

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築

所 属 国立精神・神経センター 神経研究所

研究者 赤澤 智宏

要 旨

中枢神経は末梢神経と比較して損傷を受けた際に、再生能力が低いことが知られている。末梢神経の持つ再生能力の分子基盤を明らかにするために、顔面神経再生に際して発現変化する遺伝子群を効率的に同定し、データベース化していく方法を開発した。

1. 目的

生物は一生を通じてさまざまな傷害にさらされるが、通常傷ついた組織や器官は速やかに修復される。この修復・再生能力こそ、多くの外傷や病気からの回復を可能にする成体の防御機構である。神経系においては、外傷や虚血などによる脳損傷、あるいはパーキンソン病などの神経変性疾患に際して、一定程度の再生機構が働くことが知られているが、失われた機能を完全に修復する事は現在の医学ではほとんど不可能である。これを中枢神経と末梢神経について比較した場合、末梢神経は高い再生能力を持っているのに対し、中枢神経では損傷された軸索が再生しなかったり、異所性に神経回路が形成されてしまうことが知られている。この反応性の違いは、損傷部位の局所的な環境、例えば軸索を取り巻く細胞外基質、ターゲットからの神経栄養因子の供給などの要素が、中枢神経と末梢神経で異なるからであると考えられているが、その詳細は分かっていない。末梢神経のもつ柔軟な再生能力を解明することは、中枢神経の損傷に際して再生を促す治療法の開発につながる重要な研究である。本研究は、末梢神経の損傷・再生過程で発現変化する遺伝子のデータベースを構築し、中枢神経再生治療へむけた基礎的研究を行うことが目的である。

2. 研究方法

顔面神経は橋の顔面神経核に起始する非交叉性の運動神経で、茎突乳様孔から頭蓋を出て、顔面の表層を走り表情筋を支配する。成体ラットを用いた動物モデルで、顔面神経を選択的・非侵襲的に切断することができる。顔面神経を切断した側の顔面神経核と、非切断側の顔面神経核で発現量が増加または減少する遺伝子群を網羅的に解析する。そのために、切断側と非切断側の顔面神経核からそれぞれ mRNA を調整し、サブトラクト cDNA ライブラリーを作成した。この際、[a] :切断側-非切断側、[b] :非切断側-切断側のそれぞれについてサブトラクト cDNA

ライブラリーを作成した。すなわち、[a] は顔面神経切断によって発現が上昇する遺伝子群を、[b] は発現が減少する遺伝子群をそれぞれ反映している。得られたライブラリーについてランダムに 200 クローンのシークエンスを行った。また、cDNA アレイにハイブリダイゼーションする事で、発現変化する遺伝子を同定した (cDNA アレイ法)。このようにして同定された遺伝子について、顔面神経核を含む成体ラット脳の coronal 切片に *in situ* ハイブリダイゼーションを施行し、発現変化している細胞がニューロンであるか、グリア細胞であるか同定した。

3. 研究成果

作成したサブトラクション cDNA ライブラリーについて、シークエンスおよび cDNA アレイ法を組み合わせ、発現変化する遺伝子を同定した。その中には、GAP-43、GDNF 受容体 GFR α -1、c-Ret などのように、神経繊維の損傷によって発現が上昇する事が既に報告されている遺伝子が含まれていた。更に、インターネット上の最新データベースにさえ未登録の遺伝子も数多く存在した。cDNA アレイ法で同定した遺伝子の中には、成体における機能が明らかになっていない分子も多数含まれていた。顔面神経を切断して 3 時間、6 時間、24 時間後に発現が上昇する遺伝子群をそれぞれ同一の cDNA アレイにハイブリダイゼーションさせた結果を図 1 に示した。顔面神経損傷後の遺伝子発現が、同一の cDNA アレイ上で経時的に変化していく事が分かる。このアレイ上には約 1,700 の異なる遺伝子がドットされているが、損傷後 3 時間では 10 以下の発現変化であったのが 24 時間後には 100 以上の遺伝子が発現変化していた。

同定された遺伝子の中には、既知のものであっても成体脳における機能が明らかになっていない分子も多数含まれていた。その一例として、神経系の発生過程で重要な役割を果たしてい

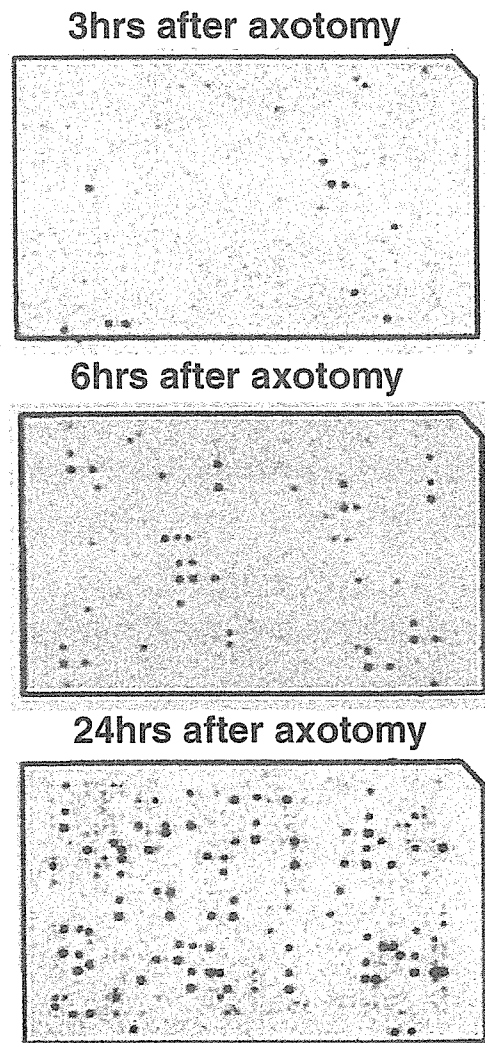


図 1 .cDNA array analyses after facial nerve axotomy

ることが知られていながら、成体脳における機能がほとんど明らかになっていない Sonic Hedgehog が、顔面神経切断後の運動ニューロンで一過性に上昇する事を見いだした（図2）。

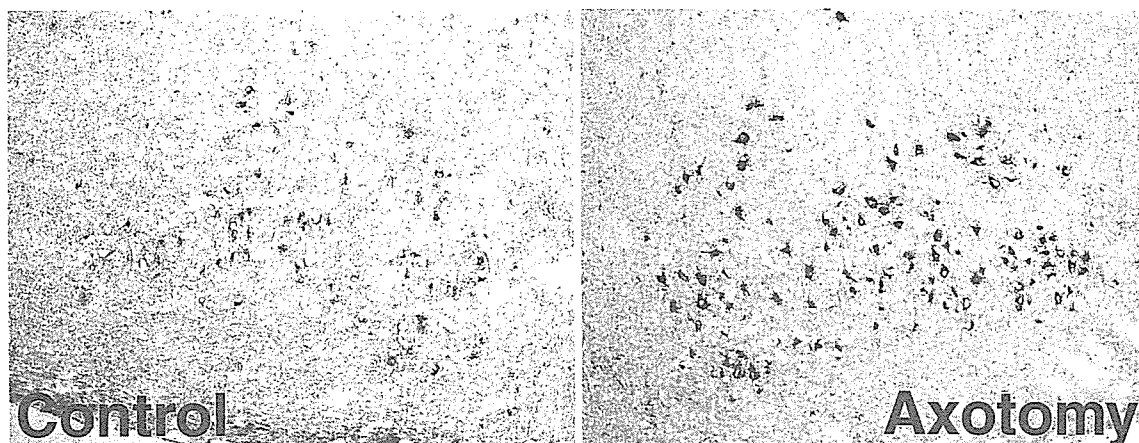


図2 . *in situ* hybridization of Sonic Hedgehog
(24 hrs after facial nerve axotomy)

4. 考察

サブトラクション cDNA ライブラリーを作成し、cDNA アレイ法を組み合わせることによって、簡便に網羅的・経時的に発現変化する遺伝子群を同定できることが明らかになった。このようにして同定された遺伝子群を、中枢神経損傷に際して強制発現させることなどで、中枢神経の修復・再生機構を促進させる技術開発へ発展していくことが期待される。

5. まとめ

顔面神経切断によって発現変化する遺伝子群を、サブトラクション cDNA ライブラリーと cDNA アレイ法を組み合わせることによって、効率的かつ系統的に同定する方法を開発した。この方法によって発現変化する遺伝子群のデータベース構築が容易となった。この方法により、今回 Sonic Hedgehog が運動ニューロンの軸索損傷後に一過性に発現上昇するという興味深い事実を明らかにした。

6. 研究発表

Haraguchi, T., Koujin, T., Hayakawa, T., Kaneda, T., Tsutsumi, C., Imoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y., and Hiraoka, Y. : Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming nuclear envelopes. *J. Cell Science*, 113, 779-794 (2000)

Kim, B.Y., Kominami, E., Kr 確 er, H., Kohsaka, S., and Akazawa, C. : Molecular characterization of mammalian homologues of Class C Vps proteins that interact with syntaxin 7. *J. Bio..Chem. in press*

赤澤智宏、高坂新一：神経栄養因子とアポトーシス *CLINICAL NEUROSCIENCE*, 18, 426-426 (2000)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

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