

200808023A

政策創薬総合研究事業

平成20年度

政策創薬総合研究

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成20年度

政策創薬総合研究

研究報告書

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	10
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	15
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	32

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	56
KHB1007	代替毒性試験法の評価と開発に関する研究	能美 健彦	66
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	79
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	91
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	102
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
KHB1101	ノロウイルスおよびサポウイルス増殖阻害剤の評価システムの構築	片山 和彦	132
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	136

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

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	149
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	158
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	167
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	169

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 ……175
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 隆宇 ……186
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 ……198
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 ……208
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 ……220
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 ……230
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 ……235
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 ……241
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 ……253
KHC1102	带状疱疹ワクチン開発のための疫学研究	山西 弘一 ……269
KHC1103	内因性幹細胞の動員・生着・分化と心筋細胞肥大の情報伝達を標的とした新規心不全治療法	長谷川浩二 ……272
KHC1104	経口脂肪酸摂取によるアルツハイマー病の発症予防法開発に関する研究	道川 誠 ……275
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 ……278
KHC1204	チオレドキシシ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 ……294
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 ……309
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 ……319
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 ……328
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 ……332
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 ……338
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 ……348

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	…… 357
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	…… 369
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	…… 381
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			
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	…… 391
B分野 医薬品開発のための評価科学に関する研究			
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	…… 401
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			
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	…… 411
KHC3331	ウイルスベクターをゲノムの特定領域に挿入させることによる安全性の高い遺伝子治療法の革新的技術開発	小山 貴芳	…… 422
KHC3332	Fc γ 受容体を介した Dengue 出血熱病態形成機序をターゲットとした治療法の開発	林 昌宏	…… 427
KHC3333	日和見感染症の予防・早期診断・治療法の開発に向けた基礎的研究	金子 幸弘	…… 432
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	…… 437
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	…… 447

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絞り込んだ 5.98Mb 病因遺伝子候補領域には約 50 個の遺伝子が存在する。この領域には copy number variation (CNV) 領域が存在し、特定の遺伝子コピー数の異常が Galloway-Mowat 症候群の原因である可能性も考えられたため、Agilent CNV array による遺伝子コピー数の検討を行ったが、候補領域内には病因と思われる CNV は存在せず、疾患遺伝子変異は従来の遺伝子シーケンスにより検出できる可能性が高いと思われた。そこで、マウス系球体発現遺伝子データベースや Stretch of Homozygous SNP 解析結果を参考に候補遺伝子をさらに絞り込み、疾患遺伝子同定のためのシーケンスを行っている。

分担研究者

亀井宏一

国立成育医療センター腎臓科医員

佐藤秀則

DNA チップ研究所研究員

鳥山紗由美

ヒュービットジェノミクス株式会社研究員

塚口裕康

関西医科大学附属男山病院内科学内講師

仲里仁史

熊本大学医学部附属病院小児科講師

治療法はない。近年、欧米の家族性ネフローゼ症例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、本邦独自の症例解析による病因・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、腎系球体

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

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 症候群の疾患遺伝子を同定し、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ことを目的とするが、本年度は遺伝学的手法による疾患遺伝子の同定を試みた。

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)。

本年度は以下の解析手法を用いて、

- 1) GM-1 家系における候補領域での CNV と病因との関連の検討
- 2) マウス糸球体発現遺伝子データベースや Stretch of Homozygous SNP 解析結果を参考にさらなる候補遺伝子の絞り込み
- 3) 絞り込んだ候補遺伝子シーケンスを行った。

1) GM-1 家系における候補領域での CNV と病因との関連の検討

GM-1 家系の患者 2 名とその両親 (図 1 GM-1 の右側の家族) の末梢血白血球から DNA を単離し、reference DNA として HAPMAP DNA NA19000 (日本人男性) を

用い、Agilent CNV array による CNV 解析を行った。なお、日本人健常成人 14 名をコントロールとした。なお、解析手法としては図 2 のように ADM2 解析と CBS 解析の二つの方法を用いた。

2) マウス糸球体発現遺伝子データベースや Stretch of Homozygous SNP 解析結果を参考にさらなる候補遺伝子の絞り込み

千葉大学・竹本稔博士との共同研究を行った。具体的には、竹本博士らが既に確立した新生児および成熟マウス糸球体に発現する遺伝子データベース (EMBO J 25: 1160-1174, 2006) 及び Affymetrix 社の GeneChip (430 2.0) を用いたマウス腎及び糸球体の発現プロファイル (J Am Soc Nephrol 19:260-268, 2008) から、候補遺伝子の中で腎及び糸球体に発現する可能性が高いと思われる遺伝子をピックアップした。

さらに Illumina Hap300 SNP マッピング グレイによる SNP タイピングデータを用いた Stretch of Homozygous SNP 解析も行った。

3) 絞り込んだ候補遺伝子シーケンス

上記の方法で絞り込んだ候補遺伝子の直接シーケンスを行った。

(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

昨年度までに行った 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、5.98Mb にまで候補領域は絞込まれたが、その候補領域には約 50 個の遺伝子が存在することがあきらかになった。また、この領域には、copy number variation (CNV) 領域が含まれていることも明らかになった。

ヒトゲノム完読後の疾患遺伝子の概念は、従来の質的な異常（点突然変異）以外に、量的な変化(コピー数多型、CNV) が加味される流れにある。つまりゲノム中のコピー数の増幅や欠失が遺伝子発現の量的な変化に直接影響を与える可能性があり、本研究でも、CNV array を用いた CNV 解析を行った。今回の CNV 解析では、絞り込まれた候補領域を含む約 14 Mb の領域に注目して解析を行った。

図 3 に ADM2 解析の結果を示す。患者 2 名においてホモ接合性を示す CNV 領域が 4 ヶ所検出され、その中には計 13 個の遺伝子が含まれていた。また、CBS 解析では患者 2 名においてホモ接合性を閉める CNV 領域が 8 ヶ所検出され、そのうちの 4 領域については ADM2 解析と共通していた(図 4)。しかし、ADM2 解析及び CBS 解析に共通するホモ接合性を示す CNV は、患者の両親やコントロールでも認め

られることから、患者特有の CNV ではないと考えられ、この CNV が GM-1 家系における Galloway-Mowat 症候群の病因である可能性は極めて低いと考えられた。

CNV が関与する可能性が非常に低いことから、やはり、遺伝子の点変異や微少な重複・欠失、スプライシング異常などが疾患の原因である可能性が高いと考えられ、パイオインフォーマティクスを利用して、約 50 個の候補遺伝子の中から疾患遺伝子である可能性の高いものをピックアップし、順次シーケンスしていくという strategy をとった。Galloway-Mowat 症候群の疾患遺伝子は腎に発現する遺伝子と考えられ、さらに腎尿管よりは糸球体に、さらにはポドサイトにより強く発現する可能性が高いと思われる。そこで、新生児および成熟マウス糸球体に発現する遺伝子データベース及び Affymetrix 社の GeneChip を用いたマウス腎及び糸球体の発現プロファイルから、腎及び糸球体に発現する可能性が高いと思われる 30 遺伝子をシーケンスしたが、病因と思われる変異は認めなかった。

ただ、上記のデータベース作成時には解析されていない遺伝子も存在するため、改めて Stretch of Homozygous SNP 解析結果を洗い直すこととした。Galloway-Mowat 症候群は常染色体劣性遺伝と考えられ、GM-1 家系もそれに矛盾しない。また、GM-1 家系は近親婚家系であることから、患者でホモ、両親でヘテロとなる領域に疾患遺伝子が存在する可能性が高いと考えられる。Stretch of Homozygous SNP 解析によって、候補領域中で患者でホモ、両親でヘテロとなる領域に存在する遺伝子を

探したところ、15 遺伝子が該当することが明らかとなった。このうち 11 遺伝子に関しては、先に述べた解析済みの 30 遺伝子に含まれており、病因遺伝子とは考えにく

い。現在、残りの 4 つ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 (ネプリリン) 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 (α -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、共通の発生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。

本研究班では、これまでに、日本人 Galloway-Mowat 症候群の 7 家系を集積し、DNA 検体及び家系情報の収集を行ってきた。このうちの GM-1 家系は近親婚家系で 4 名の患者を持つ家系であり。まず、この家系を詳細に解析することで疾患遺伝子の同定を試みた。これまでに 2 種類の高密度 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候補領域を 5.98Mb にまで絞り込むことに成功している。

その候補領域の中には約 50 個の遺伝子が存在しており、現在、マウス糸球体発現遺伝子データベースや Stretch of Homozygous SNP 解析結果を参考にしてピックアップした遺伝子のシーケンスを

行っている。これらの解析により、近々に Galloway-Mowat 症候群の疾患遺伝子が同定されるものと思われる。

E. 結論

Galloway-Mowat 症候群の近親婚家系を対象として、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。その領域に含まれる約 50 個の遺伝子をバイオインフォーマティクスを用いて絞込み、疾患遺伝子の同定に向け研究を進めている。

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

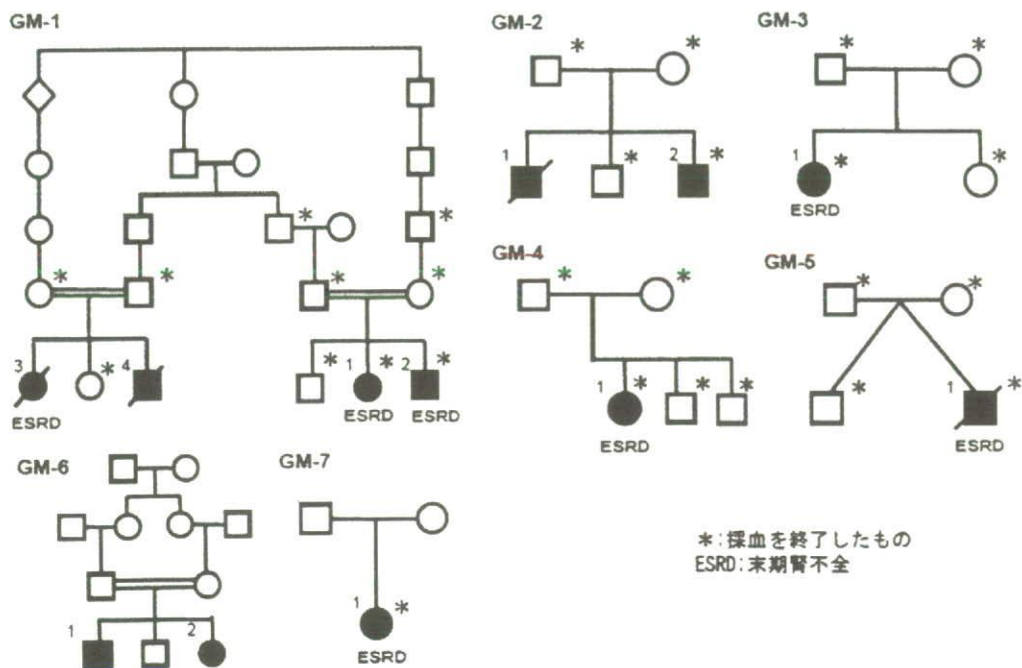
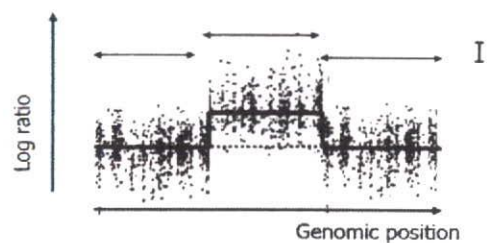


図1. わが国におけるGalloway-Mowat症候群家系

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、この家系を中心に疾患遺伝子同定を試みた。

1)ADM2解析

Aberration Detection Method-2:
LogRatioの变化が大きいRegionを検出。



2)CBS解析

Circular Binary Segmentation:
変化する2ポイントを検出。

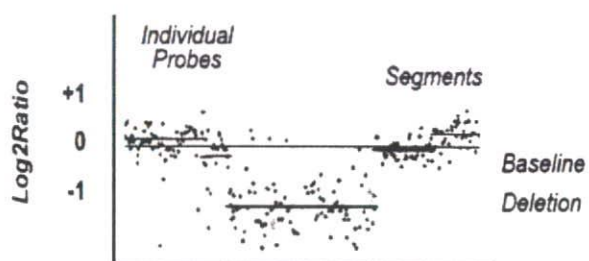


図2. ADM2解析とCBS解析

Chromosome 1 211Mb to 235Mb

Cytoband	Start	Stop	Size	Gene	Genes(Nearby)	control 1 例			GM 3 例			
						Unchanged	Amplification	Deletion	Father(25)	Mother(26)	Proband1(32)	Proband2(33)
q32.3	211066892	211074208	5516	OC149643	TATDN3, LQK1, FLVCR1	50%	50%	0%	+0.87	+0.84	+0.58	+0.58
	211075934	211075993	59			57%	43%	0%				
	211075821	211080036	4215			88%	14%	0%				
	211081482	211081541	59			86%	14%	0%				
	211082419	211083731	1312			93%	7%	0%				
211087501	211087560	59	0%	100%	0%	Unchanged	Unchanged	Unchanged				
q42.13	226771233	226782884	11651	HIST3H2A, HIST3H2BB, RNF187, NR002834, RHOU	100%	0%	0%	+0.45	+0.28	Unchanged	Unchanged	
	226811601	226811647	46		64%	36%	0%					
	226811635	226847675	36040		57%	43%	0%					
q42.13	227878152	227879902	490	TAF5L, KIAA0133	88%	0%	14%	-1.83	-2.17	-2.28	-2.21	
	227880589	227882824	2236		64%	0%	36%					
q43	234985628	234987105	1477	ACTN2	MTR	57%	29%	14%	+1.08	+0.93	+1.08	+1.34

Gene Symbol	Genome Position	Genomic Size	Description
TATDN3	211,044,199	24784	TatD DNase domain containing 3 isoform 1
LOC149643	211,078,861	17507	hypothetical protein LOC149643
LQK1	211,097,311	1484	Homo sapiens cDNA FLJ35568 fis, clone SPLEN2005727
FLVCR1	211,116,799	37160	feline leukemia virus subgroup C cellular
HIST3H2A	226,711,935	496	histone cluster 3, H2a
HIST3H2BB	226,712,656	452	histone cluster 3, H2bb
RNF187	226,745,507	7581	Protein RNF187
NR002834	226,851,031	7503	cDNA FLJ34941 fis, clone NT2RP7007480
RHOU	226,943,263	11543	ras homolog gene family, member U
TAF5L	227,811,952	32931	PCAF associated factor 65 beta isoform a
KIAA0133	227,845,586	33966	hypothetical protein LOC9816
ACTN2	234,955,287	77789	actinin, alpha 2
MTR	235,079,554	108701	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine

図 3. ADM2 解析結果

両患児においてホモ接合性を示す CNV 領域が 4 ヶ所検出された。

Chromosome 1 211Mb to 235Mb

Start	Stop	Gene	Gene(Nearby)	Father(25)		Mother(26)		Proband1(32)		Proband2(33)	
				num.mark	seg.mean	num.mark	seg.mean	num.mark	seg.mean	num.mark	seg.mean
211069692	211079977	LOC149643	TATDN3.LQK1.FLVCR1	17	+0.97	17	+0.6	17	+0.81	13	+0.71
	211087501										Unchanged
220442608	220445144		DUSP10.HIPL2	6	-0.8	6	-0.86		Unchanged		Unchanged
221889657	221891072		TP53BP2.FBXO28	13	+0.9	13	+0.65	13	+0.55	13	+0.61
222311476	222311815		TP53BP2.FBXO28		Unchanged	3	+1.18		Unchanged		Unchanged
222311218	222312019			4	+1.36			4	+1.34		+0.97
225051938	225052458		ITPKB.PSEN2	10	+0.78	10	+0.51	10	+0.55	10	+0.6
226771233			HIST3H2A.HIST3H2BB.RNF187.NR002834.RHOJ		Unchanged	67	+0.26		Unchanged		Unchanged
226811601	226847631			65	+0.46						
227879152	227882771		TAFLSKJAAD133	6	-1.88	6	-2.28	6	-2.21	6	-2.01
234985628	234987052	ACTN2	MTR	10	+1.68	10	+0.93	10	+1.05	10	+1.36

Gene Symbol	Genome Position	Genomic Size	Description
DUSP10	219,961,736	36037	dual specificity phosphatase 10 isoform b
HIPL2	220,775,146	25843	HHIP-like 2
TP53BP2	222,067,257	66080	tumor protein p53 binding protein, 2 isoform 2
FBXO28	222,391,152	45434	F-box protein 28
ITPKB	224,939,000	105974	1D-myo-inositol-trisphosphate 3-kinase B
PSEN2	225,137,661	25532	presenilin 2 isoform 1

図4. CBS 解析結果

両患児においてホモ接合性を示す CNV 領域が 8 ヶ所検出された。うち黄の 4 領域については ADM2 解析と共通していた。

ボツリヌス神経毒素による中枢情報伝達制御薬の開発 ー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（15万）ボツリヌス毒素（A2NTX）を用い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の開発を行う。てんかんのモデル動物を作成して、実際に A2NTX を脳内に局所投与したところてんかん放電を 50%減少させることに成功した。また、代表的な神経難病である ALS の治療法として、ボツリヌス毒素重鎖を drug delivery system として神経栄養因子 IGF-1 を運動ニューロン内に運ぶシステムの開発を行った。C 型と D 型の毒素の受容体についても解明した。またヒトへの投与時における安全性の担保のためにボツリヌス毒素の品質管理法や定量法の開発を行った。

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 龍兒

(2) 大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科

小崎 俊司

(3) 国立精神・神経センター・国府台病院

坂本 崇

(4) 大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科

加藤 啓子

A. 研究目的

難治性疼痛やてんかんの有効な治療法を開発する。神経筋接合部のみならず中枢神経系におけるシナプス伝達を制御することにより、グルタミン酸による興奮性神経細胞死が関与する筋萎縮性側索硬化症などの希少難病の治療法の開発についても検討する。本年は実際にてんかんのモデル動物を作成し脳内に毒素の局所投与をおこなった。

B. 研究方法

1. てんかんのモデルでの検討

7週令雄 ddY マウス (SLC) を購入後、輸送ストレスを除去し、インフルラン麻酔下で、8週令マウス・扁桃体に刺激電極（陰極）のタングステン線を挿入し（プレグマ A2.0, L3.0, V4.5 mm）、刺激電極（陽極）及び脳波測定用電極を脳表に挿入した（プレグマ A2.0, L1.5 mm）。さらに、海馬内へ毒素を投与するため、マイクロインジェクションカニューレ（ID=0.2 mm, エイコム社製）を左側海馬内へ

挿入した（プレグマ A-2.0, L1.5, V2.5 mm）。手術ストレスを1週間除去後、覚醒状態のマウスへ、軽微な刺激 [450 μ A, 60Hz, 200 μ s duration, for 2 sec; electrical stimulator (SEN-3301, 日本光電社製) & isolator (SS-202J)] を1日1度導入し、約2-3週間かけててんかん発作を誘導し、扁桃体キンドリングマウス（側頭葉てんかんモデルマウス）を作成した(1, 2, 3)。てんかん発症過程の評価は、脳波の計測[PreAmp and Head Amp (BEMCT-21 and BH-3, Low cut = 0.5, High cut = 30, バイオテックス社製) & data acquisition program SleepSign ver. 2.0, キッセイコムテック社製]]と発作発現状態から5段階評価した。コントロールには、手術後未刺激マウスを用いた。A2NTX (3.48 unit/ μ l in 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 5 mg/ml human albumin) を、海馬内注入直前に、0.35 unit/ μ l (in 2.5 mM phosphate, pH 7.5, 0.135M NaCl, 0.05 mg/ml human albumin) まで希釈し、2.5 μ l (1.05 unit)、あるいは5 μ l (1.75 unit) の用量をマウス海馬内に注入した。

2. ALS の治療薬 drug delivery system の開発

A 型ボツリヌス菌 (62A 株) と B 型ボツリヌス菌 (Okra 株) からそれぞれ DNA を抽出した。ボツリヌス菌の全 DNA のうち重鎖部分のみを PCR 法で増やした。増やした重鎖の DNA をプラスミドに組み込み、大腸菌へ導入しリコンビナントとして A 型毒素と B 型毒素の重鎖部分のみを精製した。IGF-1 をリコンビナントで生成し、ボツリヌス毒素重鎖と結合させた。

3. C, D型毒素の受容体の解明

C型およびD型 Hc リコンビナント蛋白の発現と精製

C型 (CB-19株)、D型 (003-9株) BoNT 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。

SPRを用いたリコンビナントHcと受容体分子の相互作用の解析

フォスファチジルコリンを基材として2%GT1b および50%PE 含有リポソームを調製した。脂質二重膜を保持した状態でL1センサーチップにそれぞれのリポソームを固定化し、Biacore 2000 を用いて受容体含有リポソーム (リガンド) と各型Hc (アナライト) の結合活性を調べた。毒素と受容体の相互作用は、あらかじめプログラムされた相互作用モデルに基づいたデータ解析ソフトウェア (BIAevaluation) を用いて解析した。

C型およびD型神経毒素の作用発現におけるガングリオシドの影響

(1) KOマウスの作出と野生型マウスとの判別

C57BL/6 マウスを野生型とし、GM3 合成酵素遺伝子 ST3GalV 上の一部を欠損することにより GM3 以降のガングリオシドの合成ができない KO マウスを作出した。ST3GalV 遺伝子上の特異な領域に野生型および KO マウスで増幅される PCR 産物の長さが異なるプライマーを設定し判別に用いた。

(2) BoNT のバイオアッセイ

BoNT/C および BoNT/DC に対する KO および野生型マウスの感受性を BoNT の静脈内投与により調べた。一般的に毒素活性の測定に用いられる ddY マウスと野生型マウスの BoNT に対する感受性が同じであることを確認した後、致死時間と毒力の標準曲線を用いて、KO および野生型マウスの毒力を致死時間から算出した。

4. 毒素定量法の開発

毒素はボツリヌス神経毒素 (以下、NTX) を使用した。マウス (雌性 ICR/CD-1、4 週齢、日本チャールスリバー) を用いてマウス ipLD₅₀ 試験を行い、1U=1 マウス ipLD₅₀ で定義した。毒素は0.5 w/v% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で段階希釈し LD₅₀ 用量を調製した。ラット (雌性 SD 系、4 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 (ソムノペルチン、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、各濃度の NTX を両肢の

腓腹筋内に投与した。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、刺激電極を脊髄根上に、アクティブ記録電極を後肢腓腹筋筋腹に、リファレンス記録電極を後肢腓腹筋筋腱に、アース電極を尾根部に各々設置した。記録電極は片肢毎に両肢に設置し、各々測定した。刺激は、標準条件として 1Hz、25 mA、0.2 msec で行った。CMAP 振幅値の解析には Statistical Analysis for Neurotoxin (SAN ver.2.1、自社開発ソフト) を用いた。

5. 毒素の薬効評価法の開発

毒素の調製及び投与

BOTOX[®] は ICR/CD-1 マウス (雌性、4W、チャールズリバー) を用いて ipLD₅₀ 試験を行い、1 マウス ip LD₅₀=1 U として力価を算出した。BOTOX[®] は 0.5 w/v% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で段階希釈し、0.3、1、3、10、17、34、68 及び 136 U/mL に調製した後、各毒素溶液 0.1 mL をラットの左後肢腓腹筋に投与した (5 匹/群)。

CMAP の測定

両後肢の複合筋活動電位 (CMAP) を既報の方法 (Italy, Baveno, Toxin2008) に従って、投与前及び投与 1、2、4、7、10 及び 14 日目に測定した。

データ解析

CMAP 振幅値の解析には自作ソフトの Statistical Analysis for Neurotoxin (SAN ver. 2.1) を用いた。BOTOX[®] の局所の効力を評価するため、0.03~1 U/head 投与群の投与筋における用量反応曲線について最適な回帰直線を測定日毎に計算し、投与筋の CMAP 振幅値が毒素投与前の 50% に低下する毒素用量 (ED₅₀) を算出した。BOTOX[®] の全身性の副作用を評価するため、1.7~13.6 U/head 投与群の非投与筋における用量反応曲線について最適な回帰直線を測定日毎に計算し、非投与筋の CMAP 振幅値が投与前の 50% に低下する毒素用量 (SD₅₀) を測定日毎に算出した。有効用量から毒性用量の範囲を推定するため、毒素毎に SD₅₀ を ED₅₀ で除した値を各測定日で算出し、その値を治療域とした。

C. 研究結果

1. てんかんのモデルでの検討

てんかん発症後のマウスに A2NTX を海馬内に注入後、キンドリリング刺激がてんかん発作を誘導するかどうかを、発作行動と脳波により、計測した。

第 1 回目の A2NTX 投与前日を 0 日とし、0 日に与えたキンドリリング刺激によりてんかん発作を発症したマウスのみを実験に供した。個体差はあるものの、約 50% のてんかん発症マウスに A2NTX の治療効果があり、転倒発作とてんかん後発作を完全に消失するマウスがいた。一方で、発作間期にみられる頬のけいれんや後肢の麻痺を含

むすくみ行動が残る傾向が強かった。

2. ALS の治療薬 drug delivery system の開発

大腸菌にボツリヌス神経毒素の重鎖 DNA (62A 株由来のもの、Okra 株由来のもの) を含むプラスミドを取り込ませることに成功した。現在純度の高い重鎖蛋白を精製するための条件を検索している。

3. C, D 型毒素の受容体の解明

リコンビナント Hc の調製

C 型および D 型 Hc 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検出された。

各型 Hc の受容体含有リボソームへの結合

C 型および D 型 Hc と同様に調製した A 型および B 型 Hc の受容体含有リボソームへの結合活性を比較したところ、GT1b には C 型 Hc、PE には D 型 Hc が特異的な結合を示すシグナルが増加し、平衡に達した。

各型 Hc の受容体に対する結合の詳細を調べたところ、C 型 Hc の添加濃度に依存して GT1b への結合が増加した。この結合は相互作用モデルの理論カーブ 1:1 binding model と一致し、結合速度定数 (k_1)、解離速度定数 (k_2) および解離定数 (K_d) の算出が可能であった。D 型 Hc の PE への結合も添加濃度に依存して増加した。この結合は相互作用モデルの理論カーブ bivalent binding model と一致したことから、D 型 Hc 内には PE 結合部位が 2 カ所存在することが予想され、それぞれの k_1 、 k_2 および K_d を算出した。

KO および野生型マウスの判別と BoNT/C および BoNT/D/C に対する感受性

マウスの尾部より DNA を抽出し、あらかじめ設計されたプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物の長さの違いにより KO、野生型およびヘテロマウスを確認した。致死時間から算出した BoNT/C の野生型マウスに対する毒素活性を 100% としたとき、KO マウスの毒素活性は 0.7% に低下していた。同様に BoNT/D/C は野生型マウスに対する KO マウスの毒素活性は 31% であった。

4. 毒素定量法の開発

測定後肢の保定位置

全てのラットにおいて、測定後肢がたるみなく保定できる位置を決定するため、ラットを所定の位置におき、左後肢の踵を直線 OA 上を遠位側に引っ張った際の点 O からの距離を測定した。後肢の到達距離の平均値は 67.6 mm、SD は 1.7 mm (n=13) であった。保定位置は測定される全てのラットの後肢が到達しうる距離である必要があるため、[平均値-3SD] である 62 mm の位置に決定した。

記録電極陰極の設定位置

点 OA の距離が 36~55 mm となるように記録電極陰極を

設置し、各々の CMAP を測定し、記録電極陰極の設置位置の影響が小さく、かつ腓腹筋の筋腹と一致する位置を確認した。Tukey の多重比較の結果、46~50 mm では有意差が認められたが、36~44 mm では有意差は確認されなかった。また、腓腹筋の筋腹は 42 mm 付近であることが明らかとなった。

刺激電極の設置位置

刺激電極陰極及び陽極を設置し、各々の CMAP を測定し、刺激に対する感度が高い刺激電極の設置位置を特定した。特定した位置において、刺激に対する感度は高く、各条件間で有意差 (Tukey の多重比較) は確認されなかった。

刺激強度

表 1 に示す各条件で、各電流値で刺激した際の CMAP を測定することにより、高確率で最大上刺激を与えられる刺激電極の位置及び刺激強度を確認した。条件①では CMAP 振幅値は刺激強度を 5 mA から 30 mA まで上げるにつれて徐々に高くなったが、条件②では 25 mA 以上で CMAP 振幅値に大きな変化は確認されなかった。

表 1 刺激強度の条件

項目	測定条件		
	条件①	条件②	
アース電極			
刺激電極	尾根部から近位側への距離	1	1.5
		3	4
		5	6
後肢の踵	点 O から点 A までの距離	62 mm	
記録電極		42 mm	
		58 mm	
刺激	持続時間	0.2 mm	
	周波数	1 Hz	
	電流	5~30 mA	25~48.6 mA

用量反応性・過剰差

上述の結果を基に決定した測定条件で毒素投与後 1 日目の CMAP を測定し、用量反応性の確認及び 8 週令ラットとの測定誤差の比較を行った。

今回得られたデータから投与した毒素の用量の常用対数値に対する左右腓腹筋の CMAP 振幅の平均値をそれぞれプロットし、直線性を確認した。左及び右腓腹筋ともに、0.04~0.64 U で直線性が認められた。従って、今回のデータからは左右腓腹筋それぞれで検体の力価を見積もることが出来る可能性が推察された。

今回 4 週令ラットの両肢を用いて得られた各群の 95% 信頼区間について、試みにこれまでに薬効試験等でデータが蓄積されている 8 週令ラットのデータと比較した。左右腓腹筋ともに、4 週令ラットの 95% 信頼区間は過去の 8 週令ラットの信頼区間の範囲内であることが明らかとなった。従って、週齢を 8 週令から 4 週令に変更することにより測定精度が低下しない可能性が示唆された。

5. 毒素の薬効評価法の開発

局所の効果

BOTOX®投与1日目以降、CMAP 振幅値を用量依存的に低下させた。毒素投与1,2,4,7及び14日目における0.03、0.1、0.3及び1 U/head 投与群のCMAP 振幅値のロジット変換値と用量の常用対数値について回帰分析を行ったところ、直線性が認められた。

全身性の副作用

BOTOX®投与2日目から、1.7 から13.6 U/head においてCMAP 振幅値を用量依存的に低下させた。BOTOX®投与2,4,7及び14日目における1.7, 3.4, 6.8及び13.6 U/head 投与群のCMAP 振幅値のロジット変換値と用量の常用対数値について回帰分析を行ったところ、各毒素で直線性が認められた。

治療域

各測定日における治療域 (SD_{50}/ED_{50}) を決定した。

D. 考察

本年の主な成果として、我々はてんかんのキンドリングを用いてモデルを作成し、我々の開発した安全域の高いボツリヌス毒素製剤A2NTXを脳内局所投与したところ、正常の機能を大きく損なわずに、てんかん放電を50%抑制することに成功した。てんかんは100人に1人起こりうる頻度の高い神経疾患であるが、難治例では一生痙攣発作から解放されることなく、大きな社会問題となっている。従来、てんかんをひきおこす病変部位(焦点)を外科的に切除する治療が難治例では一般化していたが脳の正常部分も切除されるために後遺症を残すことが少なからずあった。本研究で示された、正常の機能を温存しながら、てんかんの発作波のみ抑制できる点は難治性てんかんの治療に新しい治療の道筋を開くものであり、拡散性、毒性及び抗原性の低いことが示された我々のA2NTXがこのような中枢神経疾患への臨床応用を進めるうえで最も適していると考えられる。

ボツリヌス毒素を用いた中枢神経系への臨床応用を進めるにあたり、毒素が拡散しにくく、中和抗体が高感度に迅速に計れる必要があり、本年度開発された毒素の定量法や薬効評価法がこれらの中枢神経への応用に役立つと考えられる。また、痛みの神経や運動ニューロンに作用させたり、てんかんなどに臨床応用させるために必要な毒素受容体の解明や痛みの神経への毒素の直接効果を証明することができた。さらなる臨床応用に向けてC、D型の受容体の解明も進めることができた。

E. 結論

昨年度までに開発することができたA2NTXを用いて難治性てんかんの治療への臨床応用への道筋をしめすことができた。またALSや痛みなど他の疾患についても臨床応用を検討中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato K., Iwamori, M., and Hirabayashi Y. Increase of Gq1b in the hippocampus of mice following kindled-seizures. (2008) *Neurosci Lett.* 441:286-290.
2. Marconi, S., Ferracci, G., Berthomieu, M., Kozaki, S., Miquelis, R., Boucraut, J., Seagar, Michael., Leveque, C. A protein chip membrane-capture assay for botulinum neurotoxin activity. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 233(3): 439-446. 2008.
3. Mukai Y, Kaji R. Use of botulinum neurotoxin for spasticity. *Brain Nerve* 2008;60:1421-1426.
4. Sato K, Sumi-Ichinose C, Kaji R, et al. Differential involvement of striosome and matrix dopamine systems in a transgenic model of dopa-responsive dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:12551-12556.
5. Arimura K, Arimura Y, Takata Y, Nakamura T, Kaji R. Comparative electrophysiological study of response to botulinum toxin type B in Japanese and Caucasians. *Mov Disord* 2008;23:240-245.

2. 学会発表

1. 加藤啓子・大隈真矢・山田茂子・桑村充・岡田利也・坂本敏郎・遠藤昌吾・大須賀 壮・糸原重義・平林義雄, シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)遺伝子欠損が与える中枢への影響について第28回日本糖質学会 つくば国際会議場1F多目的ホール 2008.8.18 (poster P-059)
2. Kato K., Kanno H., and Hirabayashi Y. 扁桃体キンドリングマウスでのてんかん発作誘導時における成長ホルモンの関与 Role of growth hormone on epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy第31回日本神経科学大会 / Neuroscience2008 2008. 7/9-11 (7/9 P1-s12) (poster)
3. Yamada S., Sakamoto T., Endo S., Hirabayashi Y., Osuka S., Itohara S., Ikeda T and Kato K. シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)遺伝子欠損マウスの大脳辺縁系における機能障害 Analysis of brain function on the adult mouse with ST3Gal IV deficiency 第31回日本神経科学大会 / Neuroscience2008 2008. 7/9-11 (7/10 P2-p09) (poster)
4. 加藤啓子 慢性神経疾患モデルマウスを用いた生体リズム評価システムの構築 Biological rhythm evaluation system with chronic neurological disease model mice 平成20年度 第7回国際バイオフォーラム平成20年7月4日 東京ビッグサイト西展示棟

5. 加藤啓子 てんかん誘導に連動した発現上昇を示す分子の脳内の役割について 浜松医大セミナー 平成20年5月16日
6. 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). The 6th International Conference on the Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins (TOXINS 2008); 2008.
7. Naotoshi Kiyota, Nakaba Sugimoto, Ayataka Nagano, Shinji Nakahira, Tetsuhiro Harakawa, Akihiro Ginnaga. Botulinum type A2 neurotoxin (150 kDa) is stronger than type A1 progenitor toxin (900 kDa) in the inhibition activity of neuromuscular transmission of isolated mouse phrenic nerve-hemidiaphragm. TOXINS 2008; 2008.
8. Yoshitaka Goto, Yasushi Torii, Shinji Nakahira, Tetsuhiro Harakawa, Akihiro Ginnaga, Motohide Takahashi, Takashi Sakamoto, Shunji Kozaki, Ryuji Kaji. The Therapeutic Window in Rats of Botulinum Neurotoxin Subtype A2 is Wider than that of Subtype A1, Regardless of the Presence of Nontoxic Proteins. TOXINS 2008; 2008.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. **特願 2008-9479** 出願日：2008.1.18 名称：てんかんの診断、処置または予防用組成物
2. **特願 2008-23135** 出願日：2008.2.2 名称： α 2,3-シアル酸転移酵素 (ST3GalIV) 欠損非ヒト動物およびそれを用いたスクリーニング方法
3. **特願 2009-026191** 出願日：2009.2.6 名称：てんかん治療薬のスクリーニング方法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし