

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第 1 分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭 金正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭 金正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究



## アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索の ための、APP細胞内ドメインの機能解析

所属 信州大学医学部、人体構造学・講師  
主任研究者 中山 耕造

### 1. 研究要旨

我々は前年度に、APPの細胞内ドメイン(APPIC)が、 $\gamma$ -セクレターゼによって細胞膜から切り出されて細胞質へと放出され、さらに核へと移行することを示している。また、核へ移行したAPPICは、転写因子E2F1に結合することを示している。本年度、我々は、APPICの核移行は神経細胞特異的であることを明かにした。また、核に移行したAPPICがE2F1に結合することにより、アポトーシスを引き起こす事を明かにした。さらに、E2F1遺伝子のSNPを用いた遺伝子相関解析を行い、ADのリスク要因である *apolipoprotein E* 遺伝子の  $\epsilon 4$  allele (APOE4) を有する者では、E2F1がADのリスクに関与している可能性を示唆した。これらの結果から、E2F1のアルツハイマー病への関与の可能性が考えられた。

### 分担研究者

- (1) エーザイ株式会社シーズ研究所  
佐藤 俊孝
- (2) 国立病院機構・久里浜アルコール症センター  
樋口 進

### 2. 研究目的

アルツハイマー病(AD)は加齢に伴って発症し、現在のところ有効な治療法もない。高齢化社会において、有効な治療法の開発は急務であり、新規の創薬ターゲット分子を見いだすためにも、新しい観点からの病因の解明に期待が寄せられている。

NotchとDeltaは共に膜蛋白質で、神経細胞の分化を調節している。また、アルツハイマー病(AD)やCADASIL等の疾患との関連も報告されており、近年注目されるようになった。現在までは、Deltaは単なるNotchのリガンドであり、その細胞内ドメインに機能はないと考えられていた。しかしながら、我々は、Notch同様にDeltaの細胞内ドメインも $\gamma$ -セクレターゼによって切り出され、核に移行することを示した。さらに、核に移行したDeltaの細胞内ドメインは、転写因子Smadに結合して転写を調節することも示している。

近年になって、多くのI型膜蛋白質が $\gamma$ -セクレターゼによって切断され、細胞内ドメインが膜から切り出されることが知られてきている。従って、ある種のレセプター膜蛋白質ではDelta同様に、シグナルを受け取ると最終的に $\gamma$ -セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出され、それが核に移行し、

転写因子に結合して転写を調節することはある程度一般化されるのではないかと考え、 $\gamma$ -セクレターゼによって調節されるシグナル伝達機構が広く存在する可能性を提唱している。

$\gamma$ -セクレターゼは、もともとAmyloid Precursor Protein (APP)を切断する酵素として発見されたものである。APPに関しても、国外の複数のグループから、 $\gamma$ -セクレターゼによって切断され、細胞膜から切り出された細胞内ドメインが核に存在することが報告されている。これらのことから、我々は現在のところ生理的機能があまり解析されていないAPPも $\gamma$ -セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出されることに注目して、NotchやDeltaと同様に、切り出された細胞内ドメインが核に移行して特定の遺伝子の転写を調節しており、それがADに関係している可能性を考えて研究している。

これらの結果を基に、本研究の直接的な目的は、APPの細胞内ドメインの機能解析にあり、具体的には以下の3点に焦点を絞って研究を進めている。

- (1) APPの細胞内ドメインの生理的機能の解析
- (2) APPの細胞内ドメインと結合する蛋白質の同定
- (3) アルツハイマー病における、APPの細胞内ドメインの病態への関与の可能性の検討

### 3. 研究方法

APPの細胞内ドメインを発現する embryonic carcinoma 細胞 (P19細胞) の作製と神経細胞へ

### の分化誘導に伴う細胞死の判定

昨年度、APPの細胞内ドメイン(APPIC)をコードするcDNAとFLAG遺伝子を連結した発現ベクターをP19細胞に導入し、パーマネントラインを確立した。コントロールとして、発現ベクターのみを導入したP19細胞も同様に作製した。さらに、全長のAPPを発現するP19細胞も作製した。本年度は、これらの細胞を実験に用いた。

P19細胞の神経細胞への分化誘導は、レチノイン酸処理後、通常の細胞培養用のプレートに撒き直して培養することでおこなった。この方法で、90%以上のP19細胞が、神経細胞へと分化した。

細胞の生死は、トリパンブルーによる染色で判断している。またアポトーシスの判定は、常法に従って、DNAの断片化を電気泳動により観察した。更に、TUNEL法によって断片化したDNAをFITCでラベルし、サイトフローメトリーを用いて、アポトーシスをおこしている細胞を定量した。

### RNAiによるE2F1発現の阻害

E2F1の発現を阻害するために使用するsiRNAとして、B-Brige社(カリフォルニア)のプログラムを用いて、5種類の配列をデザインした。これらの配列を、pSuper.gfp/neoベクターにクローニングした。このベクターはH1プロモーターによってsiRNAを発現し、かつPGKプロモーターによりEGFPを発現する。従って、EGFPの緑色の蛍光を発する細胞は、siRNAをも発現している事になる。

これら5種類の発現ベクターをE2F1発現ベクターと共にCos7細胞にトランスフェクションし、抗E2F1抗体を用いてウエスタンブロットイングして、E2F1発現阻害の効率を調べた。その結果、2種類のsiRNA発現ベクターが90%以上の発現阻害を示したので、この2種を実験に用いた。

### E2F1遺伝子の相関解析

対象はNINCDS-ADRDAの“probable”ADの基準を満たす日本人の孤発型の臨床AD症例284例である(男性:87例、女性:197例、平均年齢±標準偏差75.3±9.0歳)。正常コントロールは年齢・性をマッチさせた日本人274名である(男性:96名、女性:178名、73.9±5.3歳)。全てのコントロールの認知機能は、Mini-Mental Stateテスト(MMSE)で正常域に入っている。

今回相関解析に使用したSNPはrs2071056で、exon4と5の間(exon5の5'のexon/intron境界から約160bp上流)のintronに存在する。相関解析は、AD群とcontrol群のみの比較だけでなく、性、ADの発症年齢、APOE4の存在の有無等で層化して検討した。

### アフィニティークロマトグラフィーによるAPP細胞内ドメイン結合タンパク質の単離と同定

神経細胞への分化特異的に、APPの細胞内ドメインに結合するタンパク質があるのか否かについて、

<sup>35</sup>S-Metラベルによる実験を行った。P19細胞をα-MEM培地で培養後、レチノイン酸添加、未添加群に分け、リプレATINGした。1日培養後、<sup>35</sup>S-Metを添加して終夜培養し、細胞内タンパク質をラベルした。培養後の細胞はホモジナイズ後に可溶性画分と膜画分に分け、それぞれの画分に大腸菌に発現させ精製したGST-APPICフュージョン蛋白質を添加してインキュベートした後、グルタチオンセファロース(GEバイオサイエンス)を用いて細胞内ドメイン-タンパク質複合体を回収した。結合タンパク質は、バッファーでセファロースを洗浄後、NaCl濃度を段階的に高くすることにより溶出した。

LC/MSによるタンパク質の同定は、LTQ(サーモエレクトロン)を用い、解析用ソフトウェア Mascotを用いて行った。

その他の実験方法は、通常の方法でおこなった。

### (倫理面への配慮)

ヒトの試料を用いる研究は、厚生労働省の臨床研究の倫理指針に従って、国立療養所久里浜病院・臨床研究部で限局しておこなった。

## **4. 研究結果**

### APPの細胞内ドメイン(APPIC)は、神経細胞に選択的な細胞内毒性を持つ

前述した仮説が正しいならば、APPICは細胞内毒性を持つことになる。この点を調べるため、APPIC及び全長のAPPを発現するembryonic carcinoma細胞(P19細胞)をレチノイン酸処理し、その後レチノイン酸を除くことにより神経細胞へと分化誘導した。その結果、発現ベクターのみを持つコントロール細胞同様に、90%以上の細胞が神経細胞へと分化した。全ての細胞において、分化誘導後2日目には突起を伸ばした神経細胞が認められた。

培養を続けると、コントロール細胞では細胞が増殖しながら神経細胞へと分化し続け、多数の神経細胞が出現した。しかしながら、APPIC及び全長のAPPを発現するP19細胞の場合、培養を続けると明らかに死んでいる細胞が多数出現し、1週間後には、全ての神経細胞が死滅した。

細胞がどのように死んでいるのかを調べるために、分化誘導後3日目、4日目、5日目に細胞を回収し、トリパンブルーで染色して死細胞数を数えた(図1)。その結果、コントロール細胞はこの期間を通して10%以下の細胞しか死んでいなかった。しかしながら、APPIC及び全長のAPPを発現するP19細胞の場合、3日目にはコントロールと同程度の死細胞しかないにもかかわらず、その後、明らかに死細胞が増えていた。細胞死数は、APPICを発現する細胞の方が全長のAPPを発現するP19細胞よりも倍程度多かった。従って、APPICは、神経細胞に選択的な細胞内毒性を持つと考えられた。

ここでみた細胞死がアポトーシスによるものかどうか調べるために、断片化した DNA を回収し電気泳動をおこなった (図 2)。その結果、全長の APP を発現させた細胞と細胞内ドメインのみを発現させた細胞では、神経細胞への分化に伴って、DNA のラダーが観察された。さらに、分化誘導後 4 日目に TUNEL 法で断片化された DNA を FITC でラベルし、フローサイトメーターで陽性細胞の割合を測定した (データは、示さない)。その結果、コントロールでは 4% 程度の細胞しか陽性でなかったが、APPIC を発現した細胞では 36.8% が TUNEL 陽性となった。従って、この細胞死はアポトーシスによっておこっていると結論できた。

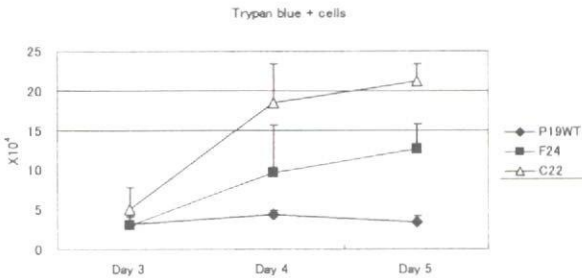


図 1、全長の APP(F24)と APPIC (C22)を発現した P19 細胞の神経分化誘導後の死細胞数。P19WT は発現ベクターのみを導入したコントロール細胞。

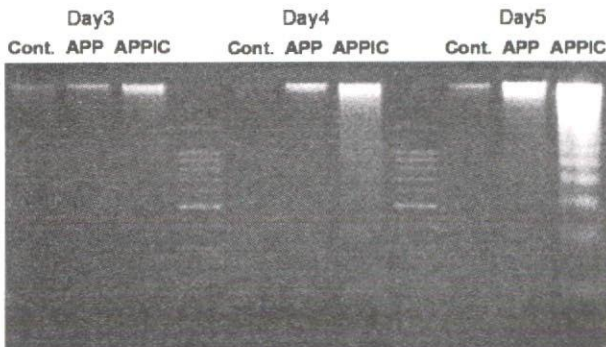


図 2、DNA の断片化。全長の APP を発現させた細胞 (APP) と細胞内ドメインのみを発現させた細胞 (APPIC) では、神経細胞への分化に伴って、DNA のラダーが観察され、アポトーシスが起きていることが明らかとなった。

### APPIC は、核に存在する

前述したように、我々は APP も Notch や Delta 同様に、 $\gamma$ -セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出され、切り出された細胞内ドメイン (APPIC) が核に移行して特定の遺伝子の転写を調節しているのではないかと考えている。もしこの仮説が正しければ、APPIC は核に存在するはずである。

実際、傷害された脳において、APPIC が核に存在しているという論文が、国外から多数だされている。

前年度、我々も、抗 APPIC 抗体を用いて、8 週齢の正常雄マウス大脳皮質の免疫染色をおこなった。その結果 1 割以下の神経細胞ではあるが、核がこの抗体で染色される事が明らかとなった。

前述したように、APPIC を発現する P19 細胞は、神経細胞に分化するとアポトーシスで死ぬが、未分化の状態では細胞死をおこさない。その原因を明らかにするため、本年度は図 3 で示すように、抗 APPIC 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、未分化な状態では APPIC は細胞質にあるが、神経細胞へと分化させると核に存在するようになることが明らかになった。この結果は、神経細胞に特異的な細胞死は、APPIC が核にあることによって生じることを示しており、細胞質から核への輸送が重要であると考えられる。

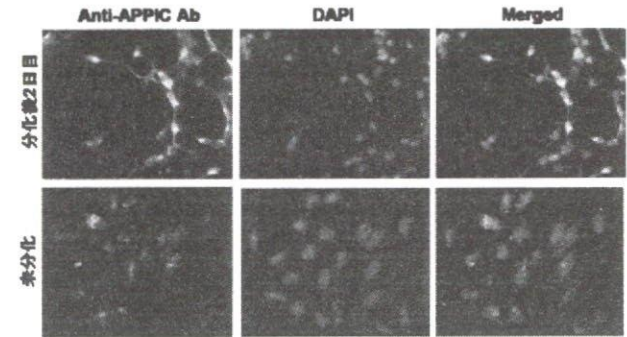


図 3、APPIC は、神経細胞では核に存在する。緑色は、抗 APPIC 抗体による染色を示す。青色は、DAPI による核染色。

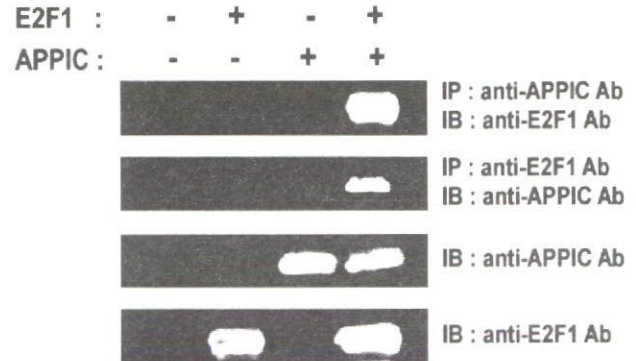


図 4、共免疫沈降により、E2F1 と APP 細胞内ドメイン (APPIC) の結合を示す。IP:免疫沈降、IB:ウエスタン

### APP の細胞内ドメインに結合する、転写因子の同定

転写因子は一般的に量が少なく、通常の方法では検出できない可能性が高い。この点を克服するために、前年度の報告書で詳しく述べたように、新規の方法を開発した。そのスクリーニング法を用いて、E2F1 が APPIC 結合転写因子として概に同定されている。この方法を用いた場合、成体マウスの脳の核蛋白では E2F1 は強いシグナルを生じるが、胎子の脳の核蛋白では全くシグナルを示さない。この結果は、E2F1 と APPIC が成体脳の核内で、複合物を形成して存在することを強く示唆している。

本年度は、E2F1 と APPIC の結合を確認するために、E2F1 と APPIC の発現ベクターを Cos7 細胞に導入して、免疫沈降をおこなった。図 4 に示すように、発現ベクターのみを導入したコントロール及び、E2F1 もしくは APPIC の発現ベクターのみを導入した Cos7 の場合、シグナルは検出できない。しかしながら、E2F1 と APPIC の両方の発現ベクターを導入した場合、強いシグナルが検出できた。この結果は、E2F1 と APPIC が結合することを明確に示している。

#### APPIC による細胞死は、E2F1 に依存している。

E2F1 は、アポトーシスや細胞周期を調節する転写因子である。多くの神経細胞において、E2F1 を強制発現すると細胞死がおこなうことが知られている。従って、APPIC が結合することにより E2F1 の活性に何らかの変化がおき、その結果として神経細胞死を引き起こす可能性が考えられ、AD との関係が興味深い。

前述した APPIC を強制発現させた P19 細胞をモデルに用いて、RNAi(siRNA)発現ベクターを導入することにより E2F1 の発現を阻害して、神経細胞への分化誘導に伴って起こる細胞死が、転写因子 E2F1 に依存するかどうかを調べた(図 5)。神経細胞に分化させて細胞死を誘導したところ、RNAi を発現しないコントロールでは、ベクターが導入されているかどうかにかかわらず、少数の細胞のみが生き残っていた。一方、RNAi 発現ベクターを導入した場合、ベクターが導入された細胞が多数生き残っていることが明らかとなった。

従って、この細胞死は E2F1 に依存している可能性が高いと考えることができた。

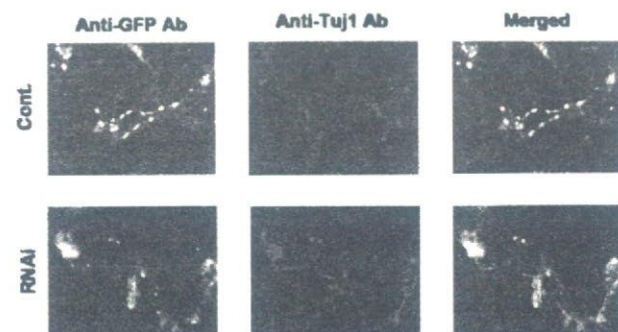


図 5、RNAi による E2F1 の発現阻害の、神経細胞死に対する影響。発現ベクターには EGFP も組み込んであり、導入された細胞は緑色の蛍光を出す。赤色の蛍光は、神経細胞のマーカー Tuj1 陽性細胞を示す。siRNA を導入された細胞は、多数が生き残っている。

#### アルツハイマー病(AD)における、E2F1 遺伝子の解析

これら一連の研究は、E2F ファミリー、特に E2F1 がアルツハイマー病 (AD) のリスクに関係してい

ることを示唆している。そこで、本研究ではまず、臨床的に AD と診断された症例を用いて、E2F1 遺伝子 coding region の sequencing を行い、AD に特異的な genetic variation が存在するか確認した。

Sequencing の対象とした症例はすべて日本人の AD 症例である。AD は臨床的に診断されたものであり、全症例が National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) が制定した “probable” AD の基準を満たしている。E2F1 の sequencing の対象としたのは表 1 に示した 12 例の孤発 AD 症例である。Apolipoprotein E 遺伝子の  $\epsilon 4$  allele (APOE4) は、AD の強力な遺伝的リスク要因である。そこで、この影響を除外する意味で、我々の有する AD 症例の中で、APOE4 を有さない症例を sequencing の対象とした (表 1)。

しかしながら、12 例の AD 症例における E2F1 遺伝子の sequencing の結果、variation は同定できなかった。既に知られているアミノ酸置換を伴う変異 (例えば、His252Arg, Met276Val, Asn311Thr, Ser393Arg など) も同定できなかった。この点については、後で議論したい。

表 1. E2F1 gene の sequence を行った対象者

No	Sex	Age	Diagnosis	APOE
1	男性	87	AD	3/3
2	男性	59	AD	3/3
3	女性	89	AD	3/3
4	女性	81	AD	3/3
5	女性	87	AD	3/3
6	女性	73	AD	3/3
7	女性	86	AD	3/3
8	男性	81	AD	3/3
9	女性	66	AD	3/3
10	男性	76	AD	3/3
11	女性	80	AD	3/3
12	女性	60	AD	3/3

さらに、既報の E2F1 遺伝子の SNP の中で informative な SNP を用いて、case-control デザインの遺伝子相関解析を行った。

AD 群と control 群で rs2071056 (T/C の SNP) の genotype および allele 頻度を比較した。しかし、全体、性別、発症年齢別のいずれも差は認められなかった。

しかしながら、APOE4 の有無による比較では差が見られた。APOE4 は AD の遺伝的リスク要因である。APOE4 の存在は、AD の発症年齢を早めることが確認されている。そこで APOE4 の confounding 効果を除外するために、APOE4 の

有無で、AD および control を層化して、T/C の分布を比較した。その結果、APOE4 を有さない群の比較では、差が認められなかった。しかし、APOE4 を有する群間の比較では、AD 群で T allele の頻度が有意に高かった (表 2)。

表 2. E2F1 gene の rs2071056 をマーカーとしたアルツハイマー病と健常者の遺伝子相関研究結果 (APOE genotype 別)

	Genotype			Allele	
	T/T	T/C	C/C	T	C
E4(-)	43	69	21	155	111
AD	(32.3)	(51.9)	(15.8)	(58.3)	(41.7)
Control	80	111	32	271	175
	(35.9)	(49.8)	(14.4)	(60.8)	(39.2)
E4(+)	65	65	21	195	107
AD	(43.1)	(43.1)	(13.9)	(64.6)	(35.4)
Control	15	22	14	52	50
	(29.4)	(43.1)	(27.5)	(51.0)	(49.0)

- a) APOE 遺伝子の genotype の分類は、APOE4 の有無に従って分類した。  
 b) 表中の数字は実数。その下の括弧内の数字は、それぞれ genotype、allele 間の比較におけるパーセント。  
 a) APOE4(-)群では、AD と control の比較で、genotype、allele ともに有意差なし。しかし、APOE4(+ )群では、genotype で  $\chi^2=5.826$ ,  $P=0.054$ , allele で  $\chi^2=5.926$ ,  $P<0.025$ 。

#### アフィニティークロマトグラフィーによる APPIC 結合タンパク質の単離と同定

<sup>35</sup>S-Met を培地に加え、P19 細胞をラベルした。その細胞から各フラクションを調整し、GST-APPIC フュージョン蛋白質をもちいて結合蛋白質を検索した (図 6)。

この図から明らかなように、分化後の細胞質画分において、分子量 50,000 付近に非常に特異的で顕著なバンドを認めた (①)。そしてこのバンドに相当するタンパク質は、NaCl 濃度を高くすることで、細胞内ドメインから溶出されることが明らかになった (②、③)。また、膜画分においても、分子量 105,000 付近に特徴的なバンドを認めた (①。このタンパク質は、細胞質画分にも認める)。なお、コントロールとして GST 蛋白質のみを用い、これらの蛋白質は単独の GST には結合しないことを確認してある。

そこでこれらのタンパク質を同定するために、マウス脳ホモジネートを用いて、タンパク質を大量に回収した (図 7)。

この図から明らかなように、マウス脳を用いても分子量 50,000 付近のタンパク質が顕著に回収され (矢印)、分子量 105,000 付近のタンパク質は、NaCl 濃度 0.3-0.4M 付近に認められた。

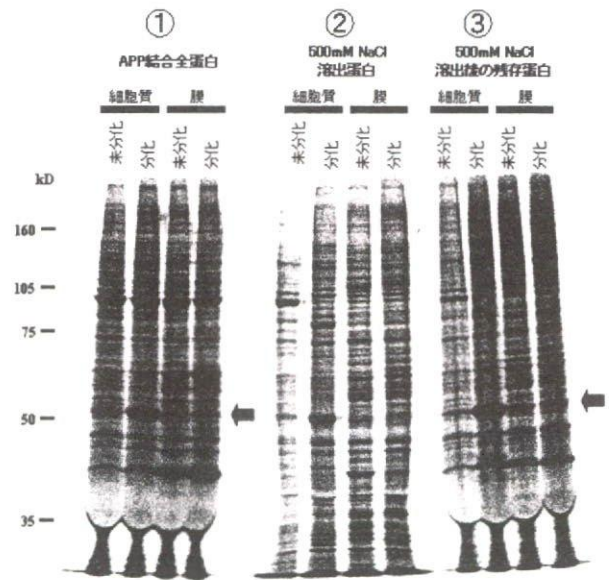


図 6、<sup>35</sup>S-Met ラベルによる細胞内ドメイン結合タンパク質の検索。分子量 50,000 に強いバンドが見られた (矢印)。

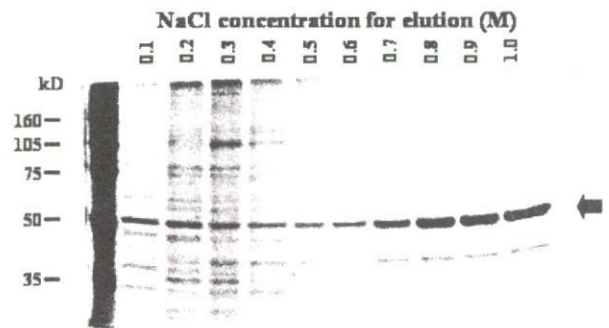


図 7、マウス脳を用いた細胞内ドメイン結合蛋白質の精製。分子量 50,000 程度の蛋白質が精製された。

これらのタンパク質を質量分析で解析した結果、分子量 50,000 付近のタンパク質は、 $\beta$  チュブリンであることが明らかとなった。また分子量 105,000 付近のバンドについては、Nucleolin, Adapter-related protein complex 2 beta 1 subunit, Alpha-actinin 1 等のタンパク質が同定された。

そこでまず、分子量 50,000 付近のタンパク質が確かに  $\beta$  チュブリンであることを確認するために、脳に多く存在するクラス III  $\beta$  チュブリンを認識する抗 Tuj 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、免疫沈降により回収されたタンパク質は、Tuj 抗体で強く染色された。また、クラス III  $\beta$  チュブリンが APPIC に結合する事は、免疫沈降を用いて明らかにしている (データは、示さない)。

## 5. 考察

我々は Notch や Delta の解析結果から、 $\gamma$ -セクレターゼによって、I 型膜蛋白質の細胞内ドメインが切り出され、切り出された細胞内ドメインが核に移行して特定の転写因子に結合し、遺伝子の転写を調節するという新しいシグナル伝達様式を提唱している。また近年知られてきたように、APP や Notch、Delta のみならず多くの I 型膜蛋白質が  $\gamma$ -セクレターゼによって切断されることから、このシグナル伝達様式は広く使われているのではないかと考えている。

生理的機能があまり解析されていない Amyloid Precursor Protein (APP) も同様のシグナル伝達の様式をとるとする仮説のもと、これがアルツハイマー病(AD)に関係している可能性を考えて研究している。

我々の  $\gamma$ -セクレターゼによって調節されるシグナル伝達の仮説が正しくて、かつ AD に関係しているのならば、APP の細胞内ドメイン (APPIC) は、細胞内毒性を持つはずである。その点を明らかにするために、APPIC 及び全長の APP を強制発現する embryonic carcinoma 細胞 (P19 細胞) を作製し、神経細胞へと分化誘導した。

コントロール細胞では細胞が増殖しながら神経細胞へと分化し続け、多数の神経細胞が出現した。しかしながら、APPIC 及び全長の APP を発現する P19 細胞の場合、神経細胞に分化すると細胞死をおこした (図 1)。また、図 2 に示したように、細胞死に伴い明確に DNA ラダーを認めた。フローサイトメーターで、陽性細胞の割合を定量した。その結果、コントロールでは 4% 程度の細胞しか陽性でなかったが、APPIC を発現した細胞では 36.8% が TUNEL 陽性となった。

従って、APPIC は、神経細胞に選択的にアポトーシスを誘導することになる。

我々の仮説が正しいならば、APPIC は核に存在するはずである。実際、傷害された脳では、APPIC が核に存在するという多数の報告がある。

図 3 に示したように、未分化な細胞では APPIC は細胞質に限局されるが、神経細胞への分化に伴って核に存在するようになる。これは APPIC が、神経細胞選択的に細胞質から核へ輸送される可能性を示している。

これらの結果から、APPIC を核に輸送するメカニズムが神経細胞選択的に存在しており、未分化な細胞では APPIC は細胞質にあるために毒性を出さないが、神経細胞では核に輸送されるためにアポトーシスを誘導する可能性が高い。

APPIC が核に存在することは、Delta 同様に、核内で転写因子に結合し転写を調節している可能性を示唆している。この点を明らかにするために、昨

年度、我々が開発した新しい方法でスクリーニングをおこない、APPIC に結合する転写因子として E2F1 を同定した。本年度は、免疫沈降によって、E2F1 と APPIC の結合を確認した (図 4)。

E2F1 は、アポトーシスや細胞周期を調節する転写因子である。多くの神経細胞において、E2F1 を強制発現すると細胞死がおこることが知られている。また、通常は神経細胞での発現は極めて低いが、神経細胞死の直前に、発現が上昇することが多数報告されている。従って、APPIC が結合することにより E2F1 の活性に何らかの変化がおき、その結果として神経細胞死を引き起こす可能性が考えられ、AD との関係が興味深い。

実際、図 5 に示したように、siRNA を用いて E2F1 の発現を阻害することにより、神経細胞への分化誘導に伴って起こる細胞死が回避できた。従って、神経細胞選択的に、核に移行した APPIC は E2F1 に結合し、E2F1 に何らかの影響を与えることでアポトーシスを誘導していると考えられる。

これらの細胞レベルでの結果が、実際の AD の発症を反映しているのかを検討する第一歩として、昨年度、AD 脳における E2F1 の発現を調べた。大脳皮質の委縮が進んだ典型的な AD 脳 3 検体の各 3 部位から、蛋白質を抽出してウエスタンブロッティングをおこなった。その結果、1 つのサンプル以外では強い E2F1 の発現が認められた。

E2F1 は、正常脳では発現が極めて低いことが知られている。従って、この E2F1 の強い発現は、これまでに述べた細胞レベルでの結果が、AD の病態を何らかの形で反映しているのではないかと考えている。

E2F1 はユビキチン化され、極めて短時間で分解されることが知られている。AD 脳で多量の E2F1 が検出されることから、核内で APPIC が結合することにより、ユビキチン化が阻害され、分解されにくくなっている可能性が考えられる。今後、この可能性を検討する予定である。

さらに、これまでに述べた細胞レベルでの研究の結果が、AD の発症を反映しているかどうかを調べるため、AD における E2F1 遺伝子の解析を行った。

我々は、もし E2F1 遺伝子が AD のリスクに関与しているなら、coding region の common polymorphism であろうと考えて、12 例に関してシーケンスを決定し、多型検索を行った (表 1)。しかし、今回は多型を検出することはできなかった。現時点では、さらに rare な変異が関係している可能性も否定できない。また、coding region ではなく遺伝子発現調節部位が関与している可能性もある。従って、今後さらに、1) 症例の増加、2) 家族性症例の検討、3) 遺伝子発現調節部位の検索等、が課題として残されている。

E2F1 遺伝子の中央付近の intron に存在する SNP を用いて case-control デザインの遺伝子相関解析を行った。その結果、APOE4 を有する群では、E2F1

がADのリスクに関与している可能性が示唆された(表2)。

今後、APOE4を有するAD症例の知見の追試が必要である。信頼できる方法として、より大きなサンプルサイズでの相関解析および家族性ADサンプルについての検討がある。実現の可能性だと前者の方が大きい。単一のSNPだけではなく複数のSNPを用いたhaplotype解析なども含め、前者は次年度の一つの課題である。また、この結果が正しいならば、coding regionの変異はむしろAPOE4を有する症例にある可能性が大きい。これらの症例で、coding regionのみならず、遺伝子発現調節部位での検索が必要である。さらに、APPの細胞内ドメイン(APPIC)は、E2F1のみならず、この遺伝子の他のファミリー、中でもE2F4にも結合することが明らかとなっている。したがって、このE2F4遺伝子も遺伝子解析のターゲットである。この点については、今年度既に解析を開始している。

我々のγ-セクレターゼによって調節されるシグナル伝達の仮説が正しければ、APPICには転写因子以外の複数の蛋白質が結合する可能性が考えられる。実際、図4に示したように、未分化な細胞ではAPPICは細胞質に局限されるが、神経細胞への分化に伴って核に存在するようになる。これは前述したようにAPPICが、神経細胞選択的に細胞質から核へ輸送される可能性を示しており、この輸送に関した蛋白質等も結合蛋白質の1つとして同定できる可能性が考えられる。

今回は、神経(脳)細胞のライセートとGST-APPICフュージョン蛋白質を用いた沈降実験により、APPICと結合する蛋白質として、クラスIIIβチュブリンを同定した。βチュブリンはαチュブリンと二量体をつくり、それが重合することでマイクロチューブが合成される。APPICはβチュブリンに強く結合する事によって、この重合過程を調節する可能性が考えられ、現在、検討中である。

現在、APPの細胞内ドメインの発現を、脳特異的にコントロールできるトランスジェニックマウスを、新潟大学脳研究所の横山峯介先生、三菱化学生命研究所の中村健司先生と共同で作製中である。

## 6. 結論

APPIC及び全長のAPPを強制発現するP19細胞を作製し、神経細胞へと分化誘導した。その結果、神経細胞への分化に伴って、APPICが核へ移行し、アポトーシスによる細胞死を誘導した。

APPICに結合する転写因子として、E2F1を同定した。E2F1は、細胞死を調節していることが知られており、APPICが結合することにより何らかの変化がおき、細胞死を引き起こすと考えられた。実際、RNAiによりE2F1の発現を阻害することに

より、この細胞死を回避することができた。

AD脳では、多量のE2F1が検出されている。従って、前述した細胞レベルでの結果が、ADの病態を反映していることを期待している。それを明かにする第一歩として、E2F1遺伝子とADのリスクについて、ADの臨床例と正常コントロールを用いて検討を加えた。まず、12例のAD症例のE2F1遺伝子coding regionのsequencingを行ったが、変異は特定できなかった。また、E2F1遺伝子の中央付近のintronに存在する遺伝子であるSNPを用いてcase-controlデザインの遺伝子相関解析を行った。その結果、APOE4を有する群では、E2F1がADのリスクに関与している可能性が示唆された。今後、より大きなサンプルと複数のマーカーを用いて、追試がなされる必要がある。

神経(脳)細胞のライセートとGST-APPICフュージョン蛋白質を用いた沈降実験により、APPICと結合する蛋白質として、クラスIIIβチュブリンを同定した。

## 7. 投稿論文、特許出願

### 1. 論文

- 1) Matsushita S, Arai H, Matsui T, Yuzuriha T, Urakami K, Masaki T, **Higuchi S**: Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and Alzheimer's disease. *J Neural Transms* 112: 703-711, 2005.
- 2) Miyasaka K, Ohta M, Takano S, Hayashi H, **Higuchi S**, Maruyama K, Tando Y, Nakamura T, Takata Y, Funakoshi A: Carboxylester lipase gene polymorphism as a risk of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 30: e87-91, 2005.
- 3) Nakamura Y, **Higuchi S**, Maruyama K: Pancreatic volume associated with endocrine and exocrine function of the pancreas among Japanese alcoholics. *Pancreatol* 28: 422-431, 2005.
- 4) Yokoyama A, Omori T, Yokoyama T, Tanaka Y, Mizukami T, Matsushita S, **Higuchi S**, Takahashi H, Maruyama K, Ishii H, Hibi T: Esophageal melanosis, an endoscopic finding associated with squamous cell neoplasms of the upper aerodigestive tract, and inactive aldehyde dehydrogenase-2 in alcoholic Japanese men. *J Gastroenterol* 40: 676-684, 2005.
- 5) Nakamura Y, Ohmori T, **Higuchi S**, Maruyama K: Certain background factors exhibit an association with an increased risk for pancreatic calcification among Japanese male alcoholics. *Pancreas* 31: 225-231, 2005.
- 6) Hesselbrock V, **Higuchi S**, Soyka M: Recent development in the genetics of alcohol-related phenotypes. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 1321-1324, 2005.
- 7) Matsushita S, Suzuki G, Matsui T, Takasugi K, Yuzuriha T, Yokoyama A, Masaki T, Yoshida Y, Arai H, **Higuchi S**: Increased risk for silent brain

infarction and deep white matter lesions in alcoholism. *J Psychiatric Res*, in press.

- 8) Miyasaka K, Hosoya H, Sekine A, Ohta M, Amono H, Matsushita S, Suzuki K, **Higuchi S**, Funakoshi A: Association of ghrelin receptor gene polymorphism with bulimia nervosa in a Japanese population. *J Neural Transm*, in press.
- 9) Matsui T, Nemoto M, Maruyama M, Yuzuriha T, Yao H, Tomita N, Matsushita S, **Higuchi S**, Yoshida Y, Seki T, Iwasaki K, Arai H: Plasma homocysteine and risk of co-existing cerebrovascular lesions in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*, in press.
- 10) Kimura M, Kimura S, Matsushita S, Kashima H, **Higuchi S**: ALDH2 promoter polymorphism has no effect on the risk for alcoholism. *Alcohol Alcohol*, in press.
- 11) Kuwano R, Miyashita A, Akazawa K, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, **Higuchi S**, Urakami K, Kanazawa I, Ihara Y: Genetic association of dynamin-binding protein gene with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, in press.
- 12) **Higuchi S**, Matsushita S: New findings of the genetic influence of alcohol use and dependence. *Curr Opin Psychiatry*, in press.
- 13) Q.-B. Tian, T. Suzukia, T. Yamauchi, H. Sakagami, Y. Yoshimura, S. Miyazawa, **K. Nakayama**, F. Saitoh, J. Zhang, Y. Lu, H. Kondo and S. Endo *European Journal of Neuroscience*. (in press)

2.特許出願  
なし



---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31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