

200632016A

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 星 美奈子

平成19（2007）年 4月

目次

I. 総括研究報告

- 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

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. 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-----17
治療法の開発に関する研究
村松 慎一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----20

IV. 研究成果の刊行物・別刷り-----22

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
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、倫理面に配慮し、(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) 昨年確立したアミロスフェロイド特異的抗体を活用して、ついにアルツハイマー病脳に特異的にアミロスフェロイドが存在することを、生化学的、免疫組織化学的解析から示すことに成功した。

(2) 昨年、線維形成のリアルタイム観測に成功し、今年、アミロスフェロイドの形成過程を定量出来る新規リアルタイム観測手法の構築に成功し、各々の凝集経路は異なることを示した。

(3) 早期診断法の構築を目指し、プリオンをモデルに生体内タンパク質を溶液中で高感度に検出する手法を構築してきたが、今年、半導体量子ドットを導入することで0.029 nMまで検出限界を下げることに成功した。

(4) 神経特異的ウィルスベクターを構築し、サル個体神経にアミロイド前駆体タンパク質を過剰発現したモデル系の構築に成功した。また、カルバインプローブを開発し、アミロスフェロイド神経細胞死機構との相関を示した。

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

ウサギ 6羽、マウス・ハムスター50匹以上に免疫し、複数のアミロスフェロイド特異的抗体を得た。これを用いて剖検脳の免疫組織化学的解析を行った。さらに、AD脳から生化学的にアミロスフェロイド類似構造体を単離する方法を確立した。アミロスフェロイド神経毒性を抑制する中和抗体、形成を阻害する抗体も確立した。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

昨年、線維形成のリアルタイム観測に成功し、今年、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。今年新たに半導体量子ドットを導入した。

(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. カルパイン可視化プローブの構築

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た FRET 型プローブを開発した。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。

b. 霊長類ES細胞の神経細胞に対する毒性の検証

ヒト骨髄間質細胞から分化誘導した神経細胞を京都大学出澤先生より供与を受け、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

CAGプロモーターあるいは神経細胞特異的SynIプロモーターによりアミロイド前駆体蛋白(APP)を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター

(AAV-APP)を作製した。カニクイサル3頭の脳内へAAV-APPを定位手術的に注入し、免疫組織化学・生化学的に検索した。

(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

アミロスフェロイド特異的抗体により、AD脳からアミロスフェロイドを生化学的に単離し、単離したヒトアミロスフェロイドに非常に強い神経毒性があることを示した。ヒトアミロスフェロイドは発症初期から10年程度のAD脳に有意に多く存在していた。

(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

A β が凝集しアミロスフェロイドを形成する過程を刻々とリアルタイムに、かつ定量的に今何量体が存在するかを観測する手法の構築に成功した。

b. 抗原抗体反応モデル系の構築

FCCS の検出限界値 (プリオン感染マウス)

プリオン感染マウスを用いて、FCCS の検出限界値を検討した。検出には、Alexa488とAlexa647でそれぞれ蛍光標識した 72 (0.1 nM)と 44B1 (0.09 nM)を用いた。

室温での 60 分間の抗原抗体反応の後、FCCS 測定を行った。検出感度は、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、PrP と 72-Alexa532、44B1-Alexa647 から成る 3 量体の量に比例する。

その結果、FCCS を用いてプリオン感染マウスから4の6乗倍希釈までPrPを検出することが可能であった。この検出感度は、フレライザ BSE の検出感度と同程度であった。r BoPrP を用いて4の6乗倍希釈の試料中の PrP 濃度を算出したところ、0.13 nM であった。この値は、前回報告した緩衝液中および牛脳抽出液中での r BoPrP の検出限界値と一致した。

Qdot を用いた場合の FCCS の検出限界値 (緩衝液中)

Qdot をプローブとして用いた場合の FCCS の検出限界値を検討した。検出対象は r BoPrP とし、緩衝液中 (PBS、pH7.3) での検出を試みた。検出には、44B1-Alexa488 (0.22 nM)と 72-Qdot655 (0.27 nM)の組み合わせを用いた。

0.23 nM rBoPrP での相互相関関数の振幅値を比較した場合、プローブとして Qdot を用いた場合は Alexa を用いた場合の約5倍の振幅値だった。検出限界値は、Qdot655 を用いた場合 0.029 ± 0 nM (n=3)だった。比較のために、44B1-Alexa488 と 72-Alexa647、72-Alexa488 と 4 4B1-Alexa647 を用いて行ったところ、検出感度はそれぞれ 0.37 ± 0.49 nM (n=3)、 0.19 ± 0.23 nM (n=3)だった。

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「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. カルパイン可視化プローブの構築

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 μ 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。

さらに、細胞膜透過性を確保するために、2種類の合成法を考案した。1つめはプローブのカルボン酸基をアセトキシメチル基で修飾する手法である。この手法を用いればプローブの負電荷をなくして細胞膜内に受動的に取り込まれ、エステラーゼ活性によって加水分解されることで細胞内に留まるプローブを作製できる。2つめは膜透過性ペプチドであるポリアルギニンを基質であるペプチド配列の先に導入するデザインである。このうち、膜透過性ペプチドの導入は、ペプチド合成機を用いた手法を組み込むことで簡便に合成できることが示された。

b. 霊長類ES細胞の神経細胞に対する毒性の検証

ヒト骨髄間質細胞から分化誘導した神経細胞の場合も、サル ES の結果と同様に、機能的により成熟した神経細胞がより多く神経細胞死を起こすことが明らかになった。従って、アミロスフェロイドはヒトを含む霊長類神経細胞、特に成熟神経細胞に毒性を発揮することが示された。

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の認知機能評価

神経細胞特異的SynIプロモーターによりAPPを発現するAAVを海馬と大脳皮質に注入した2頭の若年サルでは、6か月後の組織解析では、明らかな細胞脱落は認められなかった。CAGプロモーターを搭載したAAVベクターを海馬に注入した老齢サルについては、注入直後のMRIにより、海馬の広範な領域にベクターが拡散していることが確認できた。

D. 考察

(1) 世界で初めてヒト患者脳より神経毒性のある A β 凝集体を単離することに成功した。アミロスフェロイドは基礎研究のみならず、創薬ターゲットとしても有望であることが示された。

(2) 診断並びに治療効果の検定には、非侵襲的画像診断法が非常に重要である。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。

(3) FCCS 測定では、通常2つの波長で2つの蛍光分子を励起し、2つの検出器で受けた2つのゆら

ぎの相互相関を評価する。相互相関関数の振幅は、2つの蛍光分子の相関に比例するが、2つの共焦点領域の重なり程度にも規定される。したがって、2つのレーザー光の光軸合わせと観察領域を規定するピンホール合わせに気を配り、2つの共焦点領域を一致させねばならない。

今回新たにプローブとして用いた Qdot は、短波長領域に吸収域をもつため、一波長励起多波長発光が可能となる。したがって、今回用いた Qdot655 と Alexa488 の組み合わせに対しても、1つのレーザーのみを用いた一波長励起 (473 nm) が可能となる。これにより、レーザー光の光軸のズレによって生じる相互相関関数の振幅の減弱が改善され、S/N が高くなることが期待できる。加えて、Qdot 一分子あたりに多分子の抗体を融合させることが可能となるため、PrP に対する一分子のプローブあたりの親和性が増し、検出感度の向上が期待される。

Qdot には Fab が4分子結合していると推測される。したがって、今回の Qdot を用いた場合の検出感度の向上は、PrP に対する一 Qdot あたりの親和性が Alexa を用いた場合よりも高かったためと推測する。Qdot を用いることによって光源を1つにできるため、装置の簡素化・低額化が可能となり、より検査場に適した小型・安価な装置の製造が期待できる。今後は、Qdot への抗体の結合法の検討とプリオン感染牛からの PrP^{Sc} 検出を試みたい。

(4) 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。さらに、膜透過性プローブ合成法確立を行い、容易に実行可能である生物活性測定実験系を供出できる。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できると考えられる。カルパインは神経の障害の要因として近年注目されており、可視化プローブは非常に有効な研究ツールとなることが期待される。

(5) アミロスフェロイドがヒトを初めとする霊長類神経細胞にも毒性があり、その毒性は ES や神経幹細胞ではなく、神経細胞に特異的であることを示した。分化誘導した霊長類神経細胞の系を活用することで、アミロスフェロイド毒性を阻害する低分子薬剤のスクリーニングが可能となる。また、得られた薬剤の安全性についても、ヒトに投与する以前に、ヒト由来神経細胞にて検証することが可能である。

(6) 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。今後、それぞれ

の分化段階において、より純化した細胞集団を使用して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うことにより、毒性発現に関わる分子機構を明らかできると考えられる。

これまでの研究で、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。若年サル大脳皮質および海馬への注入では、明らかな神経細胞死は見いだせなかったが、若年サルでは、アミロイド分解酵素であるネプリライシンの活性が高いなど、種々の解毒作用が働いている可能性がある。今後、老齢サルの脳組織を詳細に解析することにより、神経細胞死の誘導とアミロスフェロイドが毒性を発揮する局面を捕捉できるものと考えられる。

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。

(3) 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。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。

(4) レシオ測定が可能であるカルpain活性測定の膜透過性蛍光プローブの合成手法を確立した。

(5) アミロスフェロイドがヒト由来神経細胞に毒性があることを示した。

(6) 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を明らかにした。APPを発現する AAV ベクターを作製し、カニクイサルの脳内に投与した。

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, 2006

2) Noguchi, A., Matsumura, S., Sato, M., Akioka, M., Ito, A., Tada, M., Ideno, S., Noda, M., Muramatsu, S., Itokazu, Y., Sato, K., Takahashi, H., Nabeshima, Y., Dezawa, M., Teplow, D., Kakita, A., Hoshi, M.: Direct identification of neurotoxic, spherical A β oligomers (amylospheroids) in Alzheimer's disease brain (submitted to Nature).

3) T. Komatsu, K. Kikuchi, H. Takakusa, K. Hanaoka, T. Ueno, M. Kamiya, Y. Urano & T. Nagano. Design and Synthesis of an Enzyme Activity-Based Labeling Molecule with Fluorescence Spectral Change. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15946-15947 (2006)

4) T. Terai, K. Kikuchi, S. Iwasawa, T. Kawabe, Y. Hirata, Y. Urano & T. Nagano. Modulation of Luminescence Intensity of Lanthanide Complexes by Photoinduced Electron Transfer and Its Application to a Long-Lived Protease Probe. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6938-6946 (2006)

5) A. Minami, N. Sakurada, S. Fuke, K. Kikuchi, T. Nagano, N. Oku & A. Takeda. Inhibition of Presynaptic Activity by Zinc Released From Mossy Terminals During Tetanic Stimulation. *J. Neurosci. Res.*, **83**, 167-176 (2006)

6) Konno H, Murakami-Fuse T, Fujii F, Koyama F, Ueoka-Nakanishi H, Pack CG, Kinjo M and Hisabori T. The regulator of the F1 motor: inhibition of rotation of cyanobacterial F1-ATPase by the epsilon subunit. *EMBO J.* 2006 Oct 4;25(19):4596-4604.

7) Jin T, Fujii F, Yamada E, Nodasaka Y and Kinjo M. Control of the optical properties of quantum dots by surface coating with calix[n]arene carboxylic acids. *J Am Chem Soc.* 2006 Jul 26;128(29):9288-9289.

8) Shintaro Mikuni, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo. Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy. *FEBS Letters* 581, 389-393, (2007)

9) Rieko Oyama, Hideaki Takashima, Masato Yonezawa, Nobuhide Doi, Etsuko Miyamoto-Sato, Masataka Kinjo and Hiroshi Yanagawa.

Protein-protein interaction analysis by C-terminally specific fluorescence labeling and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, No. 14 e102 (2006)

10) Changi Pack, Kenta Saito, Mamoru Tamura, and Masataka Kinjo. Microenvironment and effect of energy depletion in the nucleus analyzed by mobility of multiple oligomeric EGFPs. *Biophys J.* vol 91 3921-3936 (2006)

11) Yu Ohsugi, Kenta Saito, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo. Lateral Mobility of Membrane-Binding Proteins in Living Cells Measured by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy.

Biophys J. 91, 3456–3464 (2006)

12) Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Chan-Gi Pack, Gen Matsumoto, Shoshiro Hirayama, Yasuo Takahashi, Hiroshi Kimura, Masataka Kinjo, Richard I. Morimoto and Kazuhiro Nagata. Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nature Cell Biology* 8(10):1163-1169 (2006)

13) Shigeko Kawai-Noma Satoru Ayano, Chan-Gi Pack, Masataka Kinjo, Masasuke Yoshida, Kenji Yasuda and Hideki Taguchi. Dynamics of yeast prion aggregates in single living cells. *Genes to Cells* 11, 1085–1096, (2006)

14) Hideki Muto, Issei Nagao, Taku Demura, Hiroo Fukuda, Masataka Kinjo, and Kotaro T. Yamamoto. Fluorescence cross-correlation analyses of molecular interaction between an Aux/IAA protein, MSG2/IAA19, and protein-protein interaction domains of auxin response factors of Arabidopsis expressed in HeLa cells *Plant Cell Physiol.*, 47, 1095-1101 (2006)

15) Takako Kogure, Satoshi Karasawa, Toshio Araki, Kenta Saito, Masataka Kinjo, and Atsushi Miyawaki A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Biotechnol* 30, 577-581 (2006).

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

17) Wakamatsu M, Ishii A, Iwata S, Sakagami J, Ukai Y, Ono M, Kanbe D, Muramatsu S, Kobayashi K, Iwatsubo T, Yoshimoto M: Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human α -synuclein in mice. *Neurobiol Aging*, *in press*.

18) Sawada H, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, Muramatsu S, Nakano I, Nagatsu T, Sawada M: Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurosci Res*, *in press*.

19) 村松慎一：アデノ随伴ウイルスベクターを応用したパーキンソン病の遺伝子治療。機能的脳神経外科, 45(2): 148–152, 2006.

20) 村松慎一：ES細胞による Parkinson 病の移植治療—臨床応用への課題。医学のあゆみ. 217(5): 371–376, 2006.

21) 三國新太郎、金城政孝：細胞生物学における蛍光相関分光法と蛍光相互相関分光法。蛋白質核酸酵素 51, 1998-2005 (2006)

2. 学会発表

1) Noguchi. A., Sato. M., Sato, K., and Hoshi. M.:

Enhanced neurotoxicity of amylospheroid (ASPD) derived from a pathogenetic form of β -amyloid ($A\beta$), E22G (Arctic) or D7N (Tottori) (Society for Neuroscience 2006, Oct. Atlanta)

2) W.-Z. Xia, T. Matsushita, Y. Nara, N. Takino, H. Nishida, M. Kodera, Y. Sasaki, S. Kikuchi, T. Okada, M. Hoshi, I. Nakano, K. Ozawa, S. Muramatsu: Efficient transduction of oligodendrocytes by AAB8 vectors: The Japan society of gene therapy's 12th annual meeting. Tokyo, August 24, 2006. (abstract p24).

3) S. Muramatsu, W.-Z. Xia, T. Matsushita, Y. Nara, N. Takino, H. Nishida, M. Kodera, Y. Sasaki, S. Kikuchi, T. Okada, M. Hoshi, I. Nakano, K. Ozawa: Efficient transduction of oligodendrocytes by AAB8 vectors: Parvovirus Workshop 2006 : Swiss: 2006.8.28

4) Muramatsu S, Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michibata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells for safer cell therapy. Tenth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Kyoto, October 30, Movement Disorders 21(15)s399, 2006.

5) Sawada H, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, Muramatsu S, Nakano I, Nagatsu T, Sawada M: Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with MPTP. 8th International conference AD/PD.

6) Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Tamura Y, Okuno T, Konishi N, Michihata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Nakano I, Muramatsu S. Embryonic stem cells expressing suicide gene reduced risk of teratoma formation. The 29th Annual meeting of the Japan Neuroscience Society. Kyoto, July 20, 2006.

7) Muramatsu S, Kodera M, Nara Y, Takino N, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michibata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells reduces risk of teratoma formation. The Japan society of gene therapy's 12th annual meeting. Tokyo, August 26, 2006. (abstract p34).

8) 野口彰彦, 佐藤道夫, 佐藤一紀, 星美奈子：家族性アルツハイマー病原因遺伝子 Arctic, Tottori 変異を持つアミロイド β によるアミロスフェロイド形成の検証 (日本化学会第 86 春季年会、3月、船橋)

9) 星美奈子：「アミロスフェロイド」研究 その後の進展：さきがけ「タイムシグナルと制御」第 10 回領域会議 2006.1.28 東京

10) 星美奈子：脳の老化とアルツハイマー病：ラーノロジー公開講座 (招待講演)：本郷：東京 2006.12.4

11) 星美奈子：球状 β アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」の同定：鍋島陽一教授上原受賞記念研究発表会：京都：2006.4.15

12) 星美奈子：毒性球状 β アミロイド凝集体アミロ

スフェロイドー特異的抗体によるアルツハイマー病患者脳を検証：第21回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会（招待講演）：東京：2006.5.27
13) 星美奈子：アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病発症機序解明：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 許 南浩教授主催（2006年2月）岡山

14) 星美奈子：大学院特別講義 脳神経科学入門：基礎からアルツハイマー病まで：大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 菊地和也教授（2006年5月）吹田市

15) 菊地和也，千里ライフサイエンスセンターセミナーケミカルバイオロジーが拓く21世紀の創薬研究一，「生命現象を可視化するセンサー分子開発によるケミカルバイオロジー展開」2006年9月29日千里ライフサイエンスセンター，豊中市

16) K. Kikuchi, Zinc Signals 2006, “Development of a Zinc Ion-selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications” 2006年9月16日～21日，シエナ市，イタリア

17) 菊地和也，第58回日本生物工学会大会，「細胞内イベントを可視化する化学プローブ」2006年9月12日～14日，大阪大学豊中キャンパス，豊中市

18) 菊地和也，第12回日本生化学会近畿支部テクニカルセミナー分子機能の直接解析法に基づく生理機能解明一，「蛍光プローブのデザイン・合成による機能分子の可視化」2006年9月11日，大阪大学コンベンションセンター，大阪大学吹田キャンパス，吹田市

19) K. Kikuchi, International Symposium of Biomolecular Chemistry 2006, “Design Synthesis and Biological Application of Fluorescent Probes Which Convert Biological Responses to Chemical Output” 2006年8月15日～20日，神戸市

20) K. Kikuchi, Japan-UK Joint Symposium on Chemistry of Coordination Space, “Visualization of Cellular Events Using Fluorescent Sensor Molecules” 2006年7月15日～20日，University College London, ロンドン市，英国

21) 分子研シンポジウムー金属機能中心を持つ高性能分子システムの創成，その構造と機能ー「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・応用」2006年6月15日～17日，分子科学研究所，岡崎市

22) Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M and Kinjo M. Detection of prion protein

immune complex using Fluorescence Correlation Spectroscopy and Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. 第44回年会日本生物物理学会 第5回東アジア生物物理学シンポジウム合同会議（2006,11/12, 沖縄県宜野湾市）

23) 奈良優子,村松慎一：未分化ES細胞同種移植によるサル脳内腫瘍の形成. 第47回日本神経学会総会, 東京, 2006年5月12日. (プログラム P 106)

24) 村松慎一:パーキンソン病モデルサルへのヒトES細胞由来神経幹細胞移植.第47回日本神経学会総会, 東京, 2006年5月12日. (プログラム P 106)

25) 村松慎一:遺伝子治療の可能性. 第26回日本脳神経外科コンgres,東京, 2006年5月14日. (脳神経外科ジャーナル Vol.15 P 37)

26) 花園豊, 岸本紀子, 田中裕次郎, 池田たま子, 柴田宏昭, 村松慎一, 揚山直英, 林聡, 北野良博, 阿部朋之, 長尾慶和, 寺尾恵治: ES細胞を利用する移植・再生治療の安全性に関する研究. 第4回幹細胞シンポジウム, 東京, 2006年5月19日.(抄録集 p 42)

27) 古寺美加, 村松慎一, 奈良優子, 滝野直美, 西田紘子, 奥野剛, 小西奈依, 道端英男, 鈴木豊, 近藤靖, 仁藤新治, 中野今治: 自殺遺伝子を導入したより安全な移植用ES細胞の開発.第4回幹細胞シンポジウム, 東京, 2006年5月19日.(抄録集 p 42)

28) 古寺美加, 山本茂一, 近藤靖, 仁藤新治, 村松慎一: 自殺遺伝子導入による安全な移植用ES細胞の開発. 第46回日本臨床化学会年次学術集会, 東京, 2006年9月8~9日.

29) 村松慎一: 遺伝子治療. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜, 2007年3月13日. (再生医療 Vol.6 Supp1 2007 p110)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
新規3件出願予定（4月中）
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（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、（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、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、神経毒性を持つことを証明した。
- （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）線維形成に加えて、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）カルパインプローブの検証を行い有効であることを示した。
- （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）ヒト骨髄間質細胞由来神経を用いたアミロスフェロイドがヒト神経細胞に毒性を持つことを示した。

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、（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、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

ウサギ 6 羽、マウス・ハムスター 50 匹以上に免疫し、複数のアミロスフェロイド特異的抗体を得た。これを用いて剖検脳の免疫組織化学的解析を行った。さらに、AD 脳から生化学的にアミロスフェロイド類似構造体を単離する方法を確立した。アミロスフェロイド神経毒性を抑制する中和抗体、形成を阻害する抗体も確立した。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

アミロスフェロイド検出系の構築

昨年、線維形成のリアルタイム観測に成功し、今年度は、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。

（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カルパイン可視化プローブ（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

ヒト骨髄間質細胞から分化誘導した神経細胞を京都大学出澤先生より供与を受け、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。

（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

アミロスフェロイド特異的抗体により、AD脳からアミロスフェロイドを生化学的に単離し、単離したヒトアミロスフェロイドに非常に強い神経毒性があることを示した。ヒトアミロスフェロイドは発症初期から10年程度のAD脳に有意に多く存在していた。

(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

アミロスフェロイド検出系の構築

A β が凝集しアミロスフェロイドを形成する過程を刻々とリアルタイムに、かつ定量的に今何量体が存在するかを観測する手法の構築に成功した。

(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

カルパイン可視化プローブについて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
ヒト骨髄間質細胞から分化誘導した神経細胞の場合も、サルESの結果と同様に、機能的により成熟した神経細胞がより多く神経細胞死を起こすことが明らかになった。従って、アミロスフェロイドはヒトを含む霊長類神経細胞、特に成熟神経細胞に毒性を発揮することが示された。

D. 考察

(1) 世界で初めてヒト患者脳より神経毒性のあるA β 凝集体を単離することに成功した。アミロスフェロイドは基礎研究のみならず、創薬ターゲットとしても有望であることが示された。

(2) 診断並びに治療効果の検定には、非侵襲的画像診断法が非常に重要である。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。

(3) カルパインは神経の障害の要因として近年注目されており、可視化プローブは非常に有効な研究ツールとなることが期待される。

(4) 分化誘導した霊長類神経細胞の系を活用することで、アミロスフェロイド毒性を阻害する低分子薬剤のスクリーニングが可能となる。また、得られた薬剤の安全性についても、ヒトに投与する以前に、ヒト由来神経細胞にて検証することが可能である。

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。

(3) 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。

(4) アミロスフェロイドがヒト由来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, 2006
- 2) Noguchi, A., Matsumura, S., Sato, M., Akioka, M., Ito, A., Tada, M., Ideno, S., Noda, M., Muramatsu, S., Itokazu, Y., Sato, K., Takahashi, H., Nabeshima, Y., Dezawa, M., Teplow, D., Kakita, A., Hoshi, M.: Direct identification of neurotoxic, spherical A β oligomers (amylospheroids) in Alzheimer's disease brain (submitted to Nature).

2. 学会発表

- 1) Noguchi, A., Sato, M., Sato, K., and Hoshi, M.: Enhanced neurotoxicity of amylospheroid (ASPD) derived from a pathogenetic form of β -amyloid (A β), E22G (Arctic) or D7N (Tottori) (Society for Neuroscience 2006, Oct. Atlanta)
- 2) W.-Z. Xia, T. Matsushita, Y. Nara, N. Takino, H. Nishida, M. Kodera, Y. Sasaki, S. Kikuchi, T. Okada, M. Hoshi, I. Nakano, K. Ozawa, S. Muramatsu: Efficient transduction of oligodendrocytes by AAB8 vectors: The Japan society of gene therapy's 12th annual meeting. Tokyo, August 24, 2006. (abstract p24).
- 3) S. Muramatsu, W.-Z. Xia, T. Matsushita, Y. Nara, N. Takino, H. Nishida, M. Kodera, Y. Sasaki, S. Kikuchi, T. Okada, M. Hoshi, I. Nakano, K. Ozawa: Efficient transduction of oligodendrocytes by AAB8 vectors: Parvovirus Workshop 2006 : Swiss: 2006.8.28
- 4) 野口彰彦, 佐藤道夫, 佐藤一紀, 星美奈子: 家族性アルツハイマー病原因遺伝子 Arctic, Tottori 変異を持つアミロイド β によるアミロスフェロイド形成の検証 (日本化学会第86春季年会、3月、船橋)
- 5) 星美奈子: 「アミロスフェロイド」研究 その後の進展: さきがけ「タイムシグナルと制御」第10回領域会議 2006.1.28 東京
- 6) 星美奈子: 脳の老化とアルツハイマー病: ラーノロジー公開講座(招待講演): 本郷: 東京 2006.12.4
- 7) 星美奈子: 球状 β アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」の同定: 鍋島陽一教授上原受賞記念研究

発表会：京都：2006.4.15

8) 星美奈子：毒性球状 β アミロイド凝集体アミロスフェロイドー特異的抗体によるアルツハイマー病患者脳を検証：第21回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会（招待講演）：東京：2006.5.27

9) 星美奈子：アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病発症機序解明：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 許南浩教授主催（2006年2月）岡山

10) 星美奈子：大学院特別講義 脳神経科学入門：基礎からアルツハイマー病まで：大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 菊地和也教授（2006年5月）吹田市

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

新規3件出願予定（4月中）

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 ($A\beta$) 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 $A\beta(1-40)$ と競合阻害実験に用いるために $A\beta$ 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 ($A\beta$) 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 $A\beta$ 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

$A\beta$ 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

$A\beta$ の構造活性相関を調べるため $A\beta(1-40)$ 、D7N- $A\beta(1-40)$ 、E22G- $A\beta(1-40)$ 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。

$A\beta$ の会合部位をスクリーニングするため $A\beta(1-40)$ のアミノ酸を 1 残基ずつ移動したペプチド 36 種 [$A\beta(1-5)$ 、 $A\beta(2-6)$ 、 $A\beta(3-7)$ ・・・] を合成した。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

$A\beta(1-40)$ の溶解度は $A\beta(1-42)$ 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 ($A\beta$) の構造と神経毒性の相関を明らかにするために種々の $A\beta$ 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
なし

2. 学会発表

1) Noguchi, A., Sato, M., Sato, K., and Hoshi, M.: Enhanced neurotoxicity of amylosporoid (ASPD) derived from a pathogenetic form of β -amyloid ($A\beta$), E22G (Arctic) or D7N (Tottori) (Society for Neuroscience 2006, Oct. Atlanta)
2) 野口彰彦, 佐藤道夫, 佐藤一紀, 星美奈子: 家族性アルツハイマー病原因遺伝子

Arctic、Tottori 変異を持つアミロイドβによるアミロスフェロイド形成の検証（日本化学会第86春季年会、3月、船橋）

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

カルパイン活性によって波長変化を起こす蛍光プローブの開発を行った。特に、細胞膜透過性を確保する分子デザインを行い、合成ステップを確立した。スイッチには Rhodamine のアニリンのアミド型・アミノ型構造変化による、重なり積分変化を用いて蛍光共鳴エネルギー移動速度が酵素反応前後で変化する、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。さらに、膜透過性を確保するために、膜透過性ペプチドを伸長する、合成ルートを考案した。

A. 研究目的

生体内で機能する分子の挙動を、細胞が生きている状態で可視化するためには蛍光プローブをデザイン・合成することが有効である。蛍光プローブを用いて可視化解析を行う最大の利点は高感度である点である。しかし、実際に細胞や組織を用いた実験に適用した場合、蛍光分子の蛍光強度は周囲の環境の変化（pH、極性の変化、温度など）、試料の厚さの違い、プローブの局在等の影響を受けて変動することが多い。これらの要因による測定誤差を減らし、目的分子のみの定量を可能にする測定法として、レシオ蛍光測定（*ratioimetric fluorescence measurement*）がある。レシオ蛍光測定は、励起波長または蛍光波長が異なる二波長における蛍光強度を同時に測定し、その比（レシオ）を計算する手法である。レシオ蛍光測定を行うためには、測定対象分子との反応あるいは結合によってスペクトルが変化する蛍光プローブが必要となる。このセンサー分子をデザインするのに有用な原理が蛍光共鳴エネルギー移動（*fluorescence resonance energy transfer, FRET*）である。今回は、このFRETの効率を酵素活性によって制御し、さらには細胞内への導入を容易にする分子デザインを行った。

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Aβ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。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。特に、細胞膜透過性プローブの作製を行った。

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ことを確認している。

C. 研究結果

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 μM 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。

さらに、細胞膜透過性を確保するために、2 種類の合成法を考案した。1 つめはプローブのカルボン酸基をアセトキシメチル基で修飾する手法である。この手法を用いればプローブの負電荷をなくして細胞膜内に受動的に取り込まれ、エステラーゼ活性によって加水分解されることで細胞内に留まるプローブを作製できる。2 つめは膜透過性ペプチドであるポリアルギニンを基質であるペプチド配列の先に導入するデザインである。このうち、膜透過性ペプチドの導入は、ペプチド合成機を用いた手法を組み込むことで簡便に合成できることが示された。

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。さらに、膜透過性プローブ合成法確立を行い、容易に実行可能である生物活性測定実験系を供出できる。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できると考えられる。

E. 結論

レシオ測定が可能であるカルパイン活性測定の膜透過性蛍光プローブの合成手法を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) T. Komatsu, K. Kikuchi, H. Takakusa, K. Hanaoka, T. Ueno, M. Kamiya, Y. Urano & T. Nagano. Design and Synthesis of an Enzyme Activity-Based Labeling Molecule with Fluorescence Spectral Change. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15946-15947 (2006)
- 2) T. Terai, K. Kikuchi, S. Iwasawa, T. Kawabe, Y. Hirata, Y. Urano & T. Nagano. Modulation of Luminescence Intensity of Lanthanide Complexes by Photoinduced Electron Transfer and Its

Application to a Long-Lived Protease Probe. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6938-6946 (2006)

- 3) A. Minami, N. Sakurada, S. Fuke, K. Kikuchi, T. Nagano, N. Oku & A. Takeda. Inhibition of Presynaptic Activity by Zinc Released From Mossy Terminals During Tetanic Stimulation. *J. Neurosci. Res.*, **83**, 167-176 (2006)

国内外の招待講演

- 1) 菊地和也, 千里ライフサイエンスセンターセミナー—ケミカルバイオロジーが拓く 21 世紀の創薬研究—, 「生命現象を可視化するセンサー分子開発によるケミカルバイオロジー展開」2006 年 9 月 29 日千里ライフサイエンスセンター, 豊中市
- 2) K. Kikuchi, Zinc Signals 2006, “Development of a Zinc Ion-selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications” 2006 年 9 月 16 日～21 日, シエナ市, イタリア
- 3) 菊地和也, 第 58 回日本生物工学会大会, 「細胞内イベントを可視化する化学プローブ」2006 年 9 月 12 日～14 日, 大阪大学豊中キャンパス, 豊中市
- 4) 菊地和也, 第 12 回日本生化学会近畿支部テクニカルセミナー—分子機能の直接解析法に基づく生理機能解明—, 「蛍光プローブのデザイン・合成による機能分子の可視化」2006 年 9 月 11 日, 大阪大学コンベンションセンター, 大阪大学吹田キャンパス, 吹田市
- 5) K. Kikuchi, International Symposium of Biomolecular Chemistry 2006, “Design Synthesis and Biological Application of Fluorescent Probes Which Convert Biological Responses to Chemical Output” 2006 年 8 月 15 日～20 日, 神戸市
- 6) K. Kikuchi, Japan-UK Joint Symposium on Chemistry of Coordination Space, “Visualization of Cellular Events Using Fluorescent Sensor Molecules” 2006 年 7 月 15 日～20 日, University College London, ロンドン市, 英国
- 7) 分子研シンポジウム—金属機能中心を持つ高性能分子システムの創成, その構造と機能—「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・応用」2006 年 6 月 15 日～17 日, 分子科学研究所, 岡崎市

別紙 3

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

蛍光相関法による抗体探索と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として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。本年度は検出感度を高めるため、多分子の抗体を融合させた半導体量子ドット（Qdot）をプローブとして用い、組換え牛プリオンタンパク質（rBoPrP）の検出を試みた。その結果、緩衝液中で rBoPrP を 0.029 nM まで検出することが可能であった。

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 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。

前回までは、FCS および FCCS を用いて組換え牛プリオンタンパク質（rBoPrP）を検出できたことを報告した。FCS を用いた場合、緩衝液中での検出限界値は 0.44 nM だった。FCCS を用いた場合、緩衝液中での検出限界値は 0.24 nM、牛脳抽出液中での検出限界値は 0.29 nM だった。検査場での使用を想定して開発した小型 FCCS 装置での検出限界値は、緩衝液中、牛脳抽出液中ともに 0.13 nM だった。

今回は、小型 FCCS 装置を用いて、プリオン感染マウスから異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）の検出を試みた結果を報告する。検出感度をさらに高めるため、半導体量子ドット（Qdot）をプローブとして用いた場合の検出感度についても合わせて報告する。

B.研究方法

抗体の蛍光標識

抗プリオン抗体（72 と 44B1）に対して蛍光色素で標識を行った。標識には、Alexa Fluor-488

tetrafluoropheny ester (Abs/Em: 495/519) と Alexa Fluor-647 succinimidyl ester (Abs/Em: 650/668) (ともにインビトロジェン) を用いた。1抗体あたりの色素数は、それぞれ 1.4 個(72-Alexa488)、3.9 個 (72-Alexa647)、3.6 個 (44B1-Alexa488)、1.6(44B1-Alexa647)であり、どれも過剰標識ではなかった。

また、Alexa の代わりに Qdot655 (Em: 655) (インビトロジェン) をプローブとして、抗プリオン抗体 (72) に標識を行った。標識はマレイミド基で活性化した Qdot に対して、還元してチオール基を生じさせた抗体を反応させて行った。1つの Qdot あたり、4 個の Fab が結合していると推定される。

測定機器

FCCS 測定には、小型 FCCS (浜松ホトニクスと共同開発) を用いた。本装置は、2本の LD 励起固体レーザー (473, 635nm)、水浸対物レンズ (U-Apochromat, 40x, 1.15NA, オリンパス)、2つの PMT 検出器(H8631-40, 浜松ホトニクス)から成る。蛍光は 570nm のダイクロイックミラーで分離し、495-575nm と 650nm 以上のフィルターを通した後、2つの検出器で受光した。

C.研究結果

1) FCCS の検出限界値 (プリオン感染マウス)
プリオン感染マウスを用いて、FCCS の検出限界値を検討した。検出には、Alexa488 と Alexa647 でそれぞれ蛍光標識した 72 (0.1 nM) と 44B1 (0.09

nM)を用いた。

室温での 60 分間の抗原抗体反応の後、FCCS 測定を行った。検出感度は、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、PrP と 72-Alexa532、44B1-Alexa647 から成る 3 量体の量に比例する。

その結果、FCCS を用いてプリオン感染マウスから 4 の 6 乗倍希釈まで PrP を検出することが可能であった。この検出感度は、フレライザ BSE の検出感度と同程度であった。r BoPrP を用いて 4 の 6 乗倍希釈の試料中の PrP 濃度を算出したところ、0.13 nM であった。この値は、前回報告した緩衝液中および牛脳抽出液中での r BoPrP の検出限界値と一致した。

Qdot を用いた場合の FCCS の検出限界値 (緩衝液中)

Qdot をプローブとして用いた場合の FCCS の検出限界値を検討した。検出対象は r BoPrP とし、緩衝液中 (PBS、pH 7.3) での検出を試みた。検出には、44B1-Alexa488 (0.22 nM) と 72-Qdot655 (0.27 nM) の組み合わせを用いた。

0.23 nM rBoPrP での相互相関関数の振幅値を比較した場合、プローブとして Qdot を用いた場合は Alexa を用いた場合の約 5 倍の振幅値だった。検出限界値は、Qdot655 を用いた場合 0.029 ± 0 nM (n=3) だった。比較のために、44B1-Alexa488 と 72-Alexa647、72-Alexa488 と 4 4 B1 Alexa647 を用いて行ったところ、検出感度はそれぞれ 0.37 ± 0.49 nM (n=3)、 0.19 ± 0.23 nM (n=3) だった。

D. 考察

FCCS 測定では、通常 2 つの波長で 2 つの蛍光分子を励起し、2 つの検出器で受けた 2 つのゆらぎの相互相関を評価する。相互相関関数の振幅は、2 つの蛍光分子の相関に比例するが、2 つの共焦点領域の重なりにも規定される。したがって、2 つのレーザー光の光軸合わせと観察領域を規定するピンホール合わせに気を配り、2 つの共焦点領域を一致させねばならない。

今回新たにプローブとして用いた Qdot は、短波長領域に吸収域をもつため、一波長励起多波長発光が可能となる。したがって、今回用いた Qdot655 と Alexa488 の組み合わせに対しても、1 つのレーザーのみを用いた一波長励起 (473 nm) が可能となる。これにより、レーザー光の光軸のズレによって生じる相互相関関数の振幅の減弱が改善され、S/N が高くなることが期待できる。加えて、Qdot 一分子あたりに多分子の抗体を融合させることが可能となるため、PrP に対する一分子のプローブあたりの親和性が増し、検出感度の向上が期待される。

Qdot には Fab が 4 分子結合していると推測される。したがって、今回の Qdot を用いた場合の検出感度の向上は、PrP に対する一 Qdot あたりの親和性が Alexa を用いた場合よりも高かったためと推測する。

Qdot を用いることによって光源を 1 つにできるため、装置の簡素化・低額化が可能となり、より検査場に適した小型・安価な装置の製造が期待できる。今後は、Qdot への抗体の結合法の検討とプリオン感染牛からの PrPSc 検出を試みたい。

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ロイド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。

G. 研究発表

- 論文発表
 - Konno H, Murakami-Fuse T, Fujii F, Koyama F, Ueoka-Nakanishi H, Pack CG, Kinjo M and Hisabori T. The regulator of the F1 motor: inhibition of rotation of cyanobacterial F1-ATPase by the epsilon subunit. *EMBO J.* 2006 Oct 4;25(19):4596-4604.
 - Jin T, Fujii F, Yamada E, Nodasaka Y and Kinjo M. Control of the optical properties of quantum dots by surface coating with calix[n]arene carboxylic acids. *J Am Chem Soc.* 2006 Jul 26;128(29):9288-9289.
 - Shintaro Mikuni, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo. Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy. *FEBS Letters* 581, 389-393, (2007)
 - Rieko Oyama, Hideaki Takashima, Masato Yonezawa, Nobuhide Doi, Etsuko Miyamoto-Sato, Masataka Kinjo and Hiroshi Yanagawa. Protein-protein interaction analysis by C-terminally specific fluorescence labeling and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, No. 14 e102 (2006)
 - Changi Pack, Kenta Saito, Mamoru Tamura, and Masataka Kinjo. Microenvironment and effect of energy depletion in the nucleus analyzed by mobility of multiple oligomeric EGFPs. *Biophys J.* vol 91 3921-3936 (2006)
 - Yu Ohsugi, Kenta Saito, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo. Lateral Mobility of Membrane-Binding Proteins in Living Cells Measured by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys J.* 91, 3456-3464 (2006)
 - Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Chan-Gi Pack, Gen Matsumoto, Shoshiro Hirayama, Yasuo Takahashi, Hiroshi Kimura, Masataka Kinjo, Richard I. Morimoto and Kazuhiro Nagata. Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nature Cell Biology* 8(10):1163-1169 (2006)
 - Shigeko Kawai-Noma Satoru Ayano, Chan-Gi Pack, Masataka Kinjo, Masasuke Yoshida, Kenji Yasuda and Hideki Taguchi. Dynamics of yeast prion aggregates in single living cells. *Genes to Cells* 11,

1085–1096, (2006)

9) Hideki Muto, Issei Nagao, Taku Demura, Hiroo Fukuda, Masataka Kinjo, and Kotaro T. Yamamoto.

Fluorescence cross-correlation analyses of molecular interaction between an Aux/IAA protein, MSG2/IAA19, and protein-protein interaction domains of auxin response factors of Arabidopsis expressed in HeLa cells *Plant Cell Physiol.*, 47, 1095-1101 (2006)

10) Takako Kogure, Satoshi Karasawa, Toshio Araki, Kenta Saito, Masataka Kinjo, and Atsushi Miyawaki A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Biotechnol* 30, 577- 581 (2006).

11) Yasutomo Nomura, Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura and Masataka Kinjo. Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 350,

196-201 (2006)

その他 解説

三國新太郎、金城政孝：細胞生物学における蛍光相関分光法と蛍光相互相関分光法。蛋白質核酸酵素 51, 1998-2005 (2006)

2. 学会発表 (関連したもの)

1) Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M and Kinjo M. Detection of prion protein immune complex using Fluorescence Correlation Spectroscopy and Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. 第44回年会日本生物物理学会 第5回東アジア生物物理学シンポジウム合同会議 (2006,11/12, 沖縄県宜野湾市)

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

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

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A 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。未分化ES細胞および神経幹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を明らかにした。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A 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）ベクターを作製し、定位脳手術によりカニクイサルの海馬に投与した。

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A β アミロイド蛋白の蓄積が認められ、A β が神経細胞死を引き起こすと考えられている。A 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、A 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

霊長類の神経細胞は、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細胞から神経細胞を分化誘導した。未分化ES細胞を、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し、その後附着させ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(ASPD)を添加し、細胞毒性の有無を検討した。

(2) サル脳内へのAPP遺伝子導入

CAGプロモーターあるいは神経細胞特異的SynIプロモーターによりアミロイド前駆体蛋白(APP)を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(AAV-APP)を作製した。カニクイサル3頭の脳内へAAV-APPを定位手術的に注入し、免疫組織化学・生化学的に検索した。

C. 研究結果

(1) 神経細胞に選択的な毒性発現

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ASPD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) サル脳内でのAPPの発現

神経細胞特異的SynIプロモーターによりAPPを発現するAAVを海馬と大脳皮質に注入した2頭の若年サルでは、6か月後の組織解析では、明らかな細胞脱落は認められなかった。CAGプロモーターを搭載したAAVベクターを海馬に注入した老齢サルについては、注入直後のMRIにより、海馬の広範な領域にベクターが拡散していることが確認できた。

(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。今後、それぞれの分化段階において、より純化した細胞集団を使用して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うことにより、毒性発現に関わ

る分子機構を明らかできると考えられる。

これまでの研究で、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。若年サル大脳皮質および海馬への注入では、明らかな神経細胞死は見いだせなかったが、若年サルでは、アミロイド分解酵素であるネプリライシンの活性が高いなど、種々の解毒作用が働いている可能性がある。今後、老齢サルの脳組織を詳細に解析することにより、神経細胞死の誘導とアミロスフェロイドが毒性を發揮する局面を捕捉できるものと考えられる。

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を明らかにした。APP を発現する AAV ベクターを作製し、カニクイサルの脳内に投与した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 村松慎一：アデノ随伴ウイルスベクターを応用したパーキンソン病の遺伝子治療。機能的脳神経外科, 45(2): 148-152, 2006.
2. 村松慎一：ES細胞による Parkinson 病の移植治療—臨床応用への課題。医学のあゆみ. 217(5): 371-376, 2006.
3. Wakamatsu M, Ishii A, Iwata S, Sakagami J, Ukai Y, Ono M, Kanbe D, Muramatsu S, Kobayashi K, Iwatsubo T, Yoshimoto M: Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human α -synuclein in mice. *Neurobiol Aging*, *in press*.
4. Sawada H, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, Muramatsu S, Nakano I, Nagatsu T, Sawada M: Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurosci Res*, *in press*.

2. 学会発表

1. 奈良優子, 村松慎一：未分化 ES 細胞同種移植によるサル脳内腫瘍の形成。第 47 回日本神経学会総会, 東京, 2006 年 5 月 12 日。(プログラム P 106)
2. 村松慎一: パーキンソン病モデルサルへのヒト ES 細胞由来神経幹細胞移植。第 47 回日本神経学会総会, 東京, 2006 年 5 月 12 日。(プログラム P 106)
3. 村松慎一: 遺伝子治療の可能性。第 26 回日本脳神経外科コンgres, 東京, 2006 年 5 月 14 日。(脳神経外科ジャーナル Vol.15 P 37)
4. 花園豊, 岸本紀子, 田中裕次郎, 池田たま子, 柴田宏昭, 村松慎一, 揚山直英, 林聡, 北野良博, 阿部朋之, 長尾慶和, 寺尾恵治: ES 細胞を利用する移植・再生治療の安全性に関する研究。第 4 回幹細胞シンポジウム, 東京, 2006 年 5 月 19 日。(抄録集 p 42)
5. 古寺美加, 村松慎一, 奈良優子, 滝野直美, 西田紘子, 奥野剛, 小西奈依, 道端英男, 鈴木豊, 近藤靖, 仁藤新治, 中野今治: 自殺遺伝子を導入したより安全な移植用 ES 細胞の開発。第 4 回幹細胞シンポジウム, 東京, 2006 年 5 月 19 日。(抄録集 p 42)
6. Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Tamura Y, Okuno T, Konishi N, Michihata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Nakano I, Muramatsu S. Embryonic stem cells expressing suicide gene reduced risk of teratoma formation. The 29th Annual meeting of the Japan Neuroscience Society. Kyoto, July 20, 2006.
7. Xiao W-Z, Matsushita T, Nara Y, Takino N, Nishida H, Kodera M, Sasaki Y, Kikuchi S, Okada T, Hoshi M, Nakano I, Ozawa K and Muramatsu S. Efficient transduction of oligodendrocytes by AAV8 vectors. The Japan society of gene therapy's 12th annual meeting. Tokyo, August 24, 2006. (abstract p24).
8. Muramatsu S, Kodera M, Nara Y, Takino N, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michibata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells reduces risk of teratoma formation. The Japan society of gene therapy's 12th annual meeting. Tokyo, August 26, 2006. (abstract p34).
9. 古寺美加, 山本茂一, 近藤靖, 仁藤新治, 村松慎一: 自殺遺伝子導入による安全な移植用 ES 細胞の開発。第 46 回日本臨床化学会年次学術集会, 東京, 2006 年 9 月 8-9 日。
10. Muramatsu S, Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michibata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells for safer cell therapy. Tenth International Congress of Parkinson's Disease and