遺伝子発現に加えて、長期間の遺伝子発現を維持することが、運動ニューロン疾患の遺伝子治療の主要な目標の一つである。中枢神経系は従来免疫学的に保護された組織であると考えられているが、Adv を用いた遺伝子発現は、Adv の注入によって誘導される細胞性および液性免疫反応のため、in vivo では多くは一過性の発現である(Byrnes *et al.*, 1995; Ohmoto *et al.*, 1999)。Byrnes らは、ラットの線状体に AdLacZ をステレオタキシックに注入すると、2 日後にはリンパ球による著明な細胞浸潤を認めたが、炎症反応にも関わらず神経細胞における β -gal 活性の発現は、少なくとも 2 ヶ月間は持続し、次第に経時的に減少したと報告している(Byrnes *et al.*, 1995)。われわれの実験では、注入後 4 週間は脳幹部に炎症所見を認めなかった。組み換え遺伝子の逆行性輸送は、免疫原性の観点から有効であるかどうか解明するために、Adv を筋線維内に注入後、運動ニューロンでの遺伝子発現の安定性を調査した。しかしながら舌下神経核における β -gal 活性は経時的に減

少し、運動ニューロン内での転写レベルでの不活化が示唆された。本実験で使用したサイトメガロウイルス (CMV) やラウス肉腫ウイルスのようなウイルスプロモーターを含む Adv は高い転写レベルを有することが知られている一方、細胞防御機構による転写のダウンレギュレーションによって、短期間の有効性を示すに過ぎないことも報告されている (Anderson, 1998)。Navarro らは、neuron-specific enolase のプロモーターを有する AdlacZ の注入によって、 β -gal 遺伝子の発現は 3.5 ヶ月間安定であり、6 ヶ月間は検出可能であったと報告している (Navarro *et al.*, 1999)。すなわち使用するプロモーターは安定した遺伝子発現にとって重要であると考えられる。Bcl-2 遺伝子発現では、CMV プロモーターの代わりに、CMV エンハンサーを有するチキン β -アクチンプロモーターである CAG プロモーター (Niwa *et al.*, 1991) を使用した。Bcl-2 の遺伝子発現の経時的変化では、少なくとも 8 週間の観察期間中、有意に Bcl-2 を検出したが、どのプロモーターが運動ニューロンにとってもっとも適しているのか明らかにすることが今後必要であると考えられる。

AdlacZ の観察結果に基づいて、運動ニューロン疾患の遺伝子治療の開発のための次のステップとして、*in vitro* および *in vivo* で G93A マウスの運動ニューロンに長期生存のための治療用遺伝子を導入しようと試みた。最近の報告では、抗アポトーシスを有する野生型 SOD1 とは対照的に、変異型 SOD1 は神経細胞においてアポトーシスを促進するといわれている (Rabizadeh *et al.*, 1995)。また FALS トランスジェニックマウスと Bcl-2 トランスジェニックマウスの交配から、Bcl-2 の過剰発現が FALS トランスジェニックマウスの生存期間を延長することが報告されている (Kostic *et al.*, 1997)。組み換えアデノ随伴ウイルスの脊髄内注入によって、脊髄運動ニューロンに局所的に Bcl-2 を発現すると、FALS マウスの運動ニューロンの生存が増加することが観察されている (Azzouz *et al.*, 2000)。Bcl-2 が G93A マウスの運動ニューロン変性を遅延させる機序として、Bcl-2 の過剰発現によってカスパー 1 および 3 の活性化が阻害され、その結果神経変性が抑制されることが考えられている (Vukosavic *et al.*, 2000)。すなわち治療用遺伝子として Bcl-2 の有用性が示唆されている。

われわれは Adv を用いた cre-loxP 組み換えによって Bcl-2 を発現する分子スイッチを使用し、COS7 細胞および初代神経細胞、*in vivo* でのマウス運動ニューロンでの Bcl-2 発現を報告した。cre-loxP 組み換えは、トランスジ

ェニックマウスや ES 細胞, 培養細胞などでの遺伝子活性化もしくは不活化に有効に利用されている方法である. しかし効率の問題から, DNA のトランスフェクションやエレクトロポレーションによって産生される cre recombinase によって遺伝子の活性化を受ける細胞はごくわずかであり, cre-loxP システムの適応は非常に限られていた. Kanegae らは, 核移行シグナルを付加した cre 遺伝子を含む Adv を用いることによって, 培養細胞のほぼ 100% に cre による遺伝子活性化をもたらすことが可能であったと報告している (Kanegae *et al.*, 1995; Kanegae *et al.*, 1996). Sato らは Adv を用いた cre-loxP 組み換えによって, *in vitro* で神経細胞に外来性 Bcl-2 を導入する方法を述べている (Sato *et al.*, 1998). すなわち Adv を用いた cre-loxP 組み換えは, *in vitro* および *in vivo* で様々な細胞に効率よく cre recombinase によるあらゆる遺伝子操作を可能とすることが示唆される. Bcl-2 は従来癌遺伝子の蛋白産物として発見されており, 多くのヒトの悪性腫瘍において Bcl-2 発現の増加がみられ, Bcl-2 は腫瘍原性において重要な役割を果たしていることが示されている (Korsmeyer, 1992). Bcl-2 はアポトーシスに関する細胞死に対して様々な細胞を防御する点で有用であるが, Bcl-2 の過剰発現は, Bcl-2 遺伝子を導入された生物にとって有害となるかもしれない. そこで Adv を用いた cre-loxP 組み換えによる遺伝子発現の不活化のように, *in vivo* で導入された遺伝子の発現を制御することが重要であると考えられる. 今回の実験では Bcl-2 遺伝子を活性化したが, 一对の loxP 領域の位置を変更することで遺伝子を不活化することも可能である.

cre-loxP 組み換えによって発現した Bcl-2 が機能するかどうか検討するために, Bcl-2 の過剰発現が変異ヒト SOD1 遺伝子を有する初代神経細胞を STS によって誘導されるアポトーシスから防御できるかどうか観察した. Bcl-2 による細胞の生存性に関する実験の多くは, 変異 SOD1 cDNA をトランスフェクションした細胞を用いたものであり (Ghadge *et al.*, 1997; Pasinelli *et al.*, 1998), 初代神経細胞を用いた実験はわずかである (Mena *et al.*, 1997). 本実験では, 野生型の SOD1 遺伝子を有する神経細胞から分離した, 変異 SOD1 遺伝子を有する神経細胞を使用した. STS によって誘導されるアポトーシスに対する防御効果に関しては, 両細胞間で明らかな差はみられなかったが, 野生型の SOD1 遺伝子を有する神経細胞および変異 SOD1 遺伝子を有する神経細胞について, 様々なアポトーシス誘導刺激や条件下での Bcl-2 の過剰発現によ

る防御効果の差異についても検討する必要があると考えている。

われわれは、遺伝子を導入するためのルートとしての逆行性軸索輸送の可能性を検討した。もっとも重要な疑問は、G93A マウスの舌筋に注入後、2種のAdv (AxCALNLBcl-2, AxCANCre) が同一の運動ニューロンに逆行性に輸送され、Bcl-2 遺伝子を発現するのかどうかということである。Bcl-2 は舌下神経核に検出され、AxCALNLBcl-2 および AxCANCre の逆行性軸索輸送の結果、舌下神経核において cre recombinase によって Bcl-2 の発現をもたらしたと考えられた。Adv の逆行性輸送によって運動ニューロンに LacZ のようなレポーター遺伝子を導入したと報告しているグループはいくつかあるが (Finiels *et al.*, 1995; Ghadge *et al.*, 1995; Warita *et al.*, 1998), 遺伝子導入のルートとしての逆行性軸索輸送は、特に運動ニューロン疾患においてもっとも魅力的な方法の一つであるように思われる。以前の報告のように、脊髄運動ニューロンへの直接的な遺伝子導入 (Azzouz *et al.*, 2000) は、ALS を含む運動ニューロン疾患の遺伝子治療をヒトに臨床応用するには侵襲的である。そこで運動ニューロン死を防御する可能性を調査するための外来性 Bcl-2 を導入するために、Adv の逆行性輸送を利用した。

ALS が運動ニューロンの変性をきたす機序は不明である。運動ニューロンの機能異常が運動ニューロンの消失を引き起こすのか、それともミクログリアやアストロサイトなどの非ニューロンの細胞の関与が運動ニューロン死に必要なのかということも明らかではない。Bruijn らは、他の変異 SOD1 トランスジェニックマウスである G85R マウスについて、アストロサイトの直接的な傷害がほぼ同時に運動ニューロン変性をもたらすと報告しており、一次的な標的としてアストロサイトを示唆している (Bruijn *et al.*, 1997)。Pramatarova らは、ニューロン特異的に G37R 変異 SOD1 を発現させたマウスでは表現型を呈さないことを報告し、運動ニューロンにおける変異蛋白の存在は、神経変性疾患の発症には十分ではないという仮説を支持している (Pramatarova *et al.*, 2001)。Gong らは、アストロサイトへの G86R 変異 SOD1 の選択的発現は、アストロサイトの増生をきたすが、運動ニューロン変性は引き起こさないことを発見した (Gong *et al.*, 2000)。G93A マウスの舌下神経核への Bcl-2 の選択的発現が脳幹部の反応性アストロサイトの増生を抑制したというわれわれの結果は、運動ニューロンが疾患発症において一次的な標的であること、またアストロサイトの反応はそれに続く二次的な現象であることを示唆するのかもしれ

ない。これらの所見の違いは、それぞれの研究者が用いた変異 SOD1 トランスジェニックマウスのラインの違いを反映しているのかもしれない。

AxCALNLBcl-2 および AxCANCre を舌筋注入後、外来性 Bcl-2 の発現は明らかに経時的に減少し、注入後 15 週ではほぼ内在性 Bcl-2 のベースラインまで低下したが、注入 15 週後でさえも G93A マウスの脳幹部では組み換え Bcl-2 DNA フラグメントが検出された。注入 15 週後に外来性 Bcl-2 が継続して発現しているかどうかは不明であるが、Adv による Bcl-2 発現は舌下神経核の感染した運動ニューロンのみならず、おそらく非感染運動ニューロンについても、神経変性から防御した。Haase らは、Adv による neurotrophin-3 (NT-3) の遺伝子導入によって、pnn1 マウスの注入した筋線維のみならず、非注入筋線維など注入部位より離れた部位においても実質的な治療効果を認めたと報告している(Haase *et al.*, 1997)。この治療効果は本質的には、注入した筋線維での NT-3 の高レベルの産生とともに、全身循環によって輸送され、末梢で栄養因子が作用すると共に、運動ニューロンに逆行性軸索輸送されることによって作用すると推測されている。われわれの結果では、使用した免疫染色の検出感度以下で Bcl-2 が発現している運動ニューロンが存在している可能性や、舌下神経核で外来性 Bcl-2 が発現している運動ニューロンが何らかの周辺効果によって非感染運動ニューロンを保護するような影響を及ぼす可能性が考えられる。

われわれの知る限りでは、本研究は Adv の逆行性軸索輸送を用いて Bcl-2 を発現させることによって G93A マウスの舌下神経核の運動ニューロンに保護効果をもたらした最初の報告である。

9. 結語

Bcl-2 などの抗アポトーシス因子や神経栄養因子、興奮性アミノ酸阻害因子などの特定遺伝子を導入部位のみならず逆行性輸送部位で遺伝子発現させることと、cre-loxP 発現調節系を組み合わせることによって、ALS などの運動ニューロン疾患の遺伝子治療に大きな寄与をもたらすものと考えられる。

10. 図表およびその説明

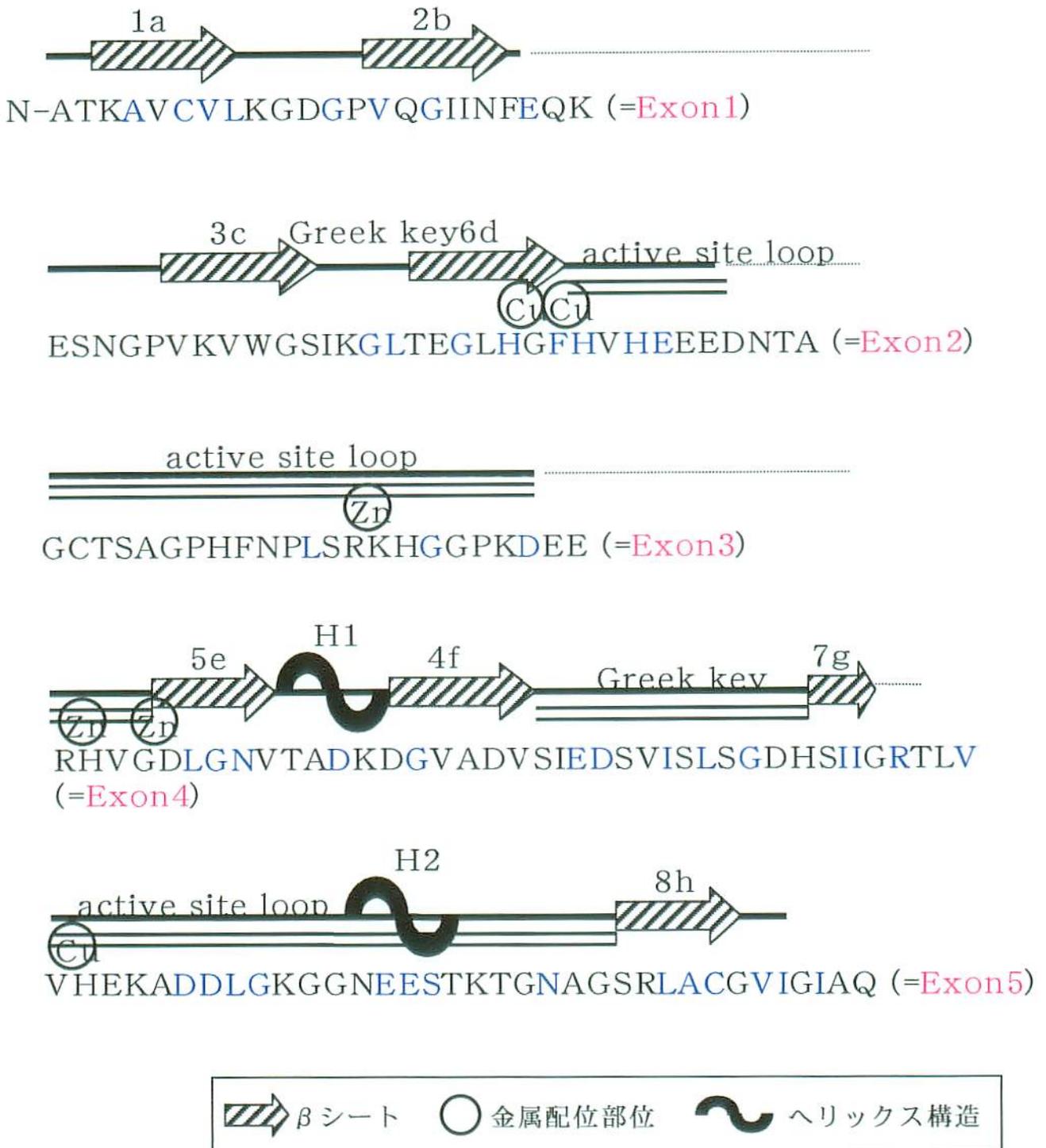


図1 ヒト正常SOD1のアミノ酸配列とドメイン，モチーフおよびアミノ酸変異部位。エクソン1-5のすべて，またドメイン，モチーフに関係なくアミノ酸変異が存在する。

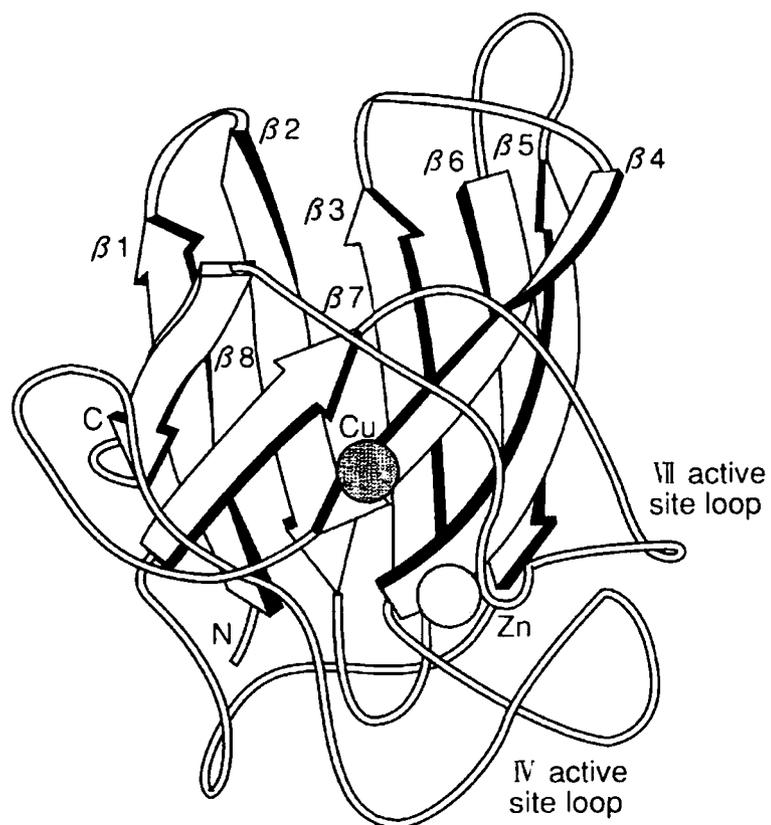


図2 SOD1の構造.

8本の β 鎖と3カ所のループから構成される β パレル構造をとる. 分子内に活性の発現に必須なCuと, 活性には直接関係しないが, 構造維持に重要なZnをそれぞれ1分子ずつ含む.

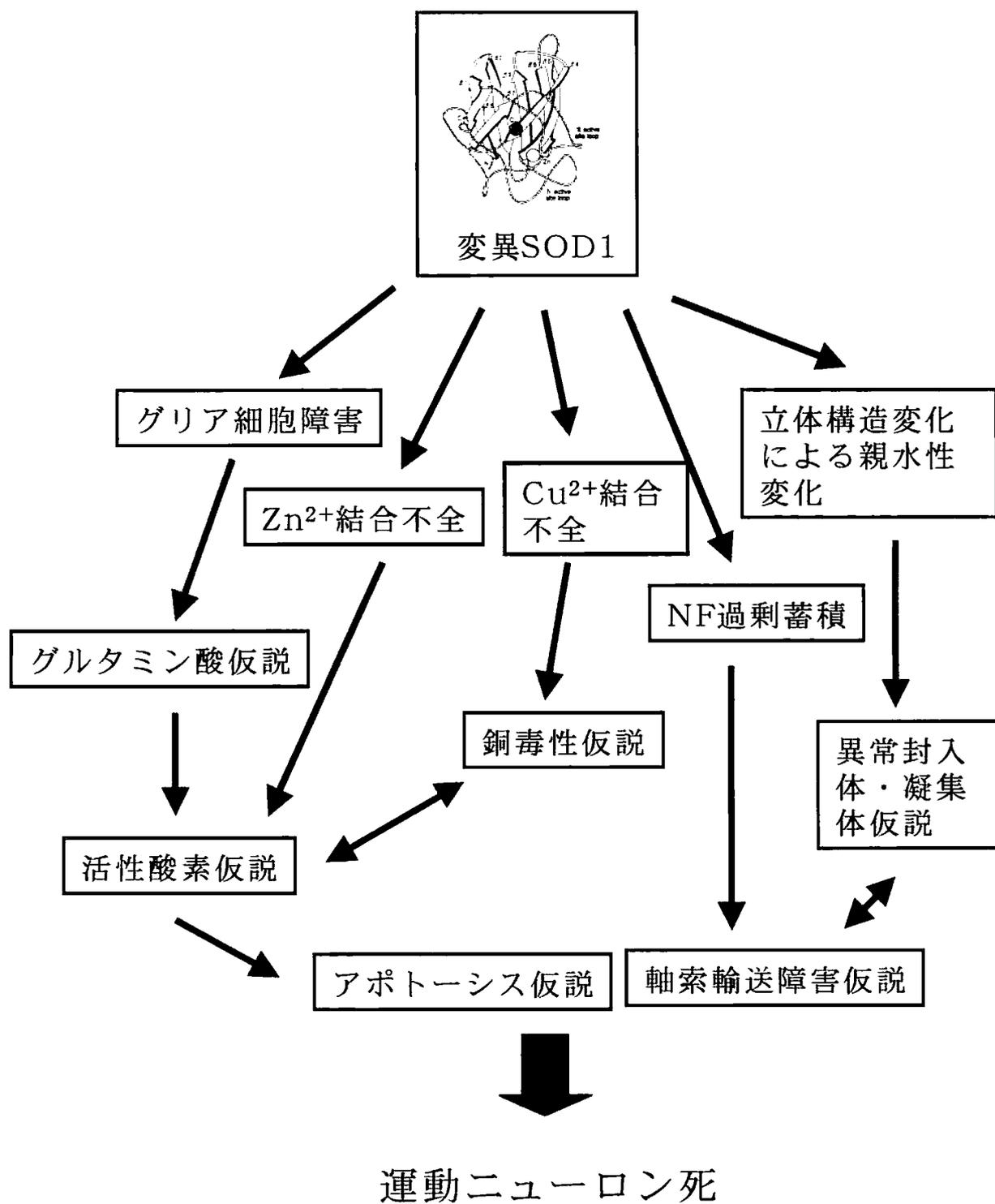


図3 変異SOD1による運動ニューロン死の機序仮説.

1. モデルマウスへの投薬が有効であったもの

1) 変異SOD1マウス

D-ペニシラミン
リルゾール (riluzole)
ギャバペンチン (gabapentin)
ビタミンE
N-アセチル-L-システイン
クレアチン
GDNF

2) wobblersマウス

7-ニトロインダゾール (nNOS阻害薬)
N-アセチル-L-システイン
インスリン様成長因子 (IGF-1)

3) pmnマウス

CNTF
BDNF
NT-3

2. 変異SOD1マウスとの交配によって有効であったトランスジェニックマウス

Bcl-2
変異カスパー-1 (DN caspase-1)
NF-H (neurotrophin-3)

3. 臨床薬

1) 臨床使用可能薬剤

リルゾール

2) 治験中

トピラメート (topiramate; GABA賦活剤)
クレアチン
ミノサイクリン (NOS, カスパー阻害薬)
ブスピロン (buspirone; 神経栄養因子類似薬)

表1 ALS治療進歩の現状.

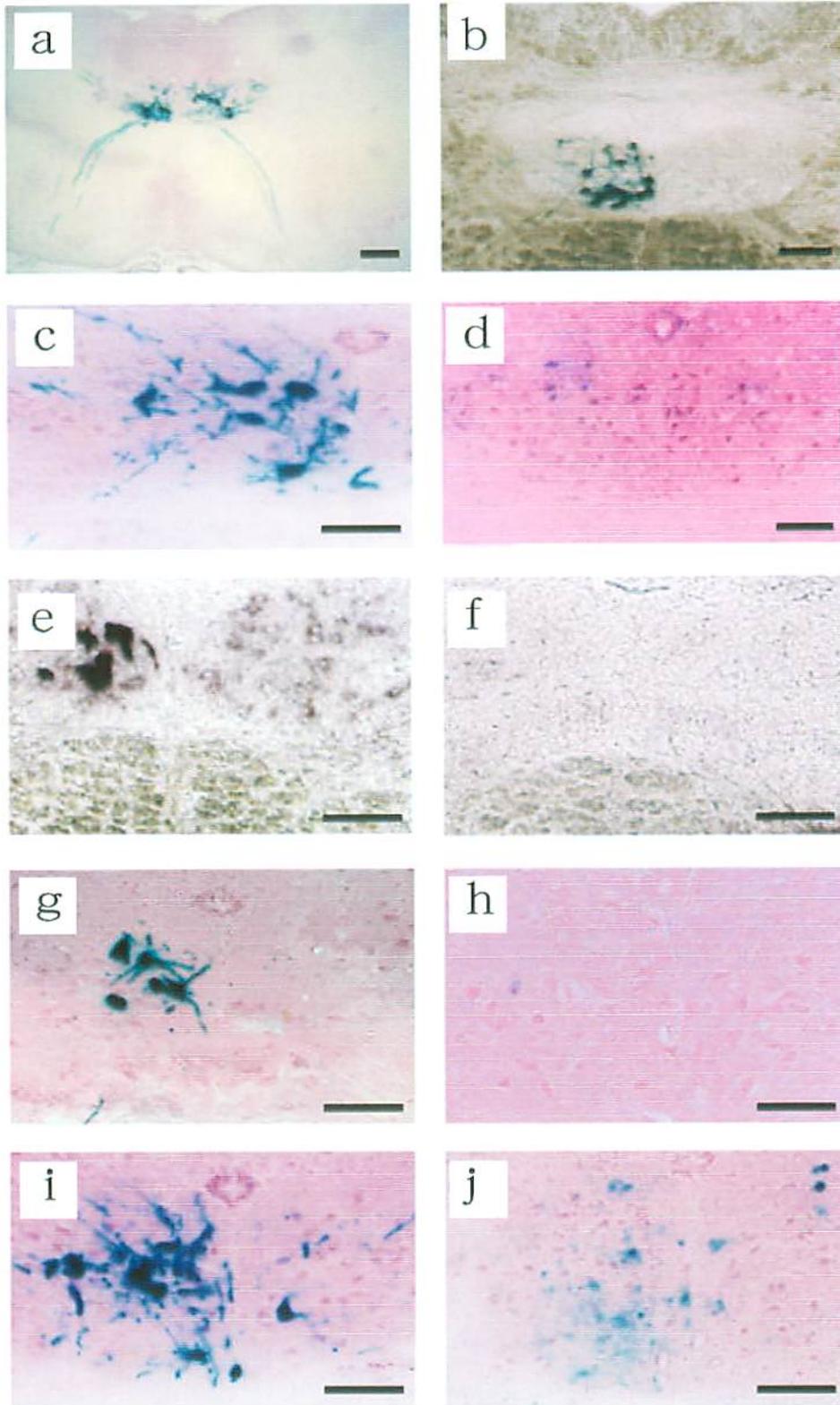


図 4. 脳幹部組織化学および *in situ* hybridization

AdLacZ は舌の中央(a)および右側(b-j)に注入し, X-gal 染色は, 脳幹部切片の β -gal 活性を検出するために行った. a, c-d, g-j では H&E 染色で対比染色を行った. (a, b)7 週齢および 24 週齢正常対照マウス ; (c, d)16 週齢および 37 週齢 G93A マウス. (e, f) LacZ RNA プローブを用いた 14 週齢正常対照マウス脳幹部切片の *in situ* hybridization. (e)アンチセンス LacZ RNA プローブを用いたとき, 右側舌下神経核の運動ニューロンに LacZ mRNA を検出した. (f)センス LacZ RNA プローブを用いると, シグナルを検出しなかった. (g, h) 16 週齢時に AdLacZ を注入後, 1 および 4 週後に観察した 17 週齢および 20 週齢の正常対照マウス. (i, j) 16 週齢時に AdLacZ を注入後, 1 および 2 週後に観察した 17 週齢および 18 週齢の G93A マウス. スケールバー=50 μ m.

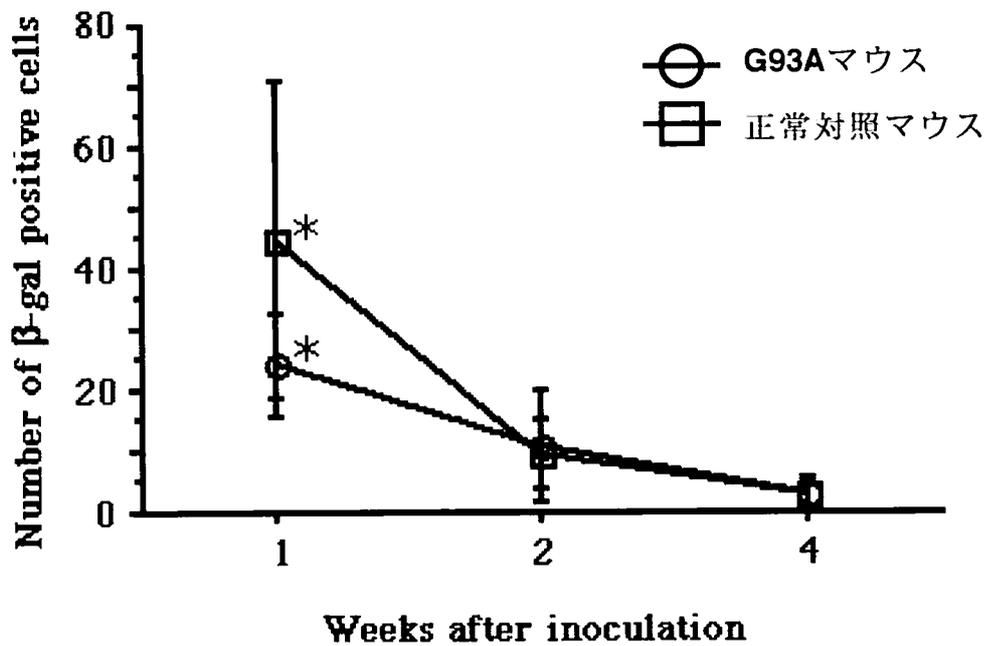


図 5. 脳幹部舌下神経核の β -gal 陽性細胞の時間的経過。
 AdLacZ を舌筋注入後 1, 2, および 4 週後の 17-28 週齢のマウスについて、注入 1 週後 13 匹 (G93A マウス 7 匹, 正常対照マウス 6 匹), 2 週後 9 匹 (G93A マウス 5 匹, 正常対照マウス 4 匹), および 4 週後 6 匹 (G93A マウス 3 匹, 正常対照マウス 3 匹) を観察した。データは平均値 \pm 標準偏差であり, *は注入後 1 週と 2 週, および注入後 1 週と 4 週の有意差 ($P < 0.01$) を示した。

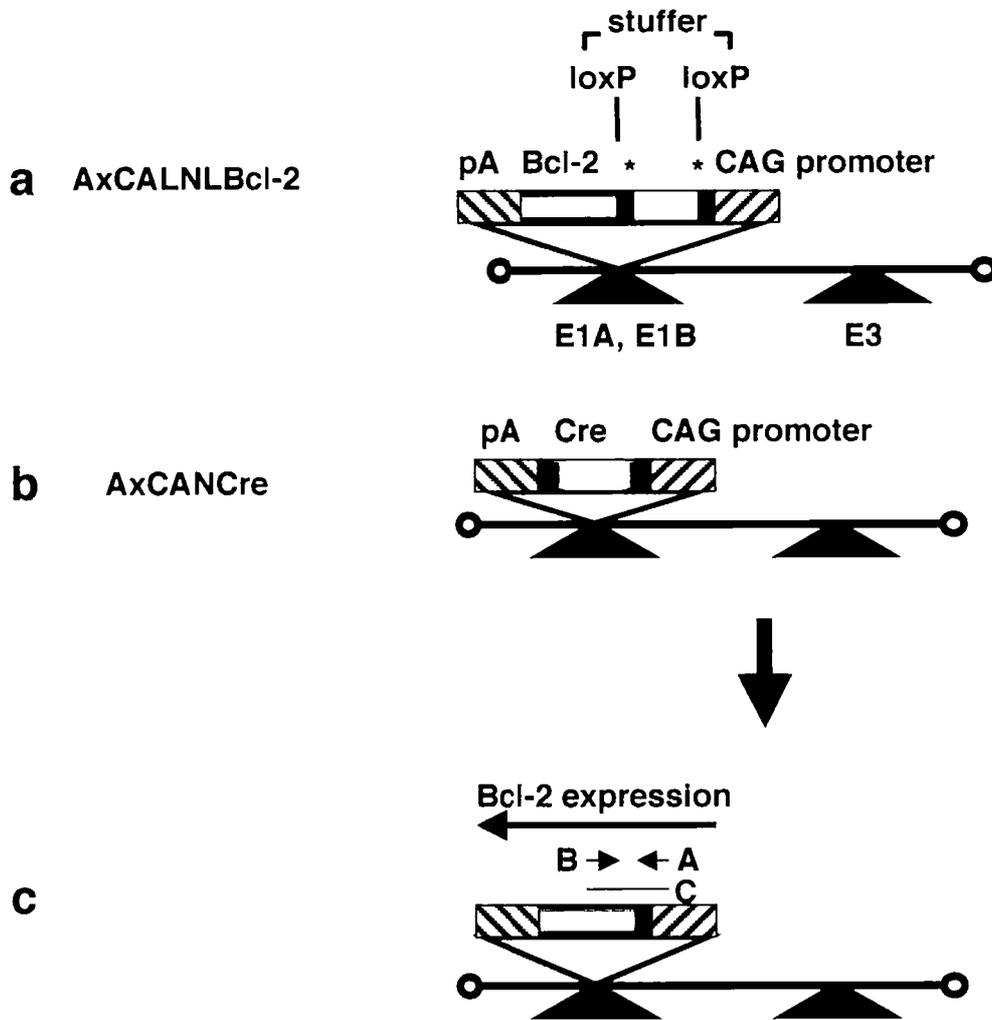
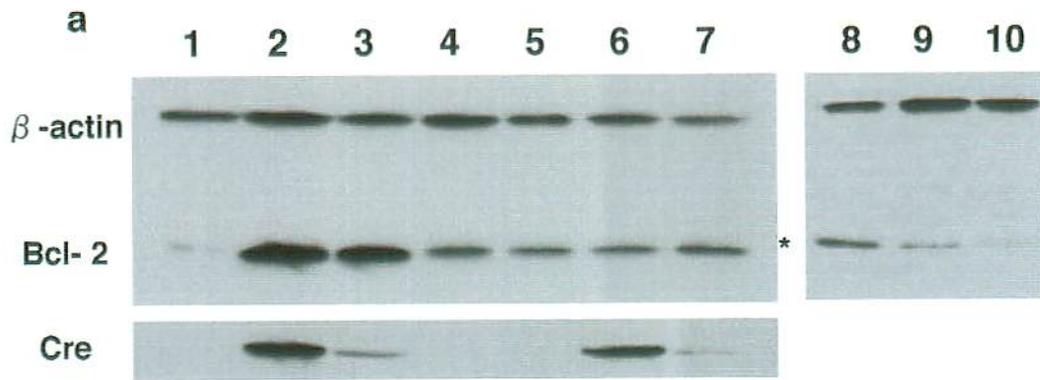


図 6. (a-c) Bcl-2 分子スイッチを含むアデノウイルスベクター(AxCALNLBcl-2)と cre recombinase を発現するアデノウイルスベクター(AxCANCre)の構造, および cre-loxP システムによる外来性 Bcl-2 の活性化方法.

AxCALNLBcl-2 では, CAG プロモーターとコードされた領域の間に存在するスタッファー領域 (neo 耐性遺伝子) によって Bcl-2 の発現が抑制されている(a). スタッファー領域は, cre 特異的認識配列である一対の loxP 領域の間に存在し, AxCANCre(b) 由来の cre recombinase によって切り出され, Bcl-2 発現ユニットが機能する(c). 三角形で示される E1A, E1B, および E3 は, 複製能力欠損アデノウイルスベクター中の 5 型アデノウイルスゲノムの欠損部位を表している. 矢印 A および B は, 組み換え後の Bcl-2 DNA を増幅するプライマーを示しており, 線 C は, 図 11 の実験で用いるプローブの配列を表している. NLS, SV40 T 抗原由来の核移行シグナル; pA, ウサギ β -globin のポリ A シグナル; *, loxP 領域.



AxCANCre	0	1	0.1	0	0	1	0.1	1	0.1	0
AxCALNLBcl-2	0	50	5	50	5	0	0	50	5	50

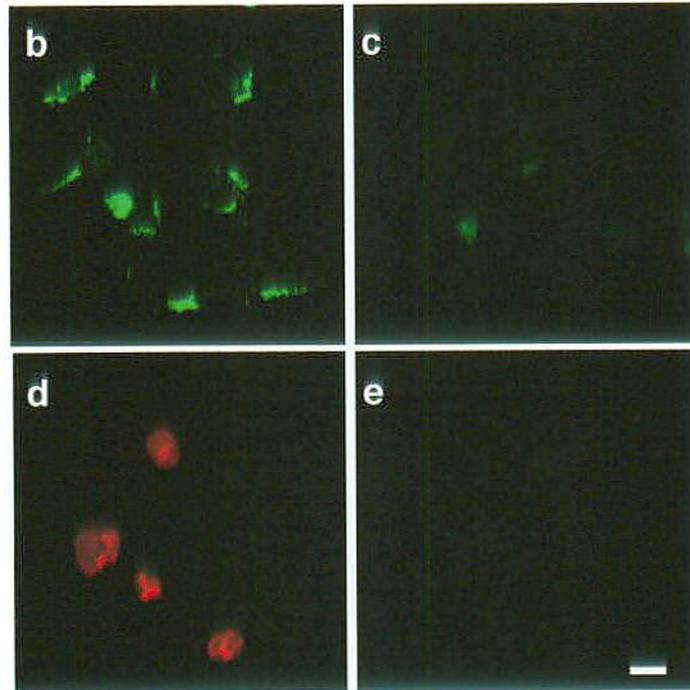


図 7. COS7 細胞での Bcl-2 発現

(a) AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 感染時の COS7 細胞における Bcl-2 および cre recombinase のウェスタンブロット法による発現解析。
感染時のそれぞれのウイルスの MOI をフィギア下部に示す (レーン 1-10)。
十分な cre recombinase が発現しているときのみ, Bcl-2 蛋白は過剰発現した。
*は, 内在性 Bcl-2 を表す。内在性 Bcl-2 に対する外来性 Bcl-2 の比を定量化するために, 3 回実験を行い, 代表的なデータをレーン 8-10 に示した。外来性 Bcl-2(Ix), 内在性 Bcl-2(In), および β -アクチン(Ia)のそれぞれのレーンのバンド強度をデンシトメトリーを用いて測定し, 内在性 Bcl-2 に対する外来性 Bcl-2 の比を $(Ix/Ia - In/Ia)/(In/Ia)$ として算出した。内在性 Bcl-2 に対する外来性 Bcl-2 の平均比は, 50MOI の AxCALNLBcl-2 および 1MOI の AxCANCre 感染時は 9.0 であり, 5MOI の AxCALNLBcl-2 および 0.1MOI の AxCANCre 感染時は 2.2 であった。

AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 共感染時の COS7 細胞における Bcl-2(b) および cre recombinase(d)の免疫蛍光染色。

50MOI の AxCALNLBcl-2 および 1MOI の AxCANCre 感染時, COS7 細胞の細胞質に Bcl-2(b), 核に cre recombinase(d)の過剰発現を認めた。50MOI の AxCALNLBcl-2 のみの感染時にはごくわずかの Bcl-2 シグナルを検出し(c), 未感染の COS7 細胞では Bcl-2 シグナルを検出しなかった(e)。スケールバー=15 μ m。

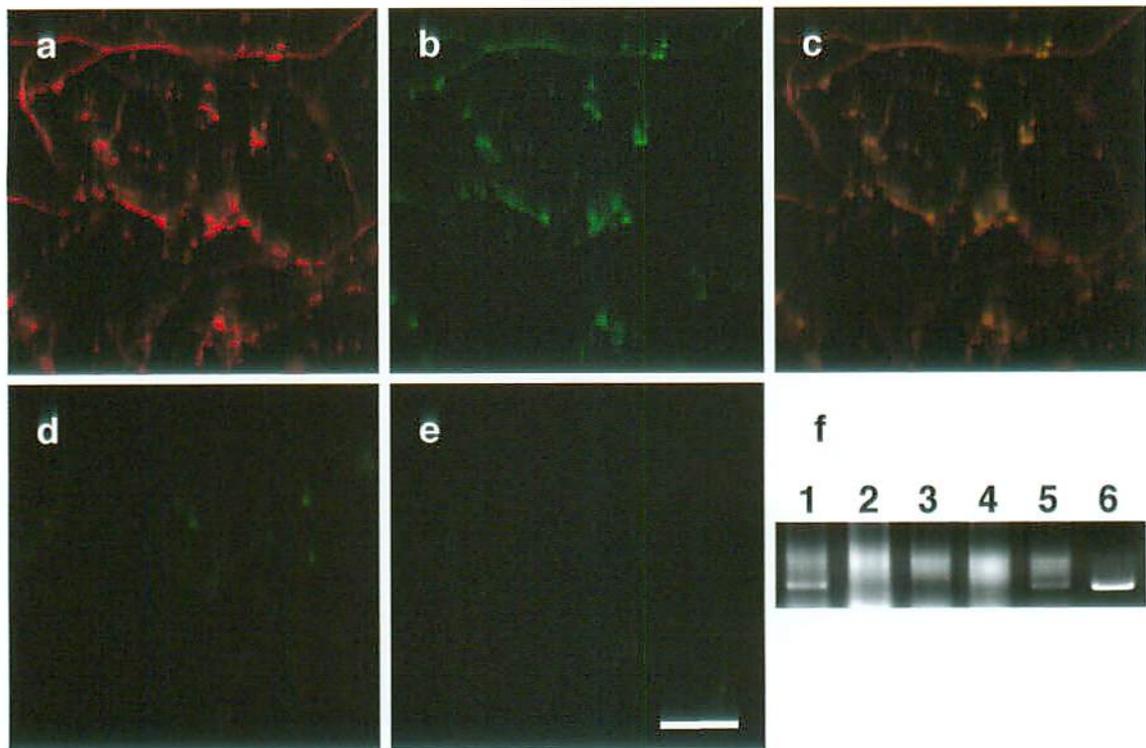


図 8. 初代神経細胞における Bcl-2 の免疫蛍光染色.

(a-e) 50MOI の AxCALNLBcl-2 および 1MOI の AxCANCre 感染後の、変異 SOD1 を有する初代神経細胞の MAP-2 (a) および Bcl-2 (b) 免疫染色.

AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 感染後、マージされた画像(c)で示されるように、Bcl-2 蛋白はほとんどすべての神経細胞において検出された. 50MOI の AxCALNLBcl-2 のみ感染時(d), もしくは未感染(e)の初代神経細胞ではごくわずかの Bcl-2 シグナルを検出するのみであった. スケールバー=25 μ m.

(f)胎仔抽出 DNA からの変異 SOD1 遺伝子解析. レーン 1 および 5 は変異 SOD1 陽性胎仔であり, レーン 6 は G93A マウス由来の陽性コントロールである.

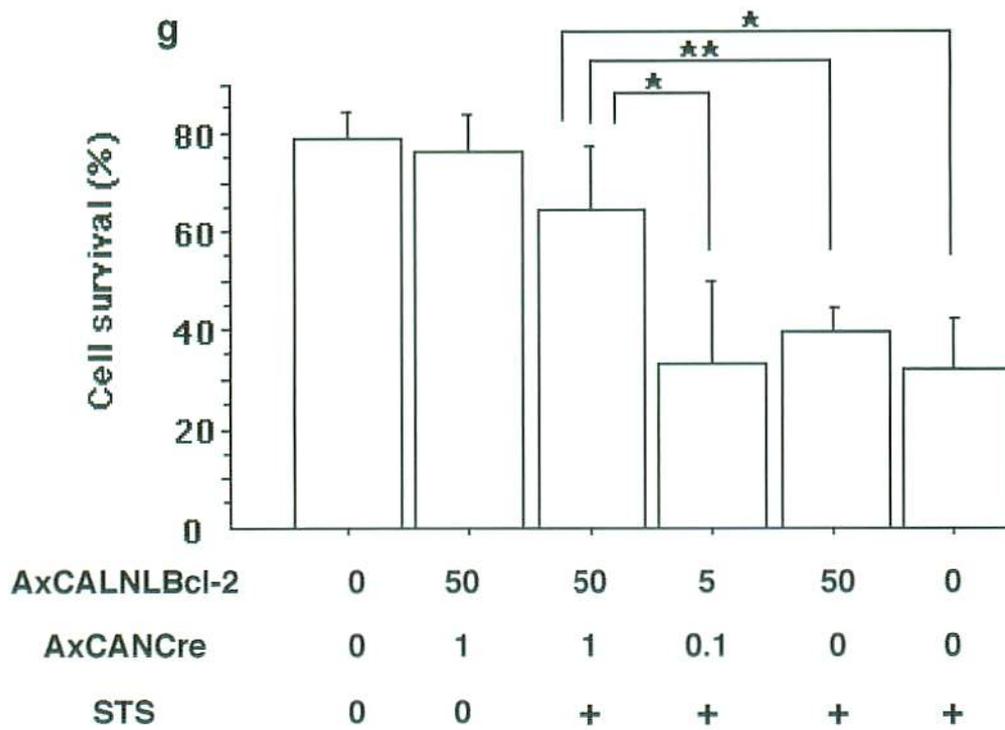
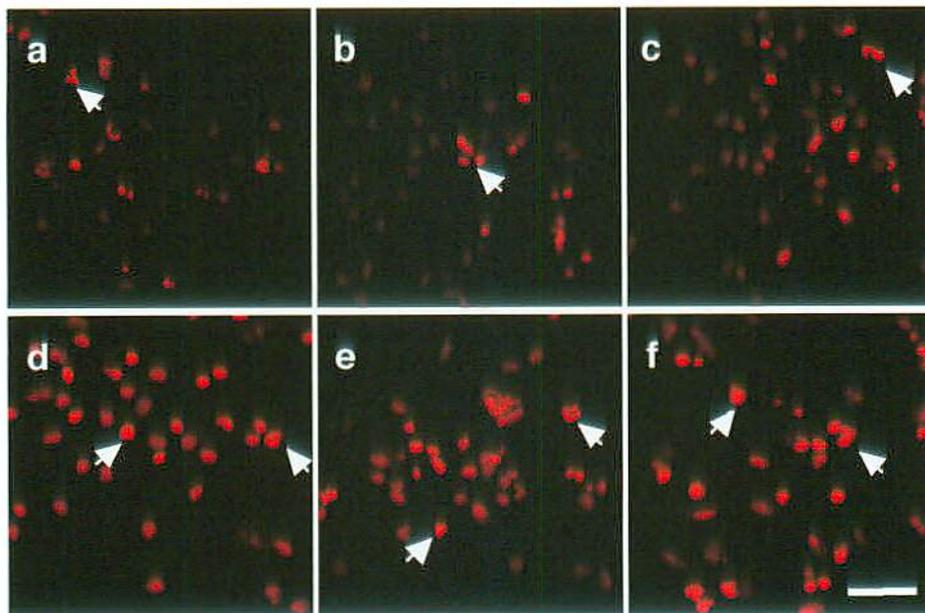


図 9. Bcl-2 発現初代神経細胞の抗アポトーシス効果

(a-f) AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 感染後, もしくは AxCALNLBcl-2 のみ感染後, STS 処置した神経細胞でのアポトーシスの検出. すべてのパネルは, 死細胞を検出する propidium iodide の蛍光顕微鏡所見である. 矢印は典型的なアポトーシス細胞を示す. (a)コントロールとして用いた未処置初代神経細胞, (b) STS 未処置の 50MOI の AxCALNLBcl-2 および 1MOI の AxCANCre 感染細胞, (c) 50MOI の AxCALNLBcl-2 および 1MOI の AxCANCre 感染後, STS 処置した細胞, (d) 5MOI の AxCALNLBcl-2 および 0.1MOI の AxCANCre 感染後, STS 処置した細胞, (e) 50MOI の AxCALNLBcl-2 のみ感染後, STS 処置した細胞, (f) STS 処置のみ行った細胞. スケールバー=25 μ m. (g)核の赤染も核クロマチンの濃縮もみとめない生細胞を, それぞれのグループの任意の 5 視野について観察し, 全細胞数に対する生細胞の比率を表示した. 全てのデータは, 3 回の実験の平均値である. *, $P < 0.001$, **, $P = 0.01$.

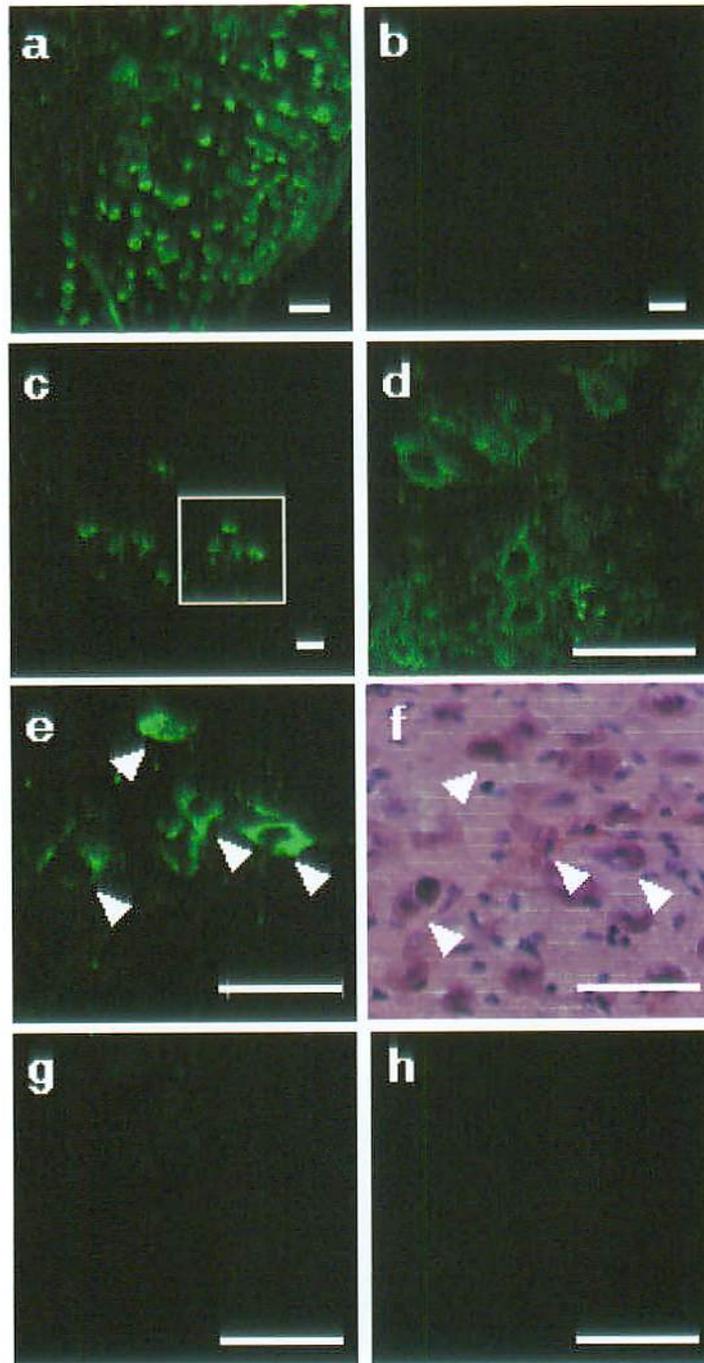


図 10. 変異 SOD1 マウスの舌筋および舌下神経核における Bcl-2 遺伝子発現.

AxCALNLBcl-2 に続いて AxCANCre 注入後(a, c-f), もしくは AxCALNLBcl-2 のみ注入後(b, g), もしくは未注入(h)の, G93A マウス(a, c, e-h)および正常対照マウス(b, d)の舌筋線維(a, b)および舌下神経核(c-h)の Bcl-2 の免疫蛍光染色. (e) は, (c)の強拡大像である. (e, f)は, それぞれ Bcl-2 免疫蛍光染色(e)および H&E 染色(f)を行った同一切片の同一視野である. これらの Bcl-2 陽性細胞は, H&E 染色で示されるように舌下神経核の大型運動ニューロンである. スケールバー=50 μ m.

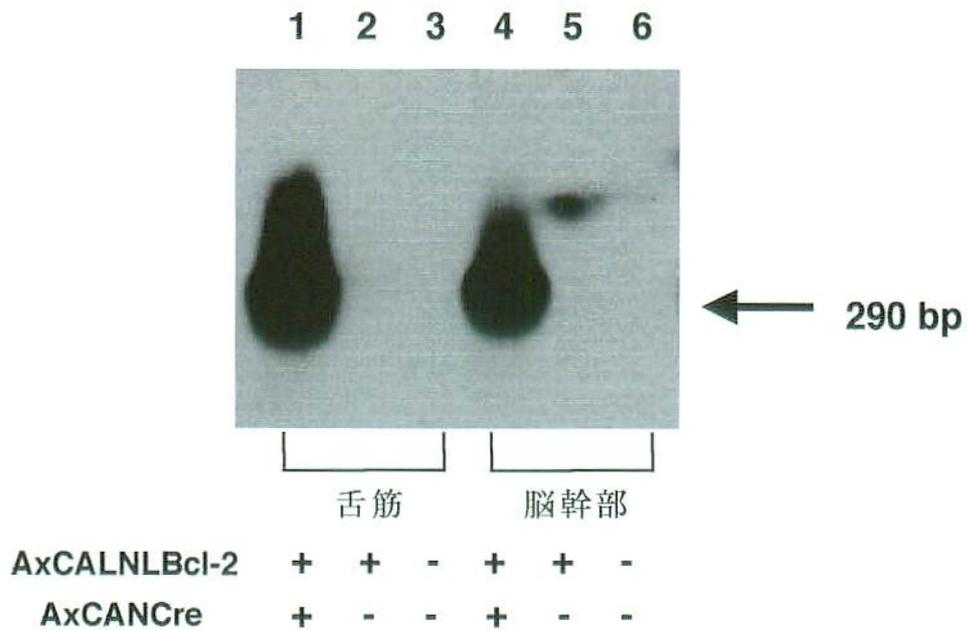


図 11. 舌筋および脳幹部での cre-loxP 組み換え後の 290-bp の Bcl-2 DNA フラグメントの検出.

G93A マウスの舌筋 (レーン 1) および脳幹部 (レーン 4) 由来の Bcl-2 DNA フラグメントは, 舌筋に AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 注入 2 日後に検出された. レーン 2: AxCALNLBcl-2 のみ注入後の舌筋切片, レーン 3: 未注入の舌筋切片, レーン 5: AxCALNLBcl-2 のみ注入後の脳幹部切片, レーン 6: 未注入の脳幹部切片. このプロットは, それぞれのグループから 5 匹ずつ行った実験の代表的なデータである.

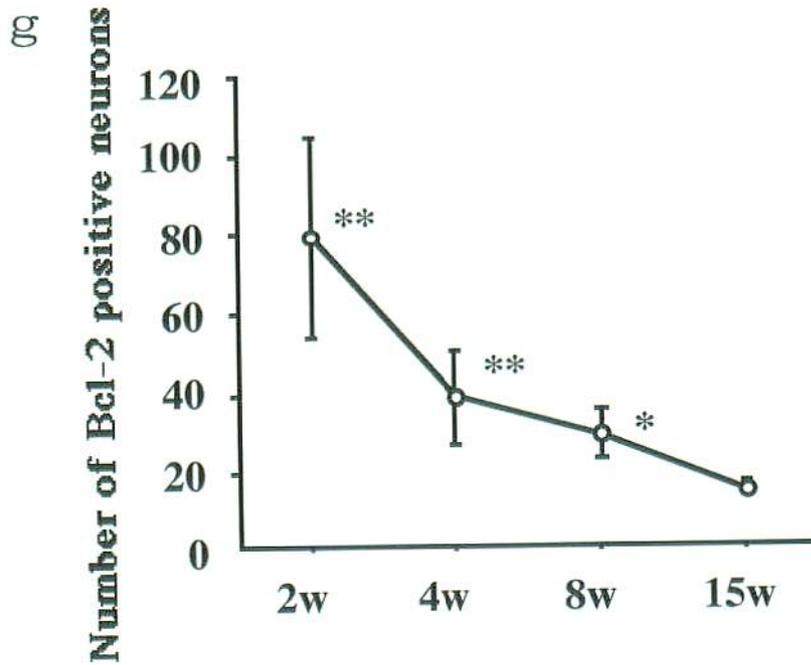
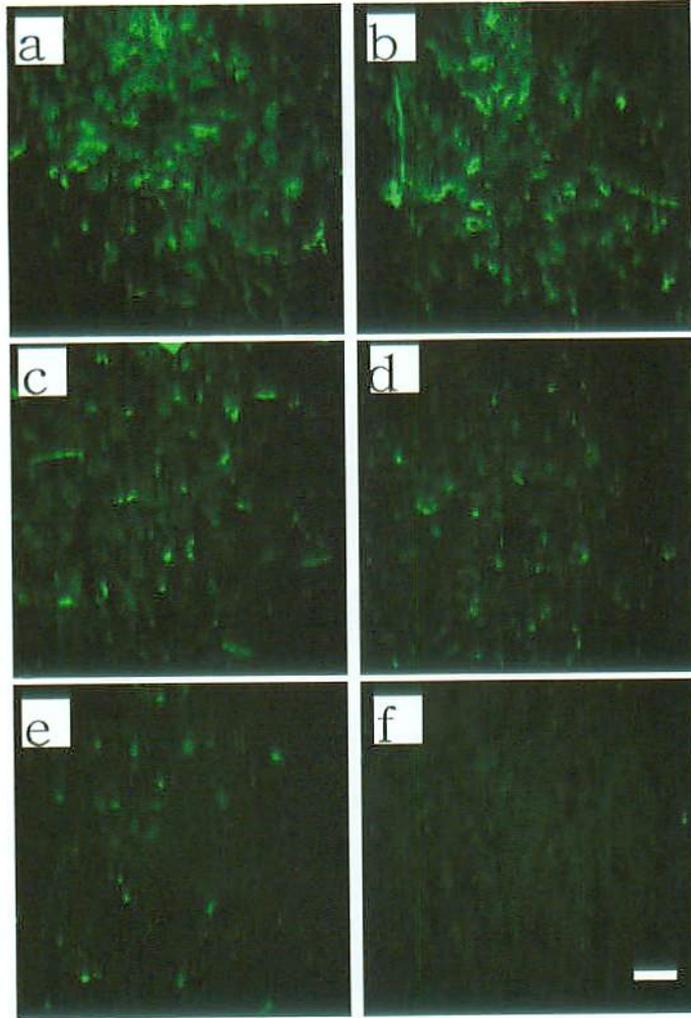


図 12. 変異 SOD1 マウスの舌下神経核における Bcl-2 遺伝子発現の経時変化

AxCALNLBcl-2 に引き続いて AxCANCre を注入後, 2 (a), 4 (b), 8 (c), および 15 (d)週後の延髄舌下神経核の Bcl-2 免疫蛍光染色. AxCALNLBcl-2 のみ舌筋注入後(e), もしくは未注入(f)の脳幹部切片では, 抗ヒト Bcl-2 抗体に対してかすかにシグナルを検出した. スケールバー=50 μ m (g)舌下神経核の Bcl-2 陽性ニューロンの経時的変化. それぞれのグループから3匹ずつ, それぞれ5切片のBcl-2免疫染色標本について細胞数を計測した. AxCALNLBcl-2に引き続いてAxCANCreを注入後, 2, 4, 8, および15週後のG93AマウスのBcl-2陽性ニューロンの数は, それぞれ79 \pm 25, 39 \pm 12, 30 \pm 6, および16 \pm 2であるが, AxCALNLBcl-2のみ注入したG93Aマウスおよび正常対照マウスは, それぞれ9 \pm 3, 4 \pm 1であった. 両ベクターを注入したG93Aマウスと正常対照マウスの間で, 統計学的比較を行った. *, P<0.05, **, P<0.01.

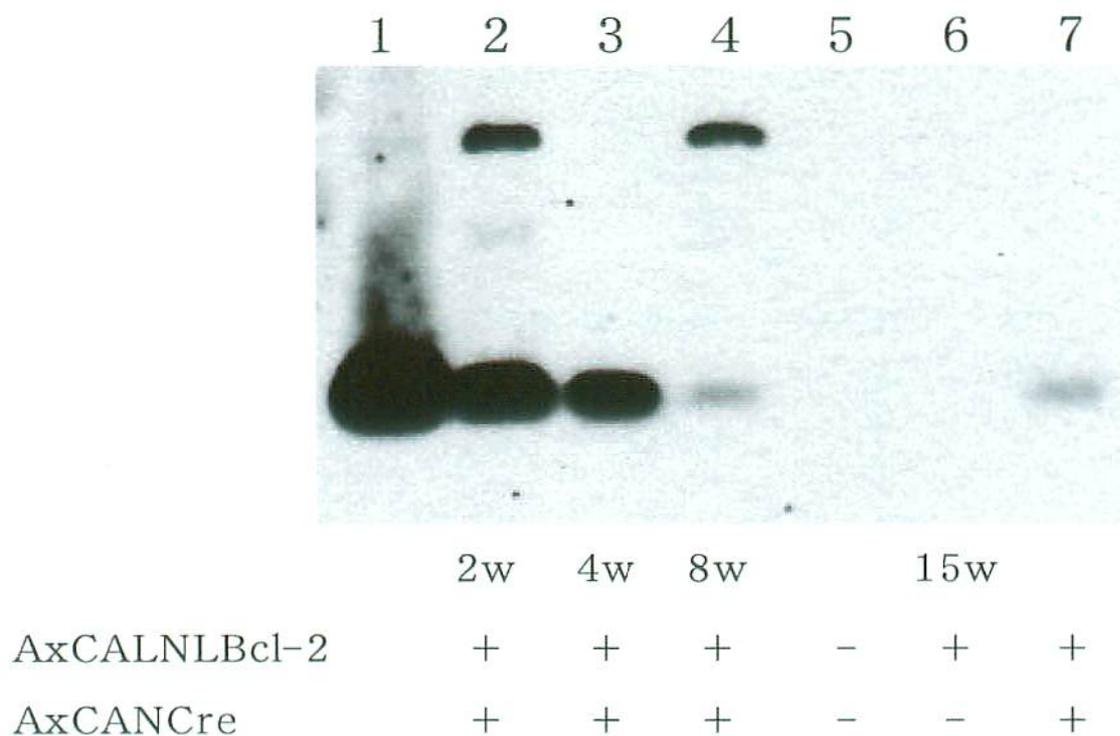


図 13. AxCANNLBcl-2 および AxCANCre 注入 2 (レーン 2), 4 (レーン 3), 8 (レーン 4), 15 (レーン 7) 週後, および AxCANNLBcl-2 のみの注入 15 週後 (レーン 6), 未注入マウス (レーン 5) の脳幹部切片での cre-loxP 組み換え後の 290-bp の Bcl-2 DNA フラグメントの検出.

約 1000bp のバンドは非組み換え Adv 由来と考えられる.

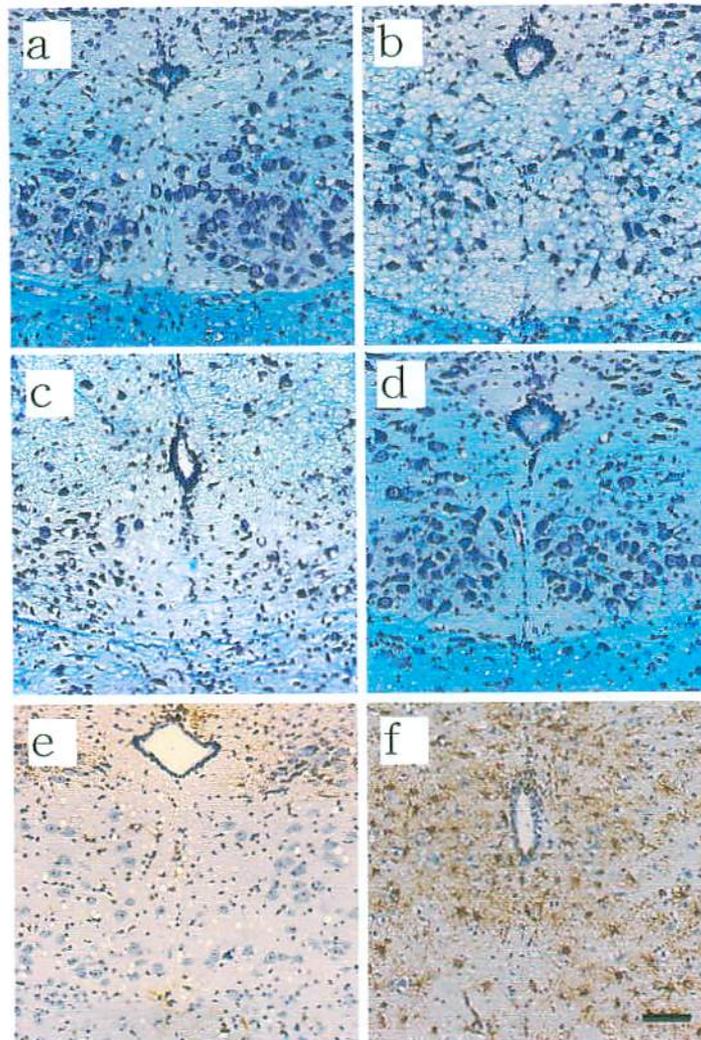


図 14. (a-f) 25 週齢のそれぞれのグループのマウスの延髄舌下神経核の代表的顕微鏡所見. AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 注入後 G93A マウス(a), AxCALNLBcl-2 のみ注入後 G93A マウス(b), 未注入 G93A マウス(c), および正常対照マウス(d)の脳幹部切片は, Kluver-Barrera 染色を行った. GFAP 免疫染色では, 未注入 G93A マウス(f)に比較して, 両ベクター注入 G93A マウス(e)の舌下神経核では明らかに反応性アストロサイトの増生が抑制されていた. スケールバー=100 μ m

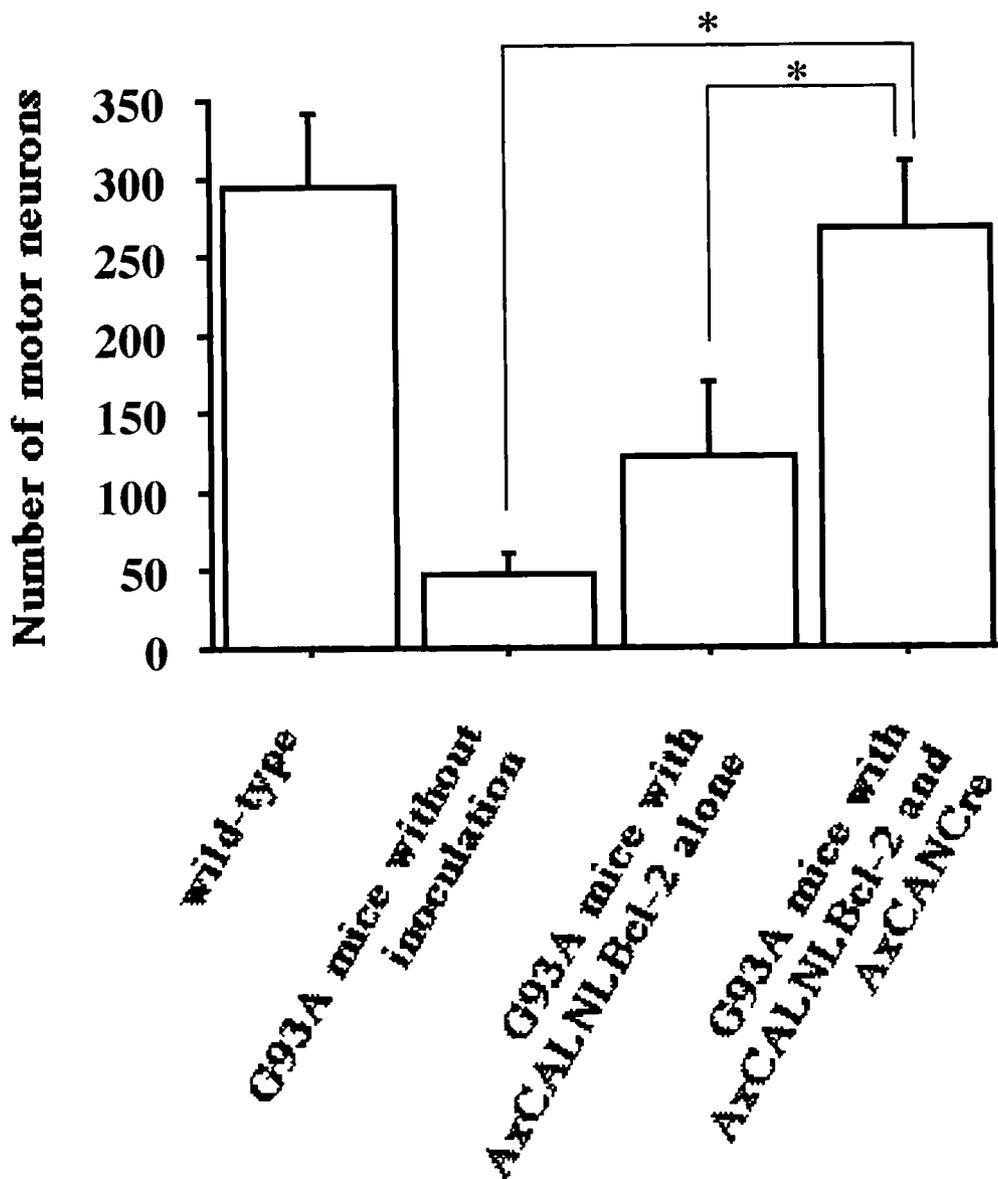


図15. 25週齢の各群のマウスの延髄舌下神経核の神経数の定量的比較.

G93A マウスの各群, すなわち AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 注入群, AxCALNLBcl-2 のみ注入群, 未注入群および正常対照マウスについて, それぞれ 3 匹ずつ計測した. AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 注入群の運動ニューロン数($n=267 \pm 42$)は, AxCALNLBcl-2 のみ注入群($n=121 \pm 48$)や未注入群($n=47 \pm 13$)より有意に残存していた. 正常対照マウスの運動ニューロン数は, 295 ± 47 であった. *, $P < 0.01$.

11. 参考文献

- Abe, K., Pan, L. H., Watanabe, M., Kato, T. and Itoyama, Y. Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 199: 152-154, 1995.
- Al-Chalabi, A., Andersen, P. M., Nilsson, P., Chioza, B., Andersson, J. L., Russ, C., Shaw, C. E., Powell, J. F. and Leigh, P. N. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 8: 157-164, 1999.
- Anderson, W. F. Human gene therapy. *Nature.* 392: 25-30, 1998.
- Andreassen, O. A., Dedeoglu, A., Klivenyi, P., Beal, M. F. and Bush, A. I. N-acetyl-L-cysteine improves survival and preserves motor performance in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport.* 11: 2491-2493, 2000.
- Azzouz, M., Hottinger, A., Paterna, J. C., Zurn, A. D., Aebischer, P. and Bueler, H. Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum Mol Genet.* 9: 803-811, 2000.
- Bensimon, G., Lacomblez, L. and Meininger, V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med.* 330: 585-591, 1994.
- Benvenisty, N. and Reshef, L. Direct introduction of genes into rats and expression of the genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 9551-9555, 1986.
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P. and et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science.* 270: 475-480, 1995.
- Broadwell, R. D. and Brightman, M. W. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol.* 166: 257-283, 1976.

- Brujin, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sisodia, S. S., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Price, D. L. and Cleveland, D. W. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*. 18: 327-338, 1997.
- Byrnes, A. P., Rusby, J. E., Wood, M. J. and Charlton, H. M. Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain. *Neuroscience*. 66: 1015-1024, 1995.
- Casareno, R. L., Waggoner, D. and Gitlin, J. D. The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 273: 23625-23628, 1998.
- Chance, P. F., Rabin, B. A., Ryan, S. G., Ding, Y., Scavina, M., Crain, B., Griffin, J. W. and Cornblath, D. R. Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. *Am J Hum Genet*. 62: 633-640, 1998.
- Costantini, L. C., Bakowska, J. C., Breakefield, X. O. and Isacson, O. Gene therapy in the CNS. *Gene Ther*. 7: 93-109, 2000.
- Dal Canto, M. C. and Gurney, M. E. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol*. 145: 1271-1279, 1994.
- Dubensky, T. W., Campbell, B. A. and Villarreal, L. P. Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81: 7529-7533, 1984.
- Durham, H. D., Roy, J., Dong, L. and Figlewicz, D. A. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol*. 56: 523-530, 1997.
- Fabian, R. H. and Petroff, G. Intraneuronal IgG in the central nervous system: uptake by retrograde axonal transport. *Neurology*. 37: 1780-1784, 1987.
- Ferrante, R. J., Shinobu, L. A., Schulz, J. B., Matthews, R. T., Thomas, C. E., Kowall, N. W., Gurney, M. E. and Beal, M. F. Increased 3-

- nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Ann Neurol.* 42: 326-334, 1997.
- Finiels, F., Gimenez y Ribotta, M., Barkats, M., Samolyk, M. L., Robert, J. J., Privat, A., Revah, F. and Mallet, J. Specific and efficient gene transfer strategy offers new potentialities for the treatment of motor neurone diseases. *Neuroreport.* 7: 373-378, 1995.
- Friedlander, R. M., Brown, R. H., Gagliardini, V., Wang, J. and Yuan, J. Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature.* 388: 31, 1997.
- Ghadge, G. D., Lee, J. P., Bindokas, V. P., Jordan, J., Ma, L., Miller, R. J. and Roos, R. P. Mutant superoxide dismutase-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis: molecular mechanisms of neuronal death and protection. *J Neurosci.* 17: 8756-8766, 1997.
- Ghadge, G. D., Roos, R. P., Kang, U. J., Wollmann, R., Fishman, P. S., Kalynych, A. M., Barr, E. and Leiden, J. M. CNS gene delivery by retrograde transport of recombinant replication- defective adenoviruses. *Gene Ther.* 2: 132-137, 1995.
- Gong, Y. H., Parsadanian, A. S., Andreeva, A., Snider, W. D. and Elliott, J. L. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci.* 20: 660-665, 2000.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36: 59-74, 1977.
- Gurney, M. E., Cutting, F. B., Zhai, P., Doble, A., Taylor, C. P., Andrus, P. K. and Hall, E. D. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 39: 147-157, 1996.
- Gurney, M. E., Fleck, T. J., Himes, C. S. and Hall, E. D. Riluzole preserves motor function in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 50: 62-66, 1998.
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y.,

- Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X. and et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 264: 1772-1775, 1994.
- Haase, G., Kennel, P., Pettmann, B., Vigne, E., Akli, S., Revah, F., Schmalbruch, H. and Kahn, A. Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat Med*. 3: 429-436, 1997.
- Hadano, S., Hand, C. K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R. S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y., Singaraja, R., Figlewicz, D. A., Kwiatkowski, T., Hosler, B. A., Sagie, T., Skaug, J., Nasir, J., Brown, R. H., Jr., Scherer, S. W., Rouleau, G. A., Hayden, M. R. and Ikeda, J. E. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet*. 29: 166-173, 2001.
- Hentati, A., Ouahchi, K., Pericak-Vance, M. A., Nijhawan, D., Ahmad, A., Yang, Y., Rimmler, J., Hung, W., Schlotter, B., Ahmed, A., Ben Hamida, M., Hentati, F. and Siddique, T. Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. *Neurogenetics*. 2: 55-60, 1998.
- Hottinger, A. F., Fine, E. G., Gurney, M. E., Zurn, A. D. and Aebischer, P. The copper chelator d-penicillamine delays onset of disease and extends survival in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci*. 9: 1548-1551, 1997.
- Ikeda, K., Wong, V., Holmlund, T. H., Greene, T., Cedarbaum, J. M., Lindsay, R. M. and Mitsumoto, H. Histometric effects of ciliary neurotrophic factor in wobbler mouse motor neuron disease. *Ann Neurol*. 37: 47-54, 1995.
- Johnston, J. A., Dalton, M. J., Gurney, M. E. and Kopito, R. R. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn- superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 12571-12576, 2000.

- Kanegae, Y., Lee, G., Sato, Y., Tanaka, M., Nakai, M., Sakaki, T., Sugano, S. and Saito, I. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res.* 23: 3816-3821, 1995.
- Kanegae, Y., Takamori, K., Sato, Y., Lee, G., Nakai, M. and Saito, I. Efficient gene activation system on mammalian cell chromosomes using recombinant adenovirus producing Cre recombinase. *Gene.* 181: 207-212, 1996.
- Klivenyi, P., Ferrante, R. J., Matthews, R. T., Bogdanov, M. B., Klein, A. M., Andreassen, O. A., Mueller, G., Wermer, M., Kaddurah-Daouk, R. and Beal, M. F. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med.* 5: 347-350, 1999.
- Korsmeyer, S. J. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood.* 80: 879-886, 1992.
- Kostic, V., Jackson-Lewis, V., de Bilbao, F., Dubois-Dauphin, M. and Przedborski, S. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 277: 559-562, 1997.
- Li, M., Ona, V. O., Guegan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L. J., Olszewski, A. J., Stieg, P. E., Lee, J. P., Przedborski, S. and Friedlander, R. M. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science.* 288: 335-339, 2000.
- Lin, C. L., Bristol, L. A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L. and Rothstein, J. D. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron.* 20: 589-602, 1998.
- Lochmuller, H., Petrof, B. J., Pari, G., Larochele, N., Dodelet, V., Wang, Q., Allen, C., Prescott, S., Massie, B., Nalbantoglu, J. and Karpati, G. Transient immunosuppression by FK506 permits a sustained high-level dystrophin expression after adenovirus-mediated

- dystrophin minigene transfer to skeletal muscles of adult dystrophic (mdx) mice. *Gene Ther.* 3: 706-716, 1996.
- Mena, M. A., Khan, U., Togasaki, D. M., Sulzer, D., Epstein, C. J. and Przedborski, S. Effects of wild-type and mutated copper/zinc superoxide dismutase on neuronal survival and L-DOPA-induced toxicity in postnatal midbrain culture. *J Neurochem.* 69: 21-33, 1997.
- Miller, R. G., Bouchard, J. P., Duquette, P., Eisen, A., Gelinas, D., Harati, Y., Munsat, T. L., Powe, L., Rothstein, J., Salzman, P. and Sufit, R. L. Clinical trials of riluzole in patients with ALS. ALS/Riluzole Study Group-II. *Neurology.* 47: S86-90; discussion S90-82, 1996.
- Mita, S., Schmidt, B., Schon, E. A., DiMauro, S. and Bonilla, E. Detection of "deleted" mitochondrial genomes in cytochrome-c oxidase-deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 9509-9513, 1989.
- Mita, S., Tokunaga, M., Uyama, E., Kumamoto, T., Uekawa, K. and Uchino, M. Single muscle fiber analysis of myoclonus epilepsy with ragged-red fibers. *Muscle Nerve.* 21: 490-497, 1998.
- Mitsumoto, H., Ikeda, K., Klinkosz, B., Cedarbaum, J. M., Wong, V. and Lindsay, R. M. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science.* 265: 1107-1110, 1994.
- Mitsumoto, H., Ikeda, K., Klinkosz, B., Cedarbaum, J. M., Wong, V. and Lindsay, R. M. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science.* 265: 1107-1110, 1994.
- Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C. and Saito, I. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 1320-1324, 1996.
- Navarro, V., Millecamps, S., Geoffroy, M. C., Robert, J. J., Valin, A., Mallet, J. and Gal La Salle, G. L. Efficient gene transfer and long-term expression in neurons using a recombinant adenovirus with a

- neuron-specific promoter. *Gene Ther.* 6: 1884-1892, 1999.
- Nicolau, C., Le Pape, A., Soriano, P., Fargette, F. and Juhel, M. F. In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80: 1068-1072, 1983.
- Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 108: 193-199, 1991.
- Ohmoto, Y., Wood, M. J., Charlton, H. M., Kajiwara, K., Perry, V. H. and Wood, K. J. Variation in the immune response to adenoviral vectors in the brain: influence of mouse strain, environmental conditions and priming. *Gene Ther.* 6: 471-481, 1999.
- Parks, R., Eveleigh, C. and Graham, F. Use of helper-dependent adenoviral vectors of alternative serotypes permits repeat vector administration. *Gene Ther.* 6: 1565-1573, 1999.
- Parks, R. J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M. A. and Graham, F. L. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 13565-13570, 1996.
- Pasinelli, P., Borchelt, D. R., Houseweart, M. K., Cleveland, D. W. and Brown, R. H., Jr. Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 15763-15768, 1998.
- Pramatarova, A., Laganiere, J., Roussel, J., Brisebois, K. and Rouleau, G. A. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci.* 21: 3369-3374, 2001.
- Rabizadeh, S., Gralla, E. B., Borchelt, D. R., Gwinn, R., Valentine, J. S., Sisodia, S., Wong, P., Lee, M., Hahn, H. and Bredesen, D. E. Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a

- proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 3024-3028, 1995.
- Radunovic, A. and Leigh, P. N. Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis: correlation between genotype and clinical features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 61: 565-572, 1996.
- Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., Wilcox, H. M., Flood, D. G., Beal, M. F., Brown, R. H., Jr., Scott, R. W. and Snider, W. D. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet*. 13: 43-47, 1996.
- Rogers, S. Gene therapy: a potentially invaluable aid to medicine and mankind. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 2: 587-600, 1971.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X. and et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 362: 59-62, 1993.
- Sato, N., Wang, S., Li, L., Okabe, K., Hashimoto, M., Yaginuma, H., Mikoshiba, K., Uchiyama, Y., Uetsuki, T., Yoshikawa, K., Milligan, C. E. and Oppenheim, R. W. A novel strategy for introducing exogenous bcl-2 into neuronal cells: the Cre/loxP system-mediated activation of bcl-2 for preventing programmed cell death using recombinant adenoviruses. *Mol Cell Neurosci*. 12: 65-78, 1998.
- Schowalter, D. B., Meuse, L., Wilson, C. B., Linsley, P. S. and Kay, M. A. Constitutive expression of murine CTLA4Ig from a recombinant adenovirus vector results in prolonged transgene expression. *Gene Ther*. 4: 853-860, 1997.
- Subramaniam, J. R., Lyons, W. E., Liu, J., Bartnikas, T. B., Rothstein, J., Price, D. L., Cleveland, D. W., Gitlin, J. D. and Wong, P. C. Mutant

- SOD1 causes motor neuron disease independent of copper chaperone-mediated copper loading. *Nat Neurosci.* 5: 301-307, 2002.
- Vukosavic, S., Stefanis, L., Jackson-Lewis, V., Guegan, C., Romero, N., Chen, C., Dubois-Dauphin, M. and Przedborski, S. Delaying caspase activation by Bcl-2: A clue to disease retardation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 20: 9119-9125, 2000.
- Warita, H., Abe, K., Setoguchi, Y. and Itoyama, Y. Expression of adenovirus-mediated *E. coli lacZ* gene in skeletal muscles and spinal motor neurons of transgenic mice with a mutant superoxide dismutase gene. *Neurosci Lett.* 246: 153-156, 1998.
- Warita, H., Itoyama, Y. and Abe, K. Selective impairment of fast anterograde axonal transport in the peripheral nerves of asymptomatic transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 819: 120-131, 1999.
- Williamson, T. L. and Cleveland, D. W. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci.* 2: 50-56, 1999.
- Yang, Y., Hentati, A., Deng, H. X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W. Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A. C., Cole, N., Gascon, G., Yagmour, A., Ben-Hamida, M., Pericak-Vance, M., Hentati, F. and Siddique, T. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 29: 160-165, 2001.
- Zhu, S., Stavrovskaya, I. G., Drozda, M., Kim, B. Y., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A. S., Hartley, D. M., Wu du, C., Gullans, S., Ferrante, R. J., Przedborski, S., Kristal, B. S. and Friedlander, R. M. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature.* 417: 74-78, 2002.