

20020749

厚生労働科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

ライソゾーム病の病態の解明及び治療法の開発に関する研究

平成14年度 研究報告書

主任研究者 桜川宣男

平成15年(2003)4月

目次

I. 総括研究報告	1
ライソゾーム病の病態の解明及び治療法の開発に関する研究 桜川宣男	
II. 分担研究報告	
1. ヒト羊膜間葉細胞由来 SP 細胞の分離・培養と phenotype の検討	10
桜川宣男	
2. ライソゾーム病の病態の解明及び治療法の開発に関する研究	13
御子柴克彦	
3. 未分化細胞からの器官形成の制御機構について	16
浅島 誠	
4. ライソゾーム病のマスクリーニングと臨床研究	19
青木継稔	
5. 合成基質を用いた galactosylceramidase(GALC)活性の測定	22
古谷博和	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24
IV. 平成14年度研究班会議抄録集	28
(1) ヒト羊膜細胞由来 SP 細胞の分離・培養と phenotype の検討	桜川宣男
(2) 脳神経系の発生・分化機構の解明	御子柴克彦
(3) 未分化細胞からの目と軟骨の形成の基礎と応用	浅島 誠
(4) 合成基質を用いた galactosylceramidase(GALC)活性の測定	古谷博和
(5) ライソゾーム病のマスクリーニングと臨床的検討	青木継稔
(6) 神経幹細胞の脳内移植によるリソゾーム病の治療	奥山虎之
(7) GM2 ガングリオシドーシス B 異型の構造学的研究	桜庭 均
(8) ムコ多糖症の新生児期マスクリーニングに関する研究—特殊抗体 を用いた血漿及び尿中ケタラン硫酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン 硫酸及びデルマタ硫酸の測定—	磯貝光治
(9) Danon 病における自己貪食空胞の筋病理学的検討	西野一三
(10) Sandhoff 病モデルマウスにおける組織異常シグナルの解明と細胞補充療法への 応用	伊藤孝司
(11) ムコ多糖症-尿スクリーニングと酵素活性測定検査体制の構築	横山安伸

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
（総括研究報告書）

ライソゾーム病の病態解明と治療法の開発に関する研究
（主任研究者：桜川宣男、東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座 客員教授）

研究要旨

ライソゾーム病に対する新規治療法として、ヒト羊膜幹細胞の移植研究を行なっている。ヒト羊膜間葉細胞（hAMC）由来の幹細胞（SP細胞）の分離、培養に成功した。本細胞はOct 4 遺伝子が発現し、細胞増殖曲線も幹細胞としての性質を保持していた。各種の組織と臓器への分化誘導実験を進めている。本細胞は同種移植可能であり、倫理的、供給面でも問題が少ない。近い将来の臨床応用が期待される。神経発生および臓器形成の基礎研究も進展しており、SP細胞へ基礎理論を応用することによる再生医療への新たな展開が有望である。Dannon 病、Tay-Sacks 病、Sandhoff 病についての病態解明の研究を行なった。そして Dannon 病などの新しい疾患概念の病態解明が進んだ。臨床研究としては発生率の検討、マススクリーニングのための基礎研究、酵素診断法の検討、尿中ムコ多糖の測定と酵素測定の中央システム化を行なった。またライソゾーム病の診断基準の見直し、重症度分類の改定、個人調査票の改定などを行なった。

【主任研究者】

桜川宣男 東邦大学医学部 教授

【分担研究者】

御子柴克彦 東大医化学研究所教授

浅島 誠 東大大学院総合文化教授

青木継稔 東邦大学医学部 学長

古谷 博和 九州大学医学部 講師

【協力研究者】

奥山 虎之 国立成育医療センター 医長

桜庭 均 東京都臨床医学研究所 部長

磯貝 光治 岐阜大学医学部 講師

横山 安伸 エス・アール・エル 課長

西野 一三 国立精神神経センター 部長

伊藤 孝司 徳島大学薬学部 教授

北里 英郎 北里大学医学部 講師

A. 研究目的

ライソゾーム病の概念は水酸化酵素の先天的欠損による疾患群から、最近ではライソゾーム膜の先天異常に関する概念も含まれるようになってきた。一方臨床診断、酵素診断、遺伝子診断が進歩し、最近では若年～成人発症する症例が知られるようになった。また酵素補充療法により腹部型の Gaucher 病などは寛解するようになり、患者さんの生活の質（QOL）が問題になってきている。そこで本研究班を(1)基礎研究、治療法開発グループ、(2)病態解明グループ、(3)臨床研究グループの構成とした。そしてライソゾーム病の病態を解明し、新し

い治療法を開発することにより、患者さんの QOL の改善に資することを目的としている。

B. 研究方法と結果

次の3グループによる研究が進行している。

(1) 基礎研究、治療法開発グループ：

桜川は、胎盤より調整した羊膜間葉細胞から細胞分離解析装置を用いて、SP (side population)細胞（幹細胞）の分離、培養に成功した。そして免疫組織染色により Phenotype の検討を行ない、RT-PCR により遺伝子発現を検討した。細胞の成長は速やかであり、20 継代目細胞の population doublings は 40 である。各種の CD 抗体による免疫組織染色を行なっ

た。CK19+/vimentin+/nestin+の特徴をもっていた。HLA class IIは陰性であるが、HLA Class Iには陽性細胞と陰性細胞が共存していた。またCD4-/CD8-/CD15-/CD34-/CD38-/CD45-/Thy-1-/c-kit-の特長を持つ細胞である。RT-PCR 解析は、Oct 4, Rex 1, nestin, Musashi-1にはいずれも当該バンドを検出した。この細胞はヒト体細胞由来の幹細胞であり、同種移植による急性拒絶を惹起しない細胞の樹立が可能となった。

御子柴は、脳内の神経細胞に位置異常が見られる様々な突然変異マウスを利用し、発生過程で各神経細胞がいかんにしてそれぞれ特異的に配置されるのかを分子生物学・細胞生物学・形態学・構造生物学的手法を駆使して明らかにした。リーリングシグナルとは無関係と考えられていた *cdk5* の系が脳内神経細胞の位置決定に関わり、しかもリーリングシグナルとクロストークしていることが明らかとなった。一方 IP_3 レセプターは細胞内からのカルシウム放出に重要であるが、 IP_3 レセプターの構造・機能相関の解析を丹念に行うことにより、 IP_3 結合領域内に天然の IP_3 レセプターよりも500倍高い配列を見いだした。更に変異を加えることにより、約1000倍高い配列のものを得て、 IP_3 を吸収して細胞機能を制御する IP_3 スポンジとして使用しうることを明らかにした。

浅島は、両生類胚のアニマルキャップ (St. 9) は未分化細胞の塊であり、そこから試験管内で様々な臓器や組織をつくり出すことを私達は独自に開発してきた。今回はアクチビン処理細胞と未処理細胞を混合することによって新規に血管系のみをつくることに成功した。また一方、未分化細胞から軟骨をつくることも成功した。特に顎骨をつくることのできたため、長期培養によってアミロゲンなどを発現することができたので、歯形成も一部できることを示した。また、マウスのES細胞を用いて、新しいモルフォジェンによって、高率にかつ多数の心筋細胞分化が可能となった。このような未分化細胞の各臓器形成に関する

と思われる TGF- β 系と Wnt 系のシグナル伝達系に関して、新規の遺伝子である ELL 遺伝子と 29B 遺伝子をクローニングし、その働きを明らかにした。

奥山は、神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの中枢神経病変に対する細胞治療法の基礎的研究を行なった。受精後 14 日目の正常 B6 マウス胎児脳の線状体からニューロスフェア法により神経幹細胞を分離し、神経幹細胞および培地における β -glucuronidase (GUSB) の活性値を測定した。ムコ多糖症 VII 型 (MPSVII) マウス由来の線維芽細胞である 3521 細胞を 2 群に分け、一方には神経幹細胞の培養に使用した培地のみを加え、もう一方には培地と 1mM のマンノース 6 リン(M6P)酸を加え、培養した。24 時間後、各群の 3521 細胞の GUSB 活性を比較した。さらに同様の実験を、C3H マウス神経およびグリア細胞に対して行い、ライソゾーム酵素のドナー・レシピエントにおける細胞間輸送の可能性を示唆する所見を得た。

(2) 病態解明グループ：

古谷は、Krabbe 病の原因酵素である galactosylceramidase(GALC)活性の測定のための基質は、これまで bovine spinal cord から抽出していたが、アイソトープを使用していたために、多くのステップ、技術の習熟、特殊な施設が必要であった。そこで、人工合成基質を用いて同様の結果が出るかどうか、Krabbe 病患者培養細胞を用い、合成基質 HMU- β -Gal (6-Hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside)を用いた GALC 活性を、天然基質 (Gal-C)と RI を用いたこれまでの方法とで比較検討した。その結果、天然基質を用いた場合と比較して、測定に多少時間がかかり、培養時間の短縮は多少精度を下げる可能性があることを除いて、Krabbe 病の診断に特に問題はないことが判明した。今後診断のみならず、GALC 機能の解析のためにもこの測定方法

は有用であると考えられた。

桜庭は、Protein Data Bank に登録されている細菌由来のヘキソサミニダーゼおよびキトビアーゼの構造情報を基に、ホモロジーモデリング法により、ヒト由来ヘキソサミニダーゼのアルファサブユニットの3次元構造を構築し、本症の病因となる9種類の遺伝子変異によって生じる構造変化を解析した。野生型 α -サブユニットは、逆平行ベータシート構造をとる第1ドメインと活性ポケットを含む(ベータ1アルファ)₈-バレル構造をとる第2ドメインから成る。今回の解析対象とした9種類の変異は5群に分類された。第1群(R178H)は活性部位近傍にあり、活性関連領域の立体構造に変化を来した。第2群(W420C、C458Y)は活性ポケット内に位置するが、変異の位置は活性部位から遠く、当該部位の周辺に大きな構造変化が生じた。第3群(R504C/H)は第2ドメインの extra helix にあり、分子表面に構造変化を起こした。一方、第4群(R499C/H)も extra helix 上に位置するが、分子内部における構造変化が予想された。第5群(R170W、L484)は、ドメイン2上の、ドメイン1に面する領域にあり、両ドメインの構造に大きな変化を起こすことが予測された。

伊藤は、生直後、2週齢(発症前)および14週齢(発症後)の各ステージのSDマウス(n=3)から得た各臓器中の各種ケモカインの発現量(mRNA およびタンパク)を定量的PCR法およびELISA法により測定し、野生型(n=3)と比較解析した。また各臓器から糖脂質を抽出し、GM2およびGA2の蓄積量を解析した。解析したケモカイン(fractalkine, MIP-1 α およびSLC)のうち、MIP-1 α の発現レベル(mRNA およびタンパク質)がSDマウスの脳(大脳、小脳および脳幹)において発症に先行して有意に増大していることを初めて明らかにした。

一方他の臓器においてはMIP-1 α の発現量の顕著な差は観察されなかった。また脳組織において他のケモカインについては変動は認められなかった。脳組織におけるMIP-1 α の発現増大は生直後から始まっており、GM2-ガングリオシドの蓄積との相関が認められた。

西野は、LAMP-2変異を認めたDanon病8家系10人の男性患者について筋病理学的に検討した。筋線維内に多数の好塩基性小空胞を認め、空胞は大半が細胞内深部に散在し、球あるいは楕円球型の完結した形態であった。空胞壁ではAChEやnonspecific esterase活性を認めるが、 α -bungarotoxinは陰性、さらにdystrophinなど筋鞘膜特異蛋白が存在し、perlecanなど細胞外マトリックス構成蛋白も認めた。リソソーム膜蛋白limp-1とdystrophinの二重染色では、空胞壁でdystrophinを発現する空胞と発現しない空胞の2種類を認めた。dystrophinで囲まれた自己貪食空胞は加齢で増加したが、limp-1を過剰発現した筋線維は加齢による増加は認めなかった。電顕的には細胞質崩壊産物を含む自己貪食空胞であり、この集合体を基底膜構造を持つ二重膜で囲まれる空胞と囲まれていない空胞を認め、免疫電顕で二重膜はdystrophinを発現していた。

(3) 臨床研究グループ：

青木は、ライソゾーム病の臨床統計の結果をもとに、本症のマススクリーニング・システム構築に関する検討を行った。平成11年度の小児慢性疾患事業などへの「先天代謝異常」の登録をもとに、ライソゾーム病各疾患における頻度を検討した。比較的頻度が高い疾患に対して、診断法、治療法、およびスクリーニングの方法を検討した。その結果、現時点においてはTay-Sachs病、GM1ガングリオシドーシス、ムコ多糖症および異染性白質ジストロフィーなどがスクリーニング対象疾患の候補疾患になりうると考えられた。今後、これらの疾患に対し尿あるいは濾紙血を用い

たスクリーニング法を検討していく必要があると考えられた。

磯貝は、ムコ多糖症の新生児期マススクリーニングに関する研究を行なった。KS, HS, CS の特殊抗体を作成し、それを用いた ELISA サンドイッチ法によって MPS 患者および健康人コントロールの血漿中、尿中のケタラン硫酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸の測定を行った。KS 抗体を用いたスクリーニング方法は、ケタラン硫酸への特異性が高く、また検量線では、吸光度とほぼ正比例の関係を得ることができた。また、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸でも同様にそれぞれの抗体を用いた方法で吸光度とほぼ正比例していた。この抗体を用いた ELISA サンドイッチ法で血漿中、尿中のムコ多糖を測定した、血漿中のケタラン硫酸は、MPS IV 型に限らず、すべての型の MPS 患者で高値となった。各年齢層の多数例の健康人および各亜型についての検討が必要である。

横山は、ライソゾーム病患者認定のため、診断方法の統一と標準化について検討した。本年度はムコ多糖症の尿スクリーニング検査と酵素測定の実施体制について、医療情勢、社会情勢を踏まえて構築する。倫理的、社会的、法的問題を内包する遺伝性疾患を対象とした遺伝子診断は、「包括的遺伝子診療体制」のもとで実施されるべきであり、「包括的遺伝子診療サポートシステム」と云った積極的な連携システムの構築が不可欠と考え、本年度は、岐阜大学小児科の協力を得て、ムコ多糖症の尿スクリーニング検査と酵素測定システムを構築した。

(倫理面への配慮)

予定帝王切開の妊婦に研究の目的と胎盤の使用について説明してから、胎盤の提供の許可を得た。このようにインフォームドコンセントを施行してから、帝王切開分娩時に胎盤を入手した。診断確定に必要な血液採取や皮

膚繊維芽細胞の培養に必要な皮膚生検は、同様にインフォームドコンセントを施行してから行なった。動物実験は、各施設内倫理委員会で許可を得て行なわれている。

C. 考察

(1) 基礎研究、治療法開発グループ

桜川は、ヒト羊膜間葉細胞由来の幹細胞 (SP 細胞) の分離、培養に成功した。羊膜間葉細胞は外胚葉盤の神経線条から分化して発生してくる中胚葉性の細胞であり、外胚葉盤由来の羊膜上皮細胞層と絨毛膜との中間に位置する。ヒト体細胞である羊膜間葉細胞からの幹細胞が分離培養可能となったことより、発生初期における細胞の分化誘導とその制御機構が注目される。御子柴、浅島らの基礎研究にこの細胞研究を応用することは、大きな研究の発展につながると考える。奥山は、神経幹細胞を用いた中枢神経病変に対する細胞治療法の基礎的研究を行なった。M6P 受容体を介する GUSB の細胞間輸送が、ドナー神経幹細胞とレシピエントの脳内細胞の間で成立しうることが示唆された。

(2) 病態解明グループ

桜庭は、Tay-Sachs 病は責任蛋白質の構造面から、本症の病因となる9種類の遺伝子変異によって生じる構造変化を解析した。構造学的視点からの Tay-Sachs 病の解析情報は、本症の病態解明に有用と考えられた。西野は、Danon 病の筋病理学的特長である筋線維内の自己貪食空胞病態解明を目指し解析した。Danon 病で認められる空胞の壁は、筋細胞膜の性質を有しており、自己貪食空胞の周囲に何らかの機序で形質膜が形成されたと推測され、空胞は蓄積性の変化と考えられた。伊藤は、Sandhoff 病モデルマウス (SD マウス) を用い、糖脂質蓄積症の発症機構を解明することを目的として研究を行った。SD マウスの脳組織では、生直後からケモカインの一種である MIP-1 α の発現が特異的に増大し始めており、またその経

時変化は GM2-ガングリオシドの蓄積の進行と平行していた。従って MIP-1 α の発現誘導が、この疾患において神経変性などの脳組織の異常を伝えるシグナルとして機能している可能性が考えられた。

(3) 臨床研究グループ

桜川は今年度よりスタートした特定疾患認定事業について、診断基準および個人調査票の見直しを行なった。28種類のライソゾーム病に新たに MPS IX型 (Hyaluronidase 欠損症) を追加した。診断基準は疾患により異なるため、病理学的診断の補助項目を設定して簡素化した。個人調査票については、重症度規定、治療による緩解による重症度の変更項目、更新用個人調査票の新規作製などを行なった。青木は、ライソゾーム病のマスクリーニングについて検討した。ムコ多糖症および異染色性白質ジストロフィーは尿検査にて、Tay-Sachs 病および GM1 ガングリオシドーシスは濾紙血を用いた検査にてスクリーニングすることが可能であると考えられた。これら4疾患がスクリーニング対象疾患の候補疾患になりうると考えられた。今後は、これらの疾患に対する一次スクリーニングの方法とその施行時期について検討していく必要があると考えられた。磯貝は、特殊抗体を用いた ELISA サンドイッチ法による血漿中、尿中ムコ多糖の測定法について検討した。KS 抗体を用いてのムコ多糖症のスクリーニングは有用と考えられるが、今後各年齢層における多数例の解析、健康対照と各亜型についてのデータの蓄積が必要である。将来新生児マस्कリーニングに KS 抗体を用いたムコ多糖症スクリーニングの有用性が判明すれば、ムコ多糖症の早期発見、早期治療が可能となると考えられる。横山は、ムコ多糖症の診断に不可欠は尿中ムコ多糖の定性と定量、関連酵素活性の測定の一元化にむけてシステム作りを行なった。大学等の研究施設におけるこれらの技術を検査会社へ移転することは、研究者の移動などに

伴ってこれらの検査が中断される危険性に対応するために行なうものである。検査料は患者の個人負担となることより、今後の課題である。

D. 結論

ライソゾーム病の中枢神経症状の治療法は未解決である。今年度、分離・培養に成功したヒト羊膜間葉細胞由来の SP 細胞は同種移植可能な体細胞由来の幹細胞であり、倫理面と供給面での問題は少ない。神経発生分子遺伝および *in vitro* での両性類における臓器形成技術の応用により、SP 細胞による再生医療は進展するであろう。SP 細胞の再生医療への応用により、自家移植による再生医療をレディメイド型再生医療へと転換することが可能となる。一方、病態解明では Dannon 病などの新しいライソゾーム病の概念の病態が明らかになってきた。臨床研究に関しては、診断基準の改定、重症度判定基準の見直し及び個人調査票の見直しを行った。患者の QOL のさらなる改善を目指して研究を進めている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koyano S, Fukui A, Uchida S, Yamada K, Asashima M, Sakuragawa N: Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Development, Growth and Differentiation*. 44: 103—112, 2002
- 2) Elwan MA, Sakuragawa N: Uptake of dopamine by cultured monkey amniotic epithelial cells. *Eur J Pharmacol*. 25: 205-208, 2002
- 3) Naganawa Y, Ohsugi K, Kase R, Date I, Sakuraba H, Sakuragawa N: In vitro study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell line. *Cell Transplantation* 11:

- 325-329, 2002.
- 4) Ogawa A, Terada S, Miki M, Matsuura K, Hoshika A, Sakuragawa N: Human amniotic epithelial (HAE) cell produce erythropoietin. *Animal cell Technology: Basic & Applied Aspects*. 12: 309-313, 2002.
 - 5) Terada S, Ogawa S, Sakai N, Miki M, Fujita T, Yata T, Nagamune T, Sakuragawa N, Suzuki E: Apoptosis inhibiting genes and caspase inhibitors improved mammalian cell survival and enhanced protein production. ACS symposium series 830. *Biological system engineering*. Edt by Maartin MR, Park TH, Nagamune T. America Chemical Society, Washington DC, pp 190- 199, 2002
 - 6) Uchida S, Suzuki Y, Araie M, Kashiwagi K, Otori Y, Sakuragawa N: Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells. *Neuroreport*. In press.
 - 7) Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Characterization of the dopamine transporter gene exprewssion and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett*. In press.
 - 8) Saneyoshi, T., Kume, S., Amasaki, Y. & Mikoshiba, K.: The Wnt/Calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos.. *Nature* 417: 295-299 , 2002
 - 9) Nagai, T., Ibata, K., Park, ES., Kubota, M., Mikoshiba, K. & Miyawaki, A.: A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol*, 20 : 87-90 , 2002
 - 10) Bosanac, I., Alattia, J. R., Mal, T. K., Chan, J., Talarico, S., Tong, F. K., Tong, K. I., Yoshikawa, F., Furuichi, T., Iwai, M., Michikawa, T., Mikoshiba, K. & Ikura, M: Structure of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor binding core in complex with IP₃. *Nature*, 420: 696-700 , 2002
 - 11) Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K. & Takenawa, T.: Sustained Activation of N-WASP through Phosphorylation Is Essential for Neurite Extension. *Developmental Cell* , 3 : 645-658, 2002
 - 12) Kuroda, H., Inui, M., Sugimoto, K., Hataya, T. and Asashima, M. : Axial protocadherin is a mediator of prenotochord cell sorting in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 244, 267-277, 2002
 - 13) Onuma, Y., Takahashi, S., Asashima, M., Kurata, S. and Walter J. Gehring. : Conservation of Pax 6 function and upstream activation by Notch signaling in eye development of frogs and flies. *PNAS*, 99(4), 2020-2025, 2002
 - 14) Kadoya, T., Yamamoto, H., Suzuki, T., Yukita, A., Fukui, A., Michiue, T., Asahara, T., Tanaka, K., Asashima, M. and Kikuchi, A. : Desumoylation activity of Axam, a novel Axin-binding protein, is involved in downregulation of β -catenin *Molecular and Cellular Biology*, 22(11), 3803-3819, 2002
 - 15) Emura, T., Asashima, M., Furue, M. and Hasizume, K.: Experimental split cord malformations. *Pediatr. Neurosurg*. 36, 229-235, 2002
 - 16) Osafune, K., Nishinakamura, R., Komazaki, S. and Asashima, M.: In vitro induction of the pronephric duct in *Xenopus* explants. *Develop. Growth Differ*. 44, 161-167, 2002
 - 17) Onuma, Y., Takahashi, S., Yokota, C. and Asashima, M.: Multiple nodal-related genes act coordinately in *Xenopus* embryogenesis. *Developmental Biology*, 241, 94-105, 2002
 - 18) Kobayashi, M., Kishida, S., Fukui, A., Michiue, T., Miyamoto, Y., Okamoto, T., Yoneda, Y., Asashima, M. and Kikuchi, A.: Nuclear localization of Duplin, a β -catenin-binding protein, is essential for its inhibitory activity on the Wnt signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, 277(8), 5816-5822, 2002
 - 19) Kakeda, M., Kyuno, J., Kato, T., Nishikawa, M. and Asashima, M.: Role of the thrombopoietin (TPO)/Mpl system: c-Mpl-lik molecule/TPO signaling enhances early hematopoiesis in *Xenopus*

- laevis. *Develop. Growth Differ.*, 44, 63-75, 2002
- 20) Sedohara, A., Fukui, A., Michiue, T. and Asashima, M.: Role of BMP-4 in the inducing ability of the head organizer in *Xenopus laevis*. *Zool. Sci.*, 19, 67-80, 2002
- 21) Wada, M., Miyazawa, H., Wang, R., Mizuno, T., Sato, A., Asashima, M. and Hanaoka, F.: The second largest subunit of mouse DNA polymerase ϵ , DPE2, interacts with SASP18 and recruits the Sin3 co-repressor protein to DNA. *J. Biochem.*, 131, 307-311, 2002
- 22) Hayata, T., Tanegashima, K., Takahashi, S., Sogame, A. and Asashima, M.: Overexpression of the secreted factor Mig30 expressed in the Spemann organizer impairs morphogenetic movements during *Xenopus* gastrulation. *Mechanisms of Development*, 112, 37-51, 2002
- 23) Koyano, S., Fukui, A., Uchida, S., Yamada, K., Asashima, M., and Sakuragawa, N.: Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Develop. Growth Differ.*, 44(2), 103-112, 2002
- 24) Satow, R., Chan, T. and Asashima M.: Molecular cloning and characterization of dullard: a novel gene required for neural development. *B. B. R. C.*, 295, 85-91, 2002
- 25) Uehara, M., Haramoto, Y., Sekizaki, H., Takahashi, H. and Asashima, M.: Chromosome mapping of *Xenopus tropicalis* using the G- and Ag-bands: Tandem duplication and polyploidization of larvae heads. *Develop. Growth Differ.*, 44, 427-436, 2002
- 26) Furue, M., Myoishi, Y., Fukui, Y., Ariizumi, T., Okamoto, T. and Asashima, M.: Activin A induces craniofacial cartilage from undifferentiated *Xenopus* ectoderm in vitro. *PNAS*, 99(24), 15474-15479, 2002
- 27) Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M. and Nishinakamura, R.: Zinc finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), 62-69, 2003
- 28) Takeshita Y, Shimizu N, Yamaguchi Y, Nakazono H, Saitou M, Fujikawa Y, Aoki T: Two families with Wilson disease in which siblings showed different phenotypes. *J Hum Genet* 47: 543-547, 2002
- 29) 清水教一, 竹下由紀子, 渡辺温子, 逸見仁道, 嶋武博之, 岡田光正, 青木継稔: 重篤な肝障害を呈した Wilson 病症例の遺伝子変異に関する検討. *Biomed Res Trace Elements* 13: 284-285, 2002
- 30) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 岡田光正, 青木継稔: 本邦における Wilson 病遺伝子診断に関する研究. *Biomed Res Trace Elements* 13: 286-287, 2002
- 31) 青木継稔, 清水教一, 竹下由紀子: Wilson 病遺伝子異常の臨床と治療. *細胞* 34: 583-586, 2002
- 32) Takahashi, H., Hirai, Y., Migita, M., Seino, Y., Fukuda, Y., Sakuraba, H., Kase, R., Kobayashi, T., Hashimoto, Y., Shimada, T.: Long-term systemic therapy of Fabry disease by adeno-associated virus-mediated muscle-directed gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 13777-13782, 2002
- 33) Naganawa, Y., Ohsugi, K., Kase, R., Date, I., Sakuraba, H., Sakuragawa, N.: In vitro study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell line. *Cell Transpl.* 11: 325-329, 2002
- 34) Sakuraba, H., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Kotani, M., Lin, H., Ohno, K., Tanaka, A., Yamada, H., Uyama, E.: Molecular and structural studies of the GM2 gangliosidosis 0 variant. *J. Hum. Genet.*, 47: 176-183, 2002
- 35) Itoh, K., Naganawa, Y., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Sasagasaki, N., Yamada, T., Kira, J., Kobayashi, T., Pshetzsky, A. V., Sakuraba, H.: Novel missense mutations in the human lysosomal sialidase gene causing sialidosis

- and structural prediction of mutant enzymes. *J. Hum. Genet.*, 47: 29-37, 2002
- 36) Takemoto Y, Suzuki Y, Tamakoshi A, Onodera O, Tsuji S, Hashimoto T, Shimozawa N, Orii T, Kondo N. Epidemiology of X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. *J Hum Gene.* 2002;47(11):590-3
- 37) Tomatsu S, Orii KO, Vogler C, Grubb JH, Snella EM, Gutierrez MA, Dieter T, Sukegawa K, Orii T, Kondo N, Sly WS. Missense models [Gustm(E536A)Sly, Gustm(E536Q)Sly, and Gustm(L175F)Sly] of murine mucopolysaccharidosis type VII produced by targeted mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 12;99(23):14982-7
- 38) Tomatsu S, Orii KO, Islam MR, Shah GN, Grubb JH, Sukegawa K, Suzuki Y, Orii T, Kondo N, Sly WS. Methylation patterns of the human beta-glucuronidase gene locus: boundaries of methylation and general implications for frequent point mutations at CpG dinucleotides. *Genomics* 2002 Mar;79(3):363-75
- 39) Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimiya J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 59: 1689-1693, 2002.
- 40) Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kellely RL, Somer H, Straub V, Mathews KD, Moore SA, Campbell KP. Posttranslational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418: 417-422, 2002.
- 41) Takahashi M, Yamamoto A, Takano K, Sudo A, Wada T, Goto Y, Nishino I, Saitoh S. Girline mosaicism of a novel mutation in LAMP-2 deficiency (Danon disease). *Ann Neurol* 52: 122-125, 2002.
- 42) Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J, Inturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Noanka I, Hirano M, Nishino I. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 58: 1773-1778, 2002.
- 43) Suzuki T, Nakagawa M, Yoshikawa A, Sasagawa N, Yoshimori T, Ohsumi Y, Nishino I, Ishiura S, Nonaka I. The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy. *J Biochem* 131: 647-651, 2002.
- 44) Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Hirano M, Nonaka I, Nishino I. Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. *Neurology* 57: 903-905, 2001.
- 45) Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y, Sue CM, Yamamoto A, Murakami N, Shanske S, Byrne E, Bonilla E, Nonaka I, DiMauro S, Hirano M. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 406: 906-910, 2000.
- 46) Itoh, M., Kuwahara, J., Itoh, K., Fukuda, Y., Kohya, M., Shindo, M., Shishido, K. : Apoptosis-inducing activity of synthetic halichlorine intermediates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2002) 12(16) 2069-2072
- 47) Itoh, K., Naganawa, Y., Matuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Sasagasako, N., Yamada, Kira, J., Kobayashi, T., Pshezhetsky, A.V., Sakuraba, H. : Novel missense mutations in the human lysosomal sialidase gene in sialidosis patients and prediction of structural alterations of mutant enzymes. *J. Hum. Genet.* (2002)47, 29-37

2. 学会発表

- 1) 桜川宣男、畑田成吾、加茂 功、菊池愛子、柿沼健一、横山安伸：ヒト羊膜細胞由来の SP 細胞の分離、培養と Phenotype の検討。第 2 回 日本再生医療学会総会。神戸、平成 15 年 3

月12日。

- 2) 成田純子, 寺尾恵治, 桜川宣男, 鳥居隆三: カニクイザル羊膜細胞を用いた核移植による胚盤胞期胚の作製。第2回日本再生医療学会総会。神戸、平成15年3月11日。
- 3) 清水教一, 山口之利, 青木継稔: Wilson 病マススクリーニング・システムの検討, 方法と施行時期に関するまとめ。第105回日本小児科学会学術集会, 名古屋, 2002年4月
- 4) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 青木継稔: 変性高速液体クロマトグラフィーによる Wilson 病遺伝子変異スクリーニングの検討。第105回日本小児科学会学術集会, 名古屋, 2002年4月
- 5) 齊藤美雪, 中園宏紀, 竹下由紀子, 清水教一, 山口之利, 青木継稔: 同胞間にて異なった病型および発症年齢を呈した Wilson 病の一家系。第105回日本小児科学会学術集会, 名古屋, 2002年4月
- 6) 山口之利, 藤井秀樹, 清水教一, 青木継稔, 玉井浩, 有馬正高: ウイルソン病友の会活動の状況。第105回日本小児科学会学術集会, 名古屋, 2002年4月
- 7) 山口之利, 清水教一, 青木継稔: Wilson 病マススクリーニング実施に向けて, 方法と施行時期に関するまとめ。第6回ウイルソン病研究会学術集会, 東京, 2002年5月
- 8) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 青木継稔: Wilson 病の遺伝子診断に関する検討, 効率の良い方略とその位置づけについて。第6回ウイルソン病研究会学術集会, 東京, 2002年5月
- 9) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 青木継稔: 神経型・肝神経型 Wilson 病に対する遺伝子診断の方略。第44回日本小児神経学会総会, 仙台, 2002年6月
- 10) 清水教一, 竹下由紀子, 山口之利, 青木継稔: 神経型および肝神経型 Wilson 病の早期診断に関する検討。第44回日本小児神経学会総会, 仙台, 2002年6月

- 11) 清水教一, 竹下由紀子, 渡辺温子, 逸見仁道, 嶋武博之, 岡田光正, 青木継稔: 重篤な肝障害を呈した Wilson 病症例の遺伝子変異に関する検討。第13回日本微量元素学会, 木更津, 2002年7月
- 12) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 岡田光正, 青木継稔: 本邦における Wilson 病遺伝子診断に関する研究。第13回日本微量元素学会, 木更津, 2002年7月
- 13) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 岡田光正, 青木継稔: 重篤な肝障害を呈した Wilson 病症例の ATP7B 遺伝子変異に関する検討 (第二報)。第19回日本小児肝臓病研究会, 土浦, 2002年7月
- 14) 清水教一, 竹下由紀子, 山口之利, 四宮範明, 青木継稔: Wilson 病マススクリーニング・システムにおける一次スクリーニング法の検討, 方法と施行時期に関するまとめ。第49回日本小児保健学会, 神戸, 2002年10月
- 15) 竹下由紀子, 清水教一, 四宮範明, 青木継稔: Wilson 病マススクリーニングにおける遺伝子診断の位置づけに関する研究。第49回日本小児保健学会, 神戸, 2002年10月
- 16) 清水教一, 竹下由紀子, 山口之利, 四宮範明, 青木継稔: Wilson 病の子後に関する検討, 早期 (発症前) 診断の重要性について。
- 17) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 四宮範明, 青木継稔: R778L 変異を有する Wilson 病症例に関する検討。第45回日本先天代謝異常学会, 神戸, 2002年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

（分担研究報告書）

細胞移植による脳代謝病の治療研究：

ヒト羊膜細胞由来 SP 細胞の分離・培養と phenotype の検討

分担研究者：桜川宣男 東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座 客員教授

協力研究者：畑田成吾、蓮見裕子 東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座

柿沼健一、横山安伸

株式会社エス・アール・エル

菊池愛子、加茂 功

国立精神・神経センター

伊野礼子

ベックマンコールター

研究要旨

SP 細胞 (side population cells) は幹細胞の性質を保持する細胞といわれている。我々はヒト羊膜間葉細胞由来の SP 細胞を分離、培養に成功した。細胞増殖曲線は最近報告された MAPCs と類似している。免疫組織染色では CK19+/vimentin+/nestin+ の特長を持ち、HLA class II は発現していない。興味深いことは、HLA class I が発現している細胞としていない細胞が存在していたことである。RT-PCR による検索では、未分化細胞に特長的な OCT4 とその下流遺伝子の発現が確認された。以上より、ヒト羊膜間葉細胞由来の SP 細胞（幹細胞）の分離・培養に成功したことより、同種移植可能な体細胞由来の幹細胞の樹立が可能となり、幹細胞バンクの確立に期待が持てる。

A. 研究目的

ヒト羊膜上皮細胞は胎生初期に形成され、免疫学的に幼稚であることより同種移植可能な細胞である。我々の従来の研究により、羊膜上皮細胞は多機能、即ち種々の生体活性物質 (acetylcholin, catecholamin, neurotrophic factors, activin, noggin, albumin, erythropoietin) の合成・分泌する機能を保持していることを報告してきた。また羊膜上皮細胞の下層に存在している羊膜間葉細胞は、神経プロゲニターの特徴をもつ細胞が存在していることを証明した。このような従来の研究から羊膜細胞には多機能の幹細胞が存在する可能性を提唱してきた。そして体細胞由来幹細胞の分離、培養の研究進めてきた。

近年、造血幹細胞や他の器官の未熟細胞の多能性が報告されている。特にマウス骨髄細胞を用い、Verapamil 添加後、Hoechst 33342 (UV レーザーに2つの波長の蛍光を発する) の波長を暗く発現している細胞集団が高い幹細胞性を持つことが証明され、その細胞分画を SP 細胞 (side population) と呼ばれている。そこで我々は羊膜細胞由来の SP 細胞の分離・培養に成功し、免疫組織

染色により phenotype を検討した。また RT-PCR により、未分化細胞に重要な役割を演じていると考えられている Oct 4 などの遺伝子発現を調べたので報告する。

B. 研究方法

インフォームドコンセント施行してから、予定帝王切開分娩の胎盤より羊膜を分離した。従来の方法により、羊膜は2段階の酵素処理法により、羊膜上皮細胞と羊膜間葉細胞とに分離して培養した。培養細胞を細胞分離装置 (ベックマン・コールター) を用いて、SP 細胞の同定を行い、分離した。分離細胞を継代培養し、細胞増殖曲線より population doublings を算出した。そして種々の抗体で染色して phenotype の検討を行った。また Oct 4 およびその下流の遺伝子発現を RT-PCR にて検討した。

C. 研究結果

細胞分離装置を用いて SP 細胞分画をゲートで囲み、verapamil 処理細胞と比較検討した。羊膜間葉細胞には 0.6% の SP 細胞の存在が確認された。10,000 個の SP 細胞を分取

し、24 well デッシュを用いて 3,000/well の濃度で培養した。細胞の成長は速やかで、8 日目にコンフルエントに達した。以後、継代を繰替えし 20 代目の population doublings は 40 である。一方、羊膜上皮細胞より同様に SP 細胞分画が分取された (1.6%)。この細胞の成長は遅く、異なった細胞集団と考えられる。各種の CD 抗体による免疫組織染色を行なった。CK19+/vimentin+/nestin+の特徴をもっていた。HLA class II は陰性であるが、HLA Class II には陽性細胞と陰性細胞が共存していた。また CD4-/CD8-/CD15-/CD34-/CD38-/CD45-/Thy-1-/c-kit-の特長を持つ細胞である。RT-PCR 解析は、Oct 4, Rex 1, nestin, Musashi-1 にはいずれも当該バンドを検出した。

D. 考察

ヒト羊膜細胞には SP 細胞の存在が証明された。その増殖曲線は最近報告された MAPCs (Mesencymal adult progenitor cells) と類似している。細胞表面マーカーは、CK19 (羊膜上皮細胞のマーカー) および vimentin (羊膜間葉細胞マーカー) の共発現する細胞であることが判明した。免疫組織染色により、HLA class II 発現は欠如している細胞である。興味深い所見は、HLA class I に陽性な細胞と陰性な細胞が存在していることが判明した。この事実は、HLA class I & II の発現を欠如している細胞、即ち免疫学的に寛容な細胞の存在が示唆された。Nestin+/Musashi 1-の特長は、本細胞が神経幹細胞の性質を保持していること示唆している。RT-PCR の結果、Oct 4 およびその下流遺伝子である Rex 1 の発現していたことより、本細胞が幹細胞の性質を保持していることが証明された。

E. 結論

インフォームドコンセント施行してから、帝王切開時に提供された胎盤より、羊膜細胞は調整される。従って羊膜細胞の調整は供給面、倫理面からは問題が少ない。また同種移植が可能な細胞であることが証明されていることより、羊膜細胞由来の幹細胞 (SP 細胞) は、再生医療にとって有望な細

胞であると同時に将来の羊膜幹細胞バンクシステムの樹立の道を開くものである。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koyano S, Fukui A, Uchida S, Yamada K, Asashima M, Sakuragawa N: Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Development, Growth and Differentiation*. 44:103—112, 2002
- 2) Elwan MA, Sakuragawa N: Uptake of dopamine by cultured monkey amniotic epithelial cells. *Eur J Pharmacol*. 25: 205-208, 2002
- 3) Naganawa Y, Ohsugi K, Kase R, Date I, Sakuraba H, Sakuragawa N: In vitro study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell line. *Cell Transplantation* 11: 325-329, 2002.
- 4) Ogawa A, Terada S, Miki M, Matsuura K, Hoshika A, Sakuragawa N: Human amniotic epithelial (HAE) cells produce erythropoietin. *Animal cell Technology: Basic & Applied Aspects*. 12: 309-313, 2002.
- 5) Terada S, Ogawa S, Sakai N, Miki M, Fujita T, Yata T, Nagamune T, Sakuragawa N, Suzuki E: Apoptosis inhibiting genes and caspase inhibitors improved mammalian cell survival and enhanced protein production. ACS symposium series 830. *Biological system engineering*. Edt by Maartin MR, Park TH, Nagamune T. America Chemical Society, Washington DC, pp 190- 199, 2002
- 6) Uchida S, Suzuki Y, Araie M, Kashiwagi K, Otori Y, Sakuragawa N: Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells. *Neuroreport*. In press.
- 7) Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Characterization of the dopamine transporter gene expression and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett*. In press.

2. 学会発表

- 1) 桜川宣男、畑田成吾、加茂 功、菊池愛子、柿沼健一、横山安伸：ヒト羊膜細胞由来の SP 細胞の分離、培養と Phenotype の検討。第2回日本再生医療学会総会。神戸、平成15年3月12日。
- 2) 成田純子、寺尾恵治、桜川宣男、鳥居隆三：カニクイザル羊膜細胞を用いた核移植による胚盤胞期胚の作製。第2回日本再生

医療学会総会。神戸、平成15年3月11日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
（分担）研究報告書

ライソゾーム病の病態の解明及び治療法の開発に関する研究
分担研究者 御子柴克彦 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

神経細胞が分裂して、脳内の正確な位置に配列すべく到達するメカニズムの解明は急務であった。リーリングシグナルとは無関係と考えられていた *cdk5* の系が脳内神経細胞の位置決定に関わり、しかもリーリングシグナルとクロストークしていることが明らかとなった。一方 IP_3 レセプターは細胞内からのカルシウム放出に重要であるが、 IP_3 レセプターの構造・機能相関の解析を丹念に行うことにより、 IP_3 結合領域内に天然の IP_3 レセプターよりも 500 倍高い配列を見いだした。更に変異を加えることにより、約 1000 倍高い配列のものを得て、 IP_3 を吸収して細胞機能を制御する IP_3 スポンジとして使用しうることを明らかにした。

A. 研究目的

高次脳機能発現の分子的基盤を明らかにするためには、脳がどのような過程を経て作られるのかについての理解が不可欠である。精子と卵の受精現象に始まり、神経外胚葉の形成、神経板の部位特異化、皮質層構造の形成、神経回路網の形成といったいくつかの決定的な事象の流れのなかで脳神経系は形づくられる。本研究チームではこれらの事象に系統的に取り組み、それぞれの過程で重要な役割を果たす分子群の構造・機能、それらの細胞、組織、個体レベルでの役割を明らかにすることにより、脳神経系に特徴的な多様性と特異性をうみだすメカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

- 1) 脳内の神経細胞に位置異常が見られる様々な突然変異マウスを利用し、発生過程で各神経細胞がいかんにしてそれぞれ特異的に配置されるのかを分子生物学・細胞生物学・形態学・構造生物学的手法を駆使して明らかにする。
- 2) IP_3 レセプターの構造・機能相関の解析を生化学的に行うことにより、 IP_3 レセプター

の配列の特徴を明らかにする。

C. 研究結果

- 1) 脳内の神経細胞の位置決定に重要な役割を担う各種分子の解析をそれらの変異マウスを利用して行うとともに、各種分子の構造生物学的な解析を行なった。変異マウスはリーリン/CR-50 抗原を欠損したリーラーとリーリングシグナルを受ける側の細胞内分子 *disabled-1* (*Dab1*) 変異マウスで我々の研究室で単離されたヨタリマウスに加え、*Cdk5/p35* キナーゼ欠損マウスを主に用いて検討を行なった。リーリンのリセプターが明らかになっているが、*Dab1* 以降のシグナル伝達の機構は不明であり、また *Cdk5/p35* の欠損による機能障害の機序もこれまでに明らかにされていない。*Cdk5/p35* 欠損マウスとリーラー及びヨタリマウスはその皮質構築異常の表現型が類似している事から、*Cdk5/p35* がリーリングシグナルの下流にある可能性が指摘されてきた。両者の関係を明らかにするために、*p35* とリーリンあるいは *Dab1* の両者の欠損したミュータントマウスを作製し解析した。この結果 *Cdk5/p35* はリーリングシグナルの下流としては機能しない

が、両者は共働的に神経細胞の位置決定に機能していることが明らかとなった。また、我々は構造生物学的アプローチにより、リーリン/C50 抗原の機能発現の分子機構を検討した。その結果、リーリンはその機能阻害抗体 CR-50 の認識するエピトープ部位を介して、その静電的相互作用により homomultimer を形成して、その下流の Dab1 のチロシン残基のリン酸化反応を起こし、以降のリーリンシグナルの伝達過程が進行することを解明し、リーリンの機能が発現されるためにはリーリンの homomultimer 形成が必須であることを明らかにした。我々の作製した CR-50 はこの homomultimer 形成を阻害する事により、リーリンシグナルを遮断し、機能阻害抗体として機能している事が示唆された。

2) IP_3 レセプターのなかに天然の IP_3 結合領域のなかに IP_3 レセプターより約 1,000 倍 IP_3 結合活性の高い配列 (IP_3 結合コア) が含まれていることを発見した。 IP_3 レセプタータイプ1の IP_3 結合領域 (C ドメイン) は N 末端約 750 アミノ酸に相当する。その部分の IP_3 結合活性は、天然のものと同じであるが、N 末端側のアミノ酸を除去したところ、Kd 値は約 500 倍高くなり、さらにアミノ酸の変異を入れることにより最終的に 1,000 倍高い IP_3 結合能を示した細胞内にこの高親和性配列を導入すると、天然の IP_3 レセプターよりも IP_3 に対する親和性が高いために、細胞内の IP_3 を補足することで、 IP_3 レセプターのはたらきをおさえることができる。そこで高親和性 IP_3 結合配列のことを IP_3 スポンジと名付けた。この“結合領域の中の結合ドメイン”の N 末端側は抑制領域となっている。しかも、その後ろにコアドメインがある。そのためにコアドメインのみであると抑制領域がない為に IP_3 結合活性が上昇すると考えられる。

IP_3 結合ドメインはさらに、まったく IP_3

結合性をもたないもの (I) とわずかに IP_3 結合性を示すもの (II) の2つのドメインに分かれた。IIが IP_3 結合のプロトタイプで、おそらく進化の過程で I の部分が付け加わり、これにより IP_3 結合活性が飛躍的に増加したが、それを抑えて調節するためにその N 末端に“抑制”領域がつけ加わったものと考えられる。

D&E. 結論及び考察

1) 今回 Cdk5 の脳発生・分化での役割を解明してきた。更にリーリンの構造生物学的性質を明らかにするとともに、今後

a. *Cdk5*^{-/-}, *p35*^{-/-} マウス及び *reeler*, *yotari* とこれらの double mutant の神経組織、培養細胞を用いて、Cdk5/p35 キナーゼがどのような蛋白のリン酸化を介して神経細胞の移動・位置決定に重要な役割を果たしているのか、Reelin シグナルとの関連もふまえて明らかにしていくことが必要と考える。

b. リーリンの F-spondin 様部位及びリーリンリピート部位について、構造生物学的解析を行ない、リーリンの機能発現の分子機構の詳細をさらに検討することが必要となる。

2) IP_3 レセプターの構造・機能相関の解析により、 IP_3 レセプター/ Ca^{2+} シグナル系を阻害する配列を手に入れることが出来た。この利点は 3 タイプの IP_3 レセプターとは無関係に全ての IP_3 レセプターの機能を阻害するところに重要な利点があり、脳の発生・分化研究に利用することが出来る。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

a) Saneyoshi, T., Kume, S., Amasaki, Y. &

Mikoshiha, K. · The Wnt/Calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. · Nature · (2002) · 417 · 295-299

b) Nagai, T., Ibata, K., Park, ES., Kubota, M., Mikoshiha, K. & Miyawaki, A. · A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. · Nat. Biotechnol. · (2002) · 20 · 87-90

c) Bosanac, I., Alattia, J. R., Mal, T. K., Chan, J., Talarico, S., Tong, F. K., Tong, K. I., Yoshikawa, F., Furuichi, T., Iwai, M., Michikawa, T., Mikoshiha, K. & Ikura, M. · Structure of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor binding core in complex with IP₃. · Nature · (2002) · 420 · 696-700

d) Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiha, K. & Takenawa, T. · Sustained Activation of N-WASP through Phosphorylation Is Essential for Neurite Extension · Developmental Cell · (2002) · 3 · 645-658

H.知的財産権の出現・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案特許

なし。

未分化細胞からの器官形成の制御機構について
分担研究者 浅島 誠 東京大学大学院総合文化研究科 教授

研究要旨

胚発生の胞胚期のアニマルキャップ（未分化細胞塊）にアクチビン処理細胞と未処理細胞を混合することによって、新しく血管系をつくることに成功した。このことによって、VEGF など既知の因子の他に血管形成に関与する新規の遺伝子などもみついている。また一方、未分化細胞から軟骨をつくることも成功した。特に顎骨をつくることができたため、長期培養によってアミロゲニンなどを発現することができたので、歯形成も一部できることを示した。また、マウスの ES 細胞を用いて、新しいモルフォジェンによって、高率にかつ多数の心筋細胞分化が可能となった。このとき、Nkx-2.5 や心筋特異的な C-ミオシンなどの遺伝子の発現やタンパク質も存在していることを明らかにした。また、このような未分化細胞の各臓器形成に関すると思われる TGF- β 系と Wnt 系のシグナル伝達系に関して、新規の遺伝子である ELL 遺伝子と 29B 遺伝子をクローニングし、その働きを明らかにした。

A. 研究目的

脊椎動物の未分化細胞から様々な臓器をつくることは、いろいろな病気治療にも非常に重要なことである。また分化がどのようにしておこるのかについてシグナル伝達機構を明らかにすることは分化メカニズムの上からも大切である。

B. 研究方法

両生類胚のアニマルキャップ (St. 9) は未分化細胞の塊であり、そこから試験管内で様々な臓器や組織をつくり出すことを私達は独自に開発してきた。その中で、今回はアクチビン処理細胞と未処理細胞を混合することによって新規に血管系のみをつくることに成功した。また TGF- β 系のシグナル伝達と Wnt 系のシグナル伝達は細胞分化や器官形成に重要であるので、それらのシグナル分子を two hybrid 法や expression cloning 法などを用いることによって単離することに成功した。

C. 研究結果

両生類胚の未分化細胞であるアニマルキャップを切り出して、アクチビン処理細胞と未処理細胞

を混合することによって、そこから新しく血管系と血球をつくり出すことに成功した。これらは血管系の特異的抗体や遺伝子発現を示していた。

また、マウスの ES 細胞を用いて、RA (レチノイン酸) のアンタゴニストを用いて拍動する心臓や骨格筋をつくることにも成功した。この時、非常に高い効率で分化誘導された。そして、又、心筋特異的抗体でも染色が可能であることが明らかとなった。

もう一つの細胞内情報伝達系としての Wnt 系では、新規の ELL 遺伝子と 29B 遺伝子のクローニングと解析がなされた。これらは Axam と結合しており、ELL 遺伝子は正の制御を、29B 遺伝子は負の制御をしていることを示した。

D. 考察

未分化細胞において、アクチビンと VEGF を用いて血管系のみをつくることができたことは、今後、血管形成のしくみを調べる上で非常に重要な系を開発したといえる。このことは、血管分化においてもカエルの血管分化はヒトでもマウスでも同じシステムで動いていることを示したものでいえよう。

細胞内情報伝達系についてはいろいろなものが知られているが、Wnt 系において、新規の ELL 遺伝子と 29B 遺伝子のクローニングと解析がなされた。それによって、Wnt 系の重要な位置を占める Axam の働きの制御機構を、より明らかにすることができた。

Axam と ELL 遺伝子と 29B 遺伝子、そこに介在する遺伝子のクローニングと解析がなされた意義は大きいといえる。

E. 結論

①今回、未分化細胞のアニマルキャップから初めて血管、しかも血管と血球を別々につくることに成功した。

この時、血管系形成にアクチビンと VEGF が重要であるが、この系を更に発展させればヒトの血管形成にも大きな知見を与えるものと思われる。

②Wnt 系において、Axam 遺伝子と関連する新規の ELL 遺伝子と 29B 遺伝子のクローニングと解析がなされ、Axam の働きを正と負に別々に制御していることが明らかになった。

③マウスの ES 細胞を用いて、レチノイン酸のアンタゴニストを用いて高率に心臓をつくることに成功したことは、今後の発展に寄与する。

F. 健康危険情報

今のところ、カエル胚の未分化細胞（アニマルキャップ）を用いているので、計画、方法、倫理面についても特に問題はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuroda, H., Inui, M., Sugimoto, K., Hataya, T. and Asashima, M.

Axial protocadherin is a mediator of prenotochord cell sorting in *Xenopus*
Developmental Biology, 244, 267-277, 2002

2. Onuma, Y., Takahashi, S., Asashima, M., Kurata, S. and Walter J. Gehring.

Conservation of Pax 6 function and upstream activation by *Notch* signaling in eye development of frogs and flies
PNAS, 99(4), 2020-2025, 2002

3. Kadoya, T., Yamamoto, H., Suzuki, T., Yukita, A., Fukui, A., Michiue, T., Asahara, T., Tanaka, K., Asashima, M. and Kikuchi, A.

Desumoylation activity of Axam, a novel Axin-binding protein, is involved in downregulation of β -catenin
Molecular and Cellular Biology, 22(11), 3803-3819, 2002

4. Emura, T., Asashima, M., Furue, M. and Hasizume, K.

Experimental split cord malformations
Pediatr. Neurosurg. 36, 229-235, 2002

5. Osafune, K., Nishinakamura, R., Komazaki, S. and Asashima, M.

In vitro induction of the pronephric duct in *Xenopus* explants
Develop. Growth Differ. 44, 161-167, 2002

6. Onuma, Y., Takahashi, S., Yokota, C. and Asashima, M.

Multiple *nodal*-related genes act coordinately in *Xenopus* embryogenesis
Developmental Biology, 241, 94-105, 2002

7. Kobayashi, M., Kishida, S., Fukui, A., Michiue, T., Miyamoto, Y., Okamoto, T., Yoneda, Y., Asashima, M. and Kikuchi, A.

Nuclear localization of Duplin, a β -catenin-binding protein, is essential for its inhibitory activity on the Wnt signaling pathway
J. Biol. Chem., 277(8), 5816-5822, 2002

8. Kakeda, M., Kyuno, J., Kato, T., Nishikawa, M. and Asashima, M.
Role of the thrombopoietin (TPO)/Mpl system: c-Mpl-like molecule/TPO signaling enhances early hematopoiesis in *Xenopus laevis*
Develop. Growth Differ., 44, 63-75, 2002
9. Sedohara, A., Fukui, A., Michiue, T. and Asashima, M.
Role of BMP-4 in the inducing ability of the head organizer in *Xenopus laevis*
Zool. Sci., 19, 67-80, 2002
10. Wada, M., Miyazawa, H., Wang, R., Mizuno, T., Sato, A., Asashima, M. and Hanaoka, F.
The second largest subunit of mouse DNA polymerase ϵ , DPE2, interacts with SASP18 and recruits the Sin3 co-repressor protein to DNA
J. Biochem., 131, 307-311, 2002
11. Hayata, T., Tanegashima, K., Takahashi, S., Sogame, A. and Asashima, M.
Overexpression of the secreted factor Mig30 expressed in the Spemann organizer impairs morphogenetic movements during *Xenopus* gastrulation
Mechanisms of Development, 112, 37-51, 2002
12. Koyano, S., Fukui, A., Uchida, S., Yamada, K., Asashima, M., and Sakuragawa, N.
Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells.
Develop. Growth Differ., 44(2), 103-112, 2002
13. Satow, R., Chan, T. and Asashima M.
Molecular cloning and characterization of dullard: a novel gene required for neural development
B. B. R. C., 295, 85-91, 2002
14. Uehara, M., Haramoto, Y., Sekizaki, H., Takahashi, H. and Asashima, M.
Chromosome mapping of *Xenopus tropicalis* using the G- and Ag-bands: Tandem duplication and polyploidization of larvae heads
Develop. Growth Differ., 44, 427-436, 2002
15. Furue, M., Myoishi, Y., Fukui, Y., Arizumi, T., Okamoto, T. and Asashima, M.
Activin A induces craniofacial cartilage from undifferentiated *Xenopus* ectoderm in vitro
PNAS, 99(24), 15474-15479, 2002
16. Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M. and Nishinakamura, R.
Zinc finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development
Molecular and Cellular Biology, 23(1), 62-69, 2003

H.知的財産権の出現・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案特許
なし。