

200710021A

政策創薬総合研究事業

平成19年度

# 政策創薬総合研究

## 研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

# 目 次

## 課題番号

## 重点研究

### A分野 稀少疾病治療薬の開発に関する研究

|         |  |       |    |    |
|---------|--|-------|----|----|
| KHA1001 | 難治性てんかん・ネフローゼを合併する新たな症候群の病態解明と診断システム及び治療法の開発に関する研究 | 飯島 一誠 | …… | 1  |
| KHA1002 | ボツリヌス神経毒素による中枢情報伝達制御薬の開発ーてんかんと難治性疼痛の克服に向けて         | 銀永 明弘 | …… | 7  |
| KHA1003 | 変異蛋白が誘導するストレスを原因とする神経(精神)筋疾患に対する治療候補化合物の開発に関する研究   | 桃井 隆  | …… | 12 |
| KHA1004 | 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             | 清河 信敬 | …… | 22 |
| KHA2031 | 輸入熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬を用いた最適な治療法による医療対応の確立に関する研究    | 木村 幹男 | …… | 34 |

### B分野 医薬品開発のための評価科学に関する研究

|         |   |       |    |     |
|---------|---|-------|----|-----|
| KHB1005 | 西洋ハーブ及び新一般用漢方処方構成生薬の品質確保と評価に関する研究             | 合田 幸広 | …… | 45  |
| KHB1006 | 先端技術を応用した製剤の品質確保と評価に関する研究                     | 川西 徹  | …… | 55  |
| KHB1007 | 代替毒性試験法の評価と開発に関する研究                           | 能美 健彦 | …… | 65  |
| KHB1008 | ファーマコゲノミクス情報に基づいた医薬品の有効性及び安全性評価系の開発と医薬品開発への応用 | 黒瀬 光一 | …… | 78  |
| KHB1009 | 医薬品の安全性監視と安全性監視計画立案のための医薬品安全性情報の解析、評価に関する研究   | 森川 馨  | …… | 89  |
| KHB1010 | グリア細胞をターゲットとした創薬のための評価科学基盤の確立                 | 佐藤 薫  | …… | 103 |
| KHB1011 | バイオ医薬品の特性解析及び品質・安全性評価法の開発                     | 山口 照英 | …… | 112 |
| KHB1012 | 抗フリーラジカル剤開発に向けた病態解析と科学的評価法の確立                 | 綱脇 祥子 | …… | 122 |
| KHB1202 | 家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発          | 寺尾 恵治 | …… | 132 |

### C分野 政策的に対応を要する疾患等の予防診断・治療法等の開発に関する研究

|         |   |       |    |     |
|---------|---|-------|----|-----|
| KH51102 | 内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法確立        | 長谷川浩二 | …… | 138 |
| KHC1013 | ワクチン創生の新テクノロジーによる新規ワクチンの開発              | 小島 朝人 | …… | 144 |
| KHC1014 | 転写制御因子ネットワークによる次世代の動脈硬化予防治療薬開発に関する基礎的研究 | 最上 知子 | …… | 150 |
| KHC1015 | ライソゾーム病の酵素製剤の適正使用法の確立と遺伝子・細胞治療法の開発      | 奥山 虎之 | …… | 159 |

|                                 |   |       |       |
|---------------------------------|---|-------|-------|
| KHC1016                         | 冠・脳血管攣縮の抑制薬としてのS1P3受容体拮抗薬の開発  | 望月 直樹 | ……161 |
| KHC1017                         | 自己免疫疾患に対する蛋白性医薬品の創出戦略とその応用に関する研究  | 堤 康央  | ……165 |
| KHC1018                         | 感染性C型肝炎ウイルス株および感受性培養細胞ライブラリーの構築   | 脇田 隆字 | ……181 |
| KHC1019                         | 癌、炎症・アレルギー、眼科疾患における創薬ターゲット遺伝子の同定  | 田中 輝幸 | ……192 |
| KHC1020                         | 脱細胞化組織を用いた再生医療用生物由来素材の開発と各種組織移植への展開   | 藤里 俊哉 | ……197 |
| KHC1021                         | 細菌性ベクター及び粘膜アジュバントを用いた新興・再興感染症に対する新規予防・治療法の開発                                  | 前山 順一 | ……207 |
| KHC1022                         | クロイツ・フェルト・ヤコブ病 (CJD) 特異的な、簡便かつ迅速髄液検査法の開発                                      | 飛梅 実  | ……217 |
| KHC1023                         | 多様な生理活性を持つ機能性成分の安定化による新たな難治性慢性疾患の予防および治療法の構築                                  | 矢野 友啓 | ……222 |
| KHC1024                         | メタボリックシンドローム予防・治療薬の開発のための基盤研究   | 江崎 治  | ……227 |
| KHC1025                         | 慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体検出のための診断用プロテインチップの開発および抗体産生機序の解明に関する研究                     | 梨井 康  | ……233 |
| KHC1203                         | 弱毒生ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究  | 大隈 邦夫 | ……242 |
| KHC1204                         | チオレドキシニンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発                                  | 井上 達  | ……247 |
| KHC2032                         | 臍帯血DLIの実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレーショナルリサーチ                                     | 藤原 成悦 | ……260 |
| KHC2206                         | 腹膜癒着予防剤の開発と応用   | 土肥多恵子 | ……268 |
| <br>D分野 医薬品等開発のためのヒト組織の利用に関する研究 |   |       |       |
| KHD1026                         | 規格化された高品質な成育バイオリソースと異種由来成分を排除した完全ヒト型培養システムの構築—再生医療・細胞治療の有効性、安全性の検証システムの標準化—   | 梅澤 明弘 | ……272 |
| KHD1027                         | 人由来組織利用研究円滑化のための社会的・技術的インターフェースの整備  | 絵野沢 伸 | ……276 |
| KHD1028                         | 医薬品開発の効率化を指向したヒトCYP分子種発現細胞系を用いる新規ヒト肝薬物代謝評価系の確立                                | 中澤 憲一 | ……282 |
| KHD1029                         | ヒト胚性幹細胞 (ES細胞) に由来する血管内皮細胞の安定大量供給のための方法論の確立—基礎研究および薬効評価・毒性試験のためのヒト材料提供を目的として— | 佐伯久美子 | ……292 |
| KHD1030                         | ヒト脂肪由来幹細胞を用いた医薬品開発研究  | 田上 昭人 | ……299 |
| KHD1205                         | ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究  | 阿久津英憲 | ……314 |
| KHD2207                         | ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究                                    | 後藤 雄一 | ……321 |

若手研究者奨励研究

A分野 稀少疾病治療薬の開発に関する研究

|         |   |       |       |
|---------|---|-------|-------|
| KH23331 | 寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究 | 中野由美子 | ……327 |
| KHA3301 | 微生物変換によるリファンピシン類の新規リード化合物の創出と創薬への応用     | 星野 泰隆 | ……339 |
| KHA3302 | 次世代の防疫用殺虫剤（医薬品）開発のための新規標的分子探索に関する研究     | 葛西 真治 | ……344 |

B分野 医薬品開発のための評価科学に関する研究

|         |  |       |       |
|---------|--|-------|-------|
| KH33332 | 制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディの基礎的および応用的研究              | 川上 浩司 | ……350 |
| KHB3304 | 病原真菌の薬剤排出ABCトランスポーターの基質特異性決定メカニズムの解明                   | 田辺 公一 | ……359 |
| KHB3305 | 開発医薬品評価への応用を目標としたアポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発 | 大喜多 肇 | ……365 |

C分野 政策的に対応を要する疾患等の予防診断・治療法等の開発に関する研究

|         |  |       |       |
|---------|--|-------|-------|
| KH53333 | 治療ターゲットとしてのFc $\gamma$ 受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析  | 林 昌宏  | ……370 |
| KHC3306 | 細胞ラベル化MRI造影剤の化学構造最適化による in vivo イメージングコントラストの向上      | 橘 洋一  | ……379 |
| KHC3307 | 日和見感染症治療ならびに遺伝子治療用ベクターとしての特性解析を目指したB群アデノウイルスの感染機構の解明 | 櫻井 文教 | ……389 |
| KHC3308 | 感染性心内膜炎起因菌によるバイオフィーム形成メカニズムの解明とバイオフィーム形成阻害薬の開発       | 中尾 龍馬 | ……397 |
| KHC3309 | 軸索保護の分子メカニズムの解明と神経変性疾患治療薬の開発への応用                     | 若月 修二 | ……405 |
| KHC3361 | C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究                         | 村上 恭子 | ……410 |
| KHC3363 | HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究       | 奥平桂一郎 | ……417 |

# 重点研究

## 難治性てんかん・ネフローゼを合併する新たな症候群 の病態解明と診断システム及び治療法の開発に関する 研究

所 属 国立成育医療センター腎臓科

研究者 飯島 一誠

**研究要旨** Galloway-Mowat 症候群の家系を対象として、高密度 SNP マッピングアレイと高密度マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析によって、病因遺伝子候補領域を 5.98Mb に絞り込んだ。現在、8 つに絞り込んだ候補遺伝子解析中である。

### 分担研究者

佐藤秀則

ヒュービットジェノミクス株式会社研究員

塚口裕康

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部病態情報診断学助教

仲里仁史

熊本大学医学部附属病院小児科助教

### A. 研究目的

ネフローゼ症候群患者の約 20%はステロイドや免疫抑制剤に反応しない難治性ネフローゼ症候群であり、高頻度に腎不全に進行し、わが国の末期腎不全症例の 3-4 割を占める主因疾患であるが、その病因・病態の解明は進んでおらず、未だに根本的な治療法はない。近年、欧米の家族性ネフローゼ症候群の家系解析研究でいくつかの病因遺伝子が判明しているが、民族間の遺伝的背景が異なるためか、わが国の症例ではほとんど変異は見いだせず、本邦独自の症候群解析による病因・病態解明が必要である。一方、精神運動発達遅延や難治性てんかんなどの対応方策の確立も成育医療上の重要課題であるが、依然として大半の疾患の病

因は不明であり対症療法がなされているに過ぎない。とくにてんかん患者の約 30%は薬剤不応性であり、治療上の大きな問題となっており、その病因・病態の分子レベルでの理解と、分子を標的とした新規治療法の開発が急務である。

ポドサイトと中枢神経細胞は、形態学的にも機能的にも類似点が指摘されており、共通の発生分化機構が存在する可能性が高い。Galloway-Mowat 症候群は、腎糸球体硬化病変を示す小児期ネフローゼと、小頭症、難治性てんかんなどの中枢神経障害を主徴とし、ポドサイトと中枢神経細胞に共通した生物経路異常が主因と推測される。

本研究では、Galloway-Mowat 症候群の病因遺伝子を同定し、腎糸球体と中枢神経に共通する分子カスケードを解明するとともに、病因遺伝子診断システムを確立する。

### B. 研究方法

Galloway-Mowat 症候群の病因遺伝子同定のために、我々は、Galloway-Mowat 症候群の日本人 7 家系を収集した。このうち近親婚家系で 4 名の患者を持つ家系 GM-1 は homozygosity mapping を用いることが

可能であることから、この家系を集中的に解析した(図1)。これまで得られていた患者・家族の DNA 検体に加え、死亡した患者3、4の組織標本からDNAを抽出し、解析に供した。遺伝学的解析法として、Affymetrix 100k SNP マッピングアレイを用いたゲノムワイド SNP タイピング及び高密度マイクロサテライトマーカーによるマッピングにより、候補領域の絞り込みを行った。また、UCSC ゲノムブラウザや Genecards 等のバイオインフォマテイクスより組織発現情報を得て候補遺伝子絞り込んだ。

(倫理面への配慮)

本研究を含めた遺伝子研究計画書「腎疾患における原因遺伝子の検索」は、平成16年1月23日、三省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した国立成育医療センター倫理審査委員会において承認された。検体の提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取扱いについては十分配慮し、必要に応じて国立成育医療センター遺伝診療科にて遺伝カウンセリングを提供する。

### C. 結果

GM-1の患者1、2及び健常者の一部を対象として、Affymetrix 100 k SNP マッピングアレイを用いたゲノムワイド SNP タイピングによる解析を行ったところ、1番染色体(Chr1q42)に、約16 Mbにわたり連続する autozygous な領域を認め、maximum regional LOD 値126.1を得ており、この領域に病因遺伝子が存在する可

能性が極めて高いと考えられた(図2)。次に、候補領域を狭小化するために、死亡した患者3、4の組織標本からDNAを抽出し、高密度マイクロサテライトマーカーによるマッピングを行ったところ、候補領域を5.98 Mbにまで絞り込めた(図3)。この候補領域に存在する遺伝子は約50個であるが、UCSCゲノムブラウザや Genecards 等のバイオインフォマテイクスより、その組織発現パターン

を検索し、胎児期の脳及び腎に発現する8つの遺伝子を候補遺伝子としてピックアップした。現在、これらの候補遺伝子のエクソン及びエクソン-イントロン境界領域をシーケンスし、変異の有無を検討中である。

### D. 考察

近年、欧米の家族性ネフローゼ症候群の遺伝子解析研究は、ポドサイト濾過障壁の分子機構解明に新たな展開をもたらした。1998年に発見されたフィンランド型先天性ネフローゼ症候群病因遺伝子 NPHS1(ネフリン)はポドサイト濾過障壁の構成分子であった。それに続き、小児発症家族性ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群(SRNS)の病因遺伝子 NPHS2(ポドシン)、成人型家族性 SRNS の病因遺伝子 ACTN4( $\alpha$ -アクチニン4)が発見され、いずれもポドサイト足突起の構成分子であることがわかった。さらに最近、TRPC6(非選択的カチオンチャンネル)や PLCE1(イノシトールリン脂質代謝経路酵素)も家族性ネフローゼ症候群の病因であることが判

明し、膜電位や脂質シグナリングという新たな生物経路の関与がトピックスとなっている。特に PLCE1 変異患者では一部ステロイドが有効な症例もあり、薬物治療的介入の有用性を示唆している。

一方、我々は、わが国では、上記の遺伝子変異を呈する症例はほとんどないことを報告している (Pediatr Nephrol 2003, Nephrol Dial Transplant 2006)。

ポドサイトと中枢神経細胞は、形態学的にも機能的にも類似点が指摘されており、共通の発分化機構が存在する可能性が高い。

難治性ネフローゼ症候群、中枢神経発達障害や難治性てんかんを主徴とする Galloway-Mowat 症候群の病変主座は糸球体上皮細胞 (ポドサイト) と中枢神経細胞にあると推測され、その病因遺伝子の同定、病因分子に関連する相互作用分子の網羅的検索、及び疾患に関与する分子カスケードの解明は、単にまれな遺伝性疾患の病因・病態の理解にとどまるものではなく、腎糸球体と中枢神経に共通する生物学的機能の普遍的な追求に通じ、新たな視点から、臨床現場で遭遇頻度の高い一般のネフローゼ症候群やてんかんの病態解明やゲノム創薬等の新規治療薬の開発に資するものである。

#### E. 結論

Galloway-Mowat 症候群の家系を対象として、高密度 SNP マッピングアレイと高密度マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析によって、病因遺伝子候補領域を 5.98Mb に絞り込んだ。現在、8 つに絞り込

んだ候補遺伝子解析中である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



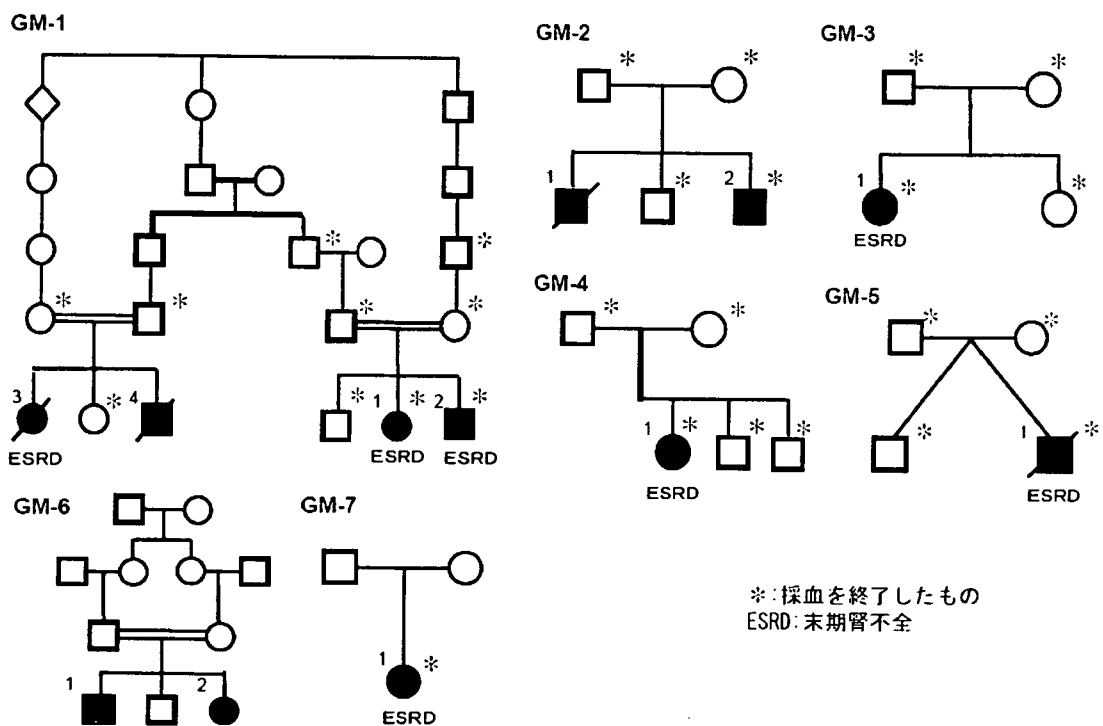
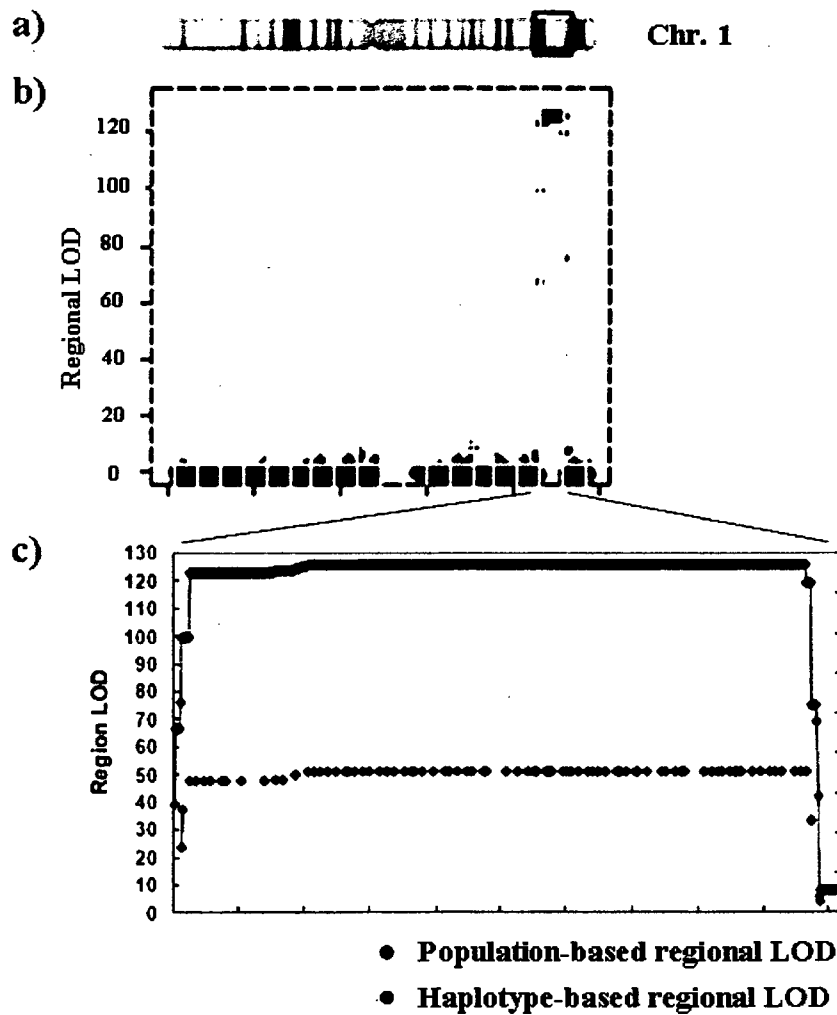


図1. わが国におけるGalloway-Mowat症候群家系

我々は、上記のように日本人Galloway-Mowat症候群の7家系を収集した。そのうちGM-1は4名の患者を持つ近親婚家系であり、今年度は、この家系を中心に解析を進めた。

図  
2 .



#### GM-1 の 100k SNP マッピングアレイを用いた一次スクリーニング

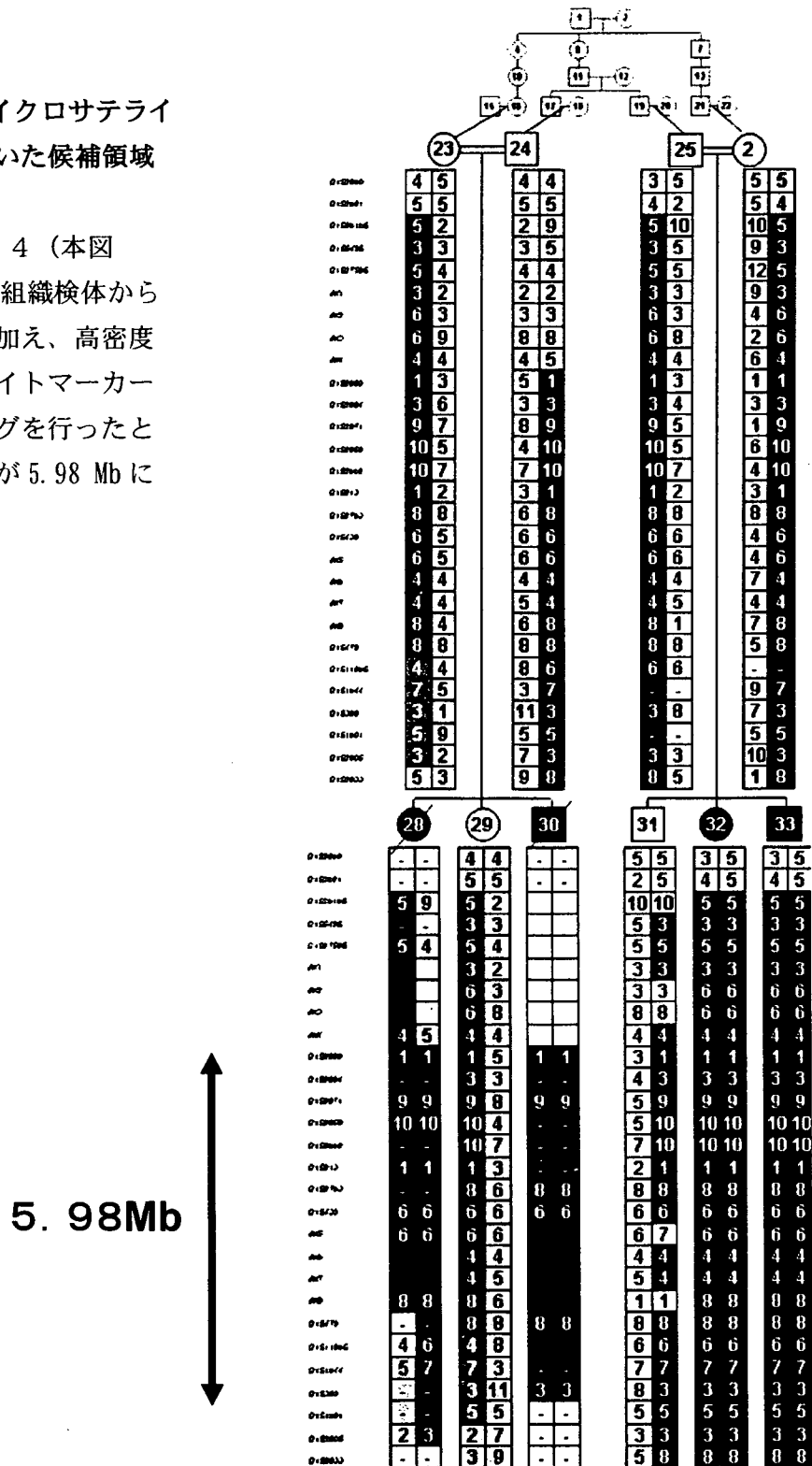
図 1 の家系 GM-1 の全ゲノム領域の SNP タイピングを行い、GeneSpring GT プログラムを用いて遺伝子型データを解析し、ホモ接合体領域を検出するとともに、Regional LOD 値を算出した。

a) 染色体 1 番の長腕テロメアに 1.6 Mb にわたり連続するホモ接合体領域 (太線で囲った部分) を検出した。

b, c) この領域の最大 Regional LOD 値は 126.1 であり、有意な連鎖を認めた。

図 3. 高密度マイクロサテライトマーカーを用いた候補領域の狭小化。

GM-1 の患者 3, 4 (本図では 28, 30) の組織検体から抽出した DNA を加え、高密度マイクロサテライトマーカーによるマッピングを行ったところ、候補領域が 5.98 Mb にまで狭まった。



## ボツリヌス神経毒素による中枢情報伝達制御薬の開発 -てんかんと難治性疼痛の克服に向けて

所 属 財団法人化学及血清療法研究所  
研究者 銀永 明弘

研究要旨 従来の薬剤に比べて安全性・有効性が高く抗原性の少ない低分子量（分子量 15 万）ボツリヌス毒素（NTX）を開発した。本研究ではこれを応用して中枢神経のシナプス伝達の調節・制御をはかり、社会的に必要性の高い難治性疼痛やてんかんの治療法を開発を行う。本年度は NTX の拡散性・抗原性・中枢神経への応用の可能性など、その基礎的な準備実験を行った。

### 分担研究者

- (1) 徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・感覚情報医学講座神経情報医学分野  
梶 龍児
- (2) 大阪府立大学大学院・農学生命科学研究科  
小崎 俊司
- (3) 国立精神・神経センター・国府台病院  
坂本 崇

### A. 研究目的

ボツリヌス毒素製剤は痙性斜頸、眼瞼痙攣などの過剰筋収縮状態に対して保険適応をもち、臨床に使用されている。その作用として、運動神経終末からのアセチルコリン放出を阻害することが分かっているが、最近になりボツリヌス毒素が放出を阻害するのは運動神経のみではなく、感覚神経や自律神経での神経伝達物質をも含むことが分かってきた。難治性神経痛は糖尿病性末梢神経障害やヘルペス後疼痛、複合性局所疼痛症候群（CRPS）、視床痛、脊髄損傷後など多岐にわたる原因によって生じるが、内服薬や神経ブロックでも満足すべき鎮痛効果が得られないことが多く、新たな治療法が開発が望まれている。末梢感覚神経の末端では自由終末として皮膚に存在する無髄C線維が温痛覚を伝達するが、その異常興奮により過剰な情報が脊髄に伝達され痛覚過敏や自発痛として捉えられる。最近開発された皮膚生検による末梢神経終末評価法により神経終末の分布を観察する事が可能となり、さらに痛みに関連したバニロイド受容体（TRPV1）などの受容体の発現を観察する事が可能となった。そこで梶らの研究の目的は、

（1）神経原性疼痛の患者ならびにモデル動物ではバニロイド受容体などの痛み関連受容体の発現が亢進しているか、（2）新型ボツリヌス毒素の局所投与

は安全な治療か、また投与により受容体の発現に変化をもたらさるか、また臨床効果はあるか、の2点を目的とした。

坂本らは、ボツリヌス神経毒素製剤の性質上、最も重要なことは、安全性の担保であり、注射部位に留まって拡散しない、ということが挙げられると考えている。今年度アメリカにおいて、ボツリヌス神経毒素製剤の使用が重篤な副作用をもたらす恐れがあるとの警告が出されており、その意味からも、品質管理の中でも特に拡散性について検討することを目的とした。

小崎らは、毒素の神経細胞への作用を発現する際の起点となる受容体の解析は、毒素の作用機構を理解する上で重要な課題であると考え、また、A型以外の他の型の毒素が治療薬として開発する際の有用な知見となる。これまで、小崎らはB型がシナプス小胞膜の構築タンパクであるシナプトタグミン I (StgI) またはシナプトタグミン II (StgII) とガングリオシドの複合体であることを実証し、最近A型がSV2 (synaptic vesicle protein 2) であることが報告されている。一方、C型はガングリオシド GD1b、GT1b、D型は磷脂質、フォスファチジルエタノールアミン (PE) の非蛋白質物質が受容体の候補となることを明らかにした。これらの結果は、これら多様な毒素受容体が末梢の神経筋接合部だけでなく、中枢神経のシナプスにも存在していることを容易に想像させ、毒素をシナプス伝達の調節・制御に応用することにより、社会的に必要性の高い難治性疼痛やてんかんの治療薬として開発しうる可能性があることを示唆している。そこで本年度は、まだ治療薬として応用されていないCおよびD型毒素の性状をさらに理解するために各型毒素分子内の受容体結合に関与するアミノ酸残基を特定し、受容体の分子間に

おける相互作用を明確にすることを目的とした。

銀永らは、ボツリヌス毒素治療を受けている患者において少ないケースではあるが治療効果が認められなくなる患者があり、その血清中には微量の毒素中和抗体が含まれる可能性を考えた。ボツリヌス毒素に対する中和抗体価の測定にはマウス中和試験法が国際的に用いられている。しかし、この方法は中和されなかった残存毒素の致死活性を指標として抗体価を測定しており、検出感度が低く、上記患者の多くは検出限界以下となるため、検出感度を上げた試験系の構築が必要と考えられる。そこで、今回、微量のボツリヌス毒素を定量できるラット複合筋活動電位測定(平成16年度～平成18年度 政策創薬研究事業 課題番号 KH41038 にて構築)を利用した中和抗体測定法(以下、ラット中和 CMAP 試験)で感度よく中和抗体価を測定できないか検討した。

## B. 研究方法

### 梶らの研究方法：

- (1) 患者：糖尿病性末梢神経障害、ヘルペス後疼痛症候群、複合性局所疼痛症候群の患者の疼痛部より直径3ミリの皮膚パンチ生検を行い、ザンボ二液で固定した後-20度で凍結保存した。ミクロトームにて厚さ50 $\mu$ mの標本を作製し、免疫組織染色を行った。一次抗体にはPGP9.5(神経軸索)、GAP43(神経再生・伸長のマーカー)、TRPV1(バニロイド受容体)、NGF(神経栄養因子)などを用い、AlexaFluor 蛍光色素で標識された2次抗体を用いた。新型ボツリヌス毒素(NTX)を疼痛部位に皮下注射し、1ヶ月後の疼痛スケールをvisual analogue scale (VAS)で投与前と比較した。
- (2) ストレプトゾシン(50mg/kg)をオスSDラットに腹腔内投与し血糖値が300mg/dl以上のものを選択し糖尿病モデルを作成した。同様にパクリタキセル(1mg/kgを一日おきに4回)腹腔内に投与し、化学療法後の神経痛モデルを作成した。ホット・コールドプレート試験(冷覚・温覚過敏の評価)、von Frey フィラメントによる感覚閾値(アロディニアの評価)を投与前後で行い、後脚足底へのNTX投与前後の行動評価を行った。患者群と同様に足底から皮膚組織を採取し、免疫組織染色を行った。

### 坂本らの研究方法：

ICRマウス5週齢メス(体重平均20g)の前肢筋にボツリヌス神経毒素製剤を注射し、経時的に前肢筋の牽引力を測定する。投与量は0.5U/kgから1U/kgまで7段階、各3匹ずつの検討を行った。牽引力はマウスを水平に保定し、左右上肢個々にフックを把握させたときの力とした。ボツリヌス神経毒素製剤

は、NTX に関しては主任研究者所属の化学及血清療法研究所によって製作されたものとし、BTX(分子量90万、LL毒素)は実験用に個人輸入したアラガン社アイルランド製BOTOXを用いた。

### 小崎らの研究方法：

1. 神経毒素重鎖C末端領域(Hc)リコンビナント蛋白の精製
  - (1) リコンビナントHcの調製  
C型(CB-19株、C)、C/Dモザイク(003-9株、D1)およびD型(1873株、D2)神経毒素HcのcDNAをpET-30ベクターにクローニングした。発現用大腸菌BL21-CodonPlus(DE3)-RILにトランスフォーメーションし、IPTGでリコンビナント蛋白の発現を誘導した。発現リコンビナント蛋白はN末端領域にHis-Tagが付加した形で産生された。菌体を遠心により回収し、可溶剤(B-PER、Pierce)に懸濁後、超音波破碎し、氷上で静置したのち、遠心上清を回収した。上清はNi-Sepharose 6 Fast Flow(GE Healthcare)を用いたアフィニティークロマトで精製した。
  - (2) 神経毒素受容体結合部位に関わるアミノ酸残基の同定  
Hc/D1のC末端領域をHc/C(C1;1112-1290 aa、C2;1230-1290 aa、C3;1279-1290 aa)に置換したキメラ変異体(Hc/DC1、Hc/DC2、Hc/DC3)を作製した。ラット脳シナプトソームを用いてキメラ変異体による<sup>125</sup>I標識Hc/CおよびHc/D1への結合阻害活性を調べた。ガングリオシドGD1b、GT1bおよびPEへの直接結合は、各標品を薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開後、ビオチン標識Hc/C、Hc/D1およびキメラ変異体による処理、さらにアビジン標識HRPを用いる検出によるoverlay assayで調べた。Hc/Cの受容体結合に関与するアミノ酸残基を特定するために、Hc/C点変異体を作製した。各Hc/C点変異体の結合活性はラット脳シナプトソームへの<sup>125</sup>IHc/Cに対する阻害の程度で調べた。

D型毒素においてHc/D1とHc/D2のPEに対する結合親和性が異なることから、Hc/D1のC末端領域をD2(1158-1275 aa;Hc/D1D2)に、Hc/D2のC末端領域をD1(1162-1279 aa;Hc/D2D1)に置換したキメラ変異体とさらにHc/D2のC末端領域をHc/D1(D1;1162-1279 aa、D2;1139-1279 aa、D3;1112-1279 aa、D4;943-1279 aa)に置換したキメラ変異体(Hc/DD1、Hc/DD2、Hc/DD3、Hc/DD4)および点変異体を作製し、ラット脳シナプトソームを用いて<sup>125</sup>IHc/D1に対するキメラ変異体および点変異体の結合阻害活性の程度を調べた。

## 銀永らの研究方法：

標準 A、B、E、及び F 型ボツリヌス抗毒素（国立感染症研究所）、頻回投与による治療効果が減弱した患者の血清、及び試験毒素（A、B、E、及び F 型ボツリヌス神経毒素）を使用した。

標準抗毒素と患者血清はそれぞれ 0.5 w/v% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で階段希釈して調製した。各試験毒素を一定の濃度（A 型：10 U/mL、B 型：6 万 U/mL、E 型：60 U/mL、F 型：600 U/mL）に希釈した。階段希釈した標準抗毒素（または患者血清）と標準抗毒素の型に対応した試験毒素をそれぞれ等量混合し、室温で 1 時間反応させた。

ラット（雌性 SD 系、9.5 週齢、日本チャールスリバー、5 匹/群）は約 40mg/Kg のペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル、共立製薬）を腹腔内に投与して麻酔した。眼瞼反射の消失後、ラット後肢を剃毛し、標準抗毒素と試験毒素の反応液を左後肢の腓腹筋に 0.1ml 投与した。投与には 30 ゲージのインシュリンシリンジ（BD Ultra-Fine、BD）を使用した。

CMAP 試験用電極は、刺激電極をラットの脊髄根上に、アクティブ記録電極を左後肢腓腹筋筋腹に、リファレンス記録電極を左後肢腓腹筋腱に、アース電極を尾根部に各々設置した。刺激は 25 mA、0.2 msec で行った。投与部位である左後肢の CMAP は 0（投与前）、1 日後に測定した。

CMAP 振幅値の解析には Statistical Analysis for Neuritoxin (SAN ver2.1、自社開発ソフト) を用いた。標準抗毒素の中和抗体価の対数値を横軸に、振幅値を縦軸にプロットし、回帰分析により直線性が得られる範囲を設定した。患者血清の中和抗体価は、標準抗毒素（A 型）の検量線から求めた。

### （倫理面への配慮）

ヒトの皮膚に対して NTX を投与することに関してすでに徳島大学倫理委員会の承認を得て、十分な説明に基づく同意をえて施行した。その他動物実験についてはそれぞれの施設の動物実験に関する指針に従っておこなわれた。

## C. 研究結果

### 梶らの結果：

- (1) 総数で 7 名の患者に対し NTX の投与を行った。筋力低下、発疹などの副作用はなく安全性を確認できた。1 ヶ月後の痛みスケール (VAS) は平均 6.5 から 4.2 へと改善を示し、持続期間は 2 から 3 ヶ月だった。3 人には鎮痛作用は明らかではなかった。皮膚生検により神経終末数には変化はなかったものの TRPV1 への染色性が低下した患者が 3 人いた。

- (2) トレプトゾシンとパクリタキセル投与モデルラット両者で投与後 2、3 週してホットプレート試験で反応時間の短縮を認め、von Frey フィラメントで反応閾値の低下を認めた。NTX 投与後 1 週間でこれらの異常所見は改善傾向を示し、皮膚組織でも同様に TRPV1 の染色性低下を認める傾向があった。

### 坂本らの結果：

注射を行った左前肢筋の牽引力は容量依存性に低下し、NTX の方が BTX (LL 毒素) に比べてその低下が早く現れる傾向がみられた。右前肢筋の牽引力の低下は 0.5U/kg・1U/kg の低容量の投与ではみられず、投与 2 日目 NTX で 5U/kg から、BTX (LL 毒素) で 2.5U/kg からみられた。さらに 50U/kg の投与では、BTX (LL 毒素) で投与 2 日目に 1 匹死に、残ったものも両前肢の機能は廃絶していた。NTX 投与でも 3 日目に 1 匹が死んでいるが、牽引力測定ではほとんど測定不能ではあるものの、右前肢を用いて動こうとする様子が保たれていた。

### 小崎らの結果：

#### 1. リコンビナント Hc の調製

C 型 (CB-19 株、C)、C/D モザイク毒素 (003-9 株、D1) および D 型 (1873 株、D2) Hc の wild type、キメラ変異体および点変異体は精製後、SDS-PAGE により純度検定を行ったところ、約 50 kDa の単一バンドとして泳動された。

#### 2. リコンビナント Hc の受容体結合活性

##### (1) C 型および D 型 Hc 変異体の結合活性

未標識の Hc/C、Hc/D1 およびキメラ変異体 (Hc/DC1、Hc/DC2、Hc/DC3) による  $^{125}\text{I}$ -Hc/C または  $^{125}\text{I}$ -Hc/D1 のラット脳シナプトソームへの結合の影響を調べた。その結果、 $^{125}\text{I}$ -Hc/C に対し Hc/C と Hc/DC1、 $^{125}\text{I}$ -Hc/D1 に対し、Hc/D1 と Hc/DC3 が同等の結合阻害活性を保持していた。TLC overlay assay により Hc/DC1 はガングリオシド GD1b および GT1b に結合し、Hc/DC3 は PE と結合した。以上のことから、C 型毒素の 1122-1279 番目の領域内に受容体結合に関与するアミノ酸残基が存在することがわかった。これら領域内の点変異体を作製し、Hc/C 点変異体による  $^{125}\text{I}$ -Hc/C のラット脳シナプトソームに対する結合阻害活性を調べた。A、B 型毒素の受容体結合部位にも同様に存在する W1257、Y1258、G1270、C 型毒素分子内に特異的に存在する H1282 のアラニンまたはグルタミン酸に置換した点変異体は受容体結合活性が低下した。

##### (2) D 型 (D1 および D2) Hc 変異体の結合活性

Hc/D1D2 は Hc/D1 と同様に Hc/D2D1 や Hc/D2 と比べてラット脳シナプトソームに対する高い結合活性

を示した。Hc/D1 の C 末端側から種々の長さの Hc/D2 を含んだ 4 種のキメラ変異体を用いて結合を調べた。Hc/DD1、Hc/DD2 と比較して Hc/DD3、Hc/DD4 がラット脳シナプトソームに対する高い結合活性を保持していた。これらの結果は、Hc/DD2 と Hc/DD3 変異部位の間、Hc/D1 分子内では 1112-1138 番目、Hc/D2 分子内では 1109-1134 番目の領域が PE 結合に関与していることがわかった。これらの知見を基にして、Hc/D1 および Hc/D2 分子内の点変異体を作製し、ラット脳シナプトソームに対する結合活性を指標に PE 結合に関与するアミノ酸残基の特定を行ったところ、1117 と 1135 番目のリジン残基が結合に強く関与することがわかった。

#### 銀永らの結果：

##### (1) 標準抗毒素の回帰直線

CMAP 振幅値を SAN を用いて解析したところ、投与した左後肢の CMAP 振幅は、A 型は 3~100mIU/mL、B 型は 25~200mIU/mL、E 型は 1~50mIU/mL、及び F 型は 3~50mIU/mL 間で回帰直線の直線性が得られた。

A 型については更に検出感度をあげるため、反応させる試験毒素の濃度を下げて検討したところ、1.5~6.25mIU/mL 間で直線性が認められた。

##### (2) 頻回投与による治療効果が減弱した患者の血清中抗体価測定

マウス中和試験法では中和抗体価が認められなかった患者血清 (5 例) 及び陽性血清 (1 例) を用いてラット中和 CMAP 試験を行った。その結果、陰性血清 5 例中のすべてから 3~5mIU/mL の中和抗体価が認められた。

#### D. 考察

- 新型ボツリヌス毒素は皮下に安全に投与でき神経原性疼痛患者と疼痛モデル動物において鎮痛効果を示した。免疫組織染色ではパニロイド受容体の発現低下が認められ、今回の鎮痛作用に作用している可能性がある (梶ら)。
- NTX は BTX (LL 毒素) に比べて低い分子量である分だけ拡散しやすいと考えられていたが、事実はむしろその逆で、神経毒素本体 (NTX) 単独の方が局所より直接的に神経筋遮断作用を発現するものと考えられる (坂本ら)。
- ボツリヌス毒素の受容体としてこれまで神経細胞膜に存在する蛋白性成分が、毒素型の特異性を決定づける重要な因子と考えられてきた。実際、A 型や B 型毒素の受容体蛋白質は、それぞれ synaptic vesicle protein 2 (SV2) と synaptotagmin II であることが明らかになり、Hc 分子内の受容体認識部位について詳細な解析が進められている。C 型および D

型の受容体として、非蛋白性の膜構成成分である ganglioside、PE を毒素の結合物質として明らかにしてきたが、毒素受容体結合領域でいずれの部位が関与しているかについてアミノ酸レベルの特定までには至っていなかった。本研究では C 型、C/D モザイク毒素および D 型の種々の Hc キメラ変異体と受容体との結合活性を調べることにより、C 型および D 型毒素分子内の受容体結合に関わる領域を限定し、さらにその領域内の点変異体を作製することにより受容体認識に直接関与するアミノ酸残基を特定した。その結果、C 型毒素分子内には A 型や B 型毒素と相同性を有するアミノ酸残基 (W1257、Y1258、G1270) に加えて、C 型に特異的なアミノ酸残基 (H1282) が存在していることがわかった。D 型毒素分子内でみられた PE に対する親和性の違いは Hc/D1 に 2 つのリジン (K1117、K1135) が関与することを明らかにした。この知見は、PE に対する親和性が低い Hc/D2 分子内で上述の部位に相当するアミノ酸残基をリジンに置換することで Hc/D1 と同程度の活性を持つようになったことから裏付けられた。以上の成績は、ボツリヌス神経毒素は型間で異なる膜構成成分を受容体として認識し、作用発現に多様な分子相互関係を構築していることを示唆している。今後、受容体物質と毒素の認識機構を詳細に検討することは、本毒素の治療薬としての科学的知見を具体的に理解する上で重要であり、さらに毒素の適応が可能な疾病を理論的に説明できる根拠を提示できることが期待される (小崎ら)。

- ボツリヌス抗毒素の中和抗体価測定は国際的にマウス中和試験法により行われてきたが、生死を判定基準にしているためバラツキが大きく、また測定感度が約 100mIU/mL であって、微量の中和抗体価を検出できない。銀永らの構築したラット中和 CMAP 試験は、マウス中和試験法よりも約 100 倍高感度で再現性良く信頼性の高いデータを得られることが分かった。また、マウス中和試験法では判定に 4 日かかるところ、1 日目で測定でき、迅速な測定が可能となった (銀永ら)。

今回の結果より、治療用ボツリヌス毒素の頻回投与により効果が減弱した患者には微量の中和抗体が含まれることが分かった。銀永らが構築したラット中和 CMAP 試験を利用することで臨床現場での治療薬選択に応用できる可能性がある。

#### E. 結論

梶らは、新型ボツリヌス毒素はジストニアなどの運動異常症のみならず、感覚神経終末に作用する事で難治性疼痛の画期的治療となる可能性があると考え。今後は症例を増やし治療プロトコルを確立

させていきたいとしている。

坂本らは、なお予備的なデータではあるが、NTXの安全性がBTX (LL 毒素) に勝る可能性のあることは確認し得たと考えられるとし、その理由に関しては基礎的な実験を重ねていく必要があるが、ボツリヌス神経毒素製剤の品質の向上にも寄与する重要なポイントと考えた。

小崎らは、C型、C/Dモザイク毒素およびD型の受容体結合部位を担うHcのキメラ変異体と点変異体を用いて、C型およびD型の受容体結合部位をアミノ酸レベルまで明らかにした。

銀永らは、ラット中和CMAP試験はマウス中和試験法よりも高感度でかつ信頼性の高い中和抗体価を測定できた。

来年度以降への実用化に向けた実験にむけての基礎的な準備が完了した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 痛みに対するボツリヌス毒素療法 野寺裕之ら. Brain and Nerve in press, 2008
- 2) Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto M and Kozaki, S. Identification of receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum toxin type C and D. Microb. Pathog. in press.

### 2. 学会発表

- 1) Yasushi Torii, Yoshitaka Goto, Motohide Takahashi, Takashi Sakamoto, Tetsuhiro Harakawa, Akihiro Ginnaga, Tomoko Kohda, Shunji Kozaki, Ryuji Kaji : QUANTIFICATION OF POTENCY OF NEUTRALIZING ANTIBODY TO BOTULINUM TOXIN BY MEASURING THE COMPOUND MUSCLE ACTION POTENTIAL (CMAP), 6<sup>th</sup> World Congress on Alternative & Animal Use in the Life Sciences. 2007年8月 東京
- 2) Yoshitaka Goto, Yasushi Torii, Motohide Takahashi, Takashi Sakamoto, Tetsuhiro Harakawa, Akihiro Ginnaga, Tomoko Kohda, Shunji Kozaki, Ryuji Kaji : CONFIRMED QUANTIFICATION OF ACTIVITY OF FLACCID PARALYSIS OF BOTULINUM NEUROTOXIN BY MEASURING COMPOUND MUSCLE ACTION POTENTIAL (CMAP) IN RAT MODEL, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternative & Animal Use in the Life Sciences. 2007年8月 東京
- 3) Motohide Takahashi, Yasushi Torii,

Yoshitaka Goto, Tetsuhiro Harakawa, Akihiro Ginnaga, Tomoko Kohda, Shunji Kozaki, Ryuji Kaji : Assay in rat for neutralizing antibody to botulinum toxin by utilizing the compound muscle action potential (CMAP), Interagency Botulinum Research Coordinationg Committee Meeting. 2007年10月 アメリカ カリフォルニア州 .

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特許出願中
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## 変異蛋白が誘導するストレスを原因とする神経(精神) 筋疾患に対する治療候補化合物の開発に関する研究

所 属：国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第五部

研究者：桃井 隆

**研究要旨** 本研究は小胞体における蛋白分解系の制御機構を基盤とし、変異蛋白凝集を原因とする神経筋疾患に対する治療戦略の確立を目的とする。本研究はさまざまな神経筋疾患の予防や病状の進行緩和に大いに役立つことが期待される。

### 分担研究者

- |            |                        |
|------------|------------------------|
| (1) 磯合 敦   | 旭硝子株式会社<br>ASPEX 事業推進部 |
| (2) 上田正次   | (株) ワイエス研究所            |
| (3) 日比野利彦  | 資生堂ライフサイエンス<br>研究センター  |
| (4) 今泉 和則  | 宮崎大学医学部<br>解剖学講座       |
| (5) 徳永文稔   | 大阪市立大学医学研究科            |
| (6) 有賀寛芳   | 北海道大学分子生物学<br>大学院薬学研究院 |
| (7) 桃井 真里子 | 自治医科大学 小児科学            |

### A. 研究目的

ハンチントン舞蹈病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患では異常蛋白の蓄積が観察される。こうした神経変性疾患では異常蛋白と小胞体における蛋白品質管理機構との関連が示唆されてきた。品質管理機構として1)フォールディングに必要なシャペロン蛋白の転写速度を上げ、かつ、新たな蛋白合成を抑制する機構(2)生体にとって有害となる折りたたみ異常蛋白(ミスフォールド蛋白)を細胞内で分解除去する小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD)機構がある。こうした品質管理機構や分解機構が破綻し、小胞体に過剰なストレスがかかると細胞では変性や死が引き起こされ、こうした反応が多様な神経変性の原因と考えられる。すなわち、小胞体に新生された蛋白質は、熱ショック蛋白ファミリー、チオレドキシンファミリー、レクチンファミリーなどの分子

シャペロンが一過性に会合し、折りたたみを識別する。その後、ミスフォールド蛋白質についてはレクチン様蛋白質(EDEMなど)が会合し、小胞体のチャンネル蛋白質(Sec61複合体、Derlinなど)を介してサイトゾルへ輸送される。サイトゾルではVCPなどのATPaseがミスフォールド蛋白質を引きずり出し、各種ユビキチンリガーゼによってユビキチン化された後、プロテアゾーム分解される。一方、神経変性疾患のような異常蛋白質の処理機構に問題があると考えられる疾患異常蛋白質の排除にオートファジーが関与していると考えられてきている。こうした異常蛋白凝集は小胞体内と外でおこる。小胞体内の場合、小胞体分子シャペロンが誘導され小胞体内腔に蓄積した異常たんぱく質を折り畳むことで細胞死から防御する。小胞体分子シャペロン BiP を細胞内に強制発現させておくと、過剰な小胞体ストレスが誘導される細胞死から保護されることが知られている。

本研究は、小胞体ストレスシグナルの下流、細胞死シグナルの上流に位置するeIF2のリン酸化に注目して、小胞体外でのポリグルタミン凝集が誘導する小胞体ストレスとオートファジーによる分解および小胞体分子シャペロン BiP を誘導する化合物や自らシャペロンとして作用する化合物の探索、開発、薬効および小胞体ストレスによる制御機構、および異常蛋白分解の機構の解明を目的としている。

我々は、神経疾患治療薬治療の候補分子の開発、化合物の探索、およびこうした化合物の結合蛋白、シナプト小胞活性化の分子機構に関与する蛋白の構造と機能解析を目的と

している。神経疾患治療薬として適した化合物の創製に利用するために、小胞体ストレスモニター細胞、マウスの作成し、小胞体ストレスを抑制する化合物を効率よくスクリーニングし、モデルマウスを用いて、治療効果を調べる。

## B. 研究方法

### 1. 細胞培養

テトラサイクリンにより目的の蛋白が発現する tet システムを用いた。ジスフェルリン、ドミナントネガティブタイプの P 小胞体 K (K618A) (DN-P 小胞体 K; Dr. Ron より供与) を pcDNA4/TO/myc-His ベクターへサブクローニングし、リン酸カルシウム法により C2C5 細胞へトランスフェクションし、50ug/ml zeocine; 25ug/ml blastin により安定に発現している細胞を選別した。細胞は、テトラサイクリンを含まない 10% 牛胎児血清入り培地を用い 37°C 50%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、テトラサイクリンを添加後、MG132、E64d/pepstatin A、小胞体ストレス誘導試薬、ラパマイシンを添加した。トランスフェクションは、リン酸カルシウム法またはリポフェクトアミン法を用いて行った。eIF2 $\alpha$  および ATG5 細胞は 10% 牛胎児血清を含む培地にて 37°C 50%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。

### 2. 変異の導入

ジスフェルリン変異 (T4022C; L1341P、G3370T; W999C) の作成には、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis kit を用いて行った。変異はシークエンス解析にて確認した。

### 3. テトラサイクリン制御によるジスフェルリンを安定細胞株の作製

正常、および変異ジスフェルリン (T4022C; L1341P、G3370T; W999C) を制限酵素で切断し pcDNA4/TO/myc-His ベクターへサブクローニングした。リン酸カルシウム法により C2C5 細胞へトランスフェクションし、50ug/ml zeocine; 25ug/ml blastin により正常および変異ジスフェルリンを安定に発現している細胞 (Tet-正常あるいは変異ジスフェルリン細胞) を選別した。

### 4. 小胞体ストレスモニター系の作製

テトラサイクリン制御によりジスフェルリン EGFP を安定的に発現する Tet-Dys-C2C5 細胞を作製し、ERAD の抑制により小胞体でジスフェルリン凝集を検出することで小胞体ストレスをモニターすることが可能となった。

### 5. ウェスタン (イムノ) プロット法

細胞を 1% TritonX-100/PBS 溶液で懸濁し、その遠心上清画分を 12% SDS-アクリルアミ

ドゲルで泳動し、ニトロセルロースフィルターにブロッティングした。抗体と反応させた後、二次抗体としてアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ラビットおよびマウスイムノグロブリンを用い、発色液で反応させた。

### 6. 細胞染色法

小胞体ストレス試薬およびリソゾームプロテアーゼ阻害試薬を添加した C2C5 細胞、EGFP-Tag を付加したポリグルタミンを導入した C2C5 細胞、Atg5<sup>+/+</sup>MEF 細胞および Atg5<sup>-/-</sup>MEF 細胞を 2% パラホルムアルデヒドを含む PBS にて固定後、PBS で洗浄した後、ブロッキングとして 0.5% ヤギ血清ミルクを用い室温で一時間置いた。一次抗体を用いた免疫染色法を行い、4°C で一昼夜反応させ、さらに二次抗体として FITC 標識抗イムノグロブリン抗体を加え、37°C 一時間反応後 PBS で希釈した後グリセロールで封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

7. RT-PCR による mRNA 発現解析: 神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞に対して 5  $\mu$ M の BIX を 6 時間処理した後、細胞から total RNA を抽出し、それを鋳型として cDNA を作成した。この cDNA を用いて各種小胞体ストレス関連遺伝子 (BiP, GRP94, calreticulin, EDEM, p58IPK, CHOP, ASNS) についてリアルタイム PCR 解析を行った。リアルタイム PCR に用いた機種は ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystem) である。

### 8. *in vitro* ユビキチン化アッセイ

20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0.5 mM ATP, 10 mM クレアチンリン酸、50 mg/ml クレアチンホスホキナーゼ溶液にバキュロウィルス発現系にて作製した E1 (5 mg/ml)、大腸菌発現 E2 (UbcH5C, 10 mg/ml)、LUBAC (50 mg/ml)、基質タンパク質、ユビキチン (250 mg/ml) を添加し、37°C、2 時間インキュベート後、SDS-PAGE、ウェスタンブロット解析した。

### 9. 免疫沈降・ウェスタンブロット

培養細胞を 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail (Sigma) にて細胞を可溶化し回収した後、タンパク質量を Bradford 法にて測定した。これを SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、一次抗体及び HRP を結合した二次抗体を順次反応させ、ECL 法によって HRP 反応性バンドを発光させ、LAS3000 Bioimaging analyzer (FUJI Film) にて検出した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト材料は用いていないためヒト人権・倫理面への配慮には該当していない。また、本研究でのマウスを用いた動物実験は施設にて設定されている動物取り扱いマニュアルに沿って行った。本研究で行う動物実験に際しては、動物への恐怖感、苦痛をさけるため、エーテル麻酔下で行うことにしており、動物に対する倫理面での十分な配慮がなされている。また、マウス各組織の採取に際しては、深いエーテル麻酔で無痛下で二度と覚醒しないよう、安楽死させてから行うことにしており、苦痛の無いように十分な配慮をした。

## C. 研究成果

### 1. 小胞体制御系による二つの分解系 UPS とオートファジーによるジスフェルリン分解。

Tet システムを用いて、正常および異常(変異)ジスフェルリンの発現を制御することで、蛋白凝集と蛋白分解および小胞体ストレスとの関係を調べた。その結果、正常ジスフェルリンは、通常レトロトランスロコン構成蛋白である Sec61 や P97 (VCP) に結合した。またプロテアーゼ阻害剤である MG132 を添加したところ、ジスフェルリンは凝集したもの、リソソームプロテアーゼ阻害剤である E64d, cathepsin D, E の阻害剤である pepstatin A は凝集は見られなかった。

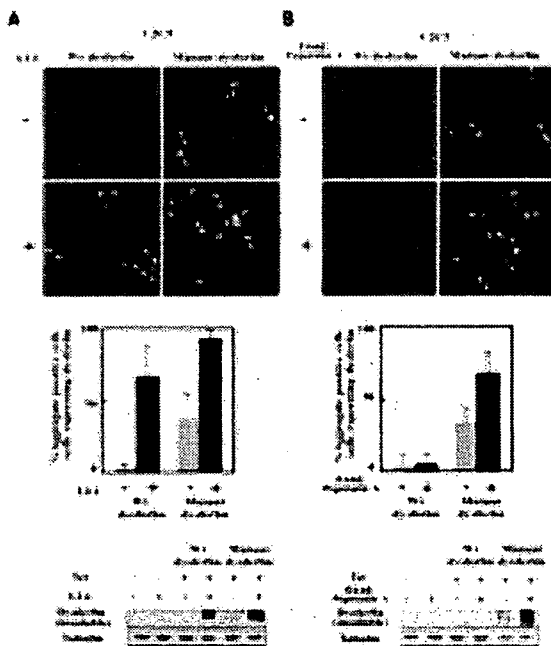


図 1. Degradation of wild and mutant dysferlin by ubiquitine/proteasome and lysosome. Effect of proteasome inhibitor (A) and lysosome inhibitor (B) on the degradation of wild and mutant dysferlin

このことから、ジスフェルリンはユビキチン/プロテアソームに関与する品質管理機構(小胞体 AD)により分解排出されていることが明らかになった。正常に比較して、変異ジスフェルリンは小胞体への顕著な凝集をひきおこした。

また変異体では、小胞体ストレスマーカーである c-jun のリン酸化、カスパーゼ 12 の活性型への切断、Chop の増加およびユビキチン化が観察されたことから小胞体ストレス細胞死を引き起こす可能性が示唆された。

正常および変異ジスフェルリン tet 細胞に MG132 および E64 を添加し、ジスフェルリンの分解について検討したところ、正常では凝集率 2-3%が MG132 により 67%に、変異では 39%が 91%であった。リソゾームプロテアーゼインヒビター E64d/pepstatin A 添加により、変異で 33%が 68%に顕著に凝集を顕著に促進した。これらの結果から、ジスフェルリンはユビキチン・プロテアソームの系だけでなく、リソゾームの系をも用いて分解されていると考えられた。

また、その凝集により小胞体ストレスに関係する eIF2  $\alpha$  のリン酸化およびオートファジー形成のマーカーとなる LC-3 の I 型から II 型への変換が観察された。

オートファジー形成 (LC-3) に必須な遺伝子 Atg5 欠損および eIF2  $\alpha$  欠損細胞では、変異ジスフェルリンの小胞体内での蓄積が顕著に増大し、小胞体ストレスが誘導され、さらにオートファジーを介したリソゾームでの分解促進が見られた。さらに、ラパマイシンを添加し、eIF2  $\alpha$  のリン酸化を促進することにより、LC-3 の変換が促進され、変異ジスフェルリンの凝集を抑制した。

### 2. 小胞体ストレスモニター細胞による変異蛋白凝集の検出

テトラサイクリン単独処理ではジスフェルリンは凝集しないが、ポリグルタミン 72mer を細胞に発現させると、ERAD が抑制され、結果として小胞体に局在するジスフェルリンがユビキチン凝集が観察された。他のホモアミノ酸ポリマーに対する反応性を調べると、PolyQ150mer よりも PolyIle に対して、ジスフェルリンが凝集されやすことが明らかになった。また、プロテアソーム阻害剤 MG132 で ERAD を抑制するとジスフェルリンの凝集は著しく促進することが明らかになった。

### 3 MM-1 のオートファジーにおける役割 MM-1 の結合タンパク質の探索を行ったところ、ubiquitin-proteasome 経路に関与す

る Fbxo25、そしてオートファジー経路に関与する Atg16L などタンパク質分解系に関与するタンパク質が複数得られた。解析の結果、MM-1 は Atg16L と直接結合し、またその coiledcoil 領域が結合の安定性に関与することが示唆された。更に、MM-1 をノックダウンした場合、starvation によるオートファジーの誘導が起りにくくなることから、MM-1 は、オートファジーの初期課程に関与する可能性が考えられた。

MM-1 はシャペロンである Hsc70, Hsp70 と複合体形成することをまず見出した。次に、PolyQ における役割を検討したところ、Hsc70, Hsp70 は凝集性の高い polyQ72 と共局在するのに対し、MM-1 は PolyQ72 を取り囲むように（隔離するように）局在した。更に、電気泳動法、FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)、MM-1 ノックダウン法を使った実験で、MM-1 は polyQ の凝集初期段階であるオリゴマー形成を抑制することを見出した。また、PFD の他の subunit である PFD3 でも同様なことが観察されたため、MM-1 は PFD として PolyQ 凝集抑制を行っていることが示唆された。

#### 4. 小胞体膜ユビキチンリガーゼ gp78 と RMA1 による協調的 ERAD

CFTR は嚢胞性線維症の原因遺伝子として同定された塩化物イオンチャンネル蛋白質であり、その Phe508 の欠失変異体 (CFTR $\square$ F508) は、小胞体関連分解 (ERAD) によって除去されることが知られる。CFTR $\square$ F508 のユビキチン化を司るリガーゼとしては CHIP, RMA1, HRD1 などが知られているが生理的リガーゼは同定されていない。興味深いことに小胞体膜には HRD1 と類似した gp78 が存在する。両者は多重膜貫通領域をもつ RING 型ユビキチンリーゼで、gp78 にのみ CUE ドメインと呼ばれる E2 結合に関与するドメインがある。

まず、CFTR $\square$ F508 の ERAD における HRD1 と gp78 の寄与を確認したところ、gp78 によってのみ細胞内の CFTR $\square$ F508 はポリユビキチン化されることが示された。そこで、HRD1 と gp78 の構成ドメインを互換したキメラを作製し、CFTR $\square$ F508 のポリユビキチン化を解析したところ、gp78 の CUE ドメインが CFTR $\square$ F508 の認識に重要な役割を果たしていることが示された。興味深いことに gp78 はユビキチン化された GST (Ub-GST) に長鎖のポリユビキチン鎖を付加する活性 (E4 活性) をもち、CUE ドメインを欠失させると E4 活性が減弱することが明らかにされた (図 3)。さらに、HRD1 に Cue ドメインを挿入し

た場合でも同様に E4 活性が発現することから、Cue ドメインがユビキチン化基質を補足し、長鎖のポリユビキチン鎖に変換すると考えられた。さらに、CFTR $\square$ F508 の最初の認識と短鎖ユビキチンの付加にかかわるユビキチンリガーゼとして RMA1 が見いだされ、gp78 の上流ではたらくと考えられた。これらの結果は、小胞体膜上で RMA1 と gp78 の 2 種のユビキチンリガーゼが協調的にはたらく CFTR $\square$ F508 に長鎖ポリユビキチン鎖を付加することで ERAD へ導いていることを示唆している。

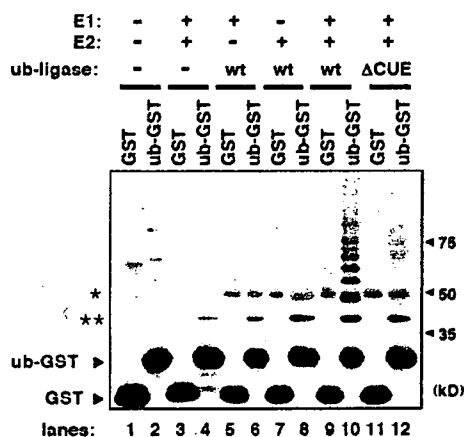


図 2 gp78 の E4 様活性の同定

GST または N 末端にユビキチンを付加した Ub-GST を基質として用い、E1, E2 (UbcH7)、正常型または Cue ドメイン欠失型 gp78 にて *in vitro* ユビキチン化反応を行い、形成されたポリユビキチン鎖を抗 GST 抗体によるイムノブロットにて検出した。

#### 5. ケミカルシャペロン

小胞体分子シャペロン BiP を細胞内に強制発現させておくと、小胞体ストレスから保護されることが知られている。小胞体ストレス誘導性神経細胞死から救済するために小胞体分子シャペロン BiP を誘導する化合物の開発を試み、新規低分子化合物 BIX (BiP inducer X) を見出した。化合物 BIX は BiP 以外の遺伝子を誘導している可能性もあるので、以下に示す遺伝子の発現解析を行った。

IRE1 経路: EDEM, p58IPK

PERK 経路: ASNS (アスパラギン合成酵素), CHOP

ATF6 経路: GRP94, calreticulin, CHOP (CHOP は PERK および ATF6 のどちらの経路からも誘導される)

化合物 BIX を SK-N-SH 細胞に投与後 6 時間で RNA を抽出し、RT-PCR およびリアルタイム PCR で測定した。その結果、化合物 BIX は GRP94,