

200500787A

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病病態解明と臨床応用に関する研究
-高等動物モデル構築と生体リアルタイム観測法開発によるアプローチ

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 星 美奈子

平成18(2006)年 4月

目次

I. 総括研究報告書

- アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病病態解明と-----1
臨床応用に関する研究
星 美奈子

II. 分担研究報告書

1. アミロスフェロイド特異的抗体作製と剖検脳の検証、毒性-----7
中和抗体、形成機序の解明に関する研究
星 美奈子
2. β アミロイド及びそのアナログの高純度合成と構造解析-----10
佐藤 一紀
3. 機能的蛍光標識導入による β アミロイド蓄積過程の分析-----12
手法開発に関する研究
菊地 和也
4. 蛍光相関法による抗体探索とタンパク質凝集リアルタイム-----14
測定に関する研究
金城 政孝
5. 霊長類モデルを用いたアルツハイマー病におけるアミロスフェロイド-----16
の病態形成機序の解明と治療法開発に関する研究
村松 慎一

III. 研究成果の刊行に関する一覧-----18

IV. 研究成果の刊行物・別刷り-----20

アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病病態解明と臨床応用に関する研究
-高等動物モデル構築と生体リアルタイム観測法開発によるアプローチ

主任研究者 星 美奈子 三菱化学生命科学研究所 アルツハイマー病発症機序解明チームリーダー
東京工業大学 大学院生命理工学研究科 連携助教授

研究要旨

β アミロイド ($A\beta$) はアルツハイマー病発症の鍵を握る分子ではあるが、真の病因となる $A\beta$ 凝集体の実体は未だ謎である。本研究は、新たに同定した、非常に強力な神経毒性を持つ球状 $A\beta$ 凝集体「アミロスフェロイド」を手がかりに、アルツハイマー病発症の開始点である異常 $A\beta$ 凝集体がいかに形成され、神経細胞死を引き起こすかを解明し、最終的には神経細胞死を阻止しようとするものである。そのために、(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和、(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要な $A\beta$ 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用、(3) 霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究を展開し、今年度は以下の結果を得た

- (1) アルツハイマー病脳に特異的にアミロスフェロイド（類似体）が存在することを、アミロスフェロイド特異的抗体を用いた生化学的、免疫組織化学的解析から示した。
- (2) アミロスフェロイド神経毒性を非常に有効に抑制する中和抗体を複数確立した。
- (3) アミロスフェロイド形成過程を定量的に観測できるリアルタイム観測手法の構築に成功した。
- (4) プリオンをモデル系に生体内タンパク質高感度検出法を構築した。
- (5) 発症の分岐点と考える「 $A\beta$ モノマーが線維になるか、アミロスフェロイドになるか」を制御する原理を試験管内で見出し、脳での $A\beta$ 凝集の制御に関する新たな仮説を示した。
- (6) アミロスフェロイド毒性にカルpain活性化が関与することをモデル動物等により示した。
- (7) サルES由来神経細胞を用い、アミロスフェロイドが霊長類神経細胞に毒性があることを示した。
- (8) アデノ随伴ウイルスベクターによる効果的遺伝子導入システムを構築した。また、老齢カニクイサルの認知機能評価を実施した。

分担研究者氏名・所属機関・職名

佐藤一紀 福岡女子大学 人間環境学部 教授
菊地和也 大阪大学 大学院工学研究科 教授
金城政孝 北海道大学 電子科学研究所 助教授
村松慎一 自治医科大学 内科学講座神経内科部門 助教授

A. 研究目的

本研究は、 $A\beta$ に由来する多様な凝集体の中で、非常に強力な神経毒性を持つ新たな球状 $A\beta$ 凝集体「アミロスフェロイド」を手がかりに、アルツハイマー病発症の開始点である異常 $A\beta$ 凝集体がいかに形成され、神経細胞死を引き起こすかを解明し、最終的にはそれを阻止しようとするものである。そのために、(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和、(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要な $A\beta$ 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用、(3) 霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究を行った。

B. 研究方法

(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和

抗原として、化学合成した純粋な $A\beta_{1-40}$ ないしは $A\beta_{1-42}$ から調製したアミロスフェロイドを用いアミロスフェロイド特異的抗体を作製し、剖検脳の生化学的・免疫組織化学的解析を実施した。また、アミロスフェロイド神経毒性を抑制する中和抗体も確立した。神経毒性は3重染色法 (propidium iodide, calcein-AM、ヘキスト)、または cell death ELISA (ロッシュ社製の一部手法を改変) でアポトーシスを定量した。

(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要な $A\beta$ 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用

a. アミロスフェロイド検出系の構築

アミロスフェロイド形成過程を定量的に観測できるリアルタイム観測手法の構築に成功した。

b. 抗原抗体反応モデル系の構築

生体内において高感度にアミロスフェロイドを検出する系を構築することを目指し、まず組み替え牛

プリオンタンパク質をモデル系に特異的抗体による高感度検出系の構築を蛍光相関分光法並びに蛍光相互相関分光法を用いて行った。

c. アミロスフェロイド凝集経路の解析

アミロスフェロイド形成に溶媒が与える効果を、透過型電子顕微鏡観察並びにバイオアッセイによって解析を行った。

(3) 霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究

a. アミロスフェロイド神経細胞死機構の解明

アミロスフェロイドによる神経細胞死機構を解明する目的でラット初代培養神経細胞、マウス海馬器管培養に対してアミロスフェロイドを投与した。さらにカルpain活性化が抑制されている遺伝子改変マウスに対しても同様の解析を行った。

b. 霊長類ES細胞の神経細胞に対する毒性の検証

カニクイサルES細胞から、効率よく大量の神経細胞を分化誘導し、アミロスフェロイドを添加し細胞毒性の有無を検証した。

c. 神経細胞に対する遺伝子導入ベクターの開発と老齢サル認知機能評価

神経細胞特異的プロモーターとしてCaMKあるいはSynIプロモーターを用い、マーカーとしてGFPを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを各種作製し、マウス海馬に導入した。アミロスフェロイド形成による認知機能の変化を検出するため、記憶に基づいて順次食物を9穴から回収する際の誤動作を測定する食物回収課題を老齢サルに実施した。

(倫理面への配慮)

各研究者は、総理府告示「動物の処分法に関する指針」(平成7年第40号)、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、総理府「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、文部省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、所属機関における動物実験指針、ヒトサンプルに関する倫理委員会の承認のもと研究を行っている。さらにインフォームドコンセントに基づいて得られたヒトサンプルのみを解析に供しているが、今後も倫理規定を遵守して研究を行う。

C. 研究結果

(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和

モノマーや線維に反応しない、アミロスフェロイド特異的抗体は、ヒト脳の免疫組織学的解析並びに生化学的解析において患者脳に特異的に反応した。アミロスフェロイド特異的抗体のあるものは、アミロスフェロイドによる神経細胞死を抑制する効果も持つことが明らかとなった。

(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要なAβ凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用

a. アミロスフェロイド検出系の構築

アミロスフェロイド形成過程を定量的に観測できるリアルタイム観測手法の構築に成功した。

b. 抗原抗体反応モデル系の構築

プリオンをモデル系として、浜松ホトニクスとの協力により従来装置より小型なFCCS検出装置の開発に取り組み、組替え牛プリオンタンパク質を緩衝液並びに牛脳抽出液中において 0.13 ± 0.03 nMと既存装置の半分以下の量で検出可能であることを示した。FCS解析に今まで散乱測定で用いられてきたCONTINアルゴリズムを、FCS用のインターフェースを作製することで取り入れ、多成分に対応出来るよう解析手法を改良した。

c. アミロスフェロイド凝集経路の解析

発症の分岐点と考える「Aβモノマーが線維になるか、アミロスフェロイドになるか」を制御する原理を試験管内で見出し、脳でのAβ凝集の制御に関する新たな仮説を示した。

(3) 霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究

a. アミロスフェロイド神経細胞死機構の解明

アミロスフェロイドによる神経細胞死にはカルpain活性化が重要であることを、カルpain特異的阻害剤を活用することで、前述のラット初代培養神経細胞、マウス海馬器管培養、遺伝子改変マウス海馬器管培養を用いて示した。また、カルpain可視化プローブについても細胞内で有効に機能していることを示す結果を得た。

b. 霊長類ES細胞の神経細胞に対する毒性の検証

カニクイサルES由来神経細胞を用いた検証から、アミロスフェロイドが霊長類神経細胞にも毒性があり、その毒性はESや神経幹細胞にはなく、神経細胞に特異的であることを示した。

c. 神経細胞に対する遺伝子導入ベクターの開発と老齢サル認知機能評価

老齢カニクイサルの記憶容量を食物回収課題により評価した。次に、アデノ随伴ウイルスベクターによる効果的遺伝子導入システムを構築し、次年度学習訓練を施した老齢カニクイサルにアミロスフェロイド形成処置を開始する予定。

D. 考察

(1) アミロスフェロイド特異的抗体が、ヒト脳においても疾患特異的染色を示すことから、アミロスフェロイド(類似)構造が生体に存在する可能性が高まった。

(2) 今回、アミロスフェロイド認識抗体だけではなく、機能的抗体、即ちアミロスフェロイド毒性中和抗体並びに形成阻害抗体も確立したため、今後治療への展開も期待出来る。アミロスフェロイド特異的抗体は、Aβモノマーや線維にほとんど反応しないことから、アミロスフェロイドはこれらとは表面構造が異なることが示唆された。今後、この点を解明することが、なぜ特定の神経だけが死に至るのか、

それをいかに阻止出来るかという基礎と応用の両観点で非常に重要である。

(3) 今回、アミロスフェロイド並びに線維の形成をリアルタイムに定量可能な手法を構築した。これは、新たな非侵襲的画像診断法の開拓基盤となる。

(4) 早期診断系を確立するには、「少量の試料でいかに高感度な検出が出来るか」が鍵となる。そのためには特異的抗体を用いた蛍光相互相関分光法

(FCCS) が有効であることが期待出来た。そこで、その基礎実験として、プリオンをモデル系として、浜松ホトニクスとの協力により従来装置より小型な FCCS 検出装置の開発に取り組み、組替え牛プリオンタンパク質を緩衝液並びに牛脳抽出液中において 0.13 ± 0.03 nM と既存装置の半分以下の量で検出可能であることを示した。

(5) 今回の検討から、アミロスフェロイドは病態解明のためのよい入り口であることが改めて示された。なぜなら、溶媒環境を問わず、毒性は 10-15 nm のアミロスフェロイド存在量と相関するからである。従って、発症の分岐点と考える「 $A\beta$ モノマーが線維になるか、アミロスフェロイドになるか」を制御する原理を試験管内で見出したことで、今後、生体内での形成機構に迫ることが可能になり、さらに凝集を制御しアミロスフェロイド形成を阻止することで疾病を治療・予防することが期待出来る。

(6) アミロスフェロイドによる毒性にはカルパインの活性化が必要であることを、初代培養系、モデルマウスを用いて示した。また、カルパイン活性を生きたまま検出出来る新規蛍光プローブの開発に着手し、有用である手応えを得た。

(7) カニクイサル ES 由来神経細胞を用いた検証から、アミロスフェロイドが霊長類神経細胞にも毒性があり、その毒性は ES や神経幹細胞にはなく、神経細胞に特異的であることを示した。霊長類神経細胞は、今後のマイクロアレイ解析により神経細胞死機構の解明に貢献するだけではなく、よりヒトに近い系での治療薬開発に用いることが可能であると考えており、最終年度は臨床応用も含めた研究を展開する予定である。

(8) 老齢カニクイサルの記憶容量を食物回収課題により評価した。次に、アデノ随伴ウイルスベクターによる効果的遺伝子導入システムを構築し、次年度学習訓練を施した老齢カニクイサルにアミロスフェロイド形成処置を開始する予定。

E. 結論

今年度の検討から、以下の結論が得られた。

(1) アルツハイマー病脳に特異的にアミロスフェロイド(類似体)が存在することを、アミロスフェロイド特異的抗体を用いた生化学的、免疫組織化学的解析から示した。

(2) アミロスフェロイド神経毒性を非常に有効に抑制する中和抗体を複数確立した。

(3) アミロスフェロイド形成過程を定量的に観測

できるリアルタイム観測手法の構築に成功した。

(4) プリオンをモデル系に生体内タンパク質高感度検出法を構築した。

(5) 発症の分岐点と考える「 $A\beta$ モノマーが線維になるか、アミロスフェロイドになるか」を制御する原理を試験管内で見出し、脳での $A\beta$ 凝集の制御に関する新たな仮説を示した。

(6) アミロスフェロイド毒性にカルパイン活性化が関与することをモデル動物等により示した。

(7) サル ES 由来神経細胞を用い、アミロスフェロイドが霊長類神経細胞に毒性があることを示した。

(8) アデノ随伴ウイルスベクターによる効果的遺伝子導入システムを構築した。また、老齢カニクイサルの認知機能評価を実施した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe, A., Okahata, Y., Furusawa, H., Hoshi, M. and Sakurai, M.: The effect of Trehalose on the aggregation of β -amyloid Cryobiology and Cryotechnology 51, 137-140, 2005

2) Nirthanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph, J. S., Sato, K., and Tytgat, J.: Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to κ -KTx1.3, a non-toxic homologue of κ -hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. Biochemical Pharmacology, 69, 669-678 (2005)

3) K. Komatsu, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima & T. Nagano. Selective Zinc Sensor Molecules with Various Affinities for Zn^{2+} , Revealing Dynamics and Regional Distribution of Synaptically Released Zn^{2+} in Hippocampal Slices. J. Am. Chem. Soc., 127, 10197-10204 (2005)

4) L.A. van Meeteren, P. Ruurs, E. Christodoulou, J.W. Goding, H. Takakusa, K. Kikuchi, A. Perrakis, T. Nagano & W.H. Moolenaar. Inhibition of Autotaxin by Lysophosphatidic Acid and Sphingosine-1-phosphate. J. Biol. Chem., 280, 21155-21161 (2005)

5) R.A. Colvin, P. Fontaine, D. Thomas, T. Hirano, T. Nagano & K. Kikuchi. Evidence for pH Dependent Zn^{2+} Influx in K562 Erythroleukemia Cells: Studies Using ZnAF-2F Fluorescence and $Zn^{65(2+)}$ Uptake. Arch. Biochem. Biophys., 442, 222-228 (2005)

6) Yasutomo Nomura a., Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura, Masataka Kinjo. Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy. Analytical Biochemistry 350 196-201, (2006)

7) Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I and Ozawa K:

Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors. *Exp Opin Biol Ther*, 5(5):663-671,2005.

8) Maruyama M, Higuchi M, Takaki Y, Matsuba Y, Tanji H, Nemoto M, Tomita N, Matsui T, Iwata N, Mizukami H, Muramatsu S, Ozawa K, Saido TC, Arai H and Sasaki H: Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 57(6):832-842,2005.

9) Liu Y, Okada T, Sheykholslami K, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu S, Kanazawa T, Takeuchi K, Ajalli R, Mizukami H, Kume A, Ichimura K and Ozawa K: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther*, 12(4):725-733,2005.

10) Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K and Muramatsu S: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther*, 13(1):160-166,2006.

11) Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K and Hanazono H: Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. *Stem Cells*, *in press*

12) Maya Hirose, Hideki Tohda, Yuko Giga-Hama, Reiko Tsushima, Tamotsu Zako, Ryo Iizuka, Changi Pack, Masataka Kinjo, Noriyuki Ishii, and Masafumi Yohda: Interaction of a small heat shock protein of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, with a denatured protein at elevated temperature *J. Biol. Chem.*;280, 32586-32593 (2005)

13) Takashi Jin, Fumihiko Fujii, Hiroshi Sakata, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo: Amphiphilic p-sulfonatocalix[4]arene-coated CdSe-ZnS quantum dots for the optical detection of the neurotransmitter acetylcholine: *Chem. Commun.* 4300-4302 (2005)

14) Yasuo Takahashi, Ryuji Sawada, Kiyochika Ishibashi, Sinterou Mikuni and Masataka Kinjo: Analysis of Cellular Functions by Multipoint Fluorescence Correlation Spectroscopy *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6, 159-156 (2005),

15) Takashi Jin, Fumihiko Fujii, Hiroshi Sakata, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo: Calixarene-coated water-soluble CdSe/ZnS semiconductor quantum dots that are highly fluorescent and stable in aqueous solution, *Chem. Commun.* 2829-2831 (2005)

16) 星美奈子: 分子の探索からシステムの解明へーアルツハイマー病研究に想う神経科学の今後への私感 繊維と工業 62, 17-18, 2006

17) 奈良優子, 村松慎一: パーキンソン病の再生医療. 特集 治療の最前線: 神経疾患の先端的治療: *Brain Medical*:17:41-45:2005

18) 中林孝和, 飯森俊文, 金城政孝, 太田信廣 蛍光寿命イメージングシステムの作成と生体試料および高分子試料への応用: *分光研究* 55, 31-39 (2006)

2. 学会発表

1) Hoshi, M. as organizer and symposist (May 19, 2005) : Spherical aggregates of β -amyloid, 'amylospheroid': Formation and suppression of its neurotoxicity: *The 82nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan: Symposium in cooperation with Molecular Biological Society of Japan: Aging Science: understanding the molecular mechanisms of aging and age-related brain dysfunctions: Sendai*

2) 星 美奈子 (2005年11月): 球状 β アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」-形成から毒性の阻止まで: 千里ライフサイエンスセミナー「老化」: 神戸

3) 野口彰彦・佐藤道夫・佐藤一紀・星 美奈子 (2005年12月): 球状 β アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」形成に至る凝集経路と神経細胞死: 第28回日本分子生物学会年会ワークショップ 蛋白質のフォールディング/プロセッシングによる細胞機能調節とその破綻: 博多

4) 星 美奈子 (2005年7月): 球状 β アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」-形成から毒性の阻止まで: 神奈川大学特別セミナー: 横浜

5) Noguchi, A., Sato, M., Ishihara, K., Sato, K. and Hoshi, M.M. (Nov. 2005) : Physiological solvent environments promoted A β assembly into amylospheroid(ASPD), 10-15-nm spherical A β aggregates with potent neurotoxicity: *The Society For Neuroscience(2005) 35th Annual Meeting: Washington, D.C.*

6) Noguchi, A., Sato, M., Ishihara, K., Sato, K. and Hoshi, M.M. (Dec. 2005) : Physiological solvent environments promoted A β assembly into amylospheroid(ASPD), 10-15-nm spherical A β aggregates with potent neurotoxicity: *International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2005: Honolulu, Hawaii*

7) Ishihara, K., Sato, K., Sato, M. and Hoshi, M.M. (Dec. 2005) : Production and characterization of gold-A β spheres of uniform size as a molecular resemblance of amylospheroid (ASPD), spherical A β aggregates with strong neurotoxicity: *International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2005: Honolulu, Hawaii*

8) 野口彰彦, 佐藤道夫, 佐藤一紀, 星美奈子: アミロスフェロイド形成に各種溶媒が及ぼす影響の解 (日本化学会第85春季年会, 3月, 横浜)

9) 石原和之, 佐藤一紀, 佐藤道夫, 星美奈子: β アミロイド毒性凝集体アミロスフェロイドの擬似構造体作製の試み (日本化学会第85春季年会, 3月, 横浜)

- 10) 渡邊 亜沙子、岡畑 恵雄、古澤 宏幸、星美奈子、櫻井 実 (2005年6月) : β アミロイド凝集に及ぼすトレハロースの効果 : 第51回低温生物工学会年会 : 長津田
- 11) 渡邊 亜沙子、岡畑 恵雄、古澤 宏幸、星美奈子、櫻井 実 (2005年11月) : β -アミロイド凝集に及ぼす水代替物質トレハロースの効果 : 第43回日本生物物理学会 : 札幌
- 12) 菅原由子、羽生 純、佐藤一紀、Nirathanan, S., Gopalakrishnakone, P., Pil, J., Tytgat, J.: 東南アジアのサソリから単離されたペプチド毒の構造活性相関(日本生化学会九州支部例会、2005年5月、福岡)
- 13) 吉田恵子、光岡瑠美、佐藤一紀、Saminathan, R., Gopalakrishnakone, P.: イモ貝 *Conus amadis* から単離された新規ペプチド毒の合成(日本生化学会九州支部例会、2005年5月、福岡)
- 14) 菅原由子、羽生 純、Nirathanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Gopalakrishnakone, P., Jeremiah S. Joseph, J. S., Tytgat, J. 佐藤一紀: アジア産サソリ *Heterometrus fulvipes* と *Heterometrus spinifer* から単離されたペプチド毒の合成と構造活性相関(第42回ペプチド討論会、2005年10月、大阪)
- 15) K. Kikuchi, Pacificchem 2005, "Visualization of Cellular Events Using Fluorescent Sensor Molecules" 2005年12月15日~20日, Hilton Hawaiian Village Hotel, ホノルル市, ハワイ州, アメリカ合衆国
- 16) 2nd Annual Symposium: Japanese-German Frontiers of Science, "Visualization and Manipulation of Cellular Events Using Fluorescence Sensor Molecules" 2005年11月2日~5日, 湘南国際村, 神奈川県葉山町
- 17) 第86日本化学会春季年会・特別企画講演「ダイナミックスピン: 動的機能の創製と解析・制御」, 「スピンドイナミクス制御に基づく生体機能可視化センサー分子のデザイン・合成・応用」2006年3月27日~30日, 日本大学, 習志野市
- 18) 分子研シンポジウム「生体における金属イオンの役割とその利用」, 「錯体化学を応用した生体機能可視化センサー分子のデザイン・合成・生物応用」2006年3月18日~20日, 分子科学研究所, 岡崎市
- 19) 第79回日本薬理学会年会・シンポジウム「創薬の未来を拓くケミカルバイオロジー」, 「細胞機能を可視化する化学プローブ」2006年3月8日~10日, パシフィコ横浜, 横浜市
- 20) 第二回ケミカルバイオロジーシンポジウム, "Design Synthesis and Biological Application of Fluorescence Sensor Molecules Which Convert Biological Responses to Chemical Output" 2006年2月17日, 東京医科歯科大学, 文京区
- 21) 岡崎統合バイオサイエンスセンター5周年記念シンポジウム, 「細胞内イベントを可視化する化学プローブ」2006年2月6日~8日, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市
- 22) 理研シンポジウム: 第9回生体分子の化学, 「細胞機能を可視化するセンサー分子のデザイン・合成・生物応用」2006年1月27日, 理化学研究所 大河内記念講堂, 和光市
- 23) 理研シンポジウム: モレキュラー・アンサンブル2005, 「可視化センサー分子の分子デザインと生物応用」2005年11月28日~29日, 理化学研究所 大河内記念ホール, 和光市
- 24) 第14回バイオイメージング学会・シンポジウム, 「新規計測技術によるバイオイメージング」, 「Eu³⁺錯体の蛍光強度制御に基づく時間分解蛍光イメージングシステム」2005年10月26日~28日, 東京大学一条講堂, 東京都文京区
- 25) 化学工学会・第37回秋季大会・シンポジウム講演, 「物質創製アプローチによる可視化センサー分子の開発と生物応用」2005年9月15日~16日, 岡山大学 キャンパス, 岡山市
- 26) 第11回機能性ホストゲスト化学研究会サマーセミナー, 「細胞機能を覗く分子デザイン」2005年7月28日~29日, 立山国際ホテル, 富山県上新川郡立山町
- 27) 第40回天然物化学談話会, 「物質創製アプローチによる生きた状態の可視化解析」2005年7月13日~15日, 熱川ホテル, 静岡県賀茂郡東伊豆町
- 28) 蛋白研セミナー, 「細胞機能を覗く分子デザイン」2005年6月22日~23日, 大阪大学蛋白質研究所
- 29) 日本顕微鏡学会第61回学術講演会—「見る」極限への挑戦—シンポジウム「光でみる生命機構」, 「細胞機能の可視化と不活化のケミカルバイオロジー」2005年6月1日~3日, つくば国際会議場, つくば市
- 30) Changi Pack and Masataka Kinjo: Studying dynamics of tandem GFPs at nucleus in living cell by fluorescence correlation spectroscopy. Prague Post Genome Technology Workshop (PPGT) Prague, Czech Republic Monday June 6 - Tuesday June 7, (2005)
- 31) Masataka Kinjo: Study of Protein Dynamics in Living Cell Using Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy. International Symposium on Molecular Nanotechnology Nara: Nov.(2005)
- 32) 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療と細胞移植. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005年5月26日.(プログラム P34)
- 33) Liu Y, et al.: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. The American society of gene therapy's 8th annual meeting. Minneapolis, June 3, 2005.
- 34) 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療. 第23回日本神経治療学会総会, 鳥羽市, 2005年6月9日.(プログラム P10)
- 35) 村松慎一: AAVベクターによるパーキンソン

病の遺伝子治療. (AAV vectors for the treatment of Parkinson's disease) 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005年7月27日.(プログラム P 57)

36) Muramatsu S, et al.: *In vivo* assessment of transgene-mediated dopamine synthesis by positron emission tomography in a primate model of Parkinson's disease. The Japan society of gene therapy's 11th annual meeting. Tokyo, July 29, 2005. (abstract p23).

37) Muramatsu S, et al.: Gene therapy for Parkinson's disease : Strategies for clinical applications. The 2nd Nikko International Symposium 2005. Nikko, September 30, 2005. (abstract p20-21).

38) Sato T, et al. Activity of 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase, the second enzyme for biosynthesis of tetrahydrobiopterin, in the brain. 第78回日本生化学会大会, 神戸, 2005年10月22日.

39) Muramatsu S, et al.: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. Society for Neuroscience's 35th Annual Meeting, Washington, DC, November 14, 2005.

40) 村松慎一 他: 血友病遺伝子治療を目指した遺伝子発現制御 AAV ベクターの開発. 第28回血栓止血学会学術集会, 福岡, 2005年11月24日.

41) 村松慎一 他: パーキンソン病の遺伝子治療. 第45回日本定位・機能神経外科学会, 埼玉, 2006年1月20日. (プログラム P 69)

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

1) 抗体とその利用

出願日:

PCT/JP2005/014735

発明者: Hoshi, M., Naito, K. & Ideno, S.

出願人: 三菱化学株式会社

2) アミロスフェロイドにより発生する疾患の予防治療剤

出願日:

特願2005-169910

発明者: 星美奈子

出願人: 三菱化学株式会社

3) 膜構造を有する生体構造物の膜機能を解析する方法

出願日: 平成16年2月25日

特願2004-50214 (P2004-50214)

特開2005-241378 (P2005-241378A)

出願日: 平成16年9月22日

公開日: 平成17年9月8日

発明者: 高橋 保夫、金城 政孝、田村 守

出願人: オリンパス株式会社

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

アミロスフェロイド特異的抗体作製と剖検脳の検証、毒性中和抗体、形成機序の解明に関する研究

主任研究者 星 美奈子 三菱化学生命科学研究所 アルツハイマー病発症機序解明チームリーダー
東京工業大学 大学院生命理工学研究科 連携助教授

研究要旨

本研究では、(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和、(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要な A β 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用、を目的とした研究を展開し、今年度は以下の結果を得た。

- (1) アルツハイマー病脳に特異的にアミロスフェロイド（類似体）が存在することを、アミロスフェロイド特異的抗体を用いた生化学的、免疫組織化学的解析から示した。
- (2) アミロスフェロイド神経毒性を非常に有効に抑制する中和抗体を複数確立した。
- (3) アミロスフェロイド形成過程を定量的に観測できるリアルタイム観測手法の構築に成功した。
- (4) 発症の分岐点と考える「A β モノマーが線維になるか、アミロスフェロイドになるか」を制御する原理を試験管内で見出し、脳での A β 凝集の制御に関する新たな仮説を示した。
- (5) アミロスフェロイド毒性にカルpain活性化が関与することをモデル動物等により示した。
- (6) サル ES 由来神経細胞を用い、アミロスフェロイドが霊長類神経細胞に毒性があることを示した。

A. 研究目的

本研究では、(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和、(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要な A β 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用、を目的に行った。

B. 研究方法

(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和

抗原として、化学合成した純粋な A β ₁₋₄₀ ないしは A β ₁₋₄₂ から調製したアミロスフェロイドを用いアミロスフェロイド特異的抗体を作製し、剖検脳の生化学的・免疫組織化学的解析を実施した。また、アミロスフェロイド神経毒性を抑制する中和抗体も確立した。神経毒性は 3 重染色法 (propidium iodide, calcein-AM, ヘキスト)、または cell death ELISA (ロッシュ社製の一部手法を改変) でアポトーシスを定量した。

(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要な A β 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用

a. アミロスフェロイド検出系の構築

アミロスフェロイド形成過程を定量的に観測できるリアルタイム観測手法の構築に成功した。

b. アミロスフェロイド凝集経路の解析

アミロスフェロイド形成に溶媒が与える効果を、透過型電子顕微鏡観察並びにバイオアッセイによっ

て解析を行った。

(3) 霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究

a. アミロスフェロイド神経細胞死機構の解明

アミロスフェロイドによる神経細胞死機構を解明する目的でラット初代培養神経細胞、マウス海馬器官培養に対してアミロスフェロイドを投与した。さらにカルpain活性化が抑制されている遺伝子改変マウスに対しても同様の解析を行った。カルpain可視化プローブ（菊地の欄参照）の有効性を検証した。

b. 霊長類 ES 細胞の神経細胞に対する毒性の検証

カニクイサルの ES 細胞から、効率よく大量の神経細胞を分化誘導し、アミロスフェロイドを添加し細胞毒性の有無を検証した（村松の欄参照）。

（倫理面への配慮）

各研究者は、総理府告示「動物の処分法に関する指針」（平成7年第40号）、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、総理府「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、文部省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、所属機関における動物実験指針、ヒトサンプルに関する倫理委員会の承認のもと研究を行っている。さらにインフォームドコンセントに基づいて得られたヒトサンプルのみを解析に供しているが、今後も倫理規定を遵守して研究を行う。

C. 研究結果

(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロ

イド特異的抗体による神経毒性の中和

モノマーや線維に反応しない、アミロスフェロイド特異的抗体は、ヒト脳の免疫組織学的解析並びに生化学的解析において患者脳に特異的に反応した。アミロスフェロイド特異的抗体のあるものは、アミロスフェロイドによる神経細胞死を抑制する効果も持つことが明らかとなった。

(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要なA β 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用

a. アミロスフェロイド検出系の構築

アミロスフェロイド形成過程を定量的に観測できるリアルタイム観測手法の構築に成功した。

b. アミロスフェロイド凝集経路の解析

発症の分岐点と考える「A β モノマーが線維になるか、アミロスフェロイドになるか」を制御する原理を試験管内で見出し、脳でのA β 凝集の制御に関する新たな仮説を示した。

(3) 霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究

a. アミロスフェロイド神経細胞死機構の解明

アミロスフェロイドによる神経細胞死にはカルパイン活性化が重要であることを、カルパイン特異的阻害剤を活用することで、前述のラット初代培養神経細胞、マウス海馬器官培養、遺伝子改変マウス海馬器官培養を用いて示した。また、カルパイン可視化プローブについても細胞内で有効に機能していることを示す結果を得た。

b. 霊長類ES細胞の神経細胞に対する毒性の検証

カニクイサルES由来神経細胞を用いた検証から、アミロスフェロイドが霊長類神経細胞にも毒性があり、その毒性はESや神経幹細胞にはなく、神経細胞に特異的であることを示した。

D. 考察

(1) アミロスフェロイド特異的抗体が、ヒト脳においても疾患特異的染色を示すことから、アミロスフェロイド(類似)構造が生体に存在する可能性が高まった。

(2) 今回、アミロスフェロイド認識抗体だけではなく、機能的抗体、即ちアミロスフェロイド毒性中和抗体並びに形成阻害抗体も確立したため、今後治療への展開も期待出来る。アミロスフェロイド特異的抗体は、A β モノマーや線維にほとんど反応しないことから、アミロスフェロイドはこれらとは表面構造が異なることが示唆された。今後、この点を解明することが、なぜ特定の神経だけが死に至るのか、それをいかに阻止出来るかという基礎と応用の両観点で非常に重要である。

(3) 今回、アミロスフェロイド並びに線維の形成をリアルタイムに定量可能な手法を構築した。これは、新たな非侵襲的画像診断法の開拓基盤となる。

(4) 今回の検討から、アミロスフェロイドは病態解明のためのよい入り口であることが改めて示され

た。なぜなら、溶媒環境を問わず、毒性は10-15 nmのアミロスフェロイド存在量と相関するからである。従って、発症の分岐点と考える「A β モノマーが線維になるか、アミロスフェロイドになるか」を制御する原理を試験管内で見出したことで、今後、生体内での形成機構に迫ることが可能になり、さらに凝集を制御しアミロスフェロイド形成を阻止することで疾病を治療・予防することが期待出来る。

(5) アミロスフェロイドによる毒性にはカルパインの活性化が必要であることを、初代培養系、モデルマウスを用いて示した。また、カルパイン活性を生きたまま検出出来る新規蛍光プローブの開発に着手し、有用である手応えを得た。

(6) カニクイサルES由来神経細胞を用いた検証から、アミロスフェロイドが霊長類神経細胞にも毒性があり、その毒性はESや神経幹細胞にはなく、神経細胞に特異的であることを示した。霊長類神経細胞は、今後のマイクロアレイ解析により神経細胞死機構の解明に貢献するだけでなく、よりヒトに近い系での治療薬開発に用いることが可能であるとされており、最終年度は臨床応用も含めた研究を展開する予定である。

E. 結論

今年度の検討から、以下の結論が得られた。

(1) アルツハイマー病脳に特異的にアミロスフェロイド(類似体)が存在することを、アミロスフェロイド特異的抗体を用いた生化学的、免疫組織化学的解析から示した。

(2) アミロスフェロイド神経毒性を非常に有効に抑制する中和抗体を複数確立した。

(3) アミロスフェロイド形成過程を定量的に観測できるリアルタイム観測手法の構築に成功した。

(4) 発症の分岐点と考える「A β モノマーが線維になるか、アミロスフェロイドになるか」を制御する原理を試験管内で見出し、脳でのA β 凝集の制御に関する新たな仮説を示した。

(5) アミロスフェロイド毒性にカルパイン活性化が関与することをモデル動物等により示した。

(6) サルES由来神経細胞を用い、アミロスフェロイドが霊長類神経細胞に毒性があることを示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe, A., Okahata, Y., Furusawa, H., Hoshi, M. and Sakurai, M.: The effect of Trehalose on the aggregation of β -amyloid Cryobiology and Cryotechnology 51, 137-140, 2005

2) 星美奈子: 分子の探索からシステムの解明へー

アルツハイマー病研究に想う神経科学の今後への私感 繊維と工業 62, 17-18, 2006

2. 学会発表

1) Hoshi, M. as organizer and symposist (May 19, 2005) : Spherical aggregates of β -amyloid, 'amylospheroid': Formation and suppression of its neurotoxicity: *The 82nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan*: Symposium in cooperation with Molecular Biological Society of Japan: Aging Science: understanding the molecular mechanisms of aging and age-related brain dysfunctions: Sendai

2) 星 美奈子 (2005年11月): 球状 β アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」-形成から毒性の阻止まで: 千里ライフサイエンスセミナー「老化」: 神戸

3) 野口彰彦・佐藤道夫・佐藤一紀・星 美奈子 (2005年12月): 球状 β アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」形成に至る凝集経路と神経細胞死: 第28回日本分子生物学会年会ワークショップ蛋白質のフォールディング/プロセッシングによる細胞機能調節とその破綻: 博多

4) 星 美奈子 (2005年7月): 球状 β アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」-形成から毒性の阻止まで: 神奈川大学特別セミナー: 横浜

5) Noguchi, A., Sato, M., Ishihara, K., Sato, K. and Hoshi, M.M. (Nov. 2005) : Physiological solvent environments promoted A β assembly into amylospheroid(ASPD), 10-15-nm spherical A β aggregates with potent neurotoxicity: *The Society For Neuroscience(2005) 35th Annual Meeting*: Washington, D.C.

6) Noguchi, A., Sato, M., Ishihara, K., Sato, K. and Hoshi, M.M. (Dec. 2005) : Physiological solvent environments promoted A β assembly into amylospheroid(ASPD), 10-15-nm spherical A β aggregates with potent neurotoxicity: *International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2005*: Honolulu, Hawaii

7) Ishihara, K., Sato, K., Sato, M. and Hoshi, M.M. (Dec. 2005) : Production and characterization of gold-A β spheres of uniform size as a molecular resemblance of amylospheroid (ASPD), spherical A β aggregates with strong neurotoxicity: *International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2005*: Honolulu, Hawaii

8) 野口彰彦、佐藤道夫、佐藤一紀、星美奈子: アミロスフェロイド形成に各種溶媒が及ぼす影響の解

(日本化学会第85春季年会、3月、横浜)

9) 石原和之、佐藤一紀、佐藤道夫、星美奈子: β アミロイド毒性凝集体アミロスフェロイドの擬似構造体作製の試み (日本化学会第85春季年会、3月、横浜)

10) 渡邊 亜沙子、岡畑 恵雄、古澤 宏幸、星美奈子、櫻井 実 (2005年6月): β アミロイド凝集に及ぼすトレハロースの効果: 第51回低温生物工学会年会: 長津田

11) 渡邊 亜沙子、岡畑 恵雄、古澤 宏幸、星美奈子、櫻井 実 (2005年11月): β -アミロイド凝集に及ぼす水代替物質トレハロースの効果: 第43回日本生物物理学会: 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

1) 抗体とその利用

出願日:

PCT/JP2005/014735

発明者: Hoshi, M., Naito, K. & Ideno, S.

出願人: 三菱化学株式会社

2) アミロスフェロイドにより発生する疾患の予防治療剤

出願日:

特願2005-169910

発明者: 星美奈子

出願人: 三菱化学株式会社

βアミロイド及びそのアナログの高純度合成と構造解析

分担研究者 佐藤一紀 福岡女子大学人間環境学部環境理学科 教授

研究要旨

βアミロイド (Aβ) の構造と神経毒性の相関を調べるため、昨年度に引き続き Aβ(1-40) と E22G-Aβ(1-40) を合成した。また、金コロイドに結合させて特異抗体を作製するために遊離の SH 基をもつ Aβ(1-39)-Cys を合成した。さらに、競合阻害実験に用いるために Aβ部分ペプチドを合成した。

A. 研究目的

アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病病態解明のためには、βアミロイド (Aβ) の構造と神経毒性の相関を明らかにする必要がある。そのためには Aβ及びそのアナログを大量に必要とする。本分担研究の役割は研究全体で使用するこれらペプチドを速やかに、かつ大量に合成することであり、また、必要に応じてそれらの物性を調べることである。

B. 研究方法

Aβ及びそのアナログの合成には Fmoc 固相合成法を用い、装置として ABI 社製 431A 型合成機を使用した。合成のプロトコールは FastMoc プログラムを採用した。合成途中でのペプチドの会合を抑える効果があると言われるシュードプロリンジペプチド誘導体を適宜用いた。樹脂から切り出した粗ペプチドを逆相 HPLC による分取を繰り返すことにより精製した。合成ペプチドの純度は HPLC で確認し、構造は質量分析とアミノ酸分析により確認した。

C. 研究結果

Aβの構造活性相関を調べるため Aβ(1-40)、D7N-Aβ(1-40)、E22G-Aβ(1-40) を合成した。目的物の純度改善をめざして、最近開発されたシュードプロリンジペプチドを採用した。その結果、通常のアミノ酸を用いた場合より純度の高い粗生成物が得られた。ペプチドの精製のために逆相 HPLC により分取を繰り返した。

次に、金コロイドに結合させて特異抗体を作製するために遊離の SH 基をもつペプチドの合成を計画した。昨年度の結果を参考に Aβ(1-39)-Cys を合成したが、精製は Aβ(1-40) に比較して困難であった。原因として、会合による分子間 S-S 結合形成の促進が考え

られた。

Aβの会合部位あるいは受容体結合部位をスクリーニングするため Aβ(1-40) のアミノ酸を 1 残基ずつ移動したペプチド 36 種 [Aβ(1-5)、Aβ(2-6)、Aβ(3-7)・・・] を合成した。今年度は、Aβ(1-42) の配列をカバーするために、Aβ(37-41) と Aβ(38-42) を新たに追加した。また、昨年度合成したペプチドの中出、さらに活性を調べる必要があると判断したペプチド 6 種類を追加合成した。

D. 考察

Aβ(1-40) の溶解度は Aβ(1-42) に比較すれば高く、逆相 HPLC による精製が可能であるが、カラム吸着によると思われる大幅な回収率の低下は避けられず、粗ペプチドの純度が低い場合には精製の繰り返しによる収率低下は避けがたい。シュードプロリンジペプチドの採用により純度の改善が見られたが、固相合成で高純度品を得るには、更なる条件の改良が必要である。

スクリーニング用ペプチドの合成に関しては、通常のココンビナトリアル合成と異なり、今回我々は 38 種のペプチドを個々に合成したので、それぞれ比較的大量の試料を所持している。これらは、今後様々な目的に使用可能と思われる。

E. 結論

アミロイド β (Aβ) の構造と神経毒性の相関を明らかにするために種々の Aβ及びそのアナログを合成した。これらのペプチドを用いて、多くの有益な情報が得られつつある。その内容については、他の分担研究者の報告及び総括研究報告を参照されたい。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nirthanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph, J. S., Sato, K., and Tytgat, J.: Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to κ -KTx1.3, a non-toxic homologue of κ -hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. *Biochemical Pharmacology*, **69**, 669-678 (2005)

2. 学会発表

- 1) 野口彰彦、佐藤道夫、佐藤一紀、星美奈子: アミロスフェロイド形成に各種溶媒が及ぼす影響の解 (日本化学会第 85 春季年会、3 月、横浜)
- 2) 石原和之、佐藤一紀、佐藤道夫、星美奈子: β アミロイド毒性凝集体アミロスフェロイドの擬似構造体作製の試み (日本化学会第 85 春季年会、3 月、横浜)
- 3) 菅原由子、羽生 純、佐藤一紀、Nirthanan, S., Gopalakrishnakone, P., Pil, J., Tytgat, J.: 東南アジアのサソリから単離されたペプチド毒の構造活性相関 (日本生化学会九州支部例会、2005 年 5 月、福岡)
- 4) 吉田恵子、光岡瑠美、佐藤一紀、Saminathan, R., Gopalakrishnakone, P.: イモ貝 *Conus amadis* から単離された新規ペプチド毒の合成 (日本生化学会九州支部例会、2005 年 5 月、福岡)
- 5) 菅原由子、羽生 純、Nirthanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Gopalakrishnakone, P., Jeremiah S. Joseph, J. S., Tytgat, J. 佐藤一紀: アジア産サソリ *Heterometrus fulvipes* と *Heterometrus spinifer* から単離されたペプチド毒の合成と構造活性相関 (第 42 回ペプチド討論会、2005 年 10 月、大阪)
- 6) Noguchi, A., Sato, M., Ishihara, K., Sato, K., and Hoshi, M.: Physiological solvent environments promoted A β assembly into amylospheroid (ASPD), 10-15-nm spherical A β aggregates with potent neurotoxicity (NEUROSCIENCE 2005, Nov. Washington D.C.)
- 7) 野口彰彦、佐藤道夫、佐藤一紀、星美奈子: 球状 β アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」形成に至る凝集経路と神経細胞死 (第 28 回日本分子生物学会年会、12 月、福岡)
- 8) Noguchi, A., Sato, M., Ishihara, K., Sato, K., and Hoshi, M.: Physiological solvent environments promoted A β assembly into amylospheroid (ASPD), 10-15-nm spherical A β aggregates with potent neurotoxicity

(PACIFICHEM 2005, Dec. Hawaii)

- 9) Ishihara, K., Sato, K., Sato, M., and Hoshi, M.: Production and characterization of gold-A β spheres of uniform size as a molecular resemblance of amylospheroid (ASPD), spherical A β aggregates with strong neurotoxicity (PACIFICHEM 2005, Dec. Hawaii)

H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし。

H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし。

機能的蛍光標識導入による β アミロイド蓄積過程の分析手法開発に関する研究

分担研究者 菊地和也 大阪大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

Rhodamine のアニリンのアミド型・アミノ型構造変化による、重なり積分変化をスイッチする FRET 型レシオ測定カルパインプローブをデザインし合成した。このプローブはカルパインとの反応によりレシオプローブとして機能することが示された。合成プローブの酵素反応特性を既存の非レシオ型プローブ LY-MCA と比較した結果、反応速度的に優れた結果を示し、パイオイメージングプローブとしての可能性があり、今までは捉えられなかったリアルタイムでの作用機序等の解明に貢献すると期待される。特に、アミロスフェロイド形成時におけるカルパイン活性の変化を示すことにより、 $A\beta$ 活性評価への貢献が期待される。

A. 研究目的

カルパインはカルシウム依存性プロテアーゼと呼ばれており、プロテアーゼ活性の発現にカルシウムを必要とする細胞内中性システインプロテアーゼである。カルパインはカルシウムによって活性化される細胞内の情報伝達経路の一員であると考えられているが必ずしもその役割、作用機序は明確ではない。特に $A\beta$ による毒性発現時におけるカルパイン活性を可視化し、アミロスフェロイド形成とカルパイン活性の相関について明らかにすることを研究目標とした。

現在、カルパイン活性の測定にはあらかじめ蛍光色素や放射性同位体で修飾した基質タンパクを用いて定量する方法が用いられており、これらの利点として感度が良いことが挙げられる。特に蛍光法は Ca^{2+} を始めとして、近年様々な分子のイメージングに用いられており、その感度の良さなどからイメージングに最も相応しい方法と考えられる。しかしながら、これまでの方法はラベル化した基質タンパクを用いるため測定環境は *in vitro* に限られる。そこで本研究ではカルパインをターゲットとした新規活性測定蛍光プローブの開発に着手した。さらに、それを用いてカルパインのバイオイメージング手法を確立し、カルパインの生体内におけるさらなる知見を得ることが最終目的である。

B. 研究方法

レシオプローブのデザインとしてバイオイメージングを目的としたときの利点等から、FRET 型プローブとすることにした。しかし、これまでのプローブは蛍光団同士がフレキシブルなペプチドリンカーで繋がれているため、色素会合による消光が起こる場合があるという欠点を持っている。そこで本研究では、蛍光団同士をリジッドなシクロヘキサンで繋ぎ、

重なり積分をスイッチとする検出原理を用いることにした。

重なり積分をスイッチとするためには、吸収特性の大きく変化するアクセプターが必要である。Förster 半径は $R_0=49$ (Å) と算出されるので、ドナー・アクセプター間距離が 20 (Å) 以下であることを考え合わせると、非常に高い効率で FRET が起こることになる。

また、酵素によって認識・切断されるペプチド配列を用いてカルパインとの酵素反応を行い、 K_m 、 k_{cat} を算出して比較検討した。その結果、どのペプチド配列においても既存プローブと比較し同程度のカルパインとの親和性、反応速度を示した。なお、ネガティブコントロールとして、他のプロテアーゼの基質である Phe-Ser-Arg-MCA プローブを用いて酵素反応を行った際は、この基質配列はカルパインによっては切断されないということを確認している。

酵素反応開始後、各時間にサンプリングしてプローブ濃度が $1.0 \mu M$ になるように希釈し、蛍光スペクトルを測定したところ、ドナーである coumarin の励起波長 400 nm で励起したところ coumarin 蛍光を示した。calpain I を添加したところ、coumarin 由来の蛍光が減少し蛍光波長がシフトしたことから、レシオプローブとして機能することが示された。

カルパインの蛍光基質として用いられている非レシオ型プローブ LY-MCA のカルパインに対する酵素反応特性を比較した結果、酵素反応速度は既存のプローブ LY-MCA より優れた結果を示した。

D. 考察

重なり積分変化をスイッチとすることで FRET 型レシオ測定カルパインプローブをデザイン・合成した。このプローブはカルパインとの反応により、レシオプローブとして機

能することが示された。今後、このプローブの生細胞内への応用によって、脳神経系におけるカルパイン活性と他のシグナル伝達物質の機能相関を明らかにすることを目的に研究展開を行う予定である。

E. 結論

レシオ測定が可能であるカルパイン活性測定蛍光プローブの開発に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1) K. Komatsu, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima & T. Nagano. Selective Zinc Sensor Molecules with Various Affinities for Zn^{2+} , Revealing Dynamics and Regional Distribution of Synaptically Released Zn^{2+} in Hippocampal Slices. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10197-10204 (2005)

2) L.A. van Meeteren, P. Ruurs, E. Christodoulou, J.W. Goding, H. Takakusa, K. Kikuchi, A. Perrakis, T. Nagano & W.H. Moolenaar. Inhibition of Autotaxin by Lysophosphatidic Acid and Sphingosine-1-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **280**, 21155-21161 (2005)

3) R.A. Colvin, P. Fontaine, D. Thomas, T. Hirano, T. Nagano & K. Kikuchi. Evidence for pH Dependent Zn^{2+} Influx in K562 Erythroleukemia Cells: Studies Using ZnAF-2F Fluorescence and $Zn^{65(2+)}$ Uptake. *Arch. Biochem. Biophys.*, **442**, 222-228 (2005)

国内外の招待講演

1) K. Kikuchi, Pacificchem 2005, "Visualization of Cellular Events Using Fluorescent Sensor Molecules" 2005年12月15日～20日, Hilton Hawaiian Village Hotel, ホノルル市, ハワイ州, アメリカ合衆国

2) 2nd Annual Symposium: Japanese-German Frontiers of Science, "Visualization and Manipulation of Cellular Events Using Fluorescence Sensor Molecules" 2005年11月2日～5日, 湘南国際村, 神奈川県葉山町

3) 第86日本化学会春季年会・特別企画講演「ダイナミックスピン：動的機能の創製と解析・制御」, 「スピンドイナミクス制御に基づく生体機能可視化センサー分子のデザイン・合成・応用」 2006年3月27日～30日, 日本大学, 習志野市

4) 分子研シンポジウム「生体における金属イオンの役割とその利用」, 「錯体化学を応用小用下生体機能可視化センサー分子のデザイン・

合成・生物応用」 2006年3月18日～20日, 分子科学研究所, 岡崎市

5) 第79回日本薬理学会年会・シンポジウム「創薬の未来を拓くケミカルバイオロジー」, 「細胞機能を可視化する化学プローブ」 2006年3月8日～10日, パシフィコ横浜, 横浜市

6) 第二回ケミカルバイオロジーシンポジウム, "Design Synthesis and Biological Application of Fluorescence Sensor Molecules Which Convert Biological Responses to Chemical Output" 2006年2月17日, 東京医科歯科大学, 文京区

7) 岡崎統合バイオサイエンスセンター5周年記念シンポジウム, 「細胞内イベントを可視化する化学プローブ」 2006年2月6日～8日, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市

8) 理研シンポジウム：第9回生体分子の化学, 「細胞機能を可視化するセンサー分子のデザイン・合成・生物応用」 2006年1月27日, 理化学研究所 大河内記念講堂, 和光市

9) 理研シンポジウム：モレキュラー・アンサンプル2005, 「可視化センサー分子の分子デザインと生物応用」 2005年11月28日～29日, 理化学研究所 大河内記念ホール, 和光市

10) 第14回バイオイメージング学会・シンポジウム, 「新規計測技術によるバイオイメージング」, 「 Eu^{3+} 錯体の蛍光強度制御に基づく時間分解蛍光イメージングシステム」 2005年10月26日～28日, 東京大学一条講堂, 東京都文京区

11) 化学工学会・第37回秋季大会・シンポジウム講演, 「物質創製アプローチによる可視化センサー分子の開発と生物応用」 2005年9月15日～16日, 岡山大学 キャンパス, 岡山市

12) 第11回機能性ホストゲスト化学研究会サマーセミナー, 「細胞機能を覗く分子デザイン」 2005年7月28日～29日, 立山国際ホテル, 富山県上新川郡立山町

13) 第40回天然物化学談話会, 「物質創製アプローチによる生きた状態の可視化解析」 2005年7月13日～15日, 熱川ホテル, 静岡県賀茂郡東伊豆町

14) 蛋白研セミナー, 「細胞機能を覗く分子デザイン」 2005年6月22日～23日, 大阪大学蛋白質研究所

15) 日本顕微鏡学会第61回学術講演会—「見る」極限への挑戦—シンポジウム「光でみる生命機構」, 「細胞機能の可視化と不活化のケミカルバイオロジー」 2005年6月1日～3日, つくば国際会議場, つくば市

蛍光相関法による抗体探索とタンパク質凝集リアルタイム測定に関する研究

分担研究者 金城政孝 北海道大学 電子科学研究所 助教授

研究要旨 アミロスフェロイド特異的抗体を用いて、剖検脳におけるアミロスフェロイドの存在を検証と、特異的抗体による早期診断系を開発するために以下の研究を行った。蛍光相関分光法（FCS）ならびに蛍光相互相関分光法（FCCS）による抗原抗体反応モデル系を構築し、通常の ELISA 法との比較を行った。モデル系としては組み換え牛プリオン蛋白質（rBoPrP）に対する検出限界値を検討した。また、今年度は凝集体形成を定量的に解析する方法としてこれまでの解析方法に加えて、分布関数を用いる方法の検討も行った。

A.研究目的

アミロスフェロイド特異的抗体を用いて、溶液中におけるアミロスフェロイド形成過程を蛍光相関分光法（FCS）と蛍光相互相関分光法（FCCS）を用いて検出する手法の確立を目指した。FCCSはFCSをさらに発展させた計測法である。2種類の色素と2個の検出器を用いることにより、試料中の2種類の蛍光強度のゆらぎ計測する。解析は相互相関関数を使って行われ、2種類の信号の同時性を評価する。今期はFCSおよびFCCSを用いて、特に緩衝溶液と牛脳抽出液中における組換え牛プリオン蛋白質（rBoPrP）に対する検出限界値を検討した。PrPを介して結合する2種類の抗PrP抗体の同時性を解析し、試料中のPrPの有無を判別できる。

また、アミロスフェロイドはAβが凝集して形成されているため、その凝集過程を拡散定数の分布としてとらえることが可能かどうか検討を行った。

B.方法

1) FCSの検出には、72-5から調製したFab'-Alexa532 (0.6 nM)と44B1 (50 nM)を用いた。60分間の反応時間の後、FCS測定を行った。検出の可否は、測定後に得られるパラメーターの1つ拡散時間を指標に決定した。

2) rBoPrPを用いて緩衝液中でのFCCSの検出限界値を決定した。検出には、Alexa488とAlexa647でそれぞれ蛍光標識した72-5 (0.1 nM)と44B1 (0.09 nM)を用いた。60分間の反応時間の後、FCCS測定を行った。検出の可否は、測定後に得られる相互相関関数の振幅を指標に決定した。ここで相互相関関数の振幅は、2色の蛍光標識された2つの物質が観察領域を同時に通過した場合に増加するパラメーターである。したがって、試料中にrBoPrPが存在する場合には、rBoPrPを介して72-5-Alexa532と44B1-Alexa647が複合体を形成し、観察領域を同時に通過する確率が増す。一方、

rBoPrPが存在しない場合には、その確率が小さい。

3) これまでFCSの測定で得られる分子の動きの成分は最大3つであると仮定してきた。これを一挙に多成分に拡張するには、これまでの方程式の成分を単純に増やすのではなく、新たなアルゴリズムを導入することが必要とされる。その一つは散乱測定に既に用いられ数々の成果を上げているCONTINを利用した。本年度はCONTINを蛍光相関分光の測定に利用できる形式、利用可能なインターフェイスを作成し、実際に分布として、凝集体を検出可能か検討を行った。

C.研究結果

1) FCSの測定結果は、緩衝液中でのrBoPrPの検出限界値は、FCS (MF-20、オリンパス)を用いた場合、 0.44 ± 0.13 nMであった。市販ELISAキットと比較した場合、緩衝液中でのELISAキットのBSEの検出限界値は、FCSよりも約2倍高かった。

2) 緩衝液中でのrBoPrPの検出限界値は、FCCS (MF-20、オリンパス)を用いた場合、 0.24 ± 0.10 nMであった。

さらに、rBoPrPを用いて牛脳抽出液中でのFCCSの検出限界値を決定した。検出には、72-5-Alexa488 (0.7 nM)と44B1-Alexa647 (0.6 nM)を用いた。測定結果は、緩衝液中でのrBoPrPの検出限界値は、FCCS (MF-20、オリンパス)を用いた場合、 0.29 ± 0.11 nMであった。一方、開発した小型FCCS装置の検出限界値は、緩衝液中と牛脳抽出液中でのrBoPrP、ともに 0.13 ± 0.03 nMであった。

3) 蛋白の凝集体をモデルとして、Aβを利用して凝集過程を解析した。時間とともに凝集する過程を分布関数として解析し、表現することができた。

また、膜タンパク質の凝集過程も解析を行い、シ

ヤペロンの有無により、膜タンパク質が凝集から解離、またはその逆過程を行うこと検出することができた。以上のように、本年度 CONTIN を用いた分布解析の方法の確立が行えた。

D. 考察

FCCS は FCS よりも約 2 倍感度が良いことが分かった。また、市販の BSE 検査用の ELISA キットと比較した場合、緩衝液中での ELISA-BSE の検出限界値は、FCCS よりも約 2 倍高かった。一方、牛脳抽出液中では、FCCS と ELISA-BSE の検出感度は、ほぼ同等であった。しかし、牛脳抽出液は自家蛍光を発しており、それが FCCS 測定に少なからず影響をあたえることが分かった。FCS を用いた抗原抗体反応の検出ではこれまでの ELIS 法と同等かそれ以上の検出感度があることが示された。分布関数を用いて FCS の結果を解析評価する方法は非常に有用であることがわかった。また、明らかになった問題点として、分布解析を行ううえで、一成分もしくは 2 成分を固定して解析する必要があることが判明した。これらは本法が細胞内微環境や生体分子間相互作用を解析するためには重要なため来年度も引き続き構築することを目指す。

E. 結論

蛍光相関分光法 (FCS) だけではなく蛍光相互相関分光法を用いたアミロスフェア形成過程の解析において、抗原抗体反応は非常に感度の高い方法である。しかしさらに感度の上昇を望むためには、特に力価の強い抗体の開発は最も重要であり、蛍光プローブや標識法の開発 (菊地) と密接に連携しながら進めることが必要である。

また、凝集体形成を定量的に行うためには、分布関数を用いることとともに、どのようなモデルを構築し、その評価を行うかが重要である。

G. 研究発表

1. 論文 (主要なもの)

Yasutomo Nomura a., Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura, Masataka Kinjo. Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy. Analytical Biochemistry 350 196-201, (2006)

中林孝和、飯森俊文、金城政孝、太田信廣
蛍光寿命イメージングシステムの作成と生体試料および高分子試料への応用
分光研究 55、 31-39 (2006)

Maya Hirose, Hideki Tohda, Yuko Giga-Hama, Reiko Tsushima, Tamotsu Zako, Ryo Iizuka, Changi Pack, Masataka Kinjo, Noriyuki Ishii, and Masafumi Yohda

Interaction of a small heat shock protein of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, with a denatured protein at elevated temperature
J. Biol. Chem.;280, 32586-32593 (2005)

Takashi Jin, Fumihiko Fujii, Hiroshi Sakata, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo
Amphiphilic p-sulfonatocalix[4]arene-coated CdSe-ZnS quantum dots for the optical detection of the neurotransmitter acetylcholine
Chem. Commun. 4300-4302 (2005)

Yasuo Takahashi, Ryuji Sawada, Kiyochika Ishibashi, Sinterou Mikuni and Masataka Kinjo
Analysis of Cellular Functions by Multipoint Fluorescence Correlation Spectroscopy
Current Pharmaceutical Biotechnology, 6, 159-156 (2005),

Takashi Jin, Fumihiko Fujii, Hiroshi Sakata, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo
Calixarene-coated water-soluble CdSe/ZnS semiconductor quantum dots that are highly fluorescent and stable in aqueous solution, Chem. Commun. 2829-2831 (2005)

2. 学会発表 (関連したもの)

Changi Pack and Masataka Kinjo
Studying dynamics of tandem GFPs at nucleus in living cell by fluorescence correlation spectroscopy. Prague Post Genome Technology Workshop (PPGT)
Prague, Czech Republic Monday June 6 - Tuesday June 7, (2005)

Masataka Kinjo
Study of Protein Dynamics in Living Cell Using Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy.
International Symposium on Molecular Nanotechnology
Nara
Nov.(2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

【発明の名称】膜構造を有する生体構造物の膜機能を解析する方法

公開番号特開 2005-241378 (P2005-241378A)

公開日平成 17 年 9 月 8 日 (2005. 9. 8)

出願番号特願 2004-50214 (P2004-50214)

出願日平成 16 年 2 月 25 日 (2004. 2. 25)

出願人氏名又は名称オリンパス株式会社

発明者：高橋 保夫、金城 政孝、田村 守

霊長類モデルを用いたアルツハイマー病におけるアミロスフェロイドの病態形成機序の解明と治療法の開発
に関する研究

分担研究者 村松慎一 自治医科大学・内科学講座神経内科部門 助教授

研究要旨

認知症（痴呆症）の主要な原因であるアルツハイマー病の発症には、球状の β アミロイド蛋白（アミロスフェロイド）が関与していると推察される。アミロスフェロイドの病態生理学的意義を明らかにし、アルツハイマー病の早期診断と治療法を開発することを目標として研究を行った。カニクイサルのES細胞から神経細胞を分化誘導し各分化段階におけるアミロスフェロイドの毒性を検討した。その結果、未分化細胞ではほとんど毒性はなく分化した神経細胞に選択的に強い毒性を示すことが判明した。アミロスフェロイドの生体内における病態を解析するために、実験動物の脳内で神経細胞特異的に β 蛋白を発現することにより持続してアミロスフェロイドを供給できると考えられるアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを開発した。また、老齢カニクイサルの記憶容量を食事回収課題により評価した。今後、これらの系を応用してモデル動物を作製するとともに、脳内のアミロスフェロイドの病態解析を継続する。

A. 研究目的

アルツハイマー病は、近年の高齢化人口の増加に伴い重要な社会問題となっている認知症（痴呆症）の主要な原因である。アルツハイマー病では、脳内に β アミロイド蛋白の蓄積が認められ、 β が神経細胞死を引き起こすと考えられている。 β の神経毒性の機序を解明することは、アルツハイマー病の発症予防および治療法の開発のために重要である。

本研究では、 β が球状の構造（アミロスフェロイド）をとることにより毒性を発揮するという星らの仮説を霊長類のモデルにより検証することを目的としている。

B. 研究方法

(1) 霊長類神経細胞における毒性の検証

カニクイサルのES細胞を使用して、ラットおよびマウス胎児の初代培養グリア細胞の条件培地中で浮遊培養する方法により効率よく大量の神経細胞を分化誘導した。未分化細胞、神経幹細胞、神経細胞の各段階において培地中にアミロスフェロイドを添加し、細胞毒性の有無を検討した。

(2) 神経細胞特異的遺伝子導入ベクターの開発

神経細胞特異的なプロモーターとしてCaMKあるいはSynIプロモーターによりGFPを発現する各種の血清型のアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作製し、マウス海馬への遺伝子導入を行った。

(3) 老齢サル認知機能評価

アミロスフェロイド形成による認知機能の変化を検出する評価法を確立するために、記憶に基づいて9穴から順次リンゴ片を回収するときの誤動作を測定する食事回収課題を老齢サルに施行した。

C. 研究結果

(1) 神経細胞に選択的な毒性

カニクイサルのES細胞から分化誘導した神経細胞の培地中に10 μ Mのアミロスフェロイドを添加すると、40時間後には生存細胞数は20%にまで減少した。一方、未分化ES細胞とNestin陽性の神経前駆細胞では、細胞数に変化はなかった。

(2) 神経細胞特異的遺伝子導入ベクターの開発

神経細胞特異的なSynIプロモーターを搭載した5型AAVあるいは8型AAVを使用することにより、マウス海馬の神経細胞に効率よく遺伝子導入が可能であった。これらの結果に基づきアルツハイマー前駆体蛋白(APP)を発現するAAVベクターを作製した。

(3) 老齢サルの認知機能の評価

食事回収課題により老齢サルの記憶容量は連続正ストローク数として測定可能であった。

(倫理面での配慮)

動物個体での実験手法は、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、総理府「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、文部省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、当施設のガイドラインに従って行った。

D. 考察

ヒトおよびサルの神経細胞は、マウスなどの小動物と異なり初代培養細胞を得ることが困難である。そこで、カニクイサルのES細胞から大量の神経細胞を分化誘導した。アミロスフェロイドの添加実験では、分化した神経細胞にのみ細胞毒性が認められ、未分化ES細胞や神経前駆細胞には明らかな細胞毒性は認められなかった。このことは、霊長類の神経細胞に対してアミロスフェロイドが特異的な傷害作用を示したものと考えられる。現在、毒性発現に関

わる分子機構を明らかにすべく、それぞれの分化段階の細胞からmRNAを抽出し、カニクイサルのDNAマイクロアレイによる解析を行っている。

昨年度までの研究で、カニクイサルの脳内へのアミロスフェロイドの単回注入では、明らかな毒性は認められなかった。培養細胞と異なり、脳内では手術操作による一時的な炎症とそれによるアミロスフェロイド除去反応が生じる可能性などが考えられるため、持続してアミロスフェロイドを作用させることが望ましい。そのため、AAVベクターによりAPPを発現させる方法を開発することにした。2型あるいは3型AAVベクターを使用すれば神経細胞にほぼ選択的に遺伝子導入できるが、SynIプロモーターを使用することで神経細胞特異的にAPPを発現できる。

モデルサルの作製にあたり認知障害の有無やその程度を評価する系は必須であるが、食事回収課題により高齢ザルの記憶容量について測定できることが明らかになった。

E. 結論

アルツハイマー病におけるアミロスフェロイドの神経細胞に対する毒性の発現機構の解明を目標として研究を行った。カニクイサル ES 細胞を応用した実験によりアミロスフェロイドは分化した神経細胞に対し選択的な毒性を示すことが明らかになった。神経細胞特異的に APP を発現する AAV ベクターを作製し、老齢サルの記憶容量の評価法を開発した。今後、これらの系を使用して研究を継続する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I and Ozawa K: Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors. *Exp Opin Biol Ther*, 5(5):663-671,2005.
2. Maruyama M, Higuchi M, Takaki Y, Matsuba Y, Tanji H, Nemoto M, Tomita N, Matsui T, Iwata N, Mizukami H, Muramatsu S, Ozawa K, Saido TC, Arai H and Sasaki H: Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 57(6):832-842,2005.
3. Liu Y, Okada T, Sheykholslami K, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu S, Kanazawa T, Takeuchi K, Ajalli R, Mizukami H, Kume A, Ichimura K and Ozawa K: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther*,12(4):725-733,2005.
4. Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K and

Muramatsu S: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther*,13(1):160-166,2006.

5. Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K and Hanazono H: Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. *Stem Cells*, *in press*.
6. 奈良優子, 村松慎一: パーキンソン病の再生医療. 特集 治療の最前線: 神経疾患の先端的治療: *Brain Medical*:17:41-45:2005

2. 学会発表

1. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療と細胞移植. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005年5月26日.(プログラム P 34)
2. Liu Y, et al.: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. The American society of gene therapy's 8th annual meeting. Minneapolis, June 3, 2005.
3. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療. 第23回日本神経治療学会総会, 鳥羽市, 2005年6月9日.(プログラム P 10)
4. 村松慎一: AAV ベクターによるパーキンソン病の遺伝子治療. (AAV vectors for the treatment of Parkinson's disease) 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005年7月27日.(プログラム P 57)
5. Muramatsu S, et al.: *In vivo* assessment of transgene-mediated dopamine synthesis by positron emission tomography in a primate model of Parkinson's disease. The Japan society of gene therapy's 11th annual meeting. Tokyo, July 29, 2005. (abstract p23).
6. Muramatsu S, et al.: Gene therapy for Parkinson's disease: Strategies for clinical applications. The 2nd Nikko International Symposium 2005. Nikko, September 30,2005. (abstract p20-21).
7. Sato T, et al. Activity of 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase, the second enzyme for biosynthesis of tetrahydrobiopterin, in the brain. 第78回日本生化学会大会, 神戸, 2005年10月22日.
8. Muramatsu S, et al.: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. Society for Neuroscience's 35th Annual Meeting, Washington, DC, November 14, 2005.
9. 村松慎一 他: 血友病遺伝子治療を目指した遺伝子発現制御 AAV ベクターの開発. 第28回血栓止血学会学術集会, 福岡, 2005年11月24日.
10. 村松慎一 他: パーキンソン病の遺伝子治療. 第45回日本定位・機能神経外科学会, 埼玉, 2006年1月20日. (プログラム P 69)

H. 知的財産権 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻号	ページ	出版年
Muramatsu S, et al.	Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors.	Exp Opin Biol Ther	5(5)	663-671	2005
Maruyama M, et al.	Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease.	Ann Neurol	57(6)	832-842	2005
Liu Y, et al.	Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector.	Mol Ther	12(4)	725-733	2005
Watanabe, A., Okahata, Y., Furusawa, H., Hoshi, M. and Sakurai, M.	The effect of Trehalose on the aggregation of β -amyloid	Cryobiology and Cryotechnology	51	137-140	2005
Li XG, et al.	Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease.	Mol Ther	13(1)	160-166	2006
Shibata H, et al.	Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting.	Stem Cells			in press
K. Komatsu, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima & T. Nagano	Selective Zinc Sensor Molecules with Various Affinities for Zn^{2+} , Revealing Dynamics and Regional Distribution of Synaptically Released Zn^{2+} in Hippocampal Slices.	<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	127	10197-10204	2005
R.A.Colvin, P. Fontaine, D. Thomas, T. Hirano, T. Nagano & K. Kikuchi	Evidence for pH Dependent Zn^{2+} Influx in K562 Erythroleukemia Cells: Studies Using ZnAF-2F Fluorescence and $Zn^{-65(2+)}$ Uptake.	<i>Arch. Biochem. Biophys.</i>	442	222-228	2005
L.A. van Meeteren, P. Ruurs, E. Christodoulou, J.W. Goding, H. Takakusa, K. Kikuchi, A. Perrakis, T. Nagano & W.H. Moolenaar	Inhibition of Autotaxin by Lysophosphatidic Acid and Sphingosine-1-phosphate.	<i>J.Biol. Chem.</i>	280	21155-21161	2005
Nirthanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph, J. S., Sato, K., and Tytgat, J.	Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to κ -KTx1.3, a non-toxic homologue of κ -hefutoxin-1, from <i>Heterometrus spinifer</i> venom.	Biochemical Pharmacology	69	669-678	2005
Yasutomo Nomura,, Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura ,	Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy.	Analytical Biochemistry	350	196-201	2006