

20000 926 ~ 0936

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

# 目 次

## 課題番号

11011	脳梗塞動物モデルの開発と創薬研究への応用	柳本 広二	……	1
11037	免疫・脳神経系のゲノム恒常性維持に係る遺伝子発現制御機構の解明	葛西 正孝	……	7
11106	ヒト組織構築モデル動物の作製と応用に関する研究	藤本純一郎	……	12
11168	疾患モデルラットの調査とラットゲノムの基盤研究によるヒト疾患遺伝子の総合的探索研究	芹川 忠夫	……	19
11178	神経・筋疾患モデル動物の病態解析及び開発のための基礎研究	菊池 建機	……	25
11217	長寿命新規蛍光標識剤の開発および応用	嶋 秀明	……	30
12004	薬物及び生体分子の高感度高性能分析・解析技術の開発に関する研究	今井 一洋	……	38
12129	ゲノム情報に基づく骨疾患治療医薬品の開発に関する研究	瀬原 淳子	……	45
12259	白血球機能の新しい制御手法の開発に関する研究	鈴木 和博	……	50
12263	チャネルの開口を視る技術の開発研究	川西 徹	……	56
12271	正常ヒト上皮組織に由来する初代培養細胞の増殖制御機構の解析とその研究資源化に関する研究	林 真	……	66

## ゲノム情報に基づく骨疾患治療医薬品の開発に関する研究

所属 京都大学再生医科学研究所 再生増殖制御学分野

瀬原 淳子

分担研究者 京都大学再生医科学研究所 再生増殖制御学分野

栗崎 知浩

東京都臨床医学総合研究所

内田 光子

持田製薬総合研究所 バイオサイエンス研究室

森下 英昭

### 要旨

ADAMファミリーに属するメルトリン $\alpha$ 、 $\beta$ 遺伝子のノックアウトマウスの作成に成功し、その表現型の解析をおこなった。その結果、メルトリン $\alpha$ ノックアウトマウスで筋形成の異常とそれに伴う骨の異常を見い出すことが出来た。メルトリン $\beta$ に関しては、その基質の一つが膜型増殖因子ニューレギュリンであることを見い出した。また、メルトリン $\beta$ に対する特異的抗体を得、メルトリン $\alpha$ ・ $\beta$ の発現が筋再生において活性化されることを見い出した。

### 1. 研究目的

本研究は、骨形成・癒合に関わる細胞間相互作用の遺伝子レベルでの解明とそれにもとづく骨疾患治療薬の開発をめざしている。

骨は、軟骨細胞・骨芽細胞・破骨細胞など骨形成に関わる細胞同士の、複雑な相互作用によってそれらが分化し、形作られていくものである。さらに、形態形成において、骨形成は骨格筋形成と協調的に進行する。それは一つには、軟骨細胞や骨芽細胞・筋細胞や腱細胞が幹細胞を共有していること、またこれらの形成が血管形成や神経形成ともリンクしていることによるのであるが、そのような形態形成の協調的プロセスに、どのような分子基盤・制御機構があるのかは、現在のところよく分っていない。これを理解するためには、間葉細胞分化における細胞間相互作用とその制御機構の解明を必要とする。従ってそのような細胞間相互作用とその制御に関する分子機構と遺伝子群の解明は、これらの疾患の理解を飛躍的に高める上、細胞間相互作用に関わるゲノム情報に基づく合目的医薬品設計を可能にする。

本研究は、骨形成を中心に、間葉細胞の分化・組織形成機構を、細胞間相互作用の視点から明らかにし、それにもとづいて骨疾患治療薬の開発を目的としてきた。特に、我々が世界に先駆けてクローニングした、ADAMファミリーに属する膜型メタロプロテアーゼ、メルトリン遺伝子群を中心として活性分子のゲノム情報にもとづいて、骨形成不全などの疾患治療薬の開発をめざしてきた。

ADAMファミリーは、メタロプロテアーゼドメイン・ディスインテグリンドメインを有するユニークなタンパク質群で、可溶性分子ヘビ毒ディスインテグリンは血液凝固阻害活性を、膜タンパク質ファーティリンはディスインテグリンドメインを介して受精に関与することが知られる。一方、同じファミリーに属する TACE のメタロプロテアーゼは TNF  $\alpha$  を、クズバニアンは Notch あるいは Delta をそれぞれ切断活性化し、これらは、細胞間シグナリングをプロセッシングという形で制御する新しいタイプの分化因子と見なすことができる。

私達は、マウス胎仔期において、骨形成のおこなわれる領域などの凝集間葉細胞でのメルトリン  $\alpha$  の強い発現や、メルトリン  $\beta$  の骨髄における発現などに興味をもち、まず、これらの遺伝子の役割や機能を知るために、次のような具体的な研究目標を立てた。

- 1) メルトリン遺伝子群の形態形成や個体レベルにおける役割を、遺伝子ノックアウトマウスを作成することにより、遺伝学的に明らかにすること。
- 2) 細胞生物学的なアプローチにより、それらメルトリンのディスインテグリンの生理活性と相互作用する分子を特定すると同時に、メタロプロテアーゼの基質を検索する。
- 3) これら膜蛋白質の可溶性フォーム・活性ペプチド・阻害抗体などを作成し、その効果を細胞レベル、個体レベルで検討する。
- 4) これらの解析から、メルトリン  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の細胞間相互作用における位置づけをあきらかにするとともに、医薬としての応用、再生医療などへの応用を検討する。

## 2. 研究方法および成果

### 1) メルトリン $\alpha$ 遺伝子のマウス個体における役割

メルトリン  $\alpha$  遺伝子欠損マウスを作成し、解析を行った。現在、BALB/c, C3H/He, C57BL6 の3系統に戻し交雑を行って解析を行っている。いずれの系統(n = 8)でもホモ個体の約40%が早期に死亡することが明らかになり、マウスの系統によるものではなく、単一遺伝子座の欠損によるものであると判断した。そして表現型の一つとして、ホモ個体では、特に僧帽筋などの筋肉を中心として、筋形成不全が見られることが明らかになった。その筋形成不全に伴って、骨のつき方にも異常がみられた。ホモ個体の約40%が出生後まもなく死亡する原因も、この筋形成不全によるのではないかと考えている。

一方、成体の筋肉ではメルトリンは発現していないが、筋破壊後の再生過程では、再生部位に一過的にメルトリン  $\alpha$  の発現が誘導されることを見いだした。しかしノックアウトマウスでは筋肉の再生に大きな異常は認められず、この過程にメルトリン  $\alpha$  は必須ではないことがわかった。

### 2) メルトリン $\alpha$ のディスインテグリンドメインの機能

ADAM ファミリーにおいて、最近はそのメタロプロテアーゼドメインに注目が集まっている。しかし、それらのディスインテグリンドメインも、ヘビ毒や受精にかかわるファーティリンの場合がそうであるように、何らかの機能を果たしているに違いない。そこで、メルトリン  $\alpha$  のこのドメインを含む可溶性組換え蛋白質を Cos 細胞で大量発現し、その精製品を得た。その蛋白質の細胞結合性をみたところ、分化後の筋管よりむしろ分化前の筋芽細胞とよく結合した。

さらに、Scripps Research Institute の高田義一博士との共同研究によって、メルトリン $\alpha$ が、筋特異的なインテグリンである、Integrin  $\alpha 9\beta 1$  発現細胞と相互作用する、という結果を得た。現在までのところ、それが細胞接着や認識に関わっているかどうかは、明らかになっていない。

### 3) メルトリン $\beta$ 遺伝子の発現とマウス個体における役割

メルトリン $\beta$  も細胞外領域にメタロプロテアーゼドメインやディスインテグリンドメインなどマルチドメインを持つ膜貫通型の ADAM である。後根神経節など末梢神経の生ずる領域、及びマウス胎仔・新生仔期の筋細胞、骨髄で強い発現が見られ、メルトリン $\alpha$ とは異なる役割を果たしていると考えられる。

メルトリン $\beta$  に関して、それらに対するポリクローナル抗体を2種、およびモノクローナル抗体を6クローンとることができた。マウス形態形成におけるメルトリン $\beta$  の発現を蛋白レベルで詳細に調べた結果、脊髄では胎生中期から出生後まで発現量に変化が認められなかったが、後根神経節では出生後に発現量が減少することが明らかになった。また免疫組織染色では、後根神経節において NF160 陽性神経細胞で発現していることが分かった。また、メルトリン $\beta$  は、筋再生過程でも活性化されることがわかった。

マウスメルトリン $\beta$  遺伝子を単離し、ES 細胞を用いた遺伝子ノックアウトマウスを作成し、ホモ個体を得た。このノックアウトマウスは出生後一週間以内にその85%が死ぬことがわかった。形態形成不全が見い出され、それが死因と考えられることから、現在さらにその異常に関して検討中である。

### 4) メルトリン $\beta$ のメタロプロテアーゼの基質の同定

一方、メルトリン $\beta$  のメタロプロテアーゼドメインは、活性部位が保存されプロテアーゼとして機能しうることが予想された。メルトリン $\beta$  の発生段階における発現部位から、これと似た発現パターンを示し、心臓形成や神経分化、神経筋接合部の形成などに関与することが知られる細胞膜貫通型増殖因子ニューレギュリンが、メルトリン $\beta$  の基質となりうる可能性が考えられたので検討した。まず、ニューレギュリンは、alternative splicing により種々のアイソフォームが生ずることから、これらの各種マウスニューレギュリンの cDNA をクローニングした。それらを用いて、ニューレギュリンのプロセッシングが野生型メルトリン $\beta$  を共発現する事により増強し、プロテアーゼ活性を持たない変異型メルトリン $\beta$  を共発現すると増強が見られない、あるいは抑制されることを見出した。また、メルトリン $\beta$  の発現によって、細胞表面に露出しているニューレギュリンの細胞外ドメインが消失し、メルトリン $\beta$  プロテアーゼドメインがこの膜蛋白質のいわゆる ectodomain shedding に関与していることを示した。更に、ニューレギュリンとメルトリン $\beta$  が互いに共沈する事も明らかにした。これらの結果はメルトリン $\beta$  がニューレギュリンのプロセッシング、すなわち蛋白分解による膜型から可溶化型への変換に直接関わっている事を示唆した。

### 3. 考察と結論

以上、メルトリン遺伝子欠損マウスは半致死であることがわかり、そのうちメルトリン $\alpha$ がマウス個体においても筋形成にかかわっていることを明らかにした。また、メルトリン $\alpha$ がそのディスインテグリンドメインを介して細胞間相互の認識に関与していることを示唆した。また、メルトリン $\beta \cdot \gamma$ が、それらのメタロプロテアーゼドメインを介して細胞膜貫通型増殖因子の蛋白分解によるプロセッシングに関与することを見い出した。

現在のところ、メルトリン $\alpha$ に関してはプロテアーゼの基質の同定ができておらず、欠損マウスの表現型がどのような分子機能の欠損によってもたらされているのかは、今後検討せねばならない。メルトリン $\beta$ に関してはこの分子が膜型プロテアーゼとしての機能を持ち、ニューレギュリンのプロセッシングにかかわることがわかったことから、今後、個体におけるメルトリン $\beta$ の役割と分子の機能を結び付ける手がかりが出来たものと考えている。また、これらのノックアウトマウスがどのような疾患のモデルマウスとして捕らえられるかを、さらに詳しく検討し、創薬への足掛かりとしたい。

### 4. 研究発表

Hiroyuki, A., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., and Yahara, I. (2001) Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nature Neurosci.*, *in press*.

Shirakabe, K., Wakatsuki, S., Kurisaki, T., and Fujisawa-Sehara, A. (2001) Role of Meltrin  $\beta$  in the processing of neuregulin. *J. Biol. Chem.*, *in press*

Eto, K., Puzon-McLaughlin, W., Sheppard, D., Fujisawa-Sehara, A., Zhang, X-P., and Takada, Y. (2000) The RGD-independent binding of integrin  $\alpha 9 \beta 1$  to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J. Biol. Chem.*, *275*, 34922-30.

Bornemann, A., Kuschel, R., and Atsuko Fujisawa-Sehara. (2000) Analysis of transcript expression of meltrin  $\alpha$  in normal, regenerating, and denervated rat muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, *21*, 475-80.

Kurohara, K., Matsuda, Y., Nagabukuro, A., Tsuji, A., Amagasa, T., and Fujisawa-Sehara, A. (2000) Chromosomal mapping of the meltrin  $\beta$  (ADAM19) gene, cloning and analysis of its regulatory region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *270*, 522-527.

Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., Ishiura, S. (1999) Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an

$\alpha$ -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* **343**, 371-375.

Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., and Mekada, E. (1998) A metalloprotease-disintegrin, ADAM9/MDC9/meltrin- $\gamma$ , and PKC $\delta$  are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.*, **17**, 7260-7272.

Kurisaki, T., Masuda, A., Osumi, N., Nabeshima, Y., and Fujisawa-Sehara, A. (1998) Spatially- and temporally-restricted expression of meltrin $\alpha$  and  $\beta$  in mouse embryo. *Mechan. Dev.* **73**, 211-215.



---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社

