
厚生省特定疾患調査研究班
基盤研究部門

特定疾患に関する分子病態研究班
平成10年度 研究報告書

平成11年 3 月

班 長 辻 省 次

まえがき

平成8年度に特定疾患調査研究班の構成について大幅な見直しが行われ、新たに横断的基盤研究班が作られました。本分子病態研究班はその横断的基盤研究班の一つとして発足し、私がお世話役を担当させていただきました。新しく設定された横断的基盤研究班ということもあり、どのような運営を行うのが適切であるかという点については、前例がないだけに難しい面が多くありました。

横断的基盤研究班の位置づけとしては、特定疾患の病態機序の解明、特定疾患の治療法の開発に貢献するような研究内容で、しかもある程度普遍性のあるようなテーマを選定すること、また、臨床研究班から派遣される難病特別研究員にとっても、普段顔を合わせることはないような多方面の医師、研究者との交流がはかれることが大切であると考えました。また、学術的には、常に独創性を重視し、高いレベルを維持することも大切なことであると考えました。このような背景から、本研究班の柱として、1.神経変性疾患の病態機序の解明、2.神経疾患以外の特定疾患の分野で研究の進捗が目まじしい分野をテーマとする、3.酸化ストレスによる組織障害機構の解明、という3つの柱を立てて研究班を構成しました。

3年間の分子病態研究班の研究内容を振り返ってみますと、班員の先生方の多大な努力により、いくつかの分野で大きな成果が得られ、また、多方面の研究者が交流すること、学際的な共同研究が発展することなど大きな成果が得られたと思います。各年度の評価会議におきましても、常に高い評価をいただくことができ、これもひとえに班員の諸先生方のご尽力のたまものと考えています。

一方、疾患の治療研究にすぐに役立つような研究というのは理想ではありますが、現実にはやはり、独創性が高く、基礎的な部分から学術的にも高いレベルの研究を推進することによって初めて治療法の研究も現実化するということもあり、すぐに治療に役立つ研究をとという要請との間にジレンマを感じることもありこのような横断的基盤研究班の課題であろうと思います。

3年間の研究期間を通じて私自身も新たに多くのすばらしい先生方と交流できたことをとても貴重な経験と思っています。班長として、未熟なところも多々あったかと思いますが、あらためて班員の先生方のご協力に感謝の意を表したいと思います。

平成11年3月

特定疾患に関する分子病態研究班
班 長 辻 省 次

目 次

I. 総合研究報告	班長 辻 省次
II. 総括研究報告	班長 辻 省次
III. 分担研究報告	
IV. 分担別報告	
1. 細胞外マトリックス構成成分のサイトカインの生物活性に及ぼす影響	藤原 作平 35 (大分医科大学皮膚科)
2. 内耳障害と一酸化窒素	工田 昌也, 他 39 (広島大学医学部耳鼻咽喉科)
3. HLAに関連したびまん性汎細気管支炎感受性遺伝子の探索	慶長 直人, 他 42 (東京大学医学部呼吸器内科)
4. ウイルス性肺炎モデルにおけるパーオキシナイトライトによる 急性肺傷害と遺伝子損傷メカニズム	赤池 孝章, 他 45 (熊本大学医学部微生物学教室)
5. 一酸化炭素を介した臓器機能制御機構 -ヘムオキシゲナーゼの臓器内分布と門脈血行異常症-	末松 誠, 他 49 (慶應義塾大学医学部医化学教室)
6. 細胞内超微活性酸素代謝特性とFALS病態の解析	井上 正康, 他 52 (大阪市立大学医学部第1生化学教室)
7. 生体組織への遺伝子導入効率の増強と長期遺伝子発現ベクターの開発	金田 安史, 他 56 (大阪大学医学部遺伝子治療学)
8. 腎間質線維化に対する遺伝子治療の可能性の検討	今井 圓裕, 他 60 (大阪大学医学部病態情報内科学)
9. E-セレクトリン遺伝子導入によるラット大動脈への白血球接着の誘導	安河内幸雄, 他 64 (東京医科歯科大学難治疾患研究所分子遺伝)

10. 神経線維腫症 2 型 (NF2) 遺伝子産物の機能と病態の関連	佐谷 秀行, 他	67
	(熊本大学医学部腫瘍医学)	
11. ステロール反応性転写因子 (SREBP) の 小胞体ループ切断プロテアーゼの精製	児玉 龍彦, 他	71
	(東京大学先端科学技術研究センター)	
12. 原発性低脂血症の病因に関する研究	石橋 俊, 他	75
	(東京大学医学部糖尿病・代謝内科)	
13. 中枢性摂食異常症におけるエネルギー代謝調節の分子機構	細田 公則	79
	(京都大学大学院人間・環境学研究科)	
14. 副腎・性腺の発生・分化に関与する核内受容体、 およびその共役因子に関する検討: Ad4BP とアンドロゲン受容体共役因子	後藤 公宣	83
	(九州大学医学部附属病院総合診療部)	
15. LH 受容体異常による男性思春期早発症 - male-limited precocious puberty (testotoxicosis) - の全国調査	矢野 公一, 他	86
	(旭川医科大学小児科)	
16. 家族性 QT 延長症候群の遺伝子解析と血管病態形成における 老化抑制遺伝子 klotho の果たす役割の解明	永井 良三, 他	89
	(群馬大学医学部第 2 内科)	
17. 日本人における PAI-1 遺伝子多型と血栓性疾患	辻 肇, 他	92
	(京都府立医科大学附属病院輸血部)	
18. 血栓性素因プロテイン S 欠乏症の分子病態解析	小嶋 哲人, 他	94
	(名古屋大学医学部第 1 内科)	
19. 不応性貧血進展に関与する転写伸長因子 MEN の造腫瘍活性	三谷 絹子, 他	97
	(東京大学医学部血液腫瘍内科)	
20. ヒト伴性劣性無ガンマグロブリン血症 (XLA) の 責任遺伝子 Btk の活性調節機構の解析	塚田 聡	100
	(大阪大学医学部分子病態内科)	

21. 再生不良性貧血一発作性夜間血色素尿症症候群のモデルマウス作製……………木下タロウ, 他 106
(大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患研究分野)
22. 分子インデックス法による神経変性疾患病態関連分子の探索……………道勇 学, 他 109
(名古屋大学医学部神経内科)
23. 鉄代謝のマスター蛋白、IRP2の神経変性疾患への関与 ……………岩井 一宏, 他 112
(京都大学大学院医学研究科免疫細胞生物学)
24. 相模原地区のパーキンソニズムの遺伝子検索(1)……………長谷川一子, 他 115
(北里大学東病院神経内科)
25. 沖縄地方に多発する感覚障害を伴う遺伝性神経原性筋萎縮症
(Hereditary Motor and Sensory Neuropathy with Proximal dominant involvement:HMSN-P)
の臨床・病理学的検討とその遺伝子連鎖解析……………中川 正法, 他 119
(鹿児島大学医学部第3内科)
26. 神経変性と α -synuclein蓄積 ……………岩坪 威, 他 123
(東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室)
27. Alzheimer病におけるA β アミロイド蓄積機構の研究
- 診断・治療マーカーによる検討 -……………東海林幹夫, 他 125
(群馬大学医学部神経内科)
28. アミロイド前駆体APPに見い出された神経特異的細胞死の調節性誘導機能……………西本 育夫 128
(慶應義塾大学医学部薬理学教室)
29. DRPLA遺伝子内CAGリピートの不安定化機構の解析
-レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いた
ヒト生殖細胞形成過程における検討- ……………滝山 嘉久, 他 132
(自治医科大学神経内科)
30. 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)遺伝子の解析:CAGリピート伸長による
神経細胞死の機構と、神経細胞死を生じる部位の特異性の解析を目指して……………山田 正夫, 他 135
(国立小児病院小児医療研究センター先天異常研究部)

31. ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死の分子解析.....垣塚 彰 139
(大阪バイオサイエンス研究所第4研究部)
32. 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症蛋白の伸長ポリグルタミン鎖の
アデノウイルスベクターを用いた発現による神経細胞障害機構の解析.....辻 省次, 他 143
(新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野)

V. 班構成員名簿

VI. 業績目録

I. 総合研究報告

特定疾患に関する分子病態研究班

班 長 辻 省 次

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科分野

総合研究報告

1. 研究目標

本研究班の目的は、特定疾患についてその分子病態機構を明らかにし、その治療法開発に向けての研究を推進することを目的として平成8年度に発足した。本研究班の位置づけとして、特定疾患のなかに多く含まれている遺伝性疾患が、分子遺伝学的研究を突破口に責任遺伝子が続々と発見されているものの、このようにして発見された責任遺伝子上の遺伝子変異がタンパクレベル、あるいは細胞、組織のレベルで具体的にどのような機序で細胞障害、組織障害を引き起こすかという点については未解明の部分が多く残されているという状況に対して、遺伝子レベルだけでなく、タンパクレベル、細胞生物学のレベルで、難治性特定疾患の分子病態機序を解明し、治療学へと発展させることを目的として発足した。

2. 分子病態班の構成

本研究班を組織するに当たって、神経疾患が特定疾患の中に数多く含まれていること、これらの神経疾患で分子遺伝学的な研究が飛躍的に発展していることから、神経疾患における神経細胞の変性機構に焦点をあてることを第一の柱とし、次ぎに特定疾患の広い領域の中で研究の進捗の著しい個々の疾患に焦点をあてることを第二の柱とし、第三の柱として、特定疾患に共通する領域として酸化ストレスの特定疾患発症機構へ関与を研究対象とした。

神経系特定疾患については、この群の疾患に共通する重要なテーマである神経細胞変性の分子病態に焦点をあて、その中でもわが国の研究者を中心に発見されてきたトリプレットリピート病について、このトリプレットリピートの伸長によりどのような機序によって神経細胞が変性するのか、中枢神経系の中でも中

で特定の部位の神経細胞が変性するかを解明し、その神経細胞の変性を防ぐためにはどのようにすればよいか、という点を解明することを重点的な目的として構成した。

造血障害、特発性血栓症、高脂血症、血管炎、動脈硬化、間質性肺炎、心筋症などの難治性疾患を対象としても、その発症に関わる遺伝子を同定すると共に、その分子病態機序を、細胞生物学のレベル、あるいは動物モデルの作成も含めて解明することを目的として、特に進捗の著しい分野からの研究者を中心に構成した。

さらに、特定疾患に分類される難治性疾患において共通する組織障害機構の一つである可能性が示されているスーパーオキシド、パーオキシナイトライトなどの活性酸素とその関連物質、一酸化窒素、一酸化炭素などによる組織障害機構を培養細胞系、モデル動物を用いて解明し、その障害予防法の確立のための検討を行い、難治性特定疾患の治療法への応用を目指すことを目的として構成した。

本研究班の構成としては、班長1名、班員14名、研究協力者2名から構成し、このうち8名は公募によるものであった。また、各臨床研究班から選ばれた難病特別研究員の方々にも参加をいただき、活発な交流を行った。一方、本研究班・班員もそれぞれの研究分野に応じて臨床研究班にも同時に所属する形で臨床研究班との交流を行った。

3. 分子病態研究班の運営

本研究班においては、特定疾患の全分野をカバーする横断的基盤研究班という位置づけから、その運営においては次のような点を重視して行った。第一に、日頃顔を合わせることの少ない臨床系の医師、基礎系の研究者が数多く参加するという班の性格から、他分野の研究者間の交流により、新たな研究の発想が生まれ

ること、新たな共同研究が生まれること、それぞれの研究者に対して新鮮な刺激が生まれることに気を配った。さらに、酸化ストレスに関連する基礎研究者の参加を得たことで、基礎研究者に対しては、臨床医学、特定疾患の内容を理解していただき、研究の動機づけ、方向性に、疾患研究という面の認識を深めていただくことをめざし、一方で、臨床系の研究者にとっては、一線の基礎系研究者との交流が深まり、新たな研究の展開が生まれるよう配慮した。また、平成8年度から始まった制度として、各臨床研究班から若手の研究者を難病特別研究員として迎えたこと、逆に本研究班班員がいずれかの臨床研究班に属し、その班会議に参加するという点で臨床研究班との交流が図られた。分子病態研究班では、年1回の班会議を開催し、上記の目的を十分達成すべく、多方面の研究者間で活発な討議が行われ、その中から新たな共同研究が多数生まれ、その一部は研究論文としても発表されるに至っている。難病特別研究員については、臨床研究班の運営方針によって、3年間難病特別研究員を固定して運営していただいた班と、年度ごとに交代した班があったが、基礎系・臨床系の研究者の交流、多彩な分野の研究者間の交流という点では一定の成果があったものと思う。

最終年度には、中村 祐輔先生が班長をつとめる遺伝子解析班（特定疾患遺伝子解析プロジェクト）との合同シンポジウムを開催し、分子遺伝学、分子医学が難病の原因とその病態機序の解明にどのようなインパクトを与えたかをテーマにして公開シンポジウム、「難病の分子医学」を開催した（平成11年1月12日、於シェーンバッハ・サボー（砂防会館））。

4. 分子病態研究班の3年間の研究成果

分子病態研究班は、研究班の構成の上からも対象とする領域が広く個々の班員の成果は後述するが、ここでは、3年間の研究で得られた主な成果を示すと次のようになる。

神経疾患に関しては、ポリグルタミンによる神経細胞変性機構の解明、治療への応用という点で大きな成果が得られた。伸張したポリグルタミンが核内凝集体を形成し、細胞にアポトーシスを誘導することが明らかにされ（垣塚、辻（省次）、山田）、凝集体の形成にトランスグルタミナーゼ反応が関与する可能性、その阻害剤を用いることによる治療への可能性が示された（辻（省次）*Nature Genet.* 18:111-117, 1998）。さら

に、アポトーシスの誘導に凝集体の形成が核内で生じることが必要であることが証明され（垣塚）、アポトーシスの過程に *SEK1* を介する細胞死シグナルの活性化が関与することが示された（垣塚、投稿中）以上のことから、ポリグルタミンによる凝集体形成の機構、アポトーシスの経路、細胞死の緩和方法の開発の点で大きな成果が得られた。パーキンソン病関係では、パーキンソン病の病態機序で重要であると考えられる Lewy 小体の主要構成成分が α -synuclein であることが証明された（岩坪）。 α -synuclein は一部の家族性パーキンソン病の病因遺伝子であるとともに、パーキンソン病、多系統萎縮症において細胞内に沈着する主な物質であることが証明され、今後その沈着過程、細胞障害機構の解明へとつながると期待される。岩井は、IRP2 に結合した鉄イオンによる酸化変化が IRP2 のユビキチン修飾、それに引き続くプロテアソーム分解のシグナルとなることを示し、パーキンソン病などで見られる鉄の沈着と神経変性の機構の関連性を示した。中川らによって発見された家族性神経原性筋萎縮症は、新たな疾患で、その遺伝子座が 3p14.2-q13 に存在することが示された（中川、*Annals of Neurology* 41:771-780, 1997）。今後この病因遺伝子の同定により、筋萎縮性側索硬化症をはじめとする運動ニューロン疾患の病態解明に大きく貢献するものと期待される。西本は、家族性アルツハイマー病の病因遺伝子の一つであるアミロイド前駆体タンパク（APP）遺伝子に焦点を絞り、APP が神経特異的な細胞死受容体機能を持つこと、変異 APP が G タンパクを介して細胞死を誘導することを見いだした。さらに、エストロゲンが変異 APP による神経細胞死を阻止することを見いだし、アルツハイマー病の治療への応用の可能性を見いだした。道勇は、分子インデクス法という新しい遺伝子発現プロファイリング法により、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病の病変部位で遺伝子発現に変化のある遺伝子群を多数同定し、これらの遺伝子の発現変化の意義を解析中である。

心、血管系では、永井らによって発見された *klotho* 遺伝子は、変異マウスが動脈硬化、肺気腫、骨粗鬆症、性腺萎縮、神経細胞萎縮等の老化現象を示す点で、老化過程の研究には必須のモデルである（永井、*Nature* 390: 45-51, 1997）。永井らにより、*klotho* 遺伝子産物の生理的機能が解析され液性因子として血管内皮細胞の NO 合成を高めることが明らかにされた。*klotho* 遺伝子は我が国で独自に発見された遺伝子で、今後老化

過程に関する治療への応用を含めて大きな進展が期待される。血栓性疾患については小嶋によりプロテイン S の異常症における分子病態機序が詳細に解析された。不応性貧血の関連では、木下らにより発作性夜間血色素尿症の詳細な病態が解明され、中でも重要な課題である体細胞突然変異によって PIG-A 遺伝子が失活した異常造血幹細胞が拡大する機序を解明するためのモデルマウス系が確立された点は特筆すべきことである。三谷らによって不応性貧血の病態における Ev11 の役割が詳細に解析された。高脂血症に関連しては、細胞内のステロールセンサーである SREBP (Sterol regulatory element binding protein) 変換酵素の解析が行われ、高脂血症の治療薬開発への新たな展望が見いだされた。

酸化的ストレスに関連して、末松は肝臓で内因性に生成される一酸化炭素 (CO) が類洞血管抵抗を生理的レベルに低く保つために必要不可欠である内因性血管弛緩因子であることをラットを用いた実験的研究で初めて明らかにした。赤池は、インフルエンザ肺炎モデルを用いて、肺組織損傷機構におけるパーオキシナイトライドの役割を検討し、パーオキシナイトライドによる肺組織蛋白のニトロ化反応が、ウイルス性急性肺損傷に深く関わっていることを示した。井上は、生体内の生理的低酸素環境下では NO の寿命が延長し、その生理作用及び病理的作用が著しく増強することが判明した。安河内は難治性血管炎の病態機序の解明を目的として、E-セレクトチンを中心に白血球の血管内皮接着現象の機序の解析を行った。

難病特別研究員は、年度ごとに交代した臨床研究班が半分くらいを占めたが、3年間固定の難病特別研究員では、滝山は、CAG リピートの不安定性に焦点を絞り、特に精子における不安定性を single cell PCR により詳細に解析をし、臨床遺伝学的に観察されていた現象を生殖細胞レベルでの解析で明らかにした。慶長は、びまん性汎細気管支炎 (DPB) について、疾患感受性遺伝子が HLA-A, B 間に存在することを強く示すデータを得た。今後この疾患感受性遺伝子の同定により分子病態機序の理解が飛躍的に進展することが期待される。

分子病態基盤研究班を組織したことで、共同研究が新たに生まれた点も臭覚であった。たとえば、高脂血症が研究分野である児玉と、神経変性疾患が研究分野である岩坪により、高脂血症の研究過程で明らかにされてきたプロテアーゼが、アルツハイマー病において

注目されているアミロイドβ蛋白の切断酵素である可能性が浮かび上がり、この点に関する共同研究がなされた (Neuroreport 9:911-91, 1998)。また辻 (省次) によって開発された CAG リピート病遺伝子の同定法 (DIRECT 法) が中川の脊髄性筋萎縮症疾患遺伝子同定の研究に活用されるなど、活発な共同研究が展開された。

5. まとめ:

以上、本年度においては、多方面にわたる研究が行われたが、中でもトリプレットリピート病における神経細胞変性機構、発作性夜間血色素尿症の発症機構、老化モデルマウスの作成などの点で飛躍的な発展が見られた。本研究班の使命は、特定疾患の診療、治療に資する新たな研究成果を生むことにあるが、臨床的に有用な研究成果をあげるためには、疾患の発症機序を分子レベルで解明し、その病態機序を明らかにし、その中から治療に役立つ研究が生まれてくると考えるべきである。その意味で、ポリグルタミン病、不応性貧血、老化過程などの病態機序が細胞生物学のレベルで詳細に解明されつつあり、難病に対する治療法開発に向けて発展が大いに期待される成果が得られた。今後も、このように難病の分子病態機序を詳細に解明し治療法に発展させていく研究を強力に推進していく必要がある。また、本研究班は横断的な構成をしていることから、基礎系の研究者、臨床系の研究者の交流、共同研究の活発化、さらに、たとえば臨床系であっても、普段、交流することの少ない異なる分野の研究者の間で活発な意見の交換が行われ、研究の推進上有益であった。

Ⅱ. 総括研究報告

特定疾患に関する分子病態研究班

班 長 辻 省 次

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科分野

総括研究報告

I. 研究の目的

本研究班の目的は、特定疾患についてその分子病態機構を明らかにし、その治療法開発に向けての研究を推進することにある。遺伝性の難治性疾患については原因遺伝子が同定されつつあるものの、その遺伝子異常がタンパクレベル、あるいは細胞、組織のレベルで具体的にどのような機序で細胞障害、組織障害を引き起こすかという点については未解明の部分が多く、遺伝子レベルだけでなく、細胞生物学のレベルを含めて、難治性特定疾患の分子病態機構を解明し、治療学へと発展させることを目的とする。

平成 10 年度は次のような点を重点的な目標として研究を行った。

神経系特定疾患については、特にトリプレットリピート病について焦点を当て、トリプレットリピートの伸長によってもたらされる細胞死の分子病態機序の解明し、その緩和方法を開発することにより、治療法開発への道を拓くことを目標とした。

心筋症、造血障害、特発性血栓症、高脂血症、血管炎、動脈硬化、間質性肺炎などの難治性疾患を対象としても、その発症に関わる遺伝子を同定すると共に、その分子病態機序を、細胞生物学のレベル、あるいは動物モデルの作成も含めて解明する。特に、老化に関連するさまざまな病態に関与する *klotho* 遺伝子については重点的にその機能を解析することを、発作性夜間血色素尿症、再生不良性貧血に関して、モデルマウス系を確立することを目標とした。

さらに、特定疾患に分類される難治性疾患において共通する組織障害機構の一つである可能性が示されているスーパーオキシド、パーオキシナイトライトなどの活性酸素とその関連物質、一酸化窒素、一酸化炭素などによる組織障害機構を培養細胞系、モデル動物

を用いて解明し、その障害予防法の確立のための検討を行い、難治性特定疾患の治療法への応用を目指す。

II. 研究成果

本研究班は設立の主旨から、横断的な班構成を行っており、その結果、研究領域も多岐にわたるが、テーマ別に本年度の研究成果を紹介する。

1. 神経系の疾患

A. トリプレットリピート病の分子病態機序

脊髄小脳変性症、ハンチントン病などの神経変性疾患の中に、トリプレットリピート病と呼ばれる一群の疾患があり、これらの疾患には共通する発症機構があると考えられ、注目されている。原因遺伝子に関しては、垣塚、山田、辻らにより Machado-Joseph 病、歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、脊髄小脳変性症 2 型 (SCA2) などの原因遺伝子が発見され、いずれもポリグルタミンをコードする CAG リピートの異常伸長によるものであることを解明し大きな成果が上がっている。現在までの研究成果から、それぞれのトリプレットリピート病において、共通の神経細胞変性機構が存在すると考えられている。従ってトリプレットリピート病における神経細胞の変性機構を解明することにより、トリプレットリピート病に対する共通の治療法の開発が実現すると期待される。

トリプレットリピート病における病態機序を解明する上で重要な課題は、1. CAG リピート伸長によって神経細胞が死に至る分子機構、2. 疾患ごとに障害される神経細胞の分布が特異的な分布を示す機序は何か、という 2 点であり、この 2 点に焦点を当てて研究を進めてきている。

辻 (省次) は、昨年度までの本研究においてアデノウイルスベクターを用いてポリグルタミンを有する DRPLA 蛋白断片を分化させて PC12 細胞に発現させる実験系を確立した。本年度はこの発現系を用いて、

神経細胞の一種である PC12 細胞と皮膚線維芽細胞とを比較しながら、ポリグルタミン蛋白の細胞内発現パターン、細胞障害機構について解析を行った。その結果、部分 DRPLA 蛋白については、82 グルタミンを有する部分 DRPLA 蛋白断片を発現させた場合、分化型 PC12 細胞では感染後 3 日目においてほぼすべての細胞 (97 %) において核内凝集体が観察されるのに対して、線維芽細胞では、31+21% (n = 3) の細胞に核内凝集体が見られるにすぎないことから、PC12 細胞では伸張したポリグルタミンの核移行を促進する性質があること、さらに、アポトーシスの誘導の程度が分化型 PC12 細胞で有意に高いことを見だし、神経系の細胞が伸張したポリグルタミンに対して、線維芽細胞と比較して高い脆弱性を持っていることを証明した。以上のことから、神経細胞は伸張したポリグルタミンにタンパクに対して核内凝集体を作りやすく、顕著な脆弱性を示すことが明らかにされ、ポリグルタミンの伸長による疾患が神経系を特異的に障害することを説明しうるものと考えた。

垣塚は、神経細胞の一種である PC12 細胞を用いて伸張したポリグルタミンタンパクを誘導的に発現できる stable transformant の確立と、ポリグルタミンを発現するショウジョウバエを作成を行った。この PC12 細胞を用いて、伸張したポリグルタミンの誘導的に発現させることにより、核内凝集体が形成され、その凝集体に一致する部位で SEK1 が活性化されることを見いだした。さらに、ドミナントネガティブ SEK1 が著明に細胞死を抑制することを見いだした。一方、核外輸送シグナル(NES:nuclear export signal)を用いて細胞質に発現させたドミナントネガティブ SEK1 は細胞死を抑制できなかった。この観察と一致して、自発的に生じた死抵抗性の細胞は核内凝集体を持たず、凝集体は細胞質にのみ存在していた。SEK1 はストレス等により活性化されアポトーシスを誘導するキナーゼとして知られているが、以上の結果から、核内で凝集したポリグルタミンにより SEK1 を介する細胞死シグナルが活性化され神経細胞死が誘導されると考えられ、この結果は、キナーゼの新しい活性化様式を提示しているだけでなく、神経変性疾患の病的遺伝子産物により引き起こされる細胞死シグナルカスケードを初めて明らかにした点で重要である。次に、ポリグルタミンが引き起こす細胞死のシグナル伝達に関わる遺伝子を同定する目的で、ショウジョウバエ複眼原基特異的プロモーターを使用し、ポリグルタミンを発現させたト

ランスジェニックフライを作製した。このトランスジェニックフライでは光受容体細胞と色素細胞の欠失、個眼の融合及び複眼の陥凹を伴う複眼の変性が観察された。続いて、染色体上の種々の欠失した領域をもつ変異体約 150 系統を用いてこのトランスジェニックフライとの遺伝的交差の解析を行い、複眼の変性を増強する系統と変性を抑制する系統を得、現在、これらのポリグルタミンによるアポトーシスを増強する、あるいは抑制する遺伝子の同定を行っている。

山田は、トランスフェクションによる培養細胞への DNA 断片導入法では、トランスフェクション自身による細胞死なども生じるため、実験系の改良を行いテトラサイクリン添加あるいは非添加により、誘導的に CAG リピートをポリグルタミンに翻訳発現できる培養細胞系を作成した。この系で、凝集体形成を確認すると共に、細胞死に先だって Caspase 3 および 9 の活性が上昇することを見だし、ポリグルタミンによって惹起されるアポトーシスに caspase 3, 9 が関与する可能性が考えられた。DRPLA 蛋白の生理的機能を明らかにする目的で、酵母ツーハイブリッド系を用いてヒト胎児脳 cDNA ライブラリーを検索し、DRPLA 蛋白質と結合する約 30 種の結合蛋白候補を得、そのうち IRSp53 について詳細に解析した。その結果、DRPLA の正常機能として、インスリン/IGF の下流で、シグナル伝達に関与している可能性が見いだされた。さらに DRPLA と高い相同性を示す新規遺伝子 RERE を単離して詳細に解析し、アルギニン-グルタミン酸が交互に繰り返すモチーフは (RERE モチーフ) 相互に結合できることを見出し、蛋白質の会合部位であると考えた。

B. 神経変性疾患

運動ニューロン疾患関係

中川は、沖縄地方で見いだした新たな遺伝性運動ニューロン疾患である家族性神経原性筋萎縮症家系について連鎖解析を行い、その遺伝子座が 3p14.2-q13 に存在することを発見した。本年度は、原因遺伝子の同定に向けての研究と、本家系第 2 例目の剖検が得られたので、その病理学的検討も行った。 遺伝子座の絞り込みのために、HMSN-P 患者 39 名を含む 16 家系 55 名の血液より DNA を抽出し、3q13.1 領域に位置するマイクロサテライト多型マーカーを用いて遺伝子連鎖解析を行った。その結果、DNA マーカー D3S3652, D3S1591, D3S1281 にて、最大 lod score 4.63, 3.13, 3.09

($\theta = 0.0, 0.043, 0.031$)を得た。D3S3652とD3S3638間のDNAマーカーハプロタイプの検討から、D3S1591とD3S1281の間に疾患遺伝子座がある可能性が示された。Likelihood ratio testでは、D3S3652, D3S1591, D3S1291, D3S3654, D3S3638に有意な連鎖不平衡がみられた。この領域の9種類のDNAマーカーを用いたDISMULTによる分析では、lod score 4.93 ($p < 0.00000095$)であり、この領域に強い連鎖不平衡が示された。本症は、沖縄本島のみにもみられる疾患であり、3q13.1領域に強い連鎖不平衡がみられることより、本症の創始者の存在が示唆された。しかし、D3S1291とD3S3654間の2.8cMの間には利用できるDNAマーカーが現在までのところ1種類のみであり、多数のDNAマーカーによるこの領域の検討が必要である。そのために、現在新しいマーカーを検索中である。一方、DNAマーカーの検索と平衡して、クローニングのために(1)3q13.1領域にあるEST、特に神経組織由来のESTを中心にスクリーニングを行う、(2)3q13.1領域の3cMをカバーするPACcontigを作成する、(3)CAGリピート異常の検出をDIRECT法にて行うなどのアプローチを行っている。

剖検例(66歳、女性)の神経病理学的所見の主な点は、以下の通りであった。1) 脊髄前角神経細胞の著しい脱落とグリオーシスを認め、頸髄・腰髄では外側で脱落が著明。Onuf核神経細胞は残存、2) 後根神経節細胞は頸髄>腰髄>胸髄の順で脱落が強い、3) 脊髄全長にわたる後索の著明な萎縮、神経線維の脱落、4) 末梢神経有髄線維の著明な脱落、5) 脳神経系では、XII, X, XIで変性を認めたが、動眼神経核は保たれている、6) 視床背側内側核、視床枕の著明な神経細胞脱落とグリオーシスなどであった。抗ユビキチン抗体染色では、核内封入体は認められなかった。以上より、本症は後根神経節細胞の障害を中心とした後索・末梢神経障害と脊髄前角の脱落を主病変とする疾患であると考えられた。

パーキンソン病, アルツハイマー病関係

岩坪は、パーキンソン病のLewy小体に対する特異抗体の作成を行っており、この抗体が認識する標的分子が、最近常染色体優性遺伝性家族性パーキンソン病の責任遺伝子として同定された責任遺伝子の遺伝子産物である(α -synuclein)ことが判明した。 α -synucleinは脳に豊富に存在し、シナプス前末端に局在する可溶性蛋白質である。本年度は次のような検討を行った。

(1)PD, DLB以外の変性疾患における α -synucleinの蓄積:Lewy小体以外の異常蓄積物に α -synucleinが存在するかどうかを、多変性疾患について検討し、多系統萎縮症(multiple system atrophy)の脳幹, 小脳, 基底核などの白質のオリゴデンドロサイトに出現するglial cytoplasmic inclusion (GCI)が α -synuclein陽性を示すことを見出した。

(2)家族性アルツハイマー病(FAD)における α -synuclein蓄積の検討: presenilin 1, 2, β APPなどに変異を有するFAD脳において α -synuclein陽性のLB及び関連病変の出現を検討した。約60%の症例で扁桃核及び近隣の側頭葉皮質に α -synuclein陽性のLB及びLewy neuriteの出現を認めた。家族性ADの原因遺伝子変異は、LBにおける α -synuclein蓄積も促進する可能性がある。

(3)培養細胞系における α -synucleinの発現: 各種培養細胞に野生型及びA53T変異 α -synuclein cDNAを一過性もしくは恒常的に発現し、 α -synucleinの局在、代謝、細胞形態・生存への影響を検討した。COS細胞の一過性発現系では、 α -synucleinは細胞質及び一部核に局在した。Neuro2a, HEK293恒常発現細胞では主として細胞質に出現し、核も陽性を示した。ウェスタンブロットでは、大部分の α -synucleinは可溶性画分に回収され、18 kDaの1本のバンドを示した。これらの性質は変異の有無、C末端FLAG tagの有無により影響を受けなかった。

(4) α -synuclein定量系の樹立: 2種類の α -synuclein特異モノクローナル抗体を用いたsandwich ELISAの樹立を試み、1~5 ng/ml以上の濃度域で α -synucleinを定量可能な系を確立した。今後脳脊髄液などの検討を予定している。

(5)LBに蓄積した α -synucleinに関する検討: リコンビナント蛋白質を用いた検討から、ヒト α -synuclein特異モノクローナル抗体LB509のepitopeはヒト α -synucleinのAsp121/Asn122に同定された。LB509は精製LBギ酸抽出物のウェスタンブロットで14~16 kDaのバンド及び高分子量のスメアを強く、全長 α -synucleinに近い16~18 kDaのバンドを弱く認識した。これに対し α -synucleinのC末端10残基(131-140)を認識する2種類の抗体(NACP-C, 209-II)は、高分子量スメア、18 kDaバンドを認識したが、14~16kDaバンドは陰性であった。この結果は、LBに含まれる単量体 α -synucleinの多くは、最C末端十数残基が切断されている可能性を示唆し、C末端欠損型リコンビナント

α -synuclein が全長型に比して凝集しやすいとする最近の実験結果(Crowther et al, FEBS lett, 1998)によく符合する。他の神経細胞蓄積蛋白(ポリグルタミンを含む蛋白など)と同様、 α -synuclein の部分的なプロセシングがその蓄積と細胞変性に関与している可能性がある。

岩井は、パーキンソン病脳で鉄の沈着が見られることに関連して、鉄代謝に重要な役割を有している iron regulatory protein (IRP) 1, 2 の病態機序に関わる研究を開始している。神経変性疾患では病巣部での鉄等の金属イオン、ユビキチン化蛋白の沈着、蛋白の酸化変性が認められ、その病態との関連が注目されている。これまで鉄代謝のマスター制御因子である2種の高い相同性を有した RNA 結合蛋白、IRP1 及び IRP2 を中心に哺乳類細胞における鉄イオン代謝の研究を解析を進め、IRP2 の解析から、金属イオンによる蛋白の酸化変化がユビキチン依存性蛋白分解のシグナルとなり得ることをはじめ示し、酸化変化を認識するユビキチンシステムが種々の神経変性疾患で認められるユビキチンを含んだ封入体形成に関与する可能性について言及してきた。また、IRP2 は脳で発現が高いことが知られており、アルツハイマー病巣においては IRP2 蛋白の蓄積が報告されていることなどから、何らかの原因で IRP2 が分解が阻害され、安定化することにより細胞内の free 鉄イオン濃度が上昇し、フリーラジカル産生が高まることが、アルツハイマー病における神経細胞死に関与していると考えられる。そこで、IRP2 蛋白自体の神経変性疾患への関与を検索すべく、a)鉄イオン以外の因子による IRP2 の RNA 結合活性増強を介したトランスフェリン受容体(TfR)発現亢進、フェリチン(Ft)発現抑制による、細胞内の free 鉄イオン濃度の上昇によるフリーラジカル産生亢進の可能性、また、b)発生工学的手法を用いて、IRP2 蛋白の神経変性疾患における意義の検索を進めている。

まず、マウス神経芽細胞腫株 Neuro 2A を各種金属イオン存在下で培養したところ、アルミニウムの添加により IRP2 の RNA 結合活性、蛋白量ともに増加することが観察された。アルミニウム添加による IRP2 の IRE 結合活性の増強を介するトランスフェリン受容体(TfR)の産生増強、フェリチン(Ft)の産生低下が認められ、アルミニウムの存在で細胞内の free 鉄イオン濃度が上昇し、フリーラジカル産生を高める可能性が示唆された。また、アルミニウムにより鉄イオンによる IRP2 の酸化修飾が抑制されたことから、IRP2 の

鉄結合部位にアルミニウムが競合的に結合することにより、IRP2 のユビキチン修飾に抑制的に働き IRP2 を安定化することが示唆された。

発生工学的なアプローチとして、既に樹立してある IRP1 ノックアウトマウスは、少なくとも 15 カ月齢まで異常が認められないが、IRP2 ノックアウトマウスは樹立されて間もないため今後の検討を待たねばならないが、加齢により十二指腸上皮での鉄イオンの蓄積が認められるのに加え、歩行異常を来すことから神経系にも異常が生じている可能性を考えられる。今後このモデルマウスを用いて、鉄代謝のマスター制御因子である IRP2 を介した鉄代謝異常の神経変性疾患における意義を検索すべく、IRP2 の各種神経変性疾患における病態機序の役割を解析していく予定である。

西本は、アルツハイマー病の病態機序を解明するために、家族性アルツハイマー病において病因遺伝子として見いだされたアミロイド前駆体タンパク遺伝子 (APP) に着目し、変異 APP 遺伝子を神経細胞に発現させるとアポトーシスを誘導することを見いだした。初代培養神経細胞由来の神経細胞株を用いて、野生型 APP695 を安定的に発現する F11 細胞を樹立した (F11/APP)。この F11/APP 細胞は、抗 APP 抗体によってもアポトーシスが誘導されること、親株の F11 細胞ではアポトーシスが誘導されないことを見いだした。この事実は APP 分子が、免疫系の FAS 分子と同様にリガンド依存性にアポトーシスを誘導する可能性が示された。このことから、APP リガンドとして作用する生理的物質の同定が重要な課題となってきた。昆虫のステロイドホルモン、エクダイソンによる発現誘導系を用いて、変異 APP (V642I) 誘導的に発現できる F11 細胞を樹立することができた。この細胞系を用いることにより APP の関与するアポトーシスに拮抗する物質の検索が可能になった。

道勇は、昨年度までに確立した分子インデックス法によって、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症において疾患特異的に発現が低下した遺伝子の特定を試みた。アルツハイマー病に関しては3つの新規遺伝子を、筋萎縮性側索硬化症については4つの新規遺伝子を単離し、これらの遺伝子の全構造の解明を進めているところである。

2. 心疾患

永井らは、トランスジェニックマウスの開発中に、導入遺伝子は染色体に組み込まれながらも転写されず

に未知遺伝子をノックアウトし、全身の老化を来たす挿入突然変異マウスを樹立した。本マウスは動脈硬化、肺気腫、骨粗鬆症、性腺萎縮、神経細胞萎縮等の老化現象を示す。我々はこの変異マウスで欠損する原因遺伝子と cDNA を、マウスとヒトにおいて単離することに成功した (klotho と命名:「運命の女神」を意味)。klotho 蛋白は分子量が約 10 万で、 β -glucosidase と 40% のホモロジーを示す 2 つのドメインをもつ膜貫通型の新規遺伝子で、一部は分泌蛋白としても存在する。そこで本研究は klotho 蛋白ならびに遺伝子の分子機能と循環器疾患の病態における意義を解明し、心臓血管疾患の新しい予防・診断・治療法を開発することを目的とした。

今年度は腎臓における klotho 遺伝子の発現調節と、klotho 遺伝子の血圧制御や血管病変の形成における klotho 遺伝子の意義を明らかにすることを目的とした。

Klotho 蛋白の血管系への作用解析について、大動脈のアセチルコリンに対する反応を調べてみると、アセチルコリン(10-5M)に対する klotho 遺伝子欠損ヘテロマウスの最大血管拡張反応は野生型に比し、明らかに低下していた (53*7 vs 88*4%)。細動脈のアセチルコリンに対する反応に関しては、アセチルコリン投与前の血管径は野生型、ヘテロ、ホモ個体でそれぞれ 49*5, 43 ± 4, 33*3 mm であった。アセチルコリン(10-5M)最大血管拡張反応は野生型、ヘテロ、ホモ個体でそれぞれ 41*5, 27*3, 12*3% であった。さらに、体結合による血管内皮機能の改善について調べたところ、野生型とヘテロ個体との体結合作成の 2 週後、ヘテロ個体のアセチルコリン(10-5M)に対する血管拡張反応はすでに改善し、4 週後では野生型と同等まで回復した。一方ヘテロ個体同士の体結合では血管拡張反応の改善は全く認められなかった。

klotho 遺伝子の発現制御については、成熟ラットにおける klothomRNA は、腎臓に強く発現し、脳、肺、腸、卵巣にも発現を認めた。またラット腎臓における klotho の発現を経時的に検討した。klotho mRNA は胎生後期には微量に存在した。生後 4 日目より強く発現するようになり、強い発現を生後 4 週間目まで維持した。さらに、LPS を負荷した急性炎症モデルでは、腎臓における klotho mRNA の発現が著明に低下した。しかし脱血による低血圧モデルまたは L-NAME 負荷による高血圧モデルでは klotho mRNA の発現は変化を認めなかった。

以上のことから、klotho 蛋白は液性因子として血管内皮細胞の NO 合成を高める、klotho 蛋白の発現が低下すると、高食塩負荷による高血圧や、高脂肪食負荷による粥状動脈硬化の発症素因になると考えられた。腎不全、急性炎症、高血圧などは腎臓における klotho 遺伝子の発現を低下させる。すなわち klotho 遺伝子の発現が病態により制御をうけることが明らかとなった。しかもレニンアンジオテンシン系の抑制によりこの発現低下は回復可能であることが判明した。

3. 血栓症

小嶋は、特発性血栓症の基礎疾患の一つであり、pseudogene の存在のため遺伝子解析が困難とされる血栓性素因プロテイン S (PS) 欠乏症において、新たな遺伝子変異を同定しその欠乏症に至る分子病態について検討した。その結果、Type I PS 欠乏症一家系において Ser62 (TCA) -> Stop (TGA) の遺伝子異常を同定した。血小板中の PS mRNA を用いてこの異常を解析したところ、変異 mRNA では exon 4 の skipping が生じ、かつその発現量は正常 mRNA に比べて激減していた。exon 4 skipping は 87 塩基の in-frame deletion を生じ、29 個のアミノ酸が欠失すると考えられた。DNA レベルの解析からは nonsense mutation により異常 PS が作られることが本 PS 欠乏症の発症病態と推察されたが、mRNA 解析の結果でこの nonsense mutation が alternative splicing による exon skipping を誘導しその mRNA の発現量が低下すること、および 29 個のアミノ酸が欠失した異常 PS が合成されることが本患者におけ Type I PS 欠乏症の原因であると考えられた。以上の結果より、本 PS 欠乏症はこの nonsense mutation そのものが原因ではなく、これが exon skipping を誘導しかつ mRNA の発現量を低下させることがその分子病態であると考えられた。これは遺伝性疾患の分子病態解析において DNA だけでなく mRNA レベルの解析の重要性を示唆する症例と思われる。

4. 不応性貧血

三谷は、進展期不応性貧血症例に観察される t(11;19)(q23;p13.1) の分子解析を行うことにより、新規融合遺伝子 MLL/MEN のクローニングに成功した。MEN はリジン豊富領域を有する 80 kD の核内蛋白質であることを証明したが、その後 RNA ポリメラーゼ II 伸長因子であることが報告された。キメラ形成による MEN の異常発現が不応性貧血の白血病化に関連

している可能性があり、MEN の造腫瘍活性について検討した。ラットの線維芽細胞 Rat1 にレトロウイルス・ベクターを用いて MEN を遺伝子導入すると、コロニー形成能の増強及び血清要求性の低下が観察された。これらの効果は MEN の C 末領域に存在するリジン豊富領域を失った欠変異体では観察されないことから、MEN はリジン豊富領域依存性に造腫瘍活性を示すことが示された。さらに、(TRE)x3-tk-Luc を用いたレポーター・アッセイの結果、MEN を発現している Rat1 細胞では AP-1 活性が亢進していることが明らかになった。これらの効果はすべて MEN のリジン豊富領域に依存性であった。さらに、MEN 発現 Rat1 細胞では mock 細胞に比べて EGF 刺激後、Fos mRNA をより早期から誘導することが観察、MEN はリジン豊富領域依存性に fos 遺伝子の転写伸長を活性化することが明らかになり、これが Fos 蛋白質の発現亢進の原因であると考えられた。

一方、免疫沈降・ウエスタン解析により、MEN には p53 結合能が観察されたが、欠変異体を用いた実験により、その結合領域は N 末の 1/2 の領域にマップされた。さらに、p53 結合領域を含む RGC(ribosomal gene cluster)-Luc を用いたレポーター・アッセイの結果、MEN は p53 による RGC-Luc の転写活性化を抑制することが明らかになった。この抑制効果には N 末 1/2 の p53 結合領域と C 末 1/3 の領域の両者が必要であった。p53 結合領域あるいは抑制領域を欠いた欠変異体を遺伝子導入した Rat1 細胞ではコロニー形成能の増強は観察されなかった。

以上の結果より、MEN は、少なくとも AP-1 活性の刺激効果と p53 に対する抑制効果により、Rat1 細胞を形質転換することが明らかとなった。今後 t(11;19)(q23;p13.1)による不応性貧血の進展の分子機構を明らかにする為に、MEN と MLL/MEN の生物学的機能及び転写伸長因子としての機能の差異を明らかにすることが重要な課題であると思われる。

木下は、今年度までに、発作性夜間血色素尿症にもっとも近いモデルマウスを作ることをめざし、コンディショナル遺伝子ターゲティングと造血幹細胞移植を組み合わせて、血液系だけに GPI アンカー欠損細胞を持つマウスを作製した。このモデルマウスの多くの個体において GPI 欠損細胞の割合を末梢血中の各細胞種で調べていくと、Tリンパ球では CD4 細胞でも CD8 細胞でも GPI 欠損細胞の割合が他の細胞種に比べ圧倒的に高かった。Tリンパ球の形成のどのステ

ップで欠損細胞の割合が高くなっているかを知るため、胸腺細胞を調べたところ、もっとも未熟な段階である CD4⁺陽性 CD25⁻陰性の細胞ですでに起こっていることがわかった。これは、GPI アンカー型タンパク質が Tリンパ球形成の初期段階で増殖を負に制御しており、欠損細胞ではその制御を受けないために正常細胞より数が増えることを示唆している。すなわち、このモデルマウスは、Tリンパ球の形成過程における増殖の制御メカニズムを解析するのにも有用である。

5. 高脂血症

児玉は、家族性高コレステロール血症などの原発性高脂血症の発症機序の解明のため、細胞内のステロールセンサーである SREBP 変換酵素を同定することにより、コレステロール転写制御の分子機構を解明することを目指した。in vitro アッセイ系を構築し、SREBP 前駆体蛋白の ER ループ部位ペプチドの切断活性をもとに、プロテアーゼの精製を試みた。肝細胞膜画分には、少なくとも 3 種類のペプチダーゼが存在し、そのうち S1P 切断部位に特異的と考えられるアセチル-GRSVL-アルデヒドに感受性の 32 kD 活性はプロカテプシン B であることがわかった。プロカテプシン B は ER に存在し、リソソームに移行する過程でさらにプロセッシングを受け成熟カテプシン B になることが知られている。強制発現系で見ると、プロカテプシン B が in vivo でも SREBP を切断する可能性も考えられ、コレステロール調節にどのように関与しているかさらに検討が必要である。また 109 kD プロテアーゼはブラウンとゴールドシュタインらによってクローニングされた S1p と分子量が類似しており、アミノ酸配列決定を急いでいる。まだ同定していない 60 kD プロテアーゼを含めて ER には SREBP 切断酵素が多数存在する可能性があり、プロテアーゼによる分解調節の機構を探る上でも、これらの酵素を同定することが重要と考えられる。ER 膜内で切断する S2P はアミロイドβ蛋白を切断しアルツハイマー病にかかわるセクリターゼと同一視する考えもあったが、S2P の欠損細胞を用いて両者は別であることを証明した。

6. 活性酸素障害などに関する難病発症の病態機序に関わる基礎的研究

末松は、第 2 年度までの動物実験の研究成果として一酸化炭素 (CO) が肝、門脈循環のトーンズの調節

に決定的な役割を果たしていること、胆汁分泌に対し抑制的調節作用を持つことが明らかになったことを背景として、新たに作成した heme oxygenase(HO)の isozyme を特異的に認識する monoclonal antibody により、ヒトにおける蛋白の発現を肝臓、脾臓、消化管などの組織を用いた免疫組織化学的解析を行った。ヒト肝臓では誘導型アイソザイムである HO-1 は主に Kupffer cell に発現し、HO-2 は肝実質細胞に発現していることが示された。また脾臓では赤脾髄のマクロファージに HO-1 が高発現していることも併せ明らかになった。また作成した抗体のうち、HO-1 活性を特異的に阻害するものが得られたため、これを利用し少量の wedge biopsy サンプルからアイソザイム特異的酵素活性を定量的に計測するシステムを確立した。研究対象の特定疾患として特に idiopathic portal hypertension (IPH)に着目し、大阪市立大学第3内科黒木教授の協力をいただき、本症の数例の肝生検、摘出脾臓標本の検索を進めた結果、肝臓の Kupffer cell の密度には変化がないにもかかわらず、HO-1 の発現が著しく低下している一方、脾臓では HO-1 発現が上昇していることが示された。同様の結果は肝硬変症では認められずむしろ Kupffer cell のみならず肝実質細胞での発現が上昇していた。IPH に見られるこのような変化は前類洞性門脈収縮の結果と考えられるが、本症における血球系の turnover の異常が単なる門脈圧増加による脾機能上昇によるものではなく、ヘム代謝コンパートメントと鉄回転の異常を背景として起きている可能性を示唆するものとして注目できる。また今後肝サンプルの HO 活性の動きと血球数異常の相関を調べることで、より、明確な重症度判定基準のなかった本症での index として応用できる可能性も提示できると考えられる。また一方で今後 HO-1 遺伝子のプロモーター領域に shear stress を感知する機構の存在の立証を試み、Kupffer cell が類洞血流動態のセンサーとして機能している可能性を検索する予定である。

赤池は、ウイルス肺炎モデルを用いて、ウイルス性炎症反応にともなって過剰に産生されるパーオキシナイトライトによる肺損傷と遺伝子変異促進作用について解析した。(1) インフルエンザウイルス肺炎モデルの肺組織と気管支・肺胞洗浄液 (BALF) 中に、ニトロチロシンが検出され、そのレベルは NOS 阻害剤やパーオキシナイトライト消去剤の投与により有意に減少し、同時に、パーオキシナイトライト消去剤により肺組織のアポトーシスも強く抑制された。この知見

は、肺組織蛋白のニトロ化反応が、ウイルス性急性肺損傷に深く関わっていることを示している。(2) iNOS (+/+)マウス感染系においては iNOS(-/-)マウスの3倍程度高いウイルス遺伝子変異率が認められた。このことは、パーオキシナイトライトが、生体やウイルスの塩基を損傷し、内因性の変異原性物質として作用することを示唆している。近年、パーオキシナイトライトが特発性間質性肺炎などの難治性炎症性疾患の組織損傷に深く関与していることが指摘されている。従って、組織中のニトロチロシンレベルが活性酸素・NO による急性組織傷害の良い指標となることが示唆された。今後、パーオキシナイトライトを標的にした各種難治性疾患の新しい治療法の開発が期待される。

井上は、脳血管病態、癌病態、および感染病態における NO の代謝制御機能を解析し、その病態への関与を明らかにすること、難治性疾患である家族性側索硬化症(FALS)の分子病態の解明を目標として研究を行った。その結果、生体内の生理的低酸素環境下では NO の寿命が延長し、その生理作用及び病理的作用が著しく増強することが判明した。このため、虚血再循環病態では血管が SOD 依存性に弛緩すること、これが低酸素下での NO 依存性 cGMP 産生増加に起因することが判明した。さらに、従来から細胞質に局在すると考えられてきた Cu/Zn-SOD が重ミトコンドリア画分やペルオキシゾーム画分にも存在すること、および FALS 患者の SOD はその超微局在性が崩れることが判明した。これらの所見から、活性酸素病態を理解するためには、分子レベルでの組織細胞内酸素環境や抗酸化防御酵素系の分布が重要であることが判明した。さらに、NO とスーパーオキシドラジカルおよび両者の反応産物であるペルオキシナイトライトが局所酸素代謝環境に応じて遺伝子発現制御や遺伝子変異を誘起する可能性が明らかになった。

安河内は、E-セレクトインを中心に白血球の血管内皮接着現象のメカニズムを解析し、難治性血管炎をはじめとする炎症性病変の病態解明をつづけてきた。昨年度までに白血球接着に際して血管内皮細胞で E-セレクトインを介したシグナル伝達が起こることを世界に先駆けて報告し、また組み換え型アデノウイルスベクターを使った遺伝子導入法により E-セレクトインを培養内皮細胞上に過剰発現させることにも成功した。今年度はこの遺伝子導入システムを用いて、E-セレクトインをラット大動脈に導入、ウエスタンブロッティング法および免疫組織染色にてその発現を確認した。さ

らにこのラット大動脈に導入した E-セレクトイン分子の白血球接着機能を検討するため、ラット大動脈を使った還流接着実験装置を構築し、E-セレクトイン導入群とコントロールベクター導入群で白血球接着現象を生理的流速存在下で比較した。E-セレクトイン導入ラット大動脈ではコントロールベクター導入群の比べて著明な白血球接着が誘導されていることが走査電子顕微鏡による観察で明らかになった。また、蛍光ラベルした白血球を用いた定量解析でも E-セレクトイン導入群における著明な白血球接着が確認された。このモデルは炎症や動脈硬化における白血球接着現象を血管レベルで検討していくうえで非常荷有用なシステムといえる。

難病特別研究員の研究成果

石橋（原発性高脂血症）は、原発性低脂血症に関して研究を行った。原発性低脂血症の重症例は脂肪と脂溶性ビタミンの吸収障害、有棘赤血球、網膜色素変性、脊髄小脳変性症などの多彩な症状を呈する。無ベータリポタンパク血症 (ABLP) と低ベータリポタンパク血症 (HBLP) の 2 種類の異なる疾患単位が原発性低脂血症の代表的原因として知られている。近年、ABLP の原因遺伝子はマイクロゾームトリグリセリド転送蛋白 (MTP) であり、HBLP の原因遺伝子はアポ B であることが明らかにされ、既に、欧米では数十家系の報告がある。一方、本邦では ABLP の報告例は数例にとどまり、遺伝子異常を同定した報告例はない。更に、HBLP の報告例もない。我々は、原発性低脂血症 3 例をについて、それらの遺伝子異常を検索した。その結果、32 歳女性例に MTP のエクソン 11 の cDNA1385-1389 の 5 連続のアデニンのひとつが欠損する結果のフレームシフト変異を、27 歳男性例に MTP の Asn780Tyr 変異を同定した。また、57 歳女性例にアポ BcDNA5472 の C が T に置換する結果 1755 番目の Gln がストップに変わるナンセンス変異を同定した。

今井（進行性腎障害）は、TGF-beta を用いた糸球体硬化発症に対する遺伝子治療の基礎的研究を行った。糸球体硬化発症・進展過程における TGF-beta の役割は広く認識されるようになってきているが、進行性腎障害の進展には糸球体障害よりも間質病変の程度が相関し、この間質病変、特に線維化に TGF-beta が深く関与することも報告されている。従って、腎間質における TGF-beta の作用の抑制が腎障害進展阻止の有力な手段となることが期待される。そこで本年度は、

腎間質線維化モデルである尿管結紮モデルを用いて、遺伝子治療が可能かを検討した。具体的には腎間質細胞に遺伝子導入を行うことにより、TGF-beta の発現および作用を制御し、間質線維化を抑制するというストラテジーに基づいた遺伝子治療の可能性を検討した。これを実現させるために、artificial viral envelope を用いた改良型 HVJ-liposome 法を開発した。in vivo の実験モデル系として腎間質線維化モデルである一側尿管結紮モデルを用いて、腎間質線維化に対して TGF-beta AS-ODN による遺伝子治療法の有効性について検討した。はじめに、artificial viral envelope を用いた改良型 HVJ-liposome 法により FITC ラベルしたオリゴ DNA をラット尿管より逆行性に腎臓へ導入したところ、10 分後、すでに FITC ラベルしたオリゴ DNA が、腎髄質のみならず皮質の間質細胞の核にも集積していることが確認された。そこで一側尿管結紮モデルを用い、TGF-beta に対する AS-ODN を改良型 HVJ-liposome 法により腎間質細胞に導入したところ、TGF-beta, Type I Collagen mRNA の発現が抑制されるところに、腎間質の線維化が抑制されることが確認された。

金田（希少難治性皮膚疾患）は、遺伝子治療法の開発の基盤研究として、リポソームをベースにしたハイブリッド型ベクター (HVJ-liposome) の開発を行っている。今年度は特に導入遺伝子の発現の維持のための研究を行った。我々はそのために Epstein-Barr (EB) ウイルスの潜伏感染装置を用いることにした。そのメリットは潜伏感染装置と最小限要素が EB ウイルスにおいて複製起点 oriP 配列とそれに結合する核蛋白 EBNA-1 であることが同定されており、EBNA-1 が CTL を誘導せず免疫学的排除から逃れうること、EBNA-1 のみではリンパ球の形質転換には不十分であること、あげられる。しかし、EB virus そのものをベクターとしたのではリンパ球にしか導入できない。そこで EB replicon vector を P205 の EBNA-1 と oriP の配列をもとに作製し、それに chick-beta actin promotor を加えて、目的遺伝子を発現できるプラスミドを構築し、これを改良型 HVJ-liposome によりあらゆる組織細胞に導入することを試みた。このレプリコンベクターに luciferase gene を挿入したプラスミドを正電荷型 HVJ-liposome でヒト培養細胞に導入した。HEK293 細胞において EB の配列を持つ pEBActluc の導入群では 2 日後からルシフェラーゼ遺伝子発現が上昇し低下は見られなかったのに対して、EB の配列を持たない

pActluc の導入群では1日目をピークに以後急速に低下した。さらに長期に培養した時にプラスミド DNA が保たれ自律増殖していることがサザンプロットにより確認された。一方、マウスやハムスターの細胞に導入すると自律増殖は見られないが、遺伝子発現は維持され、導入遺伝子の核内保持がサザンプロットにより確認された。この方法でマウス肝臓、骨格筋にルシフェラーゼ遺伝子を導入すると各々35日、96日まで認められた。潜伏感染装置を持たないと各々1、4週間で発現がなくなった。この遺伝子の維持は oriP が核マトリックスに結合しておこり、そこに EBNA-1 が作用して発現が保たれている。そこで EBNA-1 の発現量を高めれば遺伝子発現が増強されるであろうと考えて、oriP をもつルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドを EBNA-1 の組み換え蛋白と正電荷型 HVJ-liposome により HeLa 細胞に共導入した。ところが予想に反し、oriP, EBNA-1 の共導入群では EBNA-1 が核移行せず、oriP, EBNA-1 の一方を欠いた場合に比較して24時間後での発現は著しく低下した。そこで oriP をもつルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドを EBNA-1 強発現ベクターと HVJ-liposome により共導入すると、oriP 依存性、EBNA-1 DNA 量依存性にルシフェラーゼ遺伝子の発現が培養細胞において最大30倍増強された。これは主として転写の増強によっていることがノザンプロットで確認された。この系を用いてヒトインスリンをマウス骨格筋に導入することにより4週間以上にわたってヒトインスリン値をマウス血中で高く維持する事に成功した。

慶長(びまん性肺疾患)は、びまん性汎細気管支炎(DPB)発症に関係する体質的な問題として、1990年、杉山らは、DPB患者はヒト白血球抗原であるHLA-B54を持つことが多いことを報告した。本研究ではそのことを足がかりにDPBになりやすい体質を決める遺伝子(疾患感受性遺伝子)は一体どのようなものであるのか検討を進めてきた。昨年度、我々の求めに応じて韓国人のDPB症例のHLAを検討したソウル大学の朴明姫教授は、韓国の患者においてはHLA-A11抗原を持つことが特徴で、HLA-B抗原についてはB54ではなく、B55やB62を持つ者が多いと発表した。このことは、日韓の人類遺伝学上の近さを考えに入れると、B54とA11の対立遺伝子型を持つ共通の祖先染色体のA、B遺伝子座に挟まれた領域に何らかの遺伝子が存在して、その遺伝子の変異がDPB発症を促している可能性がうかがわれる。すなわち、

日本ではその遺伝子よりHLA-A遺伝子の側で染色体が切れる(組み換え)ことが多かったために、反対側のB54は保存され、逆に、韓国ではHLA-B遺伝子の側で組み換えが生じたために、A11との関連性が保たれたと考えると理解しやすい。本年度は、この仮説をめぐって、まず初めに、HLA-A、B座のほぼ中間に位置する非古典的HLAとして最近注目されるHLA-E遺伝子を候補遺伝子のひとつと考え、そのプロモータ領域およびexon 3の多型性をPCR-SSCP法により検討したが、DPBとは有意な関連性を示さなかった。そこでHLAに関連した候補遺伝子の存在すると予想される範囲をより明確にする目的で、HLA-A、B間のマイクロサテライトマーカー(m1からm6まで)を用いたハプロタイプの解析と連鎖不平衡マッピングを試みた。その結果、同一染色体上に存在する対立遺伝子のセットであるハプロタイプの中で、DPB患者に多く見られるハプロタイプはいずれもm2の#15という対立遺伝子を共有することが明らかになった。一方、連鎖不平衡の強さから感受性遺伝子のおおよその位置を推定する手法である連鎖不平衡マッピングによってもm2は疾患感受性遺伝子座と近い位置にあることを示唆するデータが得られた。今後このm2周辺の数100kbの範囲についてさらに詳細に検討し、HLA領域のDPB感受性遺伝子の本体を明らかにしていく必要がある。

後藤(副腎ホルモン産生異常)は、前年に引き続き副腎、性腺の発生、分化に早期より重要な役割を演ずるAd4BPの異常症を検索するとともに、後期分化に重要なアンドロゲン受容体(AR)遺伝子に異常を認めないにもかかわらず完全型睾丸性女性化症を発症した症例に、共役因子の異常が存在することを明らかにした。

剖検時に、副腎、性腺が無形成で、かつ外性器が女性型と、Ad4BPノックアウトマウスの表現形質と極めて類似した男児死産症例をオーストラリアより提供を受けた。Ad4BPが発現する脾臓の固定標本の免疫染色、ならびに同標本より抽出したDNAを用いてAd4BP遺伝子のコーディングエクソンをPCRにて増幅、さらに増幅産物の塩基配列を決定した。患児脾臓は抗Ad4BP抗体にて染色されず、かつエクソン2,3,4を含む領域はPCRにて増幅されず、同領域の欠失が疑われた。しかしながら、固定標本より抽出したDNAのためSouthern blotが施行できず、最終的な確証は得られなかった。