

平成15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

目 次

<p>★試行NO 20030895A</p>	<p>課題番号 KH21009 KH21010 KH21011 KH21012 KH21013 KH21014 KH21015 KH21016 KH21017 KH21018 KH21019 KH21020 KH21021 KH21022 KH21024 KH21025 KH21026 KH21027 KH22071 KH22072 KH22073 KH22082</p>	<p>リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用 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 細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発 抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構 ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究 難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用 動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発 天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究 肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発 ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究 神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬 レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用 感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発 自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発 動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用 新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用 マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析 細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明 ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発 サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発 T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立 変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析</p>	<p>西島正弘 …… 1 芝崎 太 …… 6 松田道行 …… 19 新井洋由 …… 25 葛西正孝 …… 33 井上和秀 …… 39 望月直樹 …… 47 上原至雅 …… 51 江崎 治 …… 55 絵野沢 伸 …… 59 田平 武 …… 62 若宮伸隆 …… 67 鈴木和男 …… 74 川 茂幸 …… 84 北川隆之 …… 89 山越 智 …… 95 辻本豪三 …… 104 桃井 隆 …… 111 鈴木康夫 …… 118 吉村昭彦 …… 121 宮武昌一郎 …… 125 目加田英輔 …… 133</p>
----------------------------	---	--	---

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

(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
国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部
筑波大学臨床医学系・神経内科
中外製薬株式会社・富士御殿場研究所
株式会社 GenoFunction
有限会社・ネクストワン

米川博通
水口裕之
吉澤利弘
宮内達雄
鈴木要介
坂田和彦

3年目の研究では、低酸素反応性因子HIFの結合因子の解析を詳細に行った結果、エネルギーセンサーに結びつく多くの成果を得られた。また、脊髄小脳変性症であるMJD(Machado-Joseph Disease)におけるシャペロンの重要性や、HIFがパーキンソン病、さらには虚血性脳障害の病態形成に重要な役割を担っていることが判明し、虚血性脳障害の新規薬剤の発見につながるとともに、効率的な遺伝子治療用ベクターの開発を行った。

A. 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生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。本研究はもとに、創薬、遺伝子治療を目指し、基礎研究から臨床応用に還元することを目指している。

B. 研究方法

B-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。従来とおりの方法に

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、ほぼモデルが確立したため、各種遺伝子改変マウスを用いて該当遺伝子が虚血性脳障害にどのように作用するかを検討している。

海馬領域の細胞内カルシウムの変化を観察するために、正常ラットから海馬スライスを作製し、CsAなどの薬剤の有無、および蛍光試薬としてFra-2、Rod-2を用いて、細胞内やミトコンドリア内のカルシウム変化を、虚血バッファ（無酸素+無グルコース）処理後、37℃の条件下で、カルシウムの変化を経時的に観察した。

虚血性細胞死に関わる因子の網羅的な解析を行うため、DNAチップを用いた解析を行った。ラットの虚血後、1、6、12、24、48時間ごとにCsA投与群、非投与群からCA1の神経細胞のmRNAを抽出した。DNAチップはAgilent 60-mer Oligo chipを用いて、コントロールとの比が2以上の値を有意としてその後の解析に用いた。

B-2. 低酸素反応性因子の解析

低酸素反応性因子HIF (Hypoxia responsive 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あわせて行った。

B-3. パーキンソン病および脊髄小脳変性症(MJD)における低酸素反応性遺伝子の解析

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

ーゼであることが判明した。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性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。

また、脊髄小脳変性症の3型であるMJD (Machado-Joseph Disease)の原因遺伝子Ataxin-3は吉澤等によって細胞内の凝集体形成や核内移行による転写因子の活性化などの機序が、病態形成に重であることが判明している。このような機序を解明するため、本年度はAtaxin-3に結合する因子を同定するため、Yeast Two-Hybrid法を用いて解析を行った。

B-4. アデノウイルスベクターの開発

B-4-1. 各種アデノウイルスベクターの作製

アデノウイルスゲノムのファイバーノブのHIループをコードした領域に、RGD (CDCRGDCFC) 配列に相当する合成オリゴDNAを挿入したベクタープラスミドpAd1M15-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カセットをI-CeuIとPI-SceI部位を利用してin vitroライゲーション法でE1欠損領域に挿入した。生じたプラスミドpAd1M15-RGD-L2をPacIで切断し、293細胞にトランスフェクションすることで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。同様に、RGDペプチドの代わりにNGR (Asn-Gly-Arg) ペプチドを挿入したルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター、AdNGR-L2を作製した。また、ファイバーノブのC末端領域にポリリジン (Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys; K7) ペプチドに相当する合成オリゴDNAを挿入したベクタープラスミドpAd1M41-K7を作製し、これを用いてK7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、AdK7-L2を得た。さらに、ファイバー領域を35型アデノウイルス由来のものに置換したベクタープラスミドpAd1M34を作製し、これを用いて35型アデノウイルス由来のファイバーを有したルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター、AdF35-L2を得た。ベクタープラスミドpAd1M4を用いて、従来型のルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターAd-L2を作製した。なお、以上のベクターにおいては、ルシフェラーゼを発現させるプロモーターとしてCMVプロ

モーターを用いた。

様々な転写活性化因子を搭載したルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターは、ベクタープラスミドのpAd1M4 (野生型のファイバータンパク質を発現) を用いて、in vitro ライゲーション法で作製した。プロモーターとしてはCMV プロモーター、CA プロモーター (β アクチンプロモーター/CMV エンハンサー/ β アクチンイントロン) を、イントロンとしてイントロンA (サイトメガロウイルス由来) と β アクチンイントロンを、P(A)配列として bovine growth hormone (BGH) P(A)を用いた。また、各プロモーター配列を有したベクターについて、WPRE 配列をルシフェラーゼ遺伝子と P(A)配列の間に挿入したアデノウイルスベクターを作製した。

各アデノウイルスベクターは293細胞に3次感染までさせることにより大量調製した。アデノウイルスベクターは塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し(2回)、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl₂、10 % glycerol からなる溶液で透析した。アデノウイルスベクターの物理化学的タイターはOD260法で、生物学的 (PFU: Plaque Forming Unit) タイターはEnd-point dilution法で測定した。

B-4-2. 細胞

マウスマイクログリア細胞株MG5細胞は、P53ノックアウトマウスから調製したもので、アストロサイトのならし培地で培養した。SK HEP-1細胞、HeLa細胞はDMEM(10% FCS)で培養した。

B-4-3. 培養細胞への遺伝子導入

アデノウイルスベクターによる培養細胞への遺伝子導入は、ベクターを各細胞と1.5時間作用させることで行った。48時間培養後、ルシフェラーゼ活性をluminescent assayで測定した。

B-4-4. マウスへの遺伝子導入

アデノウイルスベクターを用いたマウス (Balb/c, female, 5w) への遺伝子導入は、各種ベクターを1 x 10⁹ PFU 尾静脈から投与することにより行った。2日後、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を回収し、ホモジナイズ後、ルシフェラーゼ活性を測定した。タンパク質定量はウシ血清アルブミンをスタンダードとして、BioRad protein assay kit (BioRad) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各施設の動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施するものであり、倫理審査の承諾を得て行った。ヒト由来の生体試料等を用いた実験は行わなかった。

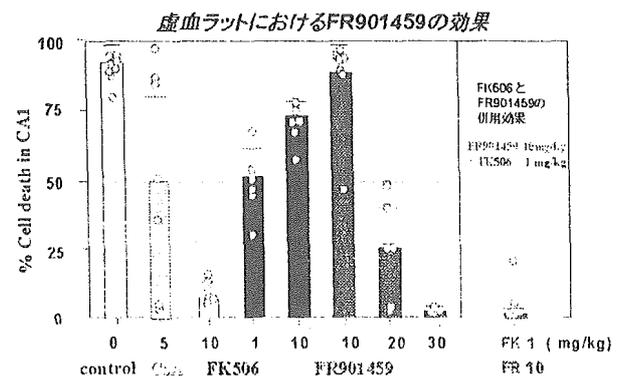
C. 研究成果

C-1. 虚血性神経障害の解析と新規治療法の開発

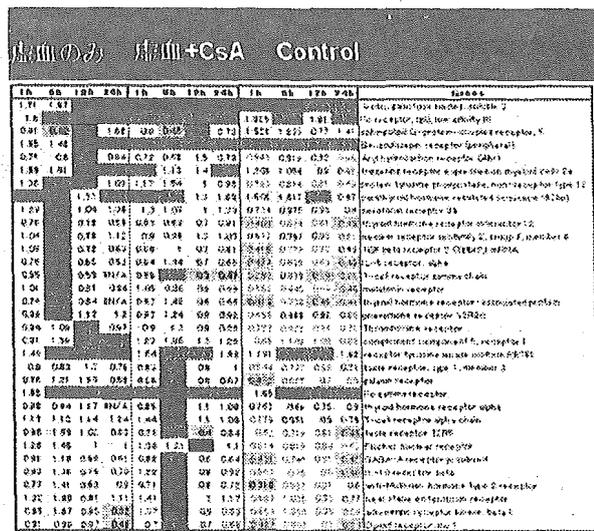
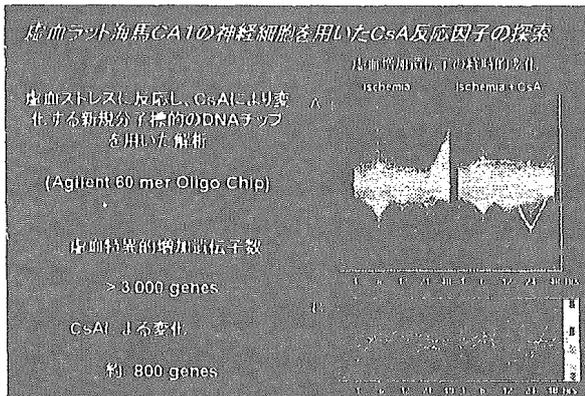
これまでに我々は脳虚血に伴う脳神経障害、特に遅発性神経細胞死のメカニズムの解明を進め、新規脳保護薬 CsJ (FR901459) の開発に成功した。これまでにこの薬剤の効果として、主に in vitro の解析を行い、強い cyclophilin 阻害作用と CsA に比べ 1/5-1/3 の弱い免疫抑制作用しか認められなかった。本年度は、この CsJ を用いて、ラット虚血モデルによる脳保護作用を調べた。CsJ を 10、20、30 mg/kg の濃度で投与すると、10 mg/kg ではほとんど効果が認められなかったが 20、30 mg/kg と増量していくごとに、抗虚血効果が認められ、30 mg/kg ではほとんど100%に近い抗虚血効果が認められた。また、単独ではほとんど効果のない投与量である 10 mg/kg と 1 mg/kg の FK506 を併用すると、100%の効果が認められた。この結果が意味するところは、大変興味深いものであり、以下の結論が導き出せる。

(1) CsJ 10 mg/kg では効果が認められないに関わらず、30 mg/kg にて著名な効果が現れた要因として、虚血直後のカルシニューリンの抑制が大きな効果を示していると考えられた。この結論を指示する結果として、FK506 との併用が著効することからも理解できる。

(2) さらに、FK506 のみの効果 (カルシニューリンの抑制のみ) では十分に虚血性障害が抑制できない点は重要であり、虚血直後のカルシニューリンの抑制に引き続く、cyclophilin の抑制がないと完全な抑制には至らない。即ち、効果の順序として、カルシニューリンの抑制→cyclophilin の抑制が重要であると考えられた。



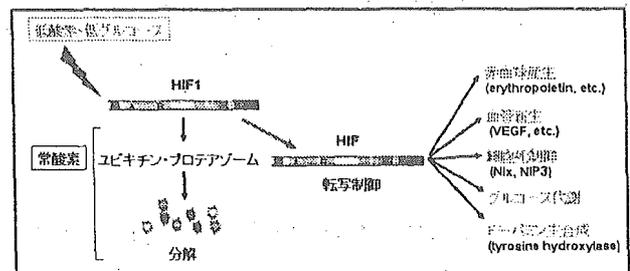
次に、DNAチップを用いた虚血後の変動遺伝子を検索した結果、虚血刺激による有意な変動遺伝子が約3,000個あり、そのうち、CsAに反応性の遺伝子が約800個認められた。特に、虚血6時間後および12時間後にカルシニューリン活性依存的な変化を来す遺伝子群、特に受容体、トランスポーター群が見いだされ、今後RT-PCR等を用いて、これらの遺伝子の発現の有意性を確認し、虚血時における意義を解析する予定である。



C-2. 低酸素反応性因子の解析

低酸素状態を理解するために最もよい例にエベレスト登山がある。登山では高度により酸素濃度が低下することが分っている。まず、3,000 m級の富士山の場合には、通常約20%空気中にある酸素が約2/3に減ってしまう。これくらいでは余り大きな変化は起こらない。といっても登山中に軽い高山病症状がでる場合もある。チベットのように5,000 m級の高地に行くと酸素濃度は約半分になり、一般人では高山病が発症する。ただ、長期間のうちに適応し改善してくる。さて、8,000 m級のエベレストの場合には、酸素濃度はさらに減り、地上の約1/3の7-8%の濃度になる。

ここまで下がっては如何に適応した登山家でも4-5時間が限界で、それ以上頂上にいた場合には、肺水腫やそれに伴う循環不全で死に至るといわれている。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、赤血球が増加しただけ少ない体外の酸素を血液の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。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。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。



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 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ている。HIF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。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。

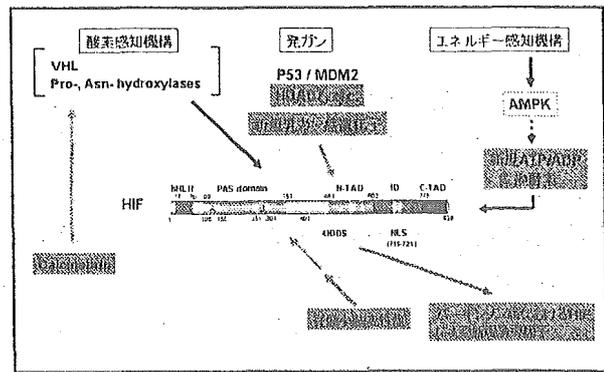
私達は、この低酸素応答機構を明らかにする手係りとして HIF1・結合タンパクの検出、同定、それらを含めた制御機構の解明に着手した。実験は (a) 生理的条件下と同じ結合を検出できるという利点を持つ Yeast Two-Hybrid 法、(b) 生化学的手法を用いた結合蛋白の同定、および (c) 低酸素に反応する蛋白群プロテオーム解析、(d) 遺伝子改変マウスを用いた標的疾患の解析を進めている。

C-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 HIF1 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。

平成13年度(初年度)、平成14年度(2年目)にて HIF1の機能ドメインを Bait とした Yeast Two-Hybrid 法を用いて 1×10^6 ヒト脳由来のライブラリーをスクリーニングし、proline hydroxylase と HDAC7 が α -galactosidase filter assay の結果陽性クローンとして得られた。Proline hydroxylase は HIF1 のプロリン残基を低酸素依存的に水酸化し、この水酸化によりユビキチン系による分解を受けること、また、HEK293 細胞に過剰発現させたところ、Proline hydroxylase は HIF1 α と同様に低酸素下で細胞質から核へ translocation していた。HDAC7 も HIF1 α に結合し転写活性を阻害する特異蛋白であり、HIF1 の核移行の際に核外へ HIF1 を運ぶいわゆる shuttling protein であった。

平成15年度(3年目)は、さらに HIF2 の結合蛋白と同様の Yeast Two Hybrid 法で調べた。その結果、乳ガンの癌化の際に重要な調節因子や、糖代謝や核酸代謝因子など重要な因子が同定でき、現在解析を進めている。



C-3 MJD における異常ポリグルタミンタンパクの安定化作用を持つ薬剤の開発

Neuro2a 細胞において、ectoin は 50 mM から 150 mM の濃度において、細胞内凝集体の形成頻度を減少させることはなかったものの、濃度依存的に細胞死頻度を抑制するした。すなわち ectoin 非投与時の凝集体形成頻度は $66.3 \pm 2.6\%$ に対して、ectoin 50 mM で $75.0 \pm 3.2\%$ 、100 mM で $76.8 \pm 2.0\%$ 、150 mM で $78.6 \pm 0.7\%$ と、ectoin 投与により若干の増加傾向を示した(数字は mean \pm SE)。これに対して細胞死頻度は、ectoin 非投与時 $33.5 \pm 4.1\%$ に対して ectoine 50 mM で $28.7 \pm 1.8\%$ 、100 mM で $20.9 \pm 2.6\%$ 、150 mM で $18.6 \pm 1.7\%$ で、有意の減少を示した(数字は mean \pm SE、ectoin 非投与時と 150 mM 投与時間 で $p=0.0076$)。同様の効果は、培養 BIK 細胞を用いた場合にも 100 mM の濃度で確認された。(凝集体形成頻度: ectoin 非投与時 $54.2 \pm 8.5\%$ vs. 100 mM 投与時 $57.7 \pm 5.1\%$; 細胞死頻度 ectoin 非投与時 $28.8 \pm 4.6\%$ vs. 100 mM 投与時 $23.2 \pm 5.2\%$)。以前に我々が報告したケミカルシャペロン様作用を有する DMSO 等の効果は、凝集体形成と細胞死に対してともに抑制的な作用を有していたが、今回検討した ectoin はそれと異なり、凝集体形成頻度を低下させる事なく細胞死を抑制したことから、作用機序として DMSO などとは異なったメカニズムが関与している可能性がある。本年は上記の ectoin に加えて proline (濃度域 10 - 100 mM)、carnithine (濃度域 10 - 100 mM) の効果もあわせ検討したが、これらに明らかな凝集体形成頻度や細胞死頻度の低下作用は認めなかった。今後、今回明らかとなった ectoin の効果を、異なるアッセイ系でも検討することが必要と考えられる。

C-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

(1) ファイバー改変アデノウイルスベクターによるマイク

ログリア細胞への遺伝子導入

中枢神経系の分化、維持に重要な役割を果たしているマイクログリア細胞 (MG5 細胞) へのアデノウイルスベクターによる遺伝子導入活性について検討した。昨年度は、ファイバー領域にRGD配列を付与したアデノウイルスベクターによる遺伝子導入活性の増強について報告したが、本年度はさらなる遺伝子導入効率の改善を目的に、種々のファイバー改変アデノウイルスベクターで検討を加えた。なお、前年度の研究において、MG5 細胞はアデノウイルス受容体のCARの発現レベルが極めて低く、従来のアデノウイルスベクターでは効率良く遺伝子導入できないことが明らかとなっている。

MG5 細胞を各種アデノウイルスベクター (Ad-L2、AdRGD-L2、AdNGR-L2、AdK7-L2、AdF35-L2) で3000 vector particles (VP)/cellの条件下で1.5時間作用させることで遺伝子導入を行ったところ、従来型アデノウイルスベクターAd-L2に比べ、AdRGD-L2、AdNGR-L2、AdK7-L2ではそれぞれ、3.4、4.6、2.1倍程度ルシフェラーゼ活性の増強が認められた。AdF35-L2は逆に、従来型アデノウイルスベクターよりも低いルシフェラーゼ活性しか示さなかった。従って、MG5 細胞への遺伝子導入には、NGR ペプチドを付与したファイバー改変アデノウイルスベクターが最も適していることが判明した。以上の結果より、NGR 配列をファイバーに有した改変アデノウイルスベクターはマイクログリア細胞への遺伝子導入に極めて優れていることが明らかとなった。

(2) 各種転写活性化因子の系統的評価による発現能に優れたアデノウイルスベクターの開発

遺伝子治療および遺伝子機能解析を目的とした基礎研究の分野においては、様々な種類のプロモーター、エンハンサー、イントロン、P(A)配列が用いられている。本研究では、各種プロモーター、イントロン、エンハンサー等の遺伝子発現能に及ぼす影響について検討した。プロモーター、エンハンサーに関しては、昨年までの研究で高い活性を示すことが判明した CMV プロモーター/エンハンサー (Ad-CMV1、Ad-CMV2) と CA プロモーター (Ad-CAL2) について検討した。CMV プロモーターについてはイントロン A を有していないベクター (Ad-CMV1) と有したベクター (Ad-CMV2) について検討した。さらに、上記ベクターに WPRE 配列を付与したベクターも作製した (Ad-WCMV1、Ad-WCMV2、Ad-WCAL2)。なお、現在日本をはじめ多くの国の遺伝子治療臨床研究で用いられている主なアデノウイ

ルスベクターは、CMV プロモーター/エンハンサーを有した Ad-CMV1 と同等のベクターである。

in vitro (SK HEP-1 細胞、HeLa 細胞) の検討では、イントロン A を付与した CMV プロモーターの Ad-CMV2 はイントロン A がない Ad-CMV1 に比べ、3-11 倍のルシフェラーゼ活性の増強が認められた。CA プロモーターをもった Ad-CAL2 に関しては、in vitro では Ad-CMV1 に比べ、1-8 倍のルシフェラーゼ活性の増強が認められ、HeLa 細胞においては Ad-CMV2 と同等の高いルシフェラーゼ活性を示した。これらの各アデノウイルスベクターに WPRE 配列を付与したところ (Ad-WCMV1、Ad-WCMV2、Ad-WCAL2)、WPRE 配列を付与していないベクターに比べ、さらに活性が数倍程度増強した。結果として最高の発現効率を示した Ad-WCMV2 は Ad-CMV1 に比べ、10-47 倍のルシフェラーゼ活性を示した。

次に in vivo での検討を行った。各アデノウイルスベクターをマウスに尾静脈内投与し、各臓器でのルシフェラーゼ活性を測定した。各種ベクター間での肝臓でのルシフェラーゼ活性は (アデノウイルスベクターはマウスに尾静脈内投与すると、95%以上の活性が肝臓で認められることが判明している)、in vitro の場合と同様の傾向を示したが、各種ベクター間でのルシフェラーゼ活性の差は in vitro の場合と比較して数倍から 10 倍程度大きかった。特にイントロン A を付与したベクターの活性増強が著しく、Ad-CMV2 は Ad-CMV1 に比べて 110 倍、Ad-WCMV2 は Ad-CMV1 に比べて 716 倍のルシフェラーゼ活性を示した。他の臓器 (肺、心臓、脾臓、腎臓) においても、ルシフェラーゼ活性の増強は肝臓で認められた程は高くはないものの、同様の傾向を示した (Ad-WCMV2 が Ad-CMV1 に比べて 50-100 倍のルシフェラーゼ活性の増強が認められた)。

一方、各種のプロモーター、エンハンサー、イントロンをもったアデノウイルスベクターのMG5細胞への遺伝子発現効率に関しても検討を加えた。Ad-CMV1、Ad-CMV2、Ad-CAL2に加え、EF-1 α プロモーターをもったAd-EFL2についても検討した。その結果、標準的なベクターのAd-CMV1と比較し、イントロンAを付与したAd-CMV2では8.2倍、CAプロモーターをもったAd-CAL2では28.5倍ルシフェラーゼ発現が増強した。Ad-EFL2では3.4倍のルシフェラーゼ発現の増強が認められた。従って、Ad-CAL2がMG5細胞への遺伝子導入・発現においては最適であることが判明した。

D. 考案

D-1. 神経細胞死と低酸素反応因子との関連

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）とも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、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あるが、マウスや手技での差をなくすためには、虚血後の脳血流量をドップラー装置にて確認することが、非常に大きな成功の要因であることが判明した。今後各種の 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。

これまでの虚血性神経細胞死の研究で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 CsJ (FR901459)を開発してきた。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、今回ラットを用いた虚血性脳障害でも著効を示した。その作用機序より、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、今後臨床応用に向けた本格的な開発を行う予定である。

CsJの適応疾患	
弱い免疫抑制作用と強いインテグラーゼ阻害作用による組織保護作用	
(1) 虚血性疾患: 脳梗塞、脳外傷、脊髄損傷、心筋梗塞、肝硬変 (強いカルシニューリン抑制作用と強いインテグラーゼ阻害作用)	
(2) 神経疾患: パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症など (強いカルシニューリン抑制作用と強いインテグラーゼ阻害作用)	
(3) 免疫疾患: アトピー性皮膚炎など (強いインテグラーゼ阻害作用)	
(4) 感染症: HIV、SARS(?) (強いインテグラーゼ阻害作用)	
(5) その他: 癌細胞増殖抑制等 (強いインテグラーゼ阻害作用)	

一方、低酸素反応性因子 HIF およびその情報伝達系は、これまで特に癌の発症機序やそれに基づく治療の面で注目され研究されてきた。HIF が制御する因子の中には血管

新生だけではなく、ミトコンドリアでのエネルギー代謝酵素、細胞死制御因子なども含まれ、また、虚血性神経疾患などで発現が上昇することが判明するにつれ、神経疾患における役割が注目されてきた。私達の研究から、この低酸素反応性因子およびその情報伝達系が、実は、パーキンソン病や脊髄小脳変性症などの神経変性疾患、虚血性神経疾患において、神経細胞死に重要な役割を演じていることが示唆される結果が次々に証明され、この因子の神経細胞における重要性が確認された。しかしながら、低酸素が神経変性疾患などの神経細胞死に大きな影響を与えているという概念はこれまでになく、この点で独創的な研究として、詳細に解析し報告する必要がある。培養細胞を用いた解析では、詳細な分子レベルでの制御機構が判明しつつあるが、ヒトの疾患との関連を研究するためには、患者さんからのサンプルや遺伝子の改変されたマウスの作製が必須となってくる。このため、特に遺伝子改変マウスの作製を今後の大きな計画として考えている。また、HIF を介する情報伝達系や分子間の制御機構の情報をもとに、創薬や遺伝子治療を目指した標的探索を同時に行う予定である。

D-2. MJD におけるシャペロンの役割と創薬

神経変性疾患における神経細胞機能障害・細胞死には低酸素条件や酸化ストレス、エネルギー代謝の変化などが密接に関係している可能性が種々の系から示唆されている。我々の解析している MJD においてもその原因遺伝子産物である ataxin-3 がこれらの制御に関わっている可能性が考慮されるため、昨年より酵母の two-hybrid 系を用いて ataxin-3 の N 末側と物理的に結合するタンパクを網羅的に解析する試みを開始した。これまでに 2 回のスクリーニングを終了し、ataxin-3 の N 末側のみならず、全長とも強い陽性の association を示す複数のクローンを単離し、そのシーケンスを解析した。その結果、ある種のアミノ酸代謝に関わる酵素の遺伝子を単離することができた。一連の deletion construct を用いた解析では、この酵素タンパクの N 末側と ataxin-3 の N 末側が association すると考えられ、現在 in vivo での関わりに関して検討を行っている。

D-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

遺伝子治療の成功は、安全で効率の良いベクターの開発にかかっている。アデノウイルスベクターは感染域が広く、現存している遺伝子治療用ベクターの中では最も遺伝

子導入効率の優れたベクターであることから、遺伝子治療のみならず基礎研究の分野においても広く用いられている。しかしながら、遺伝子治療の重要なターゲットである細胞・組織の一部において、CARの発現が乏しく、本ベクターが十分な機能を発揮できない場合が知られている。例えば、造血幹細胞をはじめとする血液細胞、樹状細胞、気道上皮細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、骨格筋細胞、一部の癌細胞、多くのマウス由来株化細胞などはCARの発現が乏しく、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率は低い。マイクログリア細胞に対するアデノウイルスベクターでの遺伝子導入効率も低く、CARの発現レベルが乏しいことが知られている。そこで本研究では、ファイバー領域を改変した次世代アデノウイルスベクターを用いて、マイクログリア細胞への遺伝子導入効率の改善を試みた。同時に、遺伝子発現に関わる各種転写活性化因子（プロモーター、エンハンサー、イントロン等）を最適化することで、遺伝子発現の増強を目指したベクター開発を行った。

ファイバー遺伝子はウイルス後期遺伝子のL5領域に位置し、その構造はテール、シャフト、ノブの領域に分けられる。CARと結合するのはC末端のノブ領域である。本研究で用いたファイバー改変アデノウイルスベクターは、ファイバー領域の外來ペプチドの挿入部位として適したノブのHIループやC末端領域にRGDペプチドや、NGRペプチド、ポリリジンペプチドを遺伝子工学的に付与させることで（RGDペプチドとNGRペプチドはHIループに、K7ペプチドはC末端領域に付与）、多くの細胞で発現している α Vインテグリンや、CD13（アミノペプチターゼN）、ヘパラン硫酸（それぞれ）を認識して感染できる。また、35型アデノウイルス由来のファイバーを付与したベクターはCD46を認識して感染できる（従来型アデノウイルスベクターは5型アデノウイルスを基盤としている）。なお、NGRペプチド自体はCD13を認識することが知られているが、NGRペプチドをアデノウイルスベクターに付与させた改変ベクターがCD13を認識して感染するかどうかは不明である。これらのルシフェラーゼを発現するファイバー改変アデノウイルスベクターを作製し、マイクログリア細胞株のMG5細胞への遺伝子導入効率を検討したところ、NGR配列を付与したベクターが最も優れていた。

本研究では、マイクログリア細胞への遺伝子導入に適したアデノウイルスベクターの開発を、ベクターの外側（ファイバータンパク質）と内側（ウイルスゲノム）の両面から検討し、ファイバータンパク質としてはNGRペプチドを付与したファイバーが、遺伝子発現に必要な転写活性化因

子としては β アクチンプロモーター/CMVエンハンサー/ β アクチンイントロンからなるCAプロモーターが最適であることを明らかにした。これらの性質を合わせたアデノウイルスベクターでは、最も標準的な従来型のファイバーを有し、CMVプロモーター/CMVエンハンサーからなるアデノウイルスベクターに比べ、100倍以上の遺伝子導入・発現効率が期待できることから、非常に有効なベクターになると考えられる。CAプロモーターには β アクチンイントロンが付与されていること、CMVプロモーター/CMVエンハンサーにイントロンAを付与することにより活性が増強したことを考えあわせると、アデノウイルスベクターにおける目的遺伝子の発現にイントロンを付与するアプローチは極めて有効と考えられる。イントロンはmRNAの核外輸送の促進や翻訳促進、mRNAの安定化作用を有していることが知られており、これらの作用により遺伝子発現の増強に至ったと考えられる。また、SKHEP-1細胞やHeLa細胞、マウス *in vivo* の検討では、転写後修飾の因子としてmRNAのP(A)化の修飾、mRNAの核外輸送や翻訳の促進作用を有している Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulation element (WPRE) を目的遺伝子とBGH P(A)の間に挿入することで更なる遺伝子発現効率の上昇が認められ、高効率遺伝子発現を得るための有効な戦略であることが明らかとなった。

標的細胞への親和性を高めたアデノウイルスベクターは、遺伝子導入効率を改善して有効性を上昇させるだけでなく、*in vivo* に適用した場合には、標的細胞から漏れ出たベクターが他組織に移行することによっておこる副作用も軽減することが期待できることから、安全性の向上にも寄与できる。また、標的細胞親和性を変更したアデノウイルスベクターは、従来のアデノウイルスベクターでは遺伝子導入出来なかった細胞種へも効率良く遺伝子導入することが可能になることから、遺伝子治療のみならず、外來遺伝子（RNA干渉による遺伝子発現抑制も含む）の導入による遺伝子機能解析研究には極めて重要な基盤技術となる。

以上、神経細胞への遺伝子導入に適したアデノウイルスベクターを開発し、その有用性を明らかにした。

E. まとめ

本研究3年目の研究成果として以下のことがあげられる。

1. 新規脳卒中治療薬としてCsJ (H901459)が発見され、CsAよりも副作用が少なく、今後有望な治療薬として

臨床開発を進める。

2. 低酸素反応性因子 HIF は虚血性傷害を含めた神経変性疾患の病因因子として重要な役割を演じていることが初めて明らかとなった。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 (MJD) に関しての本研究により、DMSO、ectoin のようなタンパクのコンフォ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。また、Yeast Two Hybrid 法にて MJD の原因遺伝子 Ataxin-3 に直接結合する数個の重要な因子の同定に成功した。今後はこれらの因子の解析を行うことによりさらなる病態の解明を行う予定である。
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。

F. 研究発表

1. 論文発表

芝崎発表分

1. Siesjö, B.K., Uchino, H., and Shibasaki, F.: Post-treatment in transient global and focal ischemia: New pharmacological avenues. **Pharmacology of Cerebral Ischemia** (Medpharm Scientific Publisher Stuttgart), 2004 in press.
2. Uchino, BK Siesjö, and F. Shibasaki Calcineurin and immunophilin are pivotal target for delayed neuronal cell death on the forebrain ischemia in the rat. **Acta Neurochirurgica Supplement Springer Verlag Wien New York** 2004(in press)

3. Tomida T, Hirose K, Takizawa A, Shibasaki F, Iino M.: NFAT functions as a working memory of Ca^{2+} signals in decoding Ca^{2+} oscillation. **EMBO. J.** 22, 3825-32, 2003.
4. Sharat, S. and Shibasaki, F.: Application of eTag protein detection system to cancer diagnosis. **Lung Cancer Today**. 2004 in press
5. 内野博之、芝崎 太、石井脩夫:「脳を守るための戦略」虚血性神経細胞死の分子機序と薬物療法による脳保護の可能性について **Lisa 1** 2004 in press
6. 芝崎 太:「日本の TRC の現状と展望」 **Medichem News** 2004 in press
7. 芝崎 太、内田和代;「新規同時他項目アッセイシステム eTag の応用」バイオベンチャー、羊土社 2004 in press
8. 芝崎 太、内野博之:特集「病態とアポトーシス」虚血による神経細胞死とカルシウム・カルシニューリン. **Biotherapy** 2004 in press
9. 内野博之、芝崎 太、石井脩夫:虚血性神経細胞死におけるカルシニューリンの役割 6月号 臨床検査 (医学書院), 12-18, 2003
10. 芝崎 太: 低酸素による遺伝子調節. 癌治療と宿主 15, 223-231, 2003.
11. Shibasaki, F., Hallin, U., and Uchino, H.; (Review Article) Calcineurin as a multifunctional regulator. **J. Biochem.** 131, 1-15, 2002.
12. Siesjö, BK, Uchino, H., and Shibasaki, F.; (Review Article) Post-treatment in transient global and focal ischemia: new pharmacological avenues. **Pharmacology of Cerebral Ischemia** 2003 (in press).

吉澤発表分

1. Yoshizawa T, Watanabe M, Furusho K, Shoji S. Pontine basis demonstrates the distinct process of atrophy from the pontine tegmentum in Machado-Joseph disease. **J Neurol Sci** 215, 45-50, 2003.
2. Yoshizawa T, Nakamagoe K, Ueno T, Furusho K, Shoji S. Early vestibular dysfunction in Machado-Joseph disease detected by caloric test. **J Neurol Sci** (in press).

米川発表分

1. Sato, E., Hirahara, K., Wada, Y., Yoshitomi, T., Azuma, T., Matsuoka, K., Kubo, S., Yonekawa, H., Taya, C., Karasuyama, H., Shiraishi, A.: Chronic inflammation of the skin can be induced in IgE transgenic mice by means of a single challenge of multivalent antigen. **J Allergy Clin Immunol.** 11:143-148, 2003.
2. Kubo, S., Nakayama, T., Matsuoka, K., Yonekawa, H., Karasuyama, H.: Long term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE. **J. Immunol.** 170:775-780, 2003
3. Sikkawa, Y., Takada, T., Sutopo, Nomura, K., Namikawa, T., Yonekawa, H., Amano, T.: Phylogenies using mtDNA and SRY provide evidence for male-mediated introgression in Asian domestic cattle. **Anim. Genet.**, 34:96-101, 2003.
4. Kikkawa, Y., Shitara, H., Wakana, S., Kohara, Y., Takada, T., Okamoto, M., Kamiya, K., Yoshikawa, Y., Tokano, H., Kitamura, K., Shimizu, K., Wakabayashi, Y., Shiroishi, T.,

- Kominami, R., Yonekawa, H.: Mutations in a new scaffold protein Sans cause deafness in Jackson shaker mice. *Hum. Mol. Genet.*, 12: 453-461, 2003.
5. Saku, KiW, Tsuchiya, K., Harada, M., Kano, M., Yoshiyuki, M., Yonekawa, H.: Molecular phylogeny of Japanese Rhinolophidae based on variations in the complete sequence of the mitochondrial cytochrome b gene. *Genes Genetic Systems*, 78: 179-189, 2003
 6. Sakai, T., Mihara, M., Yonekawa, H., Hosoya, K., Miyazaki, J.: Phylogenetic relationships and intraspecific variations of loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, cypriniformes). *Zool. Sci.*, 20: 501-514, 2003
 7. Nakano, H., Yonekawa, H., Shinohara, K.: Delayed expression of apoptosis in X-irradiated human leukemic MOLT-4 cells transfected with mutant p53. *J. Radiat. Res.*, 44: 179-183, 2003.
 8. Ono, T., Sekino-Suzuki, N., Kikkawa, Y., Kawashima, S.: alivin 1: a novel neuronal activity-dependent gene inhibits apoptosis and promotes survival of cerebellar granule neurons. *J. Neuroscience*, 23: 5887-96, 2003.
 9. Kikkawa, Y., Oyama, A., Ishii, R., Miura I., Amano, T., Ishii, Y., Yoshikawa, Y., Masuya, H., Wakana, S., Shiroishi, Taya, C., Yonekawa, H.: A small deletion hotspot in the type II keratin gene mK6irs1/Krt2-6g on mouse chromosome 15, a candidate for causing the wavy hair of the Caracul (Ca) mutation. *Genetics* 165:721-733, 2003.
 10. Kato, T., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Taya, C., Yonekawa, H., Ohue, C., Yagi, S., Seki, E., Hirano, T., Fujimoto, J., Shirai, T., Wakita, T.: Repeated hepatocyte injury promotes hepatic tumorigenesis in hepatitis C virus transgenic mice. *Cancer Sci.* 94: 679-85, 2003.
 11. Ohno, T., Katoh, J., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Nishimura, M.: Improved strain distribution patterns of SMXA recombinant inbred strains by microsatellite markers. *Exp Anim.*, 52: 415-417, 2003.
 12. Yanagida, A., Ohka, S., Hashida, N., Okamura, M., h., Kamoshita, N., Iwasaki, K., Sasaki, Yonekawa, H., Nomoto, A.: Tissue-specific replicating capacity of a chimeric poliovirus carries the internal ribosome entry site of hepatitis C virus in a new mouse model transgenic for the human poliovirus receptor. *J. Virol.*, 77: 10479-10487, 2003.
 13. Sakai, T., Miura, I., Yamada-Ishibashi, S., Wakita, Y., Kohara, Y., Yamazaki, Y., Inoue, T., Kominami, R., Moriwaki, K., Shiroishi, Yonekawa, H., Kikkawa, Y.: Update of Mouse Microsatellite of Japan (MMDBJ). *Exp. Anim.*, in press
 14. Shitara, H., SAW., Hayashi, J.-I., Mizushima, N., Yonekawa, H., Taya, C.: Simple method of zygosity identification in transgenic mice by real-time quantitative PCR. *Transgenic Research*, in press.

水口発表分

1. Xu Z.L., Mizuguchi, H., Mayumi T., Hayakawa T. Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulation element enhances transgene expression from adenovirus vectors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1621, 266-271 (2003)
 2. 水口裕之・早川堯夫; アデノウイルスベクター; *Mebio*, 21(4), 8-16 (2004)
 3. 水口裕之・早川堯夫; 遺伝子機能解析のための遺伝子導入ベクター -ウイルスベクターを中心として-; 蛋白質核酸酵素, 48, 1653-1662 (2003)
 4. 水口裕之: 次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究; 薬学雑誌, 123, 761-771 (2003)
 5. 水口裕之・早川堯夫; アデノウイルスベクター: 最近の進歩; 分子細胞治療, 2, 200-207 (2003)
- #### 2. 学会発表
1. 芝崎 太: Biostress signaling: Cell death and surviving pathway. Special lecture, Aclara Bioscience, 2003, 4, 23, Palo Alto, California
 2. 内野博之: パネルディスカッション「脳を守るための戦略」日本麻酔科学会第50回大会2003, 5, 29-6, 1 横浜.
 3. 芝崎 太: バイオストレスシグナル (I): 虚血性疾患の機序と創薬。東京大学薬学部大学院特別講義, 2003, 6, 20 東京
 4. 芝崎 太: バイオストレスシグナル (II): 転写因子を介した免疫応答の機序と創薬への応用 東京大学薬学部大学院特別講義, 2003, 6, 27 東京
 5. 加藤裕之、加藤しおり、芝崎 太: ヒストンジアセチラーゼ7 (HDAC7) は低酸素反応性因子 HIF-1 α に結合し転写を制御する。臨床研ポスター発表会 2003, 9, 18 東京
 6. 芝崎 太、陳リー、加藤しおり、内田和代、大島千絵理、坂田和彦、加藤裕之、内野博之: HIF の新たな制御因子による癌化および細胞死の制御。2003, 10, 18, 京都
 7. Yuichiro Ishikawa, Hiroyuki Uchino and Futoshi Shibasaki: Differential target analysis of neuroprotection by CsA in ischemic brain damage using 60 mer cDNA oligo Microarray. AIMBN Conference, 2003, 11, 12, 東京
 8. 芝崎 太、内野博之、内田和代、坂田和彦: 脳梗塞の発症機序解明と新規脳梗塞治療薬の開発; CsJ: Dual Inhibition of Calcineurin and CyPD. 平成15年度研究フォーラム 2003, 12, 8, 東京
 9. 加藤裕之、加藤(玉水)しおり、芝崎太: Histone-deacetylase 7 (HDAC7) binds HIF-1 α 第76回日本生化学会、2003.10.18、横浜
 10. 加藤(玉水)しおり、加藤裕之、芝崎太: Calcineurin stabilizes hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) by inhibition of von Hippel Lindau tumor suppressor protein (pVHL) 第76回日本生化学会大会、2003.10.18、横浜
 11. 井上正明、小原恭子、芝崎 太、須藤正幸、与柴 真、小原道法: シクロスポリン A による C 型可燃ウイルス遺伝子複製阻害機序の解析。第26回日本分子生物学会年会、2003.12.10、神戸
 12. 加藤裕之、加藤(玉水)しおり、星野真人、芝崎 太: ヒストンジアセチラーゼ7 (HDAC7) は低酸素反応性因子 HIF-1 α に結合し転写を制御する 第26回日本分子生物学会年会、2003.12.10、神戸
 13. 設楽浩志: マウス初期胚を用いたミトコンドリア DNA の遺伝子様式・機構に関する分子遺伝学的解析 第50回日本実験動物学会総会奨励賞受賞講演、2002.5.29-31.

- さいたま市。
14. 石井里絵、吉川欣亮、大山亜由美等:タイプIIIケラチン遺伝子におけるマウス欠失ホットスポット:毛突然変異 caracul のポジショナルクローニング.第50回日本実験動物学会総会.2003.5.29-31.さいたま市.
 15. 三浦郁生、坂井隆浩、脇田弥生等:日本産野生マウス (*Mus musculus molossinus*)由来近交系の遺伝子多型データベースの構築.第50回日本実験動物学会総会.2003.5.29-31.さいたま市.
 16. 坂井隆浩、三浦郁生、脇田弥生等:マイクロサテライト DNA 多型に基づく実験用マウスの起源.第50回日本実験動物学会総会.2003.5.29-31.さいたま市.
 17. 前小原夕紀、松岡邦枝ら:NC マウスに自然発症するヒトアトピー様皮膚炎の多因子連鎖解析.第50回日本実験動物学会総会.2003.5.29-31.さいたま市.
 18. 前田幸子、吉川欣亮ら:自然発症白内障マウス(RCT)の原因遺伝子の解析.第50回日本実験動物学会総会.2003.5.29-31.さいたま市.
 19. 城所知秀、金井克晃、藤澤正彦、的場章悟、九郎丸正道、林良博、金井正美、川上達人、重畳長進、登山壇進:マウス性分化における Syy 遺伝子による量依存的 sox9 遺伝子発現の制御.第36回日本発生生物学会.2003.6.1-13.札幌
 20. 設楽浩志: mtGFP-Tg マウスの開発と応用.哺乳動物遺伝学研究会.2003.6.26-27.埼玉県秩父郡皆野町. (木川博通:学会企画・主催)
 21. Shitara, H., Kaneda, H., Sato, H., Takada, H., Tanioka, K., Iwasaki, K., Hayashi, J., Taya, C., Yonekawa, H.: Visual Tool For Transmission Genetics of Mitochondria: mtGFP-Tg Mice. XIX International Congress of Genetics. 2003.7.6-11. Melbourne, Australia.
 22. Kikkawa, Y., Shitara, H., Wakana, S., Kohara, Y., Takada, T., Okamoto M., Taya, C., Yoshikawa, Y., Kitamura, K., Wakabayashi, Y., Shiroishi, T., Kominami, Yonekawa, H.: Sans: A Causative Protein for Deafness in Humans and Mice. XIX International Congress of Genetics. 2003.7.6-11.
 23. 米川博通: ヒト疾患モデル動物の先端医療への応用. 東京都立保健科学大学大学院講義. 2003. 8. 30. 東京
 24. 米川博通: 遺伝子改変マウスの作製と解析. 東京医科歯科大学特別講義. 2003. 9. 6. 東京.
 25. 設楽浩志ら: リアルタイムモニタリング PCR 法によるホモ接合体トランスジェニックマウスの同定法の確立. 日本遺伝学会第75回大会. 2003. 9. 24-26. 仙台.
 26. 岡本恵美子、米川博通: Min マウスの自然発生及び放射線誘発消化管腫瘍発生に関与する遺伝的要因. 日本放射線影響学会第46回大会. 2003. 10.8. 京都.
 27. 今岡達彦ら: $d\beta CMin^+$ マウスにおけるX線誘発乳腺腫瘍の被曝過剰依存性. 日本放射線影響学会第46回大会. 2003. 10. 6-8. 京都.
 28. 中野久子ら: X線誘発アポトーシスにおける細胞内 p53 蛋白の量的解析. 日本放射線影響学会第46回大会. 2003. 10. 6-8. 京都.
 29. Sato, A. et al.: Inter-mitochondrial complementation preventing individuals from respiration deficient by pathogenic mutant mtDNAs. 第76回日本生化学会大会シンポジウム, 2003.10.15-18.横浜. (招待講演)
 30. 小池 智ら: ポリオウイルスの組織特異的病原性発現とインターフェロンの関連. 第51回ウイルス学会学術集会. 2003.10.27-29. 京都.
 31. Ono, T. et al: A novel activity-dependent gene, alivin 1 (alil), inhibits apoptosis and promotes depolarization-dependent survival of cerebellar granule neurons. 第76回日本生化学会大会. 2003.10.15-18.横浜.
 32. 岡本恵美子: Min マウスにおける消化管腫瘍発生と遺伝的背景. 京都大学大学院特別講義. 2003.11.28. 京都.
 33. 米川博通: 動物実験と動物福祉-どう両立させるのか、その社会的合意のために-中立の立場から第17回日本動物実験代替法学会(市民公開フォーラム) 2003.11.8. 相模原市.
 34. Takada, T., Kumanovics, A., Yonekawa, H., Fischer-Lindahl, K.: Baplotype-Specific Class I Gene Content of the H2-D/Q Region of the Mouse Major Histocompatibility Complex (MHC). 17th International Mouse Genome Conference, 2003. 1 1.9-12, Braunschweig, Germany.
 35. Kikkawa Y., Oyama, A. Ishii, R., Miura, I., Amano, T., Ishii, Y., Yoshikawa, Y., Masuya, H., Wakana, S., Shiroishi, T., Taya, C., Yonekawa, H.: A Small Deletion Hotspot in the Type II Keratin Gene mK6irs1/Krt2-6g on Mouse Chromosome 15, A Candidate for Causing the Wavy Hair of the Caracul (Ca) Mutation. 17th International Mouse Genome Conference, 2003. 1 1.9-12, Braunschweig, Germany.
 36. Kikkawa Y., Adato, A., El-Amraoui, A., Kominami, R., Petit, C., Yonekawa, H.: Interaction of sans, the human Usher 1 G/mouse Jackson shaker gene product, with other Usher 1 gene products. 17th International Mouse Genome Conference, 2003. 11.9-12, Braunschweig, Germany.
 37. 向井香織、松岡邦枝、久保田俊之、久保秀一、佐藤英一郎、平原一樹、基山崖道、反町典子、峯岸克行、烏山一: アレルギー疾患モデルマウスを用いた慢性アレルギー炎症誘導機序の解析. 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 2003. 12. 8-10. 福岡.
 38. 松岡恵美子: Min マウスの腫瘍発生を修飾する内的・外的要因の解析. 第30回東北大学加齢医学研究所シンポジウム. 2003. 12. 20. 山台.
 39. 米川博通: ヒト疾患モデルマウスの開発・維持・解析. (財) 東京都医学研究機構・研究フォーラム. 2003. 12. 8. 東京.
 40. 小野富雄、鈴木直子ら: 新規の神経活動依存性遺伝子である alivin1 は神経細胞のアポトーシスを抑制し生存を促進する. 第26回日本分子生物学会年会. 2003. 12. 10-13. 神戸.
 41. 根根美智子、設楽浩志ら: マウス腎臓特異的転写調節に関わる Gf15 遺伝子. 第26回日本分子生物学会大会. 2002. 12. 10-13. 神戸.
 42. 徐志利、水口裕之、山口照英、真弓忠範、早川堯夫: 遺伝子発現ユニットの最適化による高効率遺伝子発現アデノウイルスベクターの開発; 日本薬学会123年会(長崎); 2003年3月

43. 徐志利、水口裕之、山口照英、真弓忠範、早川堯夫；各種遺伝子発現制御系を搭載させたアデノウイルスベクターの系統的機能評価；第 61 回日本癌学会総会（東京）；2002 年 10 月 1-3 日
44. 徐志利、水口裕之、石井（渡部）明子、内田恵理子、真弓忠範、早川堯夫；各種転写活性化因子の系統的機能評価 -アデノウイルスベクターにおける検討-；日本薬学会 122 年会（千葉）；2002 年 3 月
45. 吉澤利弘、渡邊雅彦、古庄健太郎、庄司進一。Machado-Joseph 病橋病変の MRI による形態学的検討。第 44 回日本神経学会総会（横浜）、2003、5、15-17。
46. 古庄健太郎、吉澤利弘、新里寿美子、庄司進一。Ataxin-3 の凝集体形成と細胞死に対するタンパク安定化試薬の効果について。第 44 回日本神経学会総会（横浜）、2003、5、15-17。
47. 渡邊雅彦、新里寿美子、大越教夫、吉澤利弘、庄司進一、吉沢和朗、林、明人。日本人パーキンソン病患者における DRD2 遺伝子および MAOB 遺伝子多型の解析。第 44 回日本神経学会総会（横浜）、2003、5、15-17。
48. 藤田祐之、大越教夫、吉澤利弘、玉岡晃、庄司進一。非典型的な脳 MRI 所見を呈した多発性硬化症の臨床的検討。第 44 回日本神経学会総会（横浜）、2003、5、15-17。
49. 白岩伸子、吉澤利弘、庄司進一。ベル麻痺患者の予後予測因子の検討。第 44 回日本神経学会総会（横浜）、2003、5、15-17。
50. 上野友之、大越教夫、藤田祐之、石井一弘、吉澤利弘、玉岡晃、庄司進一。髄膜炎様の発症形式を呈した非定型的多発性硬化症の二例。第 510 回日本内科学会関東地方会（東京）、2003、7、12。
51. 中澤健介、藤田祐之、吉澤利弘、玉岡晃、庄司進一、添田敦子、柿木信重、柴原健、田中直見。若年性脳梗塞を合併した Crohn 病の 1 例。第 25 回茨城医学会内科分科会／第 170 回茨城県内科集談会（水戸）、2003、10、25。
52. Yoshizawa T, Watanabe M, Furusho K, Shoji S. Magnetic Resonance Imaging demonstrates differential atrophy of pontine base and tegmentum in Machado-Joseph disease. 33st Annual Meeting of Society for Neuroscience, USA. (New Orleans), 2003, 11. 8-12.
53. 武藤秀治、大越教夫、藤田祐之、中澤健介、吉澤利弘、玉岡晃、庄司進一、吉田郁雄、渡辺重行、山口巖。虚血性心疾患を合併した POEMS 症候群の一例。第 514 回日本内科学会関東地方会（東京）、2003、12、14。
54. 和泉梢、吉澤利弘、藤田祐之、庄司進一、松枝清、

本間 覚。抗カルジオリピン $\beta 2$ グリコプロテイン 1 複合体抗体陽性を示した慢性静脈不全の 1 例。第 515 回日本内科学会関東地方会（東京）、2004、2、14。

55. 保坂愛、吉澤利弘、山本三幸、阿武泉、庄司進一。右外側紡錘状回を含む一側性梗塞により顔の部分配置の識別障害を来した一例。第 168 回日本神経学会関東地方会（東京）2004、3、6。
56. 白岩伸子、吉澤利弘、庄司進一。増悪寛解を反復し、血清抗 *Borrelia burgdorferi* 抗体陽性で毎回抗生物質にて軽快した多発単神経炎の一例。第 168 回日本神経学会関東地方会（東京）2004、3、6。

G. 知的財産権の出願・登録状況

出願中特許

1) 発明の名称：細胞障害抑制剤（FP05055-00、国際特許分類 A61K 38/00）

- ①発明者 芝崎太、内野博之、日野資弘、中田裕久
- ②出願日 平成12年10月19日（国際特許出願中；アメリカ、EU、カナダ、オーストラリア）
- ③出願人（財）東京都医学研究機構、藤沢薬品工業株式会社
- ④発明の内容の概略：新規環状ペプチド FR901459 の細胞障害抑制作用を利用した虚血性脳障害、虚血性心筋障害などの疾患に対する治療薬としての応用

2) 発明の名称：細胞障害保護作用を有する医薬組成物

- ①発明者：芝崎太、内野博之、坂田和彦
- ②出願日：平成15年12月
- ③出願人：（財）東京都医学研究機構、有限会社ケアティス
- ④発明の内容：本発明は、特に虚血性の細胞障害に対し、シクロスポリンのようなシクロフィリン型イソメラーゼ活性阻害剤と FK-506 のようなカルシニューリン活性阻害剤を併用することにより、それぞれを単独で投与した場合よりも優れた薬効を得られるという投与方法と治療法に関する。この医薬組成物は、虚血によって引き起こされる細胞障害、例えば脳梗塞や心筋梗塞などの血液循環障害や外傷性細胞障害、アルツハイマー病やパーキンソン病などの種々の神経変性疾患、移植組織の保存剤や組織移植時の細胞保護剤などとしての治療や予防に有用である。

3) 発明の名称: オリゴヌクレオチド dendrimer による
抗体の識別化

- ⑤ 発明者 : 芝崎太、坂田和彦
- ⑥ 出願日 : 平成15年12月
- ⑦ 出願人 : (財) 東京都医学研究機構、有限
会社ケアティス

平成15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16年9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