

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（I）

# 目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィトニ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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
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 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
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 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
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 …… 358
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 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
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 …… 466
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 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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 …… 551
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 龍兒 …… 566
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 …… 576



## 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

所 属 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部  
神経情報医学  
研究者 梶 龍児

研究要旨 遺伝性ジストニア DYT3 のジストニアを説明する病理所見と原因遺伝子を世界で初めて報告し、ジストニアの病態を解明した。また本研究の成果である低分子量ボツリヌス毒素 (NTX) の安全性と有効性を徳島大学倫理審査委員会の承認のもとヒトにおいて検討し、従来の LL 毒素に比して痙縮などの広汎な筋緊張の亢進にも著効を示し重篤な有害事象は認めず、高い有効性と安全性を有することを明らかにした。ボツリヌス毒素 B, C, D 型の受容体を明らかにし、毒素の重鎖を drug delivery system として用いる基礎をきずいた。

### 分担研究者

- (1) 大阪府立大学大学院・農学生命科学研究科  
小崎俊司
- (2) 岡山大学大学院・病原細菌学 小熊恵二
- (3) (財) 化学及血清療法研究所・血液製剤研究部  
原川哲博
- (4) 国立感性症研究所・細菌第2部第3室  
高橋元秀

### A. 研究目的

本研究による治療の対象であるジストニアの病態生理・発症機序を明らかにし、ボツリヌス神経毒素有効成分 (NTX) の安全性・有効性を検討する。NTX のレセプターを解明し drug delivery system としての臨床応用を試みる。

### B. 研究方法

- 1) 徳島大学倫理審査委員会の承認のもと遺伝性ジストニア DYT3 の患者から DNA を採取し、連鎖解析により明らかになっている候補遺伝子領域を shotgun 法を用いて全塩基配列を明らかにし、疾患特異的な遺伝子を検討した。患者凍結脳において候補遺伝子の発現を検討した。
- 2) 徳島大学倫理審査委員会の承認のもと、全身性ジストニア 3 例と痙縮 5 例において、2-3 ヶ月に NTX

250-500 単位を罹患筋に注射をし、modified Rankin scale による ADL の改善を指標として有効性・安全性を検討した。

3) ボツリヌス毒素有効成分 (NTX) の精製法と受容体を検討した。

### C. 研究結果・考察

ボツリヌス毒素は神経毒素と無毒成分から構成された複合体の形で菌体から放出される。無毒成分は神経毒素を安定化し、種々の条件から神経毒素を保護する働きがある。その一方でこれらの成分がアジュバント活性を持つことが報告されており、神経毒素を単独で用いる方が、長期にわたる治療に適していると考えられるため、神経毒素と無毒成分を効率よく分離することが必要である。神経毒素の高度精製標品を短時間に精製することを目的として AKTA システムで RESOURCE Q カラムによる精製を試みた結果、複合体毒素から神経毒素を 30 分以内に効率よく単離する方法を確立した。

ボツリヌス毒素分子は型に共通したドメイン構造と毒性を持っている。毒素が受容体に結合後、細胞内移行し毒性発現に至る機構を調べることは、drug delivery system を構築するために必須である。毒素の神経細胞への作用を発現する際の起点となる細胞側の受容体の性状と毒素側の受容体認識部位の検

素、さらにレンチウイルスを用いて受容体タンパクを発現させた株化細胞による一連の毒素作用の解析を試みた。これまで未知であったC型とD型神経毒素の受容体検索を行った結果、従来から予想されていたタンパク様物質ではなく、C型受容体はガングリオシドGT1b、GD1bであり、D型受容体はフォスファチジルエタノールアミンであることが明らかになった。B型について重鎖C末端領域(H<sub>C</sub>)の点変異体を用い、受容体結合部位に関わるアミノ酸を同定した。B型毒素受容体はシナプトタグミンI(StgI)またはII(StgII)とガングリオシドGT1bとの複合体であることから、StgIIとガングリオシドGT1b複合体(StgII/GT1b)またはガングリオシドGT1bに対する点変異体の受容体への結合活性を調べた。毒素分子の立体構造上、ガングリオシドGT1bとの結合に関わるH<sub>C</sub>領域内のアミノ酸は比較的広範囲にわたっていたが、StgII/GT1bとの結合に関わるアミノ酸は限局した部分に位置することがわかった。毒素の受容体タンパクへの結合後、細胞内移し毒性を発揮するまでの神経細胞における作用を詳細に調べるために、StgII発現PC12細胞を確立した。StgII発現PC12細胞をB型神経毒素で処理したところ、VAMP2の切断の程度とドーパミンの放出阻害活性に有意な差があった。PC12細胞は毒素処理による影響はなかった。このことは、毒素が受容体に結合し、タンパク受容体が型特異的性を決定する重要な役割を担うだけでなく、細胞内侵入過程で機能的な働きをしていることが示唆された。今後StgII発現PC12細胞はdrug delivery system開発のための有用なtoolとして利用できると考えられた。

ジストニアは2005年に我々が発表したDYT3の特異的な線条体ストリオゾームの変性(Goto et al. Ann Neurol 2005)によりドーパミンの過剰放出を来すために起こるという仮説は海外でも認められるようになった。今回この疾患遺伝子が明らかになったことにより、孤発性ジストニアにおいてもTAF1遺伝子が発症に関与していることが明らかになった。また、NTXは末梢の筋弛緩剤として高い安全性と有効性が示された。

本研究の成果によりボツリヌス毒素B、C、D型のレ

セプターが明らかになり、最近A型毒素のレセプターも他の施設から明らかにされてきた。E型毒素は中枢神経系において選択的にグルタミン酸の放出を抑制することが知られており、難治性てんかんの治療にも動物実験レベルで応用されてきている。今回明らかになった臨床面での安全性からも将来的にボツリヌス毒素重鎖由来の薬剤が中枢の特定のニューロンに極めて高い親和性で結合することからdrug delivery systemとして「中枢神経系での分子標的薬剤」として発展する可能性が示された。

#### D. 結論

ボツリヌス毒素重鎖由来の薬剤が中枢の特定のニューロンに極めて高い親和性で結合することからdrug delivery systemとして「中枢神経系での分子標的薬剤」として発展する可能性が示された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 梶 龍児

1. Yamada K, Goto S, Kuratsu J, Matsuzaki K, Tamura T, Nagahiro S, Murase N, Shimazu H, Kaji R. Stereotactic surgery for subthalamic nucleus stimulation under general anesthesia: A retrospective evaluation of Japanese patients with Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 2007;13(2):101-107.
2. Sato K, Kaji R, Matsumoto S, Goto S. Cell type-specific neuronal loss in the putamen of patients with multiple system atrophy. Mov Disord 2007.
3. Nodera H, Takao S, Kaji R. Neck pain and calcium deposition. Neurology 2007;68(5):383.
4. Makino S, Kaji R, Ando S, Tomizawa M, Yasuno K, Goto S, Matsumoto S, Tabuena MD, Maranon E, Dantes M, Lee LV, Ogasawara K, Tooyama I, Akatsu H, Nishimura M, Tamiya G. Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. Am J Hum Genet 2007;80(3):393-406.
5. Hitomi T, Kaji R, Murase N, Kohara N, Mezaki T,



- Nodera H, Kawamura T, Ikeda A, Shibasaki H. Dynamic change of proximal conduction in demyelinating neuropathies: A cervical magnetic stimulation combined with maximum voluntary contraction. *Clin Neurophysiol* 2007;118(4):741-750.
6. Zabetian CP, Morino H, Ujike H, Yamamoto M, Oda M, Maruyama H, Izumi Y, Kaji R, Griffith A, Leis BC, Roberts JW, Yearout D, Samii A, Kawakami H. Identification and haplotype analysis of LRRK2 G2019S in Japanese patients with Parkinson disease. *Neurology* 2006;67(4):697-699.
7. Yamada K, Goto S, Soyama N, Shimoda O, Kudo M, Kuratsu J, Murase N, Kaji R. Complete suppression of paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia by globus pallidus internus pallidal stimulation. *Mov Disord* 2006;21(4):576-579.
8. Yamada K, Goto S, Kaji R, Kuratsu J. Modulation of torsinA expression in the globus pallidus internus is associated with levodopa-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats. *Neurosci Lett* 2006;396(1):62-66.
9. Yamada K, Goto S, Matsuzaki K, Tamura T, Murase N, Shimazu H, Nagahiro S, Kuratsu J, Kaji R. Alleviation of camptocormia by bilateral subthalamic nucleus stimulation in a patient with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2006;12(6):372-375.
10. Urushihara R, Murase N, Rothwell JC, Harada M, Hosono Y, Asanuma K, Shimazu H, Nakamura K, Chikahisa S, Kitaoka K, Sei H, Morita Y, Kaji R. Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation applied over the premotor cortex on somatosensory-evoked potentials and regional cerebral blood flow. *Neuroimage* 2006;31(2):699-709.
11. Terasawa Y, Nodera H, Sato K, Nakane S, Izumi Y, Kaji R. [A case of hyperglycemic neuropathy with possible dysfunction of axonal excitability]. *臨床神経学* 2006;46(8):540-543.
12. Teng X, Sakai T, Liu L, Sakai R, Kaji R, Fukui K. Attenuation of MPTP-induced neurotoxicity and locomotor dysfunction in Nucling-deficient mice via suppression of the apoptosome pathway. *J Neurochem* 2006;97(4):1126-1135.
13. Schwarz JR, Glassmeier G, Cooper EC, Kao TC, Nodera H, Tabuena D, Kaji R, Bostock H. KCNQ channels mediate IKs, a slow K<sup>+</sup> current regulating excitability in the rat node of Ranvier. *J Physiol* 2006;573(Pt 1):17-34.
14. Nodera H, Kaji R. Nerve excitability testing and its clinical application to neuromuscular diseases. *Clin Neurophysiol* 2006;117(9):1902-1916.
15. Nodera H, Sato K, Terasawa Y, Takamatsu N, Kaji R. High-resolution sonography detects inflammatory changes in vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve* 2006;34(3):380-381.
16. Nodera H, Bostock H, Izumi Y, Nakamura K, Urushihara R, Sakamoto T, Murase N, Shimazu H, Kusunoki S, Kaji R. Activity-dependent conduction block in multifocal motor neuropathy: magnetic fatigue test. *Neurology* 2006;67(2):280-287.
17. Murase N, Shimazu H, Urushihara R, Kaji R. Abnormal sensorimotor integration in hand dystonia. *Suppl Clin Neurophysiol* 2006;59:283-287.
18. Matsui N, Nakane S, Harada M, Furutani K, Izumi Y, Oka H, Hashimoto C, Kaji R. [Neuroradiological study of a possible progressive multifocal leukoencephalopathy using diffusion tensor imaging and proton magnetic resonance spectroscopy]. *臨床神経学* 2006;46(8):555-560.
19. Kaji R. [Future prospects for botulinum toxin therapy]. *日本内科学会雑誌* 2006;95(9):1895-1899.
20. Goto S, Yamada K, Shimazu H, Murase N, Matsuzaki K, Tamura T, Nagahiro S, Kuratsu J, Kaji R. Impact of bilateral pallidal stimulation on DYT1-generalized dystonia in Japanese patients. *Mov Disord* 2006;21(10):1785-1787.

#### 小熊惠二

1. Suzuki T, Kouguchi H, Watanabe T, Hasegawa K, Yoneyama T, Niwa K, Nishikawa A, Lee JC, Oguma K, Ohyama T. Effect of Nicking the C-terminal Region of the *Clostridium botulinum* Serotype D Neurotoxin Heavy

Chain on its Toxicity and Molecular Properties. Protein J. (in press)

- Lee JC, Hwang HJ, Sakaguchi Y, Yamamoto Y, Arimitsu H, Tsuji T, Watanabe T, Ohyama T, Tsuchiya T, and Oguma K. C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine. Microbiol. Immunol. (in press)
- Hwang HJ, Lee JC, Yamamoto Y, Sarker MR, Tsuchiya T, Oguma K. Identification of structural genes for *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage particles. FEMS Microbiol. Lett. (in press)
- Matsumura T, Fujinaga Y, Jin Y, Kabumoto Y, Oguma K. Human milk SIgA binds to botulinum type B 16S toxin and limits toxin adherence on T84 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 352: 867-872, 2007.
- Nakamura T, Takada N, Tonozuka T, Sakano Y, Oguma K, and Nishikawa A. Binding properties of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin to mucins. Biochim. Biophys. Acta. 1770 : 551-555, 2007.
- Uotsu N, Nishikawa A, Watanabe T, Ohyama T, Tonozuka T, Sakano Y, and Oguma K. Cell internalization and traffic pathway of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin in HT-29 cells. Biochim. Biophys. Acta. 1763: 120-128, 2006.

#### 小崎俊司

- Kohda, T., Ihara, H., Seto, T., Tsutsuki, H., Mukamoto M. and Kozaki. S. 2007. Differential contribution of the residues in C-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin type B to its binding to the ganglioside GT1b and the synaptotagmin 2/GT1b complex. Microb. Pathog. 42:72-79
- Tsutsuki, H., Kohda, T., Hara, M., Kozaki, S. and Ihara, H. 2007. Nitric oxide inhibits depolarization-evoked glutamate release from rat cerebellar granule cells. Nitric Oxide. 16:217-227

#### 2. 学会発表

#### 小熊惠二

- 阪口義彦、林哲也、李在哲、崔錦花、黄賢正、山本由

弥子、小熊惠二 : C型とD型ボツリヌスC2毒素遺伝子をコードするプラスミドの解析. 第79回総会, 金沢, 日本細菌学雑誌, 61(1)(2006)

- 李在哲、黄賢正、有満秀幸、阪口義彦、崔錦花、山本由弥子、小熊惠二 : ラクトースゲルを用いたボツリヌスA型 Progenitor toxin 及び神経毒素の分離・精製法. 第79回総会, 金沢, 日本細菌学雑誌, 61(1)(2006)
- 黄賢正、李在哲、阪口義彦、崔錦花、山本由弥子、小熊惠二 : ボツリヌスC型神経毒素を支配するバクテリオファージの構造蛋白質解析. 第79回総会, 金沢, 日本細菌学雑誌, 61(1)(2006)
- 永浜政博、小島高志、阪口義彦、小熊惠二、櫻井純 : ボツリヌス菌C2毒素の細胞への結合と侵入. 第79回総会, 金沢, 日本細菌学雑誌, 61(1)(2006)
- 阪口義彦、林哲也、山本由弥子、李在哲、黄賢正、清水健太、藤本夕紀子、小西里枝、小熊惠二 : C型D型ボツリヌスC2毒素遺伝子をコードするプラスミドの解析. 第59回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2006) 宇部
- 清水健太、阪口義彦、唐澤忠宏、志村敏史、山本由弥子、李在哲、黄賢正、藤本夕紀子、小西里枝、小熊惠二 : C型とD型ボツリヌス菌レンチナーゼ遺伝子の塩基配列の決定. 第59回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2006) 宇部
- 黄賢正、李在哲、阪口義彦、小西里枝、山本由弥子、小熊惠二 : ボツリヌスC型神経毒素を支配するバクテリオファージの構造蛋白質解析. 第59回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2006) 宇部
- 李在哲、黄賢正、阪口義彦、小西里枝、山本由弥子、小熊惠二 : ラクトースゲルを用いたボツリヌスA型 progenitor toxin 及び神経毒素の分離・精製法. 第59回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2006) 宇部
- Sakaguchi Y, Hayashi T, Kurokawa K, Nakayama K, Ohnishi M, J-C. Lee, J-h. Cui, H-J. Hwang, Yamamoto Y, Oguma K. The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. 5<sup>th</sup> International meeting on the molecular biology and pathogenesis of the Clostridia. Nottingham UK. (2006.6.21-25)

#### 原川哲博

- 坂本崇、梶龍兒、高橋元秀、石田説而、幸田知子、小



崎俊司, 鳥居恭司, 中野宏俊, 原川哲博: 新しい日本の  
150KDa ボツリヌス毒素製剤の CMAP 測定による評価, 第 10  
回国際 Parkinson' s Disease and Movement Disorders 学  
会 平成 18 年 10 月 京都

2. 高橋元秀, 石田説而, 坂本崇, 原川哲博, 銀永明弘,  
梶龍兒: 複合筋活動電位によるボツリヌス神経毒素の筋弛  
緩活性の定量化 第 36 回日本臨床神経生理学会 平成 18  
年 11 月 横浜

3. 坂本崇, 梶龍兒, 幸田知子, 小崎俊司, 高橋元秀, 石  
田説而, 銀永明弘, 原川哲博: 低分子量ボツリヌス神経毒  
素製剤の開発と CMAP study による評価 第 36 回日本臨床  
神経生理学会 平成 18 年 11 月 横浜

4. Torii Y. Takahashi M. Ishida S. Sakamoto T.  
Harakawa T. Ginnaga A. Kozaki S. Kaji R. Quantification  
of the activity causing flaccid paralysis of botulinum  
neurotoxin by measuring the compound muscle action  
potential (CMAP). : Interagency Coordinating  
Committee on the Validation of Alternative Methods  
2006 年 11 月 米国メリーランド州 シルバースプリング

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

出願番号: 特願 2006-293173 (平成 18 年 10  
月 27 日出願)

発明の名称: 乳児ボツリヌス症原因菌由来  
の高度精製 A 型ボツリヌス毒素製剤

出願人: 財団法人化学及血清療法研究所

発明者: 原川哲博、中野宏俊、鳥居恭司、  
進村美穂、奥田祥士、梶龍兒、小崎俊司

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他



---

平成18年度  
政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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