

平成13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2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患 の機序解明と新規治療薬開発

所 属 (財)東京都医学研究機構
東京都臨床医学総合研究所
細胞生理学研究部門

研 究 者 芝崎 太

分担研究者

- | | |
|--|------|
| (1) (財)東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・実験動物研究部門 | 米川博通 |
| (2) 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部 | 早川堯夫 |
| (3) 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部 | 水口裕之 |
| (4) 筑波大学臨床医学系・神経内科 | 吉澤利弘 |
| (5) 中外製薬株式会社・富士御殿場研究所 | 海宝晋一 |
| (6) 久光製薬・研究開発本部・新規事業部 | 鈴木要介 |
| (7) 有限会社・ネクストワン | 坂田和彦 |

1. 研究目的

脳梗塞などの虚血性神経障害やパーキンソン病、脊髄小脳変性症をはじめとする神経変性疾患は、現在、社会的にも大きな問題となっており、新しい治療法や治療薬の開発が急務である。これまで我々は、脳卒中などの虚血にともなう神経細胞死が、免疫抑制剤であるシクロスポリンAで劇的に改善されることを見出し、さらに、詳細な検討の結果、これらの機能が、低酸素反応と深く結びついていることが明らかとなった。低酸素反応はこれまでに、血管新生、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝、ドーパミン産生に関わることが報告されており、この意味で、遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子である Parkin や脊髄小脳変性症遺伝子産物 (ataxin3)との関連を調べた結果、低酸素反応およびその情報伝達系と深く関わっていることが明らかになってきた。このようにこれまでの研究から、神経細胞死の重要な機序として、低酸素反応に関わる因子の存在がはじめてクローズアップされ、この機序を解明することは神経細胞死の機序解明のみならず新規治療薬、開発に大きく貢献できると確信する。さらには、これらの研究は、骨格筋、骨形成、再生にも関連している体内の酸素センサーの本体を明らかにすることに結びつき、その解明は、国民の保健・医療の向上のみならず疾患治療だけでなく、細胞の分化・発達の理解、再生医療にも波及し、社会的に大きな貢献になると確信する。

2. 研究方法

2-1. 虚血性神経障害の解析と新規治療法の開発

ヒトでの脳梗塞モデルとしては局所性脳梗塞(血栓などによる一般的な梗塞)および一過性脳虚血モデル(ヒトの心停止による脳虚血)があるが、我々は、まずラットにおける一過性脳虚血モデルを確立した。従来通りの方法にて麻酔、人工呼吸器下にて内頸・外頸動脈4本を10分間結紮し、その後血流を再還流させた。シクロスポリンA(CsA, 10 mg/ml)やFK506(1 mg/ml)などの免疫抑制剤を虚血再還流の前後から開始し、腹腔内に毎日1回、投与した。効果の判定は、動物用MRI(Magnetic Resonance Imaging)、病理解析、組織中の特定蛋白の活性測定や蛋白量の検出、さらには抗体によるリン酸化蛋白質の変化等の生化学的な検討を行った。また、今後の解析に欠かせないマウスを用いた同モデルを確立するために、挿管器具等の特殊な手術器具の開発を行い、現在モデルの安定性を検討中である。

2-2. 低酸素反応性因子の解析

低酸素反応性因子 HIF (Hypoxia inducible factor)の機能解析のために、各種細胞への HIF 遺伝子の導入と低酸素培養器での 2%酸素下での低酸素負荷を行った。さらに結合蛋白を同定するため酵母 Two-hybrid, Three-hybrid system を用いて、新規結合蛋白に対する遺伝子の同定および解析を行った。HIF の各サブタイプおよび同定された遺伝子を含めた mRNA を作製し、ラット虚血性再還流モデルにおける脳組織を用いた in situ hybridization にて部位別、虚血の影響等における mRNA 誘導の変化を観察した。さらに HIF の融合蛋白を用いて、ラット脳または肝臓の可溶性分画を用いた結合蛋白の同定、酸素センサーのプロテオミクスによる同定も合わせて行った。

2-3. パーキンソン病における低酸素反応伝達系の解析

パーキンソン病の中で遺伝的に変異が認められる若年性パーキンソン病の原因遺伝子 Parkin はユビキチンリガーゼであることが報告された。即ち、Parkin を介したユビキチンの結合により分解される基質があるはずであり、この基質を同定することが、遺伝性パーキンソン病ひてはパーキンソン病全体の病態解明に結びつくことが想定されている。このような Parkin の基質の一つとして低酸素反応にかかわる因子を我々は同定し、その解析のために、各種遺伝子を用いた細胞内への遺伝子導入を行い、低酸素負荷にて解析を行った。

2-4. 小脳脊髄変性症 MJD (Machado-Joseph 病)における低酸素反応伝達系の解析とケミカルシャペロンの効果の検定

遺伝性パーキンソン病における Parkin が、低酸素反応にかかわる因子もとづく病態を形成していることを発見したが、ポリグルタミン病でもある MJD においてもこの因子が重要な役割を演じていることが明らかになってきた。これらの解析のために、各種の遺伝子を導入し、低酸素負荷における解析を行った。

さらに、in vitro の系で細胞死を評価するために BHK-21 細胞および Neuro2a 細胞を使用した。N 末より 286 個のアミノ酸が欠失し、ポリグルタミン鎖が 77 個に伸長した ataxin-3 の部分タンパクを myc タグあるいは GFP とともに組み換えタンパクとして発現するベクターを構築した。このベクターをリン酸カルシウム法により BHK-21 あるいは Neuro2a にトランスフェクションして、細胞内に形成される凝集体と細胞死の頻度を検討した。なお組み換えタンパクの発現は抗 myc 抗体を用いた免疫組織化学法、あるいは GFP の蛍光にて評価し、細胞死は核を DNA 染色した際の形態を観察して、あるいは細胞を annexinV で染色することにより評価した。今回、ケミカルシャペロンと総称されるタンパクのコンフォーメーションの安定化作用の知られている低分子物質として、DMSO (dimethylsulfoxide)、Glycerol、TMAO(trimethylamine N-oxide)を選び、その投与が伸長したポリグルタミン鎖を含む ataxin-3 の部分タンパク発現による凝集体形成と細胞死に及ぼす影響を評価した。またラジカルスカベンジャーである N-acetyl-L-cysteine と glutathione monoethyl ester の効果もあわせて検討した。

2-5. アデノウイルスベクターの開発

2-5-1. ファイバーを修飾したルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターの作製

ベクタープラスミド pAdHM15 に、 $\alpha v \beta 3$ あるいは $\alpha v \beta 5$ インテグリンとの結合能を有した RGD 配列 (CDCRGDCFC) をコードしたオリゴヌクレオチドが挿入されたプラスミド pAdHM15-RGD を作製した。次に、CMV プロモーターからなるルシフェラーゼ発現シャトルプラスミドと pAdHM15-RGD から制限酵素解析を行い、ルシフェラーゼ発現単位が挿入されたプラスミド pAdHM15-RGD-CMV12 を得た。次に、293 細胞にトランスフェクション、RGD 配列をファイバーに有したルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター AdRGD-L2 を得た (Fig.2)。同様にして野生型のファイバーをもったルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター Ad-L2、および 35 型のファイバーをもったルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター AdF35-L2 を作製した。各ベクターは 293 細胞により大量調製した。

2-5-2. 培養細胞への遺伝子導入と細胞受容体の解析

ヒトあるいはマウス由来の様々な細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well 播種し、翌日 Ad-L2、AdRGD-L2、あるいは AdF35-L2 を 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

ヒト由来細胞の CAR、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ インテグリンの発現は、それぞれ human CAR に対する抗体 mouse monoclonal antibody RmcB、mouse anti-human integrin $\alpha v \beta 3$ (LM609, Chemicon International, Inc.より入手)、あるいは mouse anti-human integrin $\alpha v \beta 5$ (P1F6, Gibco BRL より入手)を用いてフローサイトメーターにて解析した。マウス由来細胞の CAR、 αv 、 $\beta 3$ 、 $\beta 5$ インテグリンの発現は RT-PCR を用いて解析した。

3. 研究成果

3-1-1. 虚血性神経障害の解析と新規治療法の開発

これまでに我々は脳虚血に伴う脳神経障害、特に遅発性神経細胞死のメカニズムの解明を進め、免疫抑制剤である CsA がこの細胞死を極めて効果的に抑制することを見出した (図 1)。この CsA はカルシニューリンの特異的阻害剤であるため、脳虚血におけるカルシニューリンの役割を明らかにすることが必須となってきた。私達は、雄 Wistar rat 前脳虚血モデル (2 VO + 低血圧: 内頸・外頸動脈結紮) を用い、10 分虚血再還流後 1, 6, 12, 24 時間に沿って脳凍結切片作製と海馬 CA1, CA3, DG (dentate gyrus) を取り出し、免疫染色と calcineurin 活性を測定した。この結果、これまでの

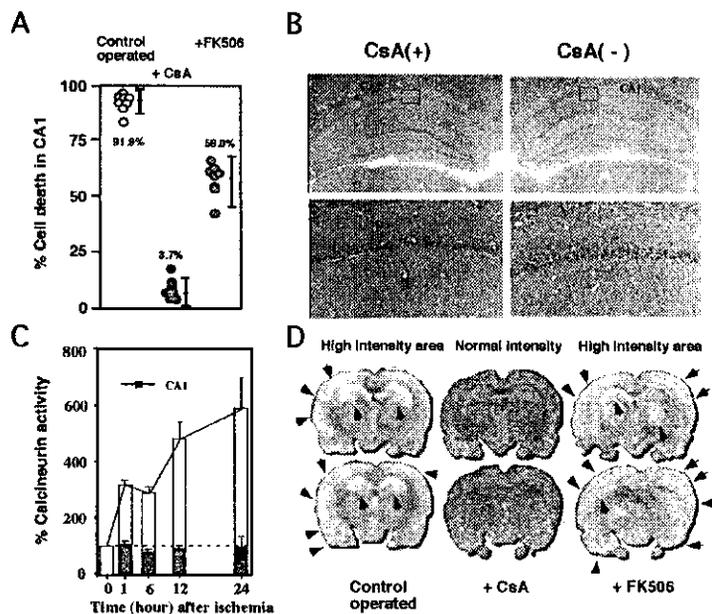


図 1 虚血性疾患における免疫抑制剤の効果

報告とは異なりカルシニューリン活性は虚血再還流後 1 時間で約 4 倍に達し、6 時間後軽度の低下を示したものの 12 時間後、24 時間後と上昇を続け、24 時間後は虚血前に比べ約 6 倍の活性上昇が認められた(図 1B, open column)。一方、CsA, FK506 投与群ではカルシニューリン活性はほぼ完全に抑制されていた(図 1B, closed column)。遅発性神経細胞死の経時的な形成を MRI (Magnetic Resonance Imaging) によって解析し(図 1D)、病理組織学的な解析(図 2C)と併せて評価を行った結果、CsA 投与群では遅発性神経細胞死がほぼ完全に抑制されていたにも関わらず、FK506 投与群では約 45-50%の抑制効果しか認められなかった(図 1D, MRI による白色の部分 (矢印) が障害部位)。免疫染色においては虚血 24 時間後に CA1 領域特異的な Bad の脱リン酸化、チトクローム c の細胞質への流出、およびそれに伴う CA1 領域細胞の特異的な細胞死が認められた。CsA 及び FK506 は CA1 領域特異的な Bad の脱リン酸化を完全に阻害したが、チトクローム c の細胞質への流出は CsA のみに阻害効果が認められた。

虚血性神経細胞死は、NGF (neurotrophic growth factor)、BDNF (brain derived neurotrophic factor)をはじめとした神経栄養因子によって著明に抑制されることが報告されているが、近年、これら神経栄養因子の転写制御に cAMP responsive element binding protein (CREB)のリン酸化が重要であり、カルシニューリンが CREB の脱リン酸化に関与していることが明らかになってきている。そこで、カルシニューリンの特異的阻害剤である CsA の投与によって、虚血刺激に対して最も脆弱な海馬 CA1 領域錐体細胞の CREB リン酸化、およびそれともなう BDNF とその受容体の発現がどの様に影響を受けるかを検討したところ、CsA 投与群(CsA(+))では、虚血後早期から著明な CREB のリン酸化、BDNF のタンパク発現の増加遷延が認められ、CREB を介した伝達系の増強が、CsA による虚血性神経細胞死に対する保護効果に関与していることが明らかとなった。このように、虚血性疾患におけるカルシニューリンの果たす役割は、細胞死制御因子や神経栄養因子の制御だけではなく、ミトコンドリアにおける細胞死誘導系の制御に大きく関わっていることが判明してきた。

3-1-2 虚血性脳障害におけるミトコンドリアの機能不全と新規薬剤の開発に向けた解析

神経細胞が虚血により細胞死に陥る過程で最近注目されているものに、ミトコンドリアにおける MPT (Mitochondrial Permeability Transition:ミトコンドリア内膜透過性亢進)がある。[Ca²⁺]_i の非生理学的な増加に伴い、Ca²⁺ 過剰負荷、酸化ストレスを誘因とする MPT に伴う非特異的な pore の形成が細胞障害に中心的な役割を果たしていることが報告されてきた。

MPT pore は、1970 年代に Hunter らによって提唱された、可逆性にミトコンドリアの膜透過性を大きく変化させることのできる Ca^{2+} 依存性 Ca^{2+} 放出(Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} release: CICR)チャンネルである。この pore はミトコンドリア

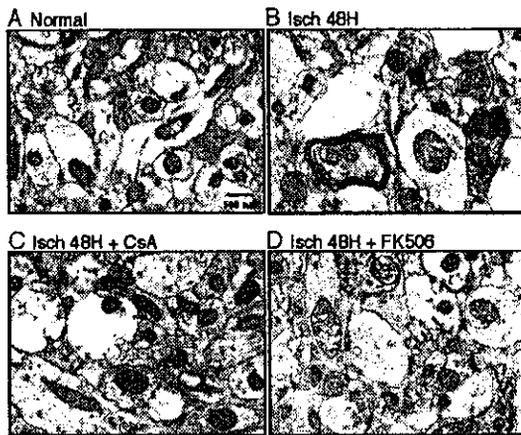


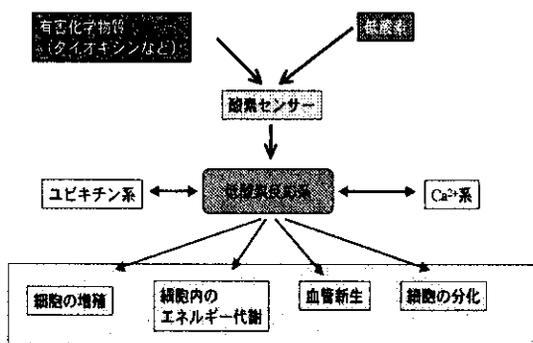
図2 虚血48時間後のミトコンドリアの変化

外膜側の VDAC(Voltage-dependent anion channel/ Porin)と内膜側の ANT(Adenine-nucleotide translocator)を主要構成要素として、マトリックスのシクロフィリン D(CyPD)のほか、いくつかのキナーゼで構成されていると推測されている。虚血時などの非生理的な(Ca^{2+})_i 上昇や酸化的ストレスによって、ミトコンドリアの Ca^{2+} の取り込みは閾値に達し、MPT は、1.5 kDa までの分子が素通りする(通常は 0.3 kDa まで) 巨大通過孔(メガチャンネル)を形成するようになる(high-conductance MPT pore)。この状態が遷延すると、ミトコンドリア膜電位の低下、ATP 産生の低下と ROS の産生、マトリックスの膨化、外膜の破裂という経過をたどり細胞死に至る。

我々は、ミトコンドリアに特異的に発現し、CsA の直接のターゲットである cyclophilin D (CyPD)に注目し、虚血性脳障害における CsA の効果の一部がこの CyPD を介して起こっているかどうかを解析した。まず、虚血性神経細胞死の際に起こる細胞の変化を詳細に観察するため、電顕によってミトコンドリアの形態変化を追ってみると、虚血 24 時間後には部分的な膨化が起り始め、48 時間後には完全に膨化し、外膜破綻や cristae の消失などの形態変化が認められミトコンドリアは機能不全に落ちていることが明らかになった(図2)。この解析のためには prolyl cis/trans isomerase である CyPD の dominant negative mutant の作製が必要であり、各種の変異体を合わせて検討した結果、ミトコンドリアの膨化を指標にし、世界で初めて CyPD の dominant negative mutant 作製に成功した。この変異体をアデノウイルスに組み込み、神経細胞 Neuro2A を用いて遺伝子導入し、ミトコンドリアを単離した後、 Ca^{2+} 負荷時に起こるミトコンドリアの膨化に与える影響を解析した。この結果、CyPD の dominant negative mutant は CsA と同じように、その発現に比例してミトコンドリアの膨化を抑制したことから、CsA の効果は、CyPD を介した MPT pore の制御によるミトコンドリアの安定化に関わっていることが判明した。このような虚血時のミトコンドリアの変化を指標にしたアッセイ系は、CsA と同様な抗虚血効果を持ち、免疫抑制効果の少ない薬剤の選択ができる可能性が高く、今後は、このアッセイ系を薬剤選択に使用するべく改良を加えていく予定である。

3-2. 低酸素反応性因子の解析

低酸素状態では血液中の酸素が低下し、これを補うためにエリスロポイエチンという赤血球増加因子が分泌され、赤血球が増加しできるだけ少ない体外の酸素を血液中に取り込む変化が起きる。この変化を起こす転写因子が発見され、HIF (hypoxic inducible factor; 低酸素反応性因子)と命名された。



- 関連疾患
- ・癌(増殖、転移、血管新生)
 - ・神経疾患(脳梗塞、変性、脱髄性疾患)
 - ・心血管系(心筋梗塞、肥大、血管の分化、増殖)
 - ・内分泌(糖尿病)
 - ・骨格筋(筋肉の肥大等)
 - ・環境因子(ダイオキシン、紫外線等)

図3 バイオストレスシグナルとしての低酸素反応

詳細な解析が行われ、実はこの因子が腫瘍の際の血管新生に必須である VEGF (血管内皮細胞増殖因子)を作りだし、さらには、ミトコンドリアでのエネルギー代謝にかかわる多くの解糖系酵素の転写制御を行うことがわかってきた。興味深いことに固形腫瘍では血流が抱負に供給されながら、腫瘍の内部はかなりの低酸素状態になっており、この状態がさらに血管新生を促す結果となる。近年、脳梗塞・心筋梗塞などの虚血性疾患、また糖尿

尿病におけるインスリン分泌機序、ダイオキシンによる障害等、大きな社会問題になっている疾患や障害の多くに、この低酸素応答のメカニズムを介した異常が関与していることが判明している(図3)。これまでの多くの研究から、低酸素

応答の機序として、1) 活性酸素種などの酸化ストレス、2) ユビキチンを介する蛋白分解の制御、3) Fe²⁺などの2価イオンを介した酵素活性の変化、4) リン酸化・脱リン酸化酵素による制御、等の仮説が報告されている (図4)。

これらの中で、我々が最も注目している情報伝達系因子に上記の転写因子 HIF 1 α があり、脳梗塞や心筋梗塞などの虚血疾患における病態は、この因子を含む情報伝達系の破綻により生じていることが明らかになってきた。HIF 1 α は、常酸素下においてユビキチン-プロテアソーム系により分解され殆ど発現が見られないが、低酸素下においては分解が抑制され核内に移行する (図4)。核内では、パートナーである別の転写因子 Arnt (ダイオキシン受容体との結合因子でもある) と2量体を形成し、DNA上に存在する HRE (hypoxia response element) に結合することで赤血球造血因子 (EPO) や血管内皮増殖因子 (VEGF) などに代表される低酸素依存性の転写を引き起こし、低酸素応答を起こす (図4)。私達は、この低酸素応答機構を明らかにする手係りとして HIF1 α 結合タンパクの検出、同定、それらを含めた制御機構の解明に着手した。実験は (a) 生理的条件下と同じ結合を検出できるという利点を持つ Yeast Two-Hybrid 法、(b) 生化学的手法を用いた結合蛋白の同定、および (c) 低酸素に反応する蛋白群プロテオーム解析、(d) 遺伝子改変マウスを用いた標的疾患の解析を進めている。

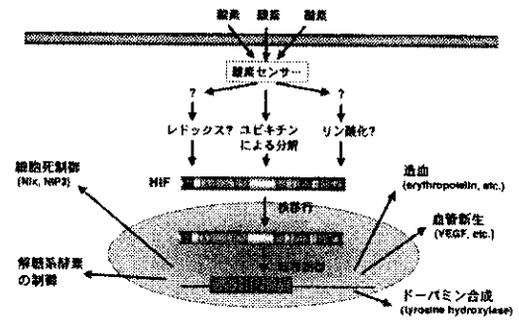


図4 低酸素反応因子HIFの制御機構

3-2-1 Yeast Two-Hybrid 法によるHIF 結合因子の同定と機能解析

細胞は様々な環境変化に対して応答性を示す。低酸素下における適応性もその一つであり、脳梗塞や心筋梗塞などの虚血疾患は、この恒常性の破綻により生じていることが明らかになってきている。低酸素下での情報伝達系は、bHLH-PAS (Per-Arnt-Sim basic helix-loop-helix)ドメインを持つファミリーの一つである転写因子 HIF 1 α により制御を受けている事を前記した。しかし、この HIF1 α を中心とする低酸素応答の詳細な機序については、現在までのところ不明な点が多い。この低酸素応答機構を明らかにする手係りとして HIF1 α 結合タンパクの検出、同定に着手した。

HIF の機能ドメインを Bait とした Yeast Two-Hybrid 法を用いて 1x10⁶ ヒト脳由来のライブラリーをスクリーニングしたところ、HYP6 と HYP10 が β -galactosidase filter assay の結果陽性クローンとして得られた。更に、PCR 及び部分塩基配列を決定したところ、HYP6 と HYP10 は 1.8kb の同一遺伝子であり、bHLH-PAS を持つ HIF ファミリーとは異なるタンパク (pHYP6/10) をコードすることがわかった。また、pHYP6/10 を HEK293 細胞に過剰発現させたところ、pHYP6/10 は HIF1 α と同様に低酸素下で細胞質から核へ translocation していた。HYC80 cDNA のコードするタンパク (pHYC80) が HIF1 α に結合することがわかり、pHYC80 により HIF1 α が調節を受けていることが予想された。今後は、更に pHYP6/10 を介する低酸素応答機構ネットワークの解明するために、培養細胞内での結合などを検討し、最終的にはノックアウトマウスを作製することで pHYP6/10 の機能を明らかにし、低酸素情報伝達を分子レベルで解明する。

3-2-2 神経細胞におけるHIFの機能解析

近年、HIF α サブユニットが癌抑制遺伝子でユビキチンリガーゼの一つである pVHL (von Hippel Lindau 病原因遺伝子) により分解制御を受けていることが報告され、pVHL の変異により、HIF α サブユニットの分解制御機構に異常が起こり、常酸素下での VEGF 転写活性の増加が癌化の一因ではないかと提起されている。

HIF α サブユニットには現在までに 3 種類が cDNA クローニングされ、それぞれ、HIF1 α , 2 α , 3 α と命名されている。これらのサブタイプはアミノ酸一次構造において PAS (Per/Arnt/Sim) ドメインを含む N 末端で相同性が高い。そこで、我々は HIF α サブユニットの脳内での局在を調べるために、3 種類の α サブユニットに特異的な C 末端のプロープを用い、ラット脳で in situ ハイブリダイゼーションを行った。その結果、各々の α サブユニットが異なった脳内分布で存在することが判明した。そこで、脳組織を一過的に低酸素状態におく虚血モデルを用いて、虚血処理後、経時的に脳切片を作製し、mRNA 量を比較した。特に、海馬の CA1 では HIF1 α , 2 α , 3 α の mRNA が殆ど認められないにもかかわらず、一過性脳虚血後 48 時間後に HIF 1 α と HIF 3 α の発現量が増加することを見出した。これまで、HIF 1 α が転写を行う遺伝子群

には p53 など、細胞死に関わる遺伝子が存在することが知られている。従って、HIF1 α が遅発性神経細胞死に関与していることが予想されたが、2001年にクローニングされた HIF3 α では、どのような遺伝子が転写されているか、またその転写が虚血による低酸素状態で誘導されるのかなどの研究報告は全く行われていない。我々のデータが唯一、HIF3 α が HIF1 α と相同的に遅発性神経細胞死に関与していることを示唆するものであり、今後さらに詳細な検討をおこない、各サブタイプの特異性を明らかにする。

3-2-3 HIF1 α 結合タンパク質の生化学的解析と酸素センサーの同定

正常酸素状態では、HIF1 α は Oxygen-dependent Degradation Domain [ODD]のユビキチン化により、生成後直ちに分解される。そこで、ODD に結合するタンパクが低酸素状態における HIF1 α の機能発現に重要であると考え、ODD-GST をリガンドとし、Affigel-15 を担体として用いたアフィニティカラムを作製し、ODD 結合タンパクを精製した。ラット肝臓細胞質画分を ODD-Affigel カラムに添加・洗浄し、20 mM EDTA, 150 mM NaCl, 500 mM NaCl で溶出した。さらに、各画分について、Mono Q カラムを用い精製を進めた。折しも昨年、新規のプロリン水酸化酵素が ODD のプロリンを水酸化し、HIF1 α の機能発現に必要であることが報告され、新たな酸素センサーとして注目された。しかし、そのタンパクならびに遺伝子は同定されていないことから、この新規酵素の精製も視野に入れ精製を進めた。

さらに細胞の酸素センサーシステムの全容を明らかにするために、正常および低酸素状態に置いた培養細胞中のタンパク質の変化を、二次元電気泳動法におけるスポットの量的な増減あるいは位置の移動によって検索し、質量分析計を用いてこれを同定を試みた。本年度は、経時的变化を検討することにより、酸素濃度が低下した後、最も早い時期に変化を示すスポットに特に注目することとし、それらの検索・同定した。

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞を通常 (21%O₂) および低酸素 (2%O₂) インキュベータ中で1時間培養し、全タンパク質を抽出した後、等電点電気泳動と SDS-PAGE により二次元電気泳動を行い、タンパク質スポットの異同を検討した。その結果、低酸素状態で等電点に変化するスポットが2種類検出され、現在同定中である。これらのタンパク質の等電点の変化が何に起因し、また低酸素応答においてどのような役割を果たしているかについては、今後解析を進めて行く予定である。

次に、低酸素応答に関するさらなる情報を得るために、より詳細な経時的变化の解析と細胞分画法の改良を検討した。HEK293 細胞を2%O₂ 中で0、10、30、および60分間培養し、細胞抽出液を可溶性画分と膜画分とに分け、それぞれを二次元電気泳動法により解析した。その結果、現在までに、低酸素後10分で一過性に出現するスポット、時間とともに増加するスポット、あるいは等電点の変化を示すスポット等がそれぞれの画分において見つかった。今後は、これらのタンパク質の同定に加え、HEK293 以外の培養細胞でのこれらスポットの経時的变化、あるいは、これら以外の低酸素特異的スポットの検出等の検討を行う予定である。

3-3 脊髄小脳変性症における異常ポリグルタミン鎖の解析

ポリグルタミン鎖が伸長した ataxin-3 の部分タンパク発現により培養細胞系に誘導される細胞内凝集体形成と細胞死に対して、タンパクのコンフォーメーション安定化作用がある低分子物質 (ケミカルシャペロンと総称) の投与効果の評価を行った。その結果、ケミカルシャペロンの投与は伸長ポリグルタミン鎖による凝集体形成と細胞死のいずれをも抑制した。今後、ケミカルシャペロン様作用を有するより広範な物質をスクリーニングすることが重要と考えられた。

特定のタンパク内に存在するポリグルタミンモチーフの伸長によって神経細胞死が誘導される一群の遺伝性神経変性疾患は「ポリグルタミン病」と総称され、核内封入体の存在など各疾患に共通した特徴を有することから、その発症機構に共通の過程が存在するものと予想されている。我々のグループでは、従来「ポリグルタミン病」の一型である Machado-Joseph 病(MJD)をモデルとして、その病因タンパクであるポリグルタミン鎖の伸長した ataxin-3 を培養細胞に発現させて細胞死を誘導する系を確立し、そのメカニズムを研究してきた。近年、複数の研究グループより、分子シャペロンである HSP70 をポリグルタミン鎖の伸長した異常タンパクと共発現させることにより、伸長ポリグルタミン鎖による細胞死を抑制できることが報告され、タンパクの折り畳みの異常が細胞死に密接に関わっている可能性が強く示唆されている。本研究では「ポリグルタミン病」の薬物治療開発を目的としているため、分子シャペロンを用いたタンパクの折り畳み異常に対する介入ではなく、タンパクのコンフォーメーションを安定化させる作用が知られている複数の低分子

物質を使用し、これらの物質が伸長ポリグルタミン鎖による細胞死に対して与える効果について評価を行った。

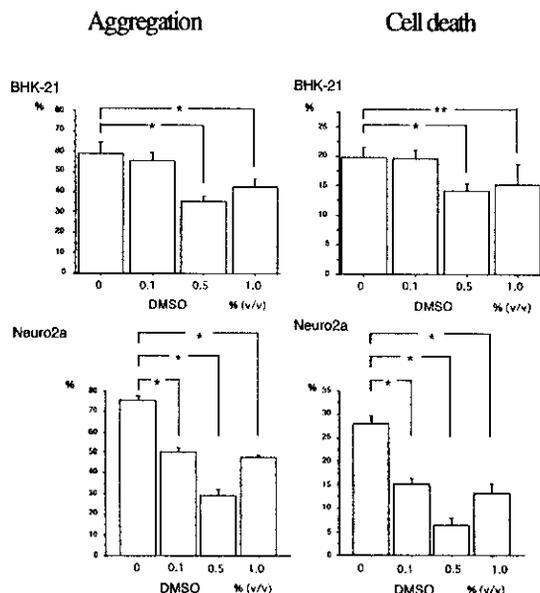


図5 ケミカルシャペロン処理による凝集体形成と細胞死の抑制効果

を示さなかった。

伸長したポリグルタミン鎖を含む ataxin-3 の部分タンパク発現によって BHK-21 および Neuro2a の細胞内に誘導される凝集体の形成頻度は培地に 0.5%(V/V)ないし 1.0%(V/V)の DMSO を添加することで有意に抑制された (図1)。その抑制効果は0.5%で最大であった。同様に、組み換えタンパク発現により BHK-21 および Neuro2a に誘導される細胞死の頻度は、培地に 0.5%(V/V)ないし 1.0%(V/V)の DMSO を添加することで有意に抑制され、その抑制効果は 0.5%で最大であった (図 5)。他のケミカルシャペロンである Glycerol を使用した場合には2%(V/V)、TMAO を使用した場合には 150mM で最大となるような凝集体形成と細胞死の抑制効果が観察された。

DMSOにはケミカルシャペロンとしての作用に加えてラジカルスカベンジャーとしての作用も知られているため、BHK-21 において代表的なラジカルスカベンジャーである N-acetyl-L-cysteine と glutathione monoethyl ester の効果も検討したが、これらは凝集体形成と細胞死のいずれに対しても抑制効果

3-4. 遺伝子治療を目指したアデノウイルスベクターの開発

3-4-1. RGD 配列をファイバーに有したアデノウイルスベクターの開発と機能評価

E1・E3 領域を除くアデノウイルス全ゲノムを有したベクタープラスミドのファイバー-HI loop にユニークな制限酵素部位を挿入することで、1 ステップの in vitro ライゲーションで任意の外来遺伝子をファイバー領域に挿入できるファイバーミュータントアデノウイルスベクターシステムを開発し、各細胞での遺伝子導入効率を解析した。

ヒト由来接着細胞 (SK HEP-1, HeLa, LN444, LNZ308, SF295 細胞) に関しては、SK HEP-1, LN319 細胞は CAR を高発現していたが、LN444, LNZ308, SF295 細胞は CAR の発現をほとんど認めなかった。一方インテグリンの発現に関しては、いずれの細胞も $\alpha\beta3$ あるいは $\alpha\beta5$ (あるいは両者) インテグリンを高発現していた。これらの細胞に対する遺伝子導入活性については、SK HEP-1, LN319 細胞では従来型ベクターの Ad-L2 においても高いルシフェラーゼ発現が認められ、AdRGD-L2 では数倍程度ルシフェラーゼ活性は上昇した。一方、LN444, LNZ308, SF295 細胞においても高いルシフェラーゼ発現が認められ Ad-L2 の約 1000 倍の遺伝子導入活性を示した。

次にヒト白血病細胞 (Y79, K-562, Ramon, KG-1a 細胞) への遺伝子導入活性について検討した。Y79 細胞は CAR を高発現しており、K-562, Ramon 細胞においては中程度の CAR の発現を認めた。KG-1a 細胞においては CAR の発現は認められなかった。一方、インテグリンの発現に関しては、K-562, Ramon, KG-1 細胞において $\alpha\beta3$ あるいは $\alpha\beta5$ (あるいは両者) インテグリンの発現が認められた。これらの細胞に対する遺伝子導入活性については、CAR を発現している K-562, Y79, Ramon 細胞では AdRGD-L2 では数倍から数十倍程度ルシフェラーゼ活性は上昇した。一方、AdRGD-L2 では、KG-1a 細胞においても若干のルシフェラーゼ発現が認められ、いずれの細胞においても AdRGD-L2 を用いることで遺伝子導入活性の改善が認められた。

次にマウス由来の細胞 (NIH3T3, L, B16, colon26, MS1) に対する遺伝子導入実験を行った。一般にアデノウイルスベクターによる遺伝子導入では、ヒト由来の細胞の場合と比べマウス由来の細胞を用いた場合には効率が悪いことが知られている。まず、各細胞の CAR、インテグリン ($\alpha\beta3$, $\beta5$) の発現を RT-PCR 法で確認した。その結果、MS1 細胞のみ CAR の発現が認められ、NIH3T3, L, B16, colon26 細胞においては CAR の発現は検出限界以下であった。また、いずれの細胞においても $\alpha\beta$ インテグリンの発現は認められ、 $\beta3$ あるいは $\beta5$ インテグリンも発現していた。こ

これらの細胞へのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入活性については、CAR を発現している MS1 細胞のみ従来型ベクターの Ad-L2 において若干のルシフェラーゼ発現が認められたが、その他の4種の細胞では Ad-L2 でのルシフェラーゼ発現は極めて軽度であった。一方、AdRGD-L2 では、MS1 細胞で Ad-L2 の約 100 倍、他の細胞では約 1000 倍のルシフェラーゼ発現の上昇が観察された。これらの結果より、RGD 配列をファイバーに有したアデノウイルスベクターは、CAR の発現が乏しく従来型のアデノウイルスベクターでは遺伝子導入が困難である細胞に対しても極めて効率良く遺伝子導入できうるベクターであると考えられた。

3-4-2. 35 型のファイバーをもったアデノウイルスベクターの開発と機能評価

sub-group B に属する 35 型のアデノウイルスは CAR 以外の分子を受容体として細胞に感染することが知られており、5 型ウイルスのファイバーを 35 型のものに置き換えることで感染域を変更し、従来型のアデノウイルスベクターでは遺伝子導入が困難であった細胞に対しても効率良く遺伝子導入可能なベクターが開発できる可能性がある。そこで、35 型のファイバーをもった簡便なアデノウイルスベクター作製法を開発し、その機能を従来型ベクターと比較・検討した。作製したベクタープラスミド pAdHM34 を用いることで、上記(1)のベクターシステムと同様に、簡便な *in vitro* ライゲーションで目的遺伝子を E1 欠損領域に挿入することが可能となった。CAR 陽性あるいは陰性のヒト由来接着細胞 (10 種類) について、従来型ベクターと 35 型のファイバーをもったベクターの遺伝子導入効率を比較したところ、多くの細胞において 35 型のファイバーをもったベクターの遺伝子導入効率は従来型ベクター以上であり、かつより広い感染域をもつことが明らかとなった。特に CAR 陰性の LNZ308、LN444 細胞については、従来型ベクターの 100 倍以上の遺伝子導入効率を示した。ヒト白血病細胞 (血球系細胞) (5 種類)、マウス由来細胞 (6 種類) についても同様に検討した結果、多くの細胞において 35 型のファイバーをもったベクターは従来型ベクター以上の遺伝子導入活性を示した。従って、35 型のファイバーをもったアデノウイルスベクターを用いることで、遺伝子導入効率・感染域の変更が可能であり、より広範な目的にアデノウイルスベクターが使用できることが明らかとなった。

4. 考案

4-1. 虚血性神経疾患の機序と新たな治療法の可能性

虚血性神経細胞死の研究結果で最も興味深いことは、CsA はほぼ 100%に近い虚血性障害を阻止することに対して FK506 の場合は海馬 CA1 領域の遅発性神経細胞死を平均で 5 0ー6 0%しか抑制せず、両薬剤のメカニズムの違いが明確な点である。両免疫抑制剤に共通な点はカルシニューリン (CaN) 活性抑制を通じて CaN 依存性アポトーシスを抑制していることであるが、大きな違いとしては CsA は、ミトコンドリアのマトリックスに特異的に発現する CyPD (サイクロフィリン) に結合しその活性を抑制して MPT pore の開孔抑制を行っていることが考えられた。なぜならば、ミトコンドリアに FKBP の発現はなく、FK506 は MPT pore の開孔抑制作用を有していないからである。このように、CsA は CaN の抑制のみならずミトコンドリア機能維持作用をもつために神経細胞死を劇的に阻止しうる可能性が示唆され、虚血性神経細胞死の発生機序解明を考える上で大きな糸口を与えたのである。この推測を裏付ける事実として、CsA の作用として、単離海馬ミトコンドリアでの Ca^{2+} 誘発性の膨化の抑制や、低血糖脳障害モデルにおける脳神経細胞死抑制およびミトコンドリア機能維持などの、多くのアポトーシス抑制効果が報告されている。このような抗細胞死効果は (1) CsA 自体が CyPD の isomerase 活性を阻害して、直接的または間接的に MPT pore の高次構造を変化させることにより MPT pore 開孔制御を調節していること、(2) カルシニューリン依存的な細胞死の抑制が重要であると考えられる。

虚血性神経細胞死の研究は、これまでラットを中心に行われてきた。ラットのモデルは安定した結果が得られ、局所脳虚血モデル (ヒト脳梗塞に近似) および前脳虚血モデル (ヒト一過性心停止に近似) とともに薬剤の効果や機序解析には非常に有用である。しかしながら、虚血性神経細胞死の解析に今後有望な遺伝改変動物は、ラットでは技術的にも物理的事情からも困難な状況である。私達は、分子生物学的な解析に KO や Tg マウスを用いることを考慮し、マウスを用いた虚血モデルの開発に着手した。特にマウス前脳虚血モデルは、世界でも今だ完成しておらず、技術的な難しさもさることながら、解析から得られる結果の重要性は世界から注目を集めている。現在、手術手技は確立し、モデルの安定性を検討している段階で、本年度中にも、各種の KO や Tg マウスを用いた虚血モデルの解析結果を出す予定である。

これまでに得られた結果をもとに、ミトコンドリアの保護作用、および弱いカルシニューリン抑制作用を持つ新規薬剤

を共同研究で開発に成功した。この薬剤は免疫抑制作用が弱く（副作用が少ない）、様々な細胞死抑制効果を持ち、ラットを用いた虚血性脳障害でも著効を示した。虚血性障害（心筋梗塞、脳梗塞）、アルツハイマー病、パーキンソン病などの変性疾患、筋萎縮性側索硬化症（ALS）のみならず、その機序から HIV や肝障害、免疫疾患などへの治療効果が期待されている。

4-2. 神経変性疾患と低酸素応答

脳虚血を始め、パーキンソン病や脊髄小脳変性症における病態は、様々な要因が考えられている。しかしながら多くの場合最終的には、アポトーシスやネクローシスの混在したいわば細胞のエネルギー不全による細胞死が観察されている。この際に、ミトコンドリアを中心としたエネルギー代謝回路の不全は、低酸素反応性因子 HIF の制御下にある解糖系代謝酵素の異常が要因の一つとして考えられる。また、最近報告されているように、ユビキチン分解系の異常により、蛋白質の凝集体が細胞質や核内に蓄積し、転写異常や情報伝達系の制御不全が細胞死に結びつく可能性も指摘され始めた。我々が注目している脊髄小脳変性症および遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物は、培養細胞を用いた実験により、低酸素状態で大きな変化を認めた。このことは、これらの疾患で病態形成や原因の一部として脳内の局所的な低酸素状態、あるいは低酸素反応情報伝達系が異常になっている可能性も考えられる。今後は詳細な研究を行いこれらの機序を明らかにするとともに、創薬や遺伝子治療に向けた標的を探求していく予定である。

一方、脊髄小脳変性症に関しての本研究により、DMSO のようなタンパクのコンフォーメーション安定化作用のある低分子物質の投与が、伸長したポリグルタミン鎖による細胞死を抑制できる可能性が強く示唆された。すでに分子シャペロンである HSP70 の細胞内過剰発現によりこの細胞死が抑制できることが知られているが、実際に HSP70 を疾患に罹患したヒトに応用するには遺伝子治療のような手段が必要になると考えられる。それに対して、DMSO のような低分子物質は血液循環の通過方法のみを工夫すれば比較的容易にヒトに応用しうる可能性がある。特に今回の *in vitro* における系では、各ケミカルシャペロンの細胞死抑制効果は必ずしも強力なものではないが、実際の罹患脳における異常タンパクの発現程度は培養細胞系に比しずっと低レベルであると考えられるので、これらの物質でも十分効果を有する可能性は否定できない。今後これらの物質の *in vivo* における効果を評価するため、transgenic mouse に対して投与を試みるとともに、さらに有効なケミカルシャペロン作用を有する低分子物質のスクリーニングが必要であると考えられる。

4-3. 遺伝子治療を目指したアデノウイルスベクターの開発

アデノウイルスの細胞内への侵入は、ファイバーが受容体の CAR に結合し、その後ペントンベースの RGD モチーフが細胞表面上のインテグリンに結合することによって起こる。エンドソームに達したウイルスは酸性条件下でカプシドタンパク質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して、細胞質内に侵入する。従って、細胞表面上の CAR に、ウイルスのファイバーが結合するのが感染の第一ステップであり、ファイバーを修飾することによりベクターの感染域を変えることができると考えられる。

我々は、 αv インテグリンとの親和性があることが知られている RGD 配列をコードした遺伝子をファイバー領域に挿入したアデノウイルスベクター (AdRGD-L2) を作製し、その特性について検討した。その結果、CAR の発現が乏しい種々の細胞において、従来型アデノウイルスベクターの Ad-L2 の約 100-1000 倍の効率で遺伝子導入可能なことが明らかとなった。また、本改良型ベクターはマウス由来の細胞に対しても効率良く遺伝子導入できることが判明した。 αv インテグリンは一部の血球系細胞を除く多くの種類の細胞に発現していることが知られていることから、本アデノウイルスベクターの開発はその汎用性と応用面での広がりを見ると大きな意義をもつと考えられる。

本研究ではさらに、sub-group B に属する 35 型のアデノウイルスのファイバーを付与することで感染域を変更したアデノウイルスベクターシステムも開発した。本研究での遺伝子導入実験の結果より、35 型のファイバーをもったアデノウイルスベクター (AdF35-L2) は、従来型ベクター (Ad-L2) よりも広い感染域をもつことが明らかとなり、35 型アデノウイルスの受容体は CAR よりも広範囲に発現していることが示唆された。

任意の外来ペプチドを挿入したファイバーミュータントアデノウイルスベクターや、35 型のファイバーを組み込んだファイバー置換型アデノウイルスベクターを用いることで、アデノウイルスベクターで遺伝子導入可能な細胞種は拡大することから、本ベクターは遺伝子治療のみならず遺伝子機能解析を目的とした基礎研究分野においてより重要な基盤技術になると考えられる。

5. まとめ 本年度の研究成果として以下のことがあげられる。

- (1) 虚血性疾患における機序の解析から、免疫抑制剤である CsA や FK506 が著明な神経細胞死抑制効果を持ち、臨床的な新しい治療薬として今後の可能性が示唆された。
- (2) 低酸素反応性因子はこれまでに報告された癌での血管新生や赤血球増加反応に関与するだけでなく、多くの神経疾患、特に神経変性疾患での役割が明らかになりつつある。これまでの研究により新たな結合因子や制御機構が明らかになり、この情報伝達系を標的とした創薬、遺伝子治療の可能性を今後検討していく
- (3) 脊髄小脳変性症に関しての本研究により、DMSO のようなタンパクのコンフォーメーション安定化作用のある低分子物質の投与が、伸長したポリグルタミン鎖による細胞死を抑制できる可能性が強く示唆された。
- (4) 今回開発に成功した、任意の外来ペプチドを挿入したファイバーミュータントアデノウイルスベクターや、35型のファイバーを組み込んだファイバー置換型アデノウイルスベクターを用いることで、アデノウイルスベクターで遺伝子導入可能な細胞種は拡大することから、本ベクターは遺伝子治療のみならず遺伝子機能解析を目的とした基礎研究分野においてより重要な基盤技術になると考えられる。

今後は上記の結果をもとに、さらに研究を進め各神経変性疾患の機序を明らかにするとともに、新たな治療法や新規薬剤スクリーニングのためのアッセイ系を確立する。

6. 研究発表

1. Shibasaki, F., Hallin, U., and Uchino, H.; Review: Calcineurin as a multifunctional regulator. **J. Biochem.** 131, 1-15, 2002.
2. Uchino, H., Minamikawa-Tachino, R., Kristián, T., Perkins, G., Narazaki, M., Siesjö, B.K., and Shibasaki, F. Differential neuroprotection by Cyclosporin A and FK506 following ischemia corresponds with differing abilities to inhibit calcineurin and the mitochondrial permeability transition. **Neurobiol Dis.** 2001 (in press)
3. Miyata, K., Omori, N., Uchino, H., Yamaguchi, T., Isshiki, A. and Shibasaki, F.: Brain derived neurotrophic factor/TrkB mediates the neuroprotective effect of cyclosporin A in forebrain ischemia. **Neuroscience**, 105, 571-578. 2001
4. Shitashige, M., Toi, M., Yano, T., Shibata, M., Matsuo, Y., and Shibasaki, F.: Phosphorylation of serine 70 of Bcl-2 as a possible prognostic marker in breast cancer. **J. Biochem.** 130, 741-748, 2001
5. Uchino, H., Kawakami, M., Shibasaki, F. and Siesjö, B. K.; Differential Alteration of Immediate early Gene, c-fos, fos B, c-jun, jun B, jun D in the rat brain following transient forebrain ischemia. **Brain Res.** 2001 (in press).
6. Machida, K., Tsukiyama-Kohara, K., Seike, E., Tone, S., Shibasaki, F., Shimizu, M., Takahashi, H., Hayashi, Y., Funata, N., *Taya, C.*, et al. Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. **J. Biol. Chem.** 276, 12140-12146, 2001.
7. Okamoto, K., Shinoura, N., Egawa, N., Asai, A., Kirino, T., Shibasaki, F., and Shitara, N. Adenovirus-mediated transfer of p53 augments hyperthermia-induced apoptosis in U251 glioma cells. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** 50, 525-531, 2001.
8. Zou, Y., Hiroi, Y., Uozumi, H., Takimoto, E., Toko, H., Zhu, W., Kudoh, S., Mizukami, M., Shimoyama, M., Shibasaki, F., Nagai, R., Yazaki, Y., and Komuro, I. Calcineurin plays a critical role in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. **Circulation** 104, 97-101, 2001.
9. Zou, Y., Yao, A., Zhu, W., Kudoh, S., Hiroi, Y., Shimoyama, M., Uozumi, H., Kohmoto, O., Takahashi, T., Shibasaki, F., Nagai, R., Yazaki, Y., and Komuro, I. Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. **Circulation** 104, 102-108, 2001.
10. Siesjö, B. K., Uchino, H., Yoshimoto, T., Hu, B. and Shibasaki, F.: Mitochondrial dysfunction and maturation of brain damage after transient ischemia. Maturation Phenomenon in cerebral ischemia IV. Springer Velague U Ito (e.d.s) 2001 (in press).
11. Nomura, T., Yamamoto, H., Mimata, H., Shitashige, M., Shibasaki, F., Miyamoto, E., and Nomura, Y.: Enhancement by cyclosporin A of Taxol-induced apoptosis of human urinary bladder cancer cells. **Urological Research** (in press).
12. 芝崎 大: ニューロサイエンスの話題、虚血性神経細胞死の機序と治療への展望。 **脳の科学** 23, 885-888, 2001

13. 芝崎 太: 細胞極性 運動の制御と細胞内シグナル情報伝達 カルシニューリン・NFATの制御システム, **実験医学増刊号** (羊土社) 2002 (印刷中)
14. 芝崎 太: 低酸素反応性転写因子 (hypoxia inducible factor: HIF) . **生化学** 73, p1128, 2001
15. Yoshizawa T, Yoshida H, Shoji S. Differential susceptibility of cultured cells to aggregate formation and death by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. **Brain Res. Bull.** 56; 349-352, 2001.
16. Ohye T, Ichinose H, Yoshizawa T, Kanazawa I, Nagatsu T. A new splicing variant for human tyrosine hydroxylase in the adrenal medulla. **Neurosci. Lett.**, 312: 157-160, 2001.
17. Hatakeyama S, Wakamori M, Ino M, Miyamoto M, Takahashi E, Yoshinaga T, Sawada K, Imoto K, Tanaka I, Yoshizawa T, Nishizawa Y, Mori Y, Niidome T, Shoji S. Differential nociceptive response in mice lacking the alpha1B subunit of N-type Ca²⁺ channels. **Neuroreport**, 12: 2423-2427, 2001.
18. Yoshizawa T, Kohno Y, Nissato S, Shoji S. Compound heterozygosity with 2 novel mutations in the *HEXB* gene produces adult Sandhoff disease presenting as a motor neuron disease phenotype. **J. Neurol. Sci.** (in press)
19. Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F, Shoji S, Kanazawa I. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. (submitted to Neurobiol. Dis.)
20. Ida-Hosonuma, M, Iwasaki, T., Taya, C., Sato, Y., Li, J., Nagata, N., Yonekawa, H. and Koike, S.: Comparison of neuropathogenicity of poliovirus in two transgenic mouse strains expressing human poliovirus receptor with different distribution patterns. **J. Gen. Viol.**, in press.
21. Ohno, T, Ishih, A., Kohara, Y., Yonekawa, H., Terada, M. and Nishimura, M.: Chromosomal mapping of the host resistance locus to rodent malaria (*Plasmodium yoelii*) infection in mice. **Immunogenet.**, in press.
22. Sumida, M., Kanamori, Y., Kaneda, H., Kato, Y., Nishioka, M., Hasegawa, M. and Yonekawa, H.: Complete nucleotide sequence and gene arrangement of the mitochondrial genome of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*. **Gens Genet.Syst.** 76: 311-325, 2001.
23. Sekine, M., Taya, C., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Takenaka, M., Imai, E., Izawa, M., Kannagi, R. and Suzuki, A.: Regulation of mouse kidney tubular epithelial cell-specific expression of core 2 GlcNAc transferase. **Eur.J.Biochem.**, 268:1129-1135, 2001.
24. Machida, K., Tsukiyama-Kohara, K., Seike, E., Tone, S., Shibasaki, F., Shimizu, M., Takahashi, H., Hayashi, Y., Funada, N., Taya, C., Yonekawa, H. and Kohara, M.: Inhibition of Cytochrome C Release in Fas-mediated Signaling Pathway in Transgenic Mice Induced to Express Hepatitis C Viral Proteins. **J. Biol. Chem.**, 276:12140-12146, 2001.
25. Maeda, Y.Y., Funata, N., Takahama, S., Sugata, Y. and Yonekawa, H.: Two interactive genes responsible for a new inherited cataract (RCT) in the mouse. **Mamm. Genome**, 12:278-283, 2001.
26. Kohara, Y., Tanabe, K., Matsuoka, K., Kanda, N., Matsuda, H., Karasuyama, H. and Yonekawa, H.: A Major Determinant Quantitative-trait Locus Responsible for Atopic Dermatitis - like Skin Lesions in NC/Nga Mice is Located on Chromosome 9. **Immunogenetics**, 53:15-21, 2001.
27. Wada, T., Wakabayashi, Y., Takahashi, S., Ushiki, T., Kikkawa, Y., Yonekawa, H. and Kominami, R.: A point mutation in a cadherin gene, *Cdh23*, causes deafness in a novel mutant, Waltzer mouse niigata. **Biochem Biophys Res Commun.**, 283:113-117, 2001.
28. Shitara, H., Kaneda, H., Sato, A., Iwasaki, K., Hayashi, J.-I., Taya, C., Yonekawa, H.: Non-invasive visualization of sperm mitochondria behavior in transgenic mice with introduced green fluorescent protein (GFP). **FEBS Lett.**, 500:7-11, 2001.
29. Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A. and Kohno, K.: Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. **Nature Biotechnol.**, 19:746-750, 2001.
30. Kubo, S., Matsuoka, K., Taya, C., Kitamura, F., Takai, T., Yonekawa, H. and Karasuyama, H.: Drastic up-regulation of Fc ϵ RI on mast cells is induced by IgE binding through stabilization and accumulation of Fc ϵ RI on the cell surface. **J. Immunol.**, 167:3427-34, 2001.
31. Kikkawa, Y., Miura, I., Takahama, S., Wakana, S., Yamazaki, Y., Moriwaki, K., Shiroishi, T. and Yonekawa, H.: Microsatellite database for MSM/Ms and JF1/Ms, molossinus-derived inbred strains. **Mamm. Genome**, 12: 750-752, 2001.
32. H. Mizuguchi, N. Koizumi, T. Hosono, N. Utoguchi, Y. Watanabe, M. A. Kay, T. Hayakawa, A. simplified system for constructing

- recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther.*, 8, 730-735 (2001)
33. N. Koizumi, H. Mizuguchi, T. Hosono, A. Ishii-Watabe, E. Uchida, N. Utoguchi, Y. Watanabe, T. Hayakawa. Efficient gene transfer by fiber-mutant adenoviral vectors containing RGD peptide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1568, 13-20 (2001)
 34. N. Okada, Y. Tsukada, S. Nakagawa, H. Mizuguchi, K. Mori, T. Saito, T. Fujita, A. Yamamoto, T. Hayakawa, T. Mayumi. Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, 173-179 (2001)
 35. N. Okada, T. Saito, Y. Masunaga, Y. Tsukada, S. Nakagawa, H. Mizuguchi, K. Mori, Y. Okada, T. Fujita, T. Hayakawa, T. Mayumi, A. Yamamoto. Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells. *Cancer Res.*, 61, 7913-7919 (2001)
 36. H. Mizuguchi, M. A. Kay, T. Hayakawa. Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv. Drug. Deli. Rev.*, 52, 165-176 (2001)
 37. H. Mizuguchi, T. Hayakawa. Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene*, in press.
 38. H. Mizuguchi, & T. Hayakawa. Enhanced anti-tumor effect and reduced vector dissemination with fiber-modified adenovirus vectors expressing herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancer Gene Ther.*, in press.
 39. Y. Okada, N. Okada, S. Nakagawa, H. Mizuguchi, M. Kanehira, N. Nishino, K. Takahashi, N. Mizuno, T. Hayakawa, T. Mayumi. Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors. *Cancer Lett.*, in press.
 40. 水口裕之；遺伝子治療とDDS、*Drug Delivery System*、印刷中
 41. 早川堯夫、水口裕之；遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けて—新世代アデノウイルスベクターの開発—、*医薬ジャーナル*、37、101-107、2001
 42. 水口裕之・早川堯夫；プラスミド構築に基づいた組換えアデノウイルスベクター作製技術、*BIO INDUSTRY*、18(7)、5-14、2001
 43. 水口裕之・早川堯夫；アデノウイルスベクター、*バイオ医薬品の品質・安全性評価*、pp383-393、2001、早川堯夫・山崎修道・延原正弘編、エル・アイ・シー
 44. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : Tet-Off System is More Effective than Tet-On System for Regulating Transgene Expression in Single Adenoviral Vector, *J. Gene. Med.* (in press)
 45. Y. NAGAYAMA, M. KITA-FURUYAMA, T. ANDO, K. NAKAO, H. MIZUGUCHI, T. HAYAKAWA, K. EGUCHI, M. NIWA. A novel murine model of graves 2 hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor, *J. Immunol.* (in press).
 46. Takahito NAKAGAWA, Masato TAKAHASHI, Toshinori OZAKI, Ken-ichi WATANABE, Satoru TODO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, and Akira NAKAGAWARA : Autoinhibitory Regulation of p73 by Δ Np73 to Modulate Cell Survival and Death Through p73-Specific Target Element Within the Δ Np73 Promoter, *Mol. Cell. Biol.* (in press)
 47. Akiko EGUCHI, Teruo AKUTA, Hajime OKUYAMA, Takao SENDA, Haruhiko YOKOI, Hachiro INOKUCHI, Shigeo FUJITA, Takao HAYAKAWA, Katsuo TAKEDA, Mamoru HASEGAWA and Mahito NAKANISHI: Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, 276, 26204-26210 (2001)
 48. Naoki OKADA, Tomomi SAITO, Yasushige MASUNAGA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Yuka OKADA, Takuya FUJITA, Takao HAYAKAWA, Tadanori MAYUMI, and Akira YAMAMOTO: Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells, *Cancer Res.* 61, 7913-7919 (2001)
 49. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA, Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline controllable expression system, *Biochim Biophys Acta*, 1568, 21-29 (2001)
 50. Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY, Takao HAYAKAWA: In vitro ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 as well as E1 deletion region for generation of recombinant adenovirus vector, *Bio Techniques*, 30, 1112-1116 (2001)

平成13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2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10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