

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

## 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

所 属 国立精神・神経センター神経研究所  
モデル動物開発部  
研究者 菊池 建機

### 分担研究者

- |                        |      |
|------------------------|------|
| (1) (財)日本生物科学研究所       | 水谷 誠 |
| (2) 近畿大学農学部            | 角田幸雄 |
| (3) 科研製薬(株)開発研究所       | 千田尚人 |
| (4) 日本臓器製薬(株)生物活性科学研究所 | 三上博輝 |

### 要 旨

医薬品開発に利用される神経・筋疾患モデル動物を確立し、それらを治療実験に応用することを最終目標とする。我々は自然発症ミュータントの病態解析と治療実験を行なうとともに、胚操作による遺伝子導入マウスや核移植によるクローンマウスを作製するための基礎的研究を行う。

#### 1. 研究目的

自然発症ミュータントとして軸索変性 gracile axonal dystrophy (gad) マウス、末梢神経ニューロパチーの Trembler (Tr) マウス、小脳変性 cerebellar calcification (cc)ラット及び糖原病 II 型ウズラ(AMD ウズラ)の病態解析と分子遺伝学的研究を行う(国立精神・神経センター神経研究所)。また、筋緊張性ジストロフィー様ウズラ、ニューロフィラメント欠損ウズラおよび視覚障害を呈する GSN/1 系ニワトリの各系統の改良を行うとともに、疾患モデル動物としての利用性を検討する((財)日本生物科学研究所、国立精神・神経センター)。小脳変性症 (spinocerebellar degeneration: SCD) あるいは運動失調のモデルとされる gad、PCD、Reeler(rl)、Staggerer(stg)、Trembler(Tr)および Weaver(wv)の6系統のマウスを用い、行動薬理学的あるいは組織学的な解析を行う。また、SCD 患者に対して有効性が一部明らかにされているワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出物製剤(ノイロトロピン®)の薬効評価および作用機序を上記の解析結果をもとに検索する(日本臓器製薬(株)、国立精神・神経センター)。

1997年2月に綿羊乳腺培養細胞の核移植によって仔が得られて以来、マウスでも体細胞由来の産子が得られているが、その成功率は低く Tg マウスの作出に応用することは困難である。昨年度、我々はマウス ES 細胞の核移植によって、きわめて低率ではあるが死亡産子を得ることができた。そこで本年度は、遺伝的背景の異なる ES 細胞株を用いて核移植を行い、産子への発生能を調べた(近畿大学農学部、国立精神・神経センター)。ヒト型神経成長因子(hNGF)を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスの生存率と脊髄灰白質のグリア増生や脊髄神経節の一次感覚神経細胞の神経ペプチドの免疫組織学的研究を行う(科研製薬、国立精神・神経センター)。

#### 2. 研究方法

##### 1) 自然発症疾患モデル動物を用いた研究

Gad マウスはポジショナルクローニングにより疾患遺伝子を単離した。小脳変性症 cc ラットはβ<sub>2</sub>ミクログロブリン細胞の変性と石灰沈着について病理組織学的に解析した。AMD ウズラはその病理学的検討とともに遺伝子異常解析を行い、国際共同事業により酵素補充療法を実施した。AMD ウズラは(財)日本生物科学研究所が維持、改良を行うとともに、原因遺伝子のマッピングを行うための標準家系を作製した。

発症マウスおよび非発症マウス間での歩行障害度の比較から stg マウスが薬効評価に適した系統であることが判明し、stg マウスを用いてその失調歩行に対するノイロトロピン(100NU/kg,i.p.)の1週間連日投与による改善効果を検討したところ、投与4日目および投与7日目に投与開始前と比較して軽度ではあるが有意な歩行障害の改善を示した。そこで、ノイロトロピンの長期投与(28日間)試

験を実施し、ノイロトロピンの失調歩行改善効果の再現性および投与をさらに継続した場合に改善効果が増強されるか否かについて検討し、対照薬の甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (Thyrotropin releasing hormone:TRH) の誘導体である TRH-T(酒石酸プロチレリン、ヒルトニン、武田薬品)の効果と比較検討した。また、stg マウスでは胸腺や脾臓の萎縮およびマクロファージの活性上昇など免疫系の異常が報告されているので、胸腺および脾臓重量への影響も併せて検討した。

被検物質としてノイロトロピン (100 NU/kg) を、比較対照薬には TRH-T(25 mg/kg)を用い、いずれも 28 日間連日腹腔内投与した。対照群には生理食塩液を 10 mL/kg の容量で同様に投与した。失調歩行に対する薬物の効果はオープンフィールド法により転倒指数 (転倒回数/移動量) を指標に検討し、測定は投与開始前および投与 1、4、7、14、21 および 28 日目の投与 15、30 および 60 分後に 10 分間実施した。オープンフィールド法による最終測定終了後、エーテル麻酔下で腹部大動脈より放血した後、胸腺および脾臓を摘出し、湿重量を測定した。また、臓器重量を体重で除した相対重量 (mg/g) も求めた。統計解析には t 検定あるいは Dunnett 多重検定を用い、 $P < 0.05$  の場合に有意差ありとした。

## 2) 発生工学的的手法による疾患モデル動物の作出

ドナー細胞には新しく樹立した 10 種類の ES 細胞を用いた。それぞれ 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ノコダズール添加 DMEM 培地で 3 時間培養後、培養ディッシュ底面から浮き上がってきたものをドナー細胞として用いた。このような細胞は、M 期であることをあらかじめ確認した。レシピエント卵細胞質は、hCG 投与後 13.5~15 時間目の F1 雌より未受精卵を採取し、卵丘細胞を除去後、第 2 減数分裂中期の染色体を除去したものを用いた。ドナー細胞とレシピエント卵細胞質の融合は不活化センダイウイルスを用いて行い、融合後活性化刺激を与えるまで M16 培地に 1 時間静置した。ついで、150v/mm 50 $\mu\text{sec}$  の直流パルスを与えた後 50v/mm 50 $\mu\text{sec}$  の電気を 2 回通電するか、10mM ストロニウム添加 M16 培地で 5 時間培養することによって活性化させた。活性化後 5 時間目に核の形成の有無を確認し、1 核 1 極体を形成した卵子をその後体外培養した。4 日間体外培養後、胚盤胞へ発生した胚は仮親へ移植し、体内での発生能を検討した。また、一部の核移植卵由来 2 細胞期胚は、体外受精卵由来 2 細胞期胚との再核置換を行った。

Tg マウスの作製ではヒト NGF 導入マウス及びヒト aFGF 導入マウスの系統維持を行っており、約 2 年間に及ぶマウスの生存率を測定する。加齢に伴う中枢神経系 (大脳、小脳、延髄、脊髄、脊髄神経節 (DRG)) の病理形態学的変化を 2 才齢の老齢 hNGF-Tg マウスと対照野生マウスの間で検討した。マウスを心臓左心室より Zamboni 固定液で還流固定した。パラフィン包埋後、5  $\mu\text{m}$  切片を作製した。中枢神経系の脊髄及び脊髄神経節の感覚神経細胞と神経ペプチド、Substance P (SP) と Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP) の分布を免疫組織学的に解析した。

## 3. 研究成果

### 1) 自然発症疾患モデル動物の病態解析と治療法の開発

Gad マウスは染色体 5 番に位置する Ubiquitin c-terminal hydrolase type-L1 (Uchl-L1) 遺伝子のエクソン欠失により発症することが明らかとなった。Uchl-L1 はユビキチンの再利用に必須の酵素で主に中枢神経系で作用する。免疫組織染色によると gad マウスの中枢神経系は広範囲にユビキチンの沈着がみられ、ユビキチンに関連する代謝異常が本ミュータントの発症と密接に関係している。Uchl-L1 遺伝子異常は軸索終末に変性蛋白の蓄積を招き、再利用されないユビキチンが沈着するものと考えられる。今後は gad マウスに Uchl-L1 遺伝子を導入した Tg マウスを作製し、軸索変性を阻止できるかどうかを検討する。

糖原病 II 型ウズラはヒトの代表的なリソソーム病である Pompe 病の疾患モデル動物であることを遺伝子レベルで明らかにした。クローニングの過程で、GAA1 と GAA2 の 2 種類の酵素 cDNA を単離した。ポリゼンによる発症のメカニズムは現在最も注目されている分野であり、ウズラの 2 種類の酵素遺伝子の発症に及ぼす相互作用を今後とも解明していきたい。遺伝子異常解析ではエクソン 7 に 1 塩基 (G:guanine) の欠失を認めた。我々が Gene bank へ登録した塩基配列によれば (ヒトの場合より非翻訳領域が長い) 変異の位置は delG1639 であり、アミノ酸レベルでは Ara366->Shift である。すなわち翻訳領域のアミノ酸 366 番目のアラニン (Ala) がヒスチジン (His) に変わり、その後フレームシフト変異により 24 番目に TGA の終始コドンが入り、その後のアミノ酸は合成されないことが明らかとなった。また、早期発症系および遅発症系を確立し、これら両系の交配実験から早期発症遺伝子 (E) は常染色体性の優性遺伝子により支配されていることを明らかにした。また、この優性遺伝子がホモ (EE)

では致死となり、ヘテロ(Ee)個体では 4~6 週齢で発症し、遅発症遺伝子がホモ(ee)の個体は 6 ヶ月齢以上で発症することが明らかとなった。

視覚障害を呈する GSN/1 系ニワトリに関しては、視細胞に含まれる光受容蛋白質であるオプシンに異常はないことを明らかにした。筋緊張性ジストロフィーウズラに関しては、マッピングのためのリファレンスファミリーを作製し、血液を保存した。ニューロフィラメント欠損ウズラに関しては継代を 2 世代行った。

Stg マウスを用いて、ノイロトロピン 100 NU/kg の 28 日間連日腹腔内投与による影響を検討した結果、ノイロトロピンは投与 7、14 および 21 日目の投与 15 分後に投与開始前と比較して軽度ではあるが、有意な転倒指数の低下を示した。一方、比較対照薬である TRH-T 25 mg/kg 投与群では、投与前値あるいは対照群のいずれと比較しても投与 15 分後をピークとした転倒指数の有意な低下が投与 1 日目から投与期間中を通じてみられたが、60 分後には投与開始前の状態にほぼ戻った。非発症群において生理食塩液投与の影響をみたが、無処置群と投与群間に有意差は無く、何ら影響は認められなかった。次に、非発症および発症マウスに生理食塩液を投与した対照群同士の比較を行ったところ、発症群では非発症群と比較して脾臓および胸腺（雄の胸腺を除く）の絶対重量および相対重量の有意な低下がみられた。このような特徴を持つ Stg マウスに対して、ノイロトロピン 100 NU/kg あるいは TRH-T 25 mg/kg を 4 週間連日投与したが、何れの薬剤とも胸腺および脾臓の絶対重量ならびに相対重量に対して何ら影響を及ぼさなかった。

## 2) 発生工学的な手技を用いた研究

本実験で用いた 10 株のキメラ形成率は 40~88% である。融合率は 44~86%、核の形成率はストロンチウム活性化処理区で 95~99%、電気刺激区で 80~94% を示した。また、胚盤胞への発生率は 34~88% を示し、いずれの細胞株および活性化方法を用いた場合も、高率に胚盤胞への発生が認められた。胚盤胞への発生率は用いた細胞株で差がみられ、NARA10 ならびに NARA11 で有意に高く、NARA8 および EGFP 株で有意に低かった。しかしながら、キメラ形成率は 44% と 57%、88% と 50% であることから、胚盤胞への発生率とキメラ形成率間に相関はみられなかった。また、ストロンチウム区で胚盤胞への発生率が高い細胞株 (NARA9, 12) と逆に電気区で高い細胞株 (R1) がみられた。これらの胚盤胞を仮親に移植した結果、9 株の ES 細胞から 1~3% の確率で合計 19 匹の ES 細胞由来マウスが得られた。これらのマウスのうち、14 匹は分娩後 48 時間以内に死亡した。得られた胎子体重は平均 1.42 g であり無処置区と大差なかったが、胎盤重量は 0.28 g と通常の 2 倍以上あった。死亡した 14 匹の大部分で、腹部の膨潤や出血が認められた。また、48 時間以上生存した 5 匹のうち、原因は不明であるが 2 匹は 23 日目と 30 日目に突然死亡した。残りの 3 匹は現在まで (338~359 日) 生存し、いずれも正常な生殖能力を有することが確認された。

ヒト NGF 導入マウス 2 家系は、野生マウスと比較し、老齢に伴う所見 (削瘦、失明、胆癌等) が経度で生存率が高い傾向が認められた。現在も飼育継続中で全ての個体で有意差がでるものと思われる。Tg マウス脊髄や延髄の灰白質のアストログリアの活性化や増生は自然老化の対照群マウスの灰白質に比べ抑制されていた。この結果は前年度のものとも一致する。また、脊髄の前、後索及び側索の白質には SP と CGRP 陽性の軸索が多数認められた。このような所見は対照群マウスにはみられない。脊髄神経節細胞は Tg マウスで SP と CGRP 陽性細胞が野生マウスに比べ多数みられた。

## 4. 考察

Uchl-1 遺伝子異常によるヒト疾患はパーキンソン病の一家系としてドイツで報告されているが、gad マウスに見られるような末梢神経系の障害を示さない。従って、gad マウスと同一のヒト疾患はより末梢神経系に障害を示す患者に含まれていたことが考えられ、現在国内で情報を集めている。糖原病 II 型ウズラの遺伝子異常解析ではエクソン 7 の 1 塩基置換によるフレームシフトが原因で GAA 蛋白が合成されないことが明かとなった。第 2 の遺伝子 GAA2 は酵素の残余活性 (10% 程度) と関連し、遅発症型糖原病ウズラの修飾遺伝子の可能性があるが、現在検討中である。

視覚障害を呈する GSN/1 系の光受容体蛋白質であるオプシンに異常が認められなかったことから、本モデルがヒトの色盲のモデルになる可能性はなくなった。しかし、ヒトの弱視のモデルになると思われる。筋緊張性ジストロフィーウズラに関しては、今後、原因遺伝子のマッピングを行い、ニワトリの筋ジストロフィー遺伝子との異同を検索する予定である。

これまでに得られた行動薬理試験の結果から、薬効評価に適した SCD モデルマウスとして stg マ

ウスを選別し、前年度このマウスを用いてノイロトロピンの7日間連日腹腔内投与による失調歩行改善効果をオープンフィールド法による転倒指数を指標に検討した結果、投与4日目および7日目に軽度な転倒指数の改善がみられた。そこで、今年度はノイロトロピンの効果の再現性、さらに長期投与した場合の効果増強の有無を検討するために、28日間の連日投与を実施した。その結果、投与7~21日目において軽度な改善効果がみられ、前報の再現性が確認された。

Stg マウスでは失調歩行と同時に、胸腺や脾臓の萎縮など免疫機能の異常が発現すると報告されている。ノイロトロピンの免疫系に関する基礎研究では(NZB×NZW) F1 マウスや NZB マウスの免疫機能異常を正常化することが報告されている。そこで胸腺および脾臓重量への影響も併せて検討したが、ノイロトロピンの影響は認められなかった。stg マウスは retinoid-related orphan receptor  $\alpha$  (ROR  $\alpha$ ) 遺伝子の一部が欠損して発症し、ROR  $\alpha$  は小脳のプルキンエ細胞の成長に必要な甲状腺ホルモンを介する情報伝達系と関連しているといわれている。また、プルキンエ細胞の正常な分化や発達あるいは維持に必要であるため、この遺伝子欠損が stg マウスの失調歩行に関与していると推察されている。ノイロトロピンの神経系に対する作用としてこれまで報告されているのは、低酸素下のラット海馬 CA1 pyramidal cell の異常興奮を抑制する作用や、PC12 細胞における神経突起伸展を促進する作用など、神経細胞に対する直接作用が報告されている。以上の結果をまとめると、今回みられたノイロトロピンの失調歩行改善効果は、免疫系よりもこれらの神経系に対する改善作用が直接関係していると考えられた。

キメラ形成能や遺伝的背景の異なる 10 種のマウス ES 細胞株を用いて除核未受精卵への核移植を行った結果、いずれの細胞株を用いた場合でも胚盤胞への発生率は高く、また、9 株の細胞株から低率ではあるが産子を得ることができた。しかしながら、得られた産子の多くは、分娩直後に死亡することが判明した。核移植卵を受胎雌へ移植後の産子発生率は高いことから、着床後の胚死滅が高いと考えられる。また、胎盤重量が通常の2倍以上あることから、用いた ES 細胞にインプリンティング遺伝子の発現異常があると考えられる。

遺伝子導入 Tg マウスの一般状態観察から、hNGF 導入マウス 2 系統は、野生マウスと比較し、老齢に伴う所見(削瘦、失明、胆癌等)が軽度で生存率が高い傾向が認められた。脊髄や延髄でアストログリアの活性化が Tg マウスで抑制される原因は無処置群ではニューロン周辺のシナプス結合に加齢にともない障害が現れるが、Tg マウスでは軸索とニューロンの結合や機能が正常に保たれているため、グリアの増生や活性化がみられないものと推察した。脊髄神経節に含まれる一次感覚ニューロンは中枢神経系の中で NGF 過剰発現に対して影響を受けやすく、脊髄白質の SP や CGRP などにみられる陽性の神経線維は脊髄神経節ニューロンの中核側で分枝や再生が盛んになっていることを示している。これらの反応はオリゴデンドログリアで過剰発現する hNGF により引き起こされることが推察される。ニューロンの末梢神経側でも同様の結果がみられるか否かは今後の課題である。

## 5. 結 論

Gad マウスはユビキチンの合成と再利用に関わる Uchl-1 遺伝子異常により発症することをポジショナルクローニングにより明らかにした。cc ラットはプルキンエ細胞の変性脱落と石灰沈着を主病変とする小脳変性症の動物モデルとなる可能性がある。ウズラは GAA1 と GAA2 の二つの遺伝子を持ち、GAA1 遺伝子の欠失により  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を著しく低下するために発症することが明らかとなった。早期発症と遅発症の遺伝解析から発症の時期には GAA2 が介在し、ある種の変異遺伝子として作用していることが予想された。筋緊張性ジストロフィーウズラの原因遺伝子マッピング用のリファレンスファミリーを作製し、赤血球 (DNA) を保存した。今後、これらを用いマッピングを行う予定である。小脳変性症モデルマウスの gad, Trembler および Weaver について行動薬理的に調べた結果、昨年からの成績と合わせ、stg マウスがオープンフィールド試験で安定、かつ薬効評価に十分な転倒指数を示すことが明らかになった。stg マウスを用い、ノイロトロピン 100 NU/kg1 週間腹腔内投与により軽度な転倒指数の改善が認められた。一方、陽性対照薬の THR-T では明らかな転倒指数の改善が認められた。今年度はノイロトロピンの効果の再現性、さらに長期投与した場合の効果増強の有無を検討するために、28日間の連日投与を実施した。その結果、投与7~21日目において軽度な改善効果がみられ、前報の再現性が確認された。

ES 細胞株が樹立されて以来、標的遺伝子組換えが行われ、多くの疾患モデルマウスが作出されてきている。すなわち、変異させた ES 細胞を用いてキメラマウスを作成し、交配を2回繰り返して

目的とする遺伝子の変異をホモに持つマウスを作出する方法である。この方法では、生殖細胞への伝達能の高い ES 細胞を用いる必要があること、遺伝子操作によって致死になる場合は適用できないこと、変異遺伝子に関してホモになるマウスを得るのに比較的長期間を要することなどの欠点がある。本研究から、キメラを介さずに ES 細胞由来の個体を直接作出できることが明らかになった。正常な生存産子が得られる割合が向上すれば、従来のキメラを介する手法に代わる新しい疾患モデルマウス作出法となる可能性が高い。

細胞成長因子遺伝子導入マウスでは引き続き hNGF 導入マウス及び haFGF 導入マウスの系統維持を行っており、加齢に伴う中枢神経系（大脳、小脳、延髄、脊髄）の病理形態学的変化を検討した。これらの Tg マウスの観察から、hNGF 導入マウス 2 系統は、野生マウスと比較し、老齢に伴う所見（消瘦、失明、胆癌等）が軽度で生存率も高い傾向があることが観察された。hNGF 導入マウスの脊髄神経節ニューロンはオリゴデンドログリアの NGF 過剰発現の影響を受けて中枢側の軸索で活発な分枝や再生を惹起していたものと考えられる。中枢神経系のこのような変化が Tg マウスの生存率の向上とどのような関連性を有するかは今後の検討課題である。

## 6. 研究発表

- 1) Ando Y, Takeshita S, Fujimoto K, Shimizu M, Nagata M, Kikuchi T, Wakasugi N: Genetic mapping of a neurological mutation cerebellar calcification in the rat. *Mamm Genome* 20 (1): 80-82 (2001)
- 2) Hagiwara Y, Sasaoka T, Araishi K, Imamura M, Yorifuji H, Nonaka I, Ozawa E, Kikuchi T: Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice. *Hum Mol Genet* 9 (20):3047-3054, 2000
- 3) 水谷 誠. 日生研において維持されているニワトリとウズラの近交系, クローズドコロニーおよびミュータント系 (疾患モデル系)、動物遺伝育種研究 28: 45-58. 2000.
- 4) 李 恩俊、万年英之、水谷 誠、辻 莊一. AFLP 法によるニワトリ連鎖地図作製. 動物遺伝育種研究 28: 95-100. 2000.
- 5) Amano T, Tani T, Kato, Y, Tsunoda Y : Mouse cloned from embryonic stem (ES) cells synchronized in metaphase with nocodazole. *Journal of Experimental Zoology* 289 : 139-145, 2001.
- 6) Yabuuchi A, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y . : Nuclear transfer of mouse follicular epithelial cells pretreated with spermine, protamine, or putrescine. *Journal of Experimental Zoology* 289 : 208-211 , 2001



---

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

