

200908022A

政策創薬総合研究事業

平成21年度

政策創薬総合研究

総括 研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成21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

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	……	1
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	……	10
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	……	20
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	……	36

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	……	58
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	……	74
KHB1007	代替毒性試験法の評価と開発に関する研究	能美 健彦	……	89
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	……	114
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	……	131
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	……	147
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	……	162
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	網脇 祥子	……	177
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	……	194
KHB1201	免疫調整作用に基づく医薬品探索とその安全性評価技術の開発	手島 玲子	……	200

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	……	210
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	……	224
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	……	235
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	……	241
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	……	256
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	……	271

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 ……	286
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 ……	327
KHC1022	クロイツト・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 ……	341
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 ……	354
KHC1102	帯状疱疹ワクチン開発のための疫学研究	山西 弘一 ……	363
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 ……	367
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 ……	371
KHC1202	高分化型三次元細胞培養系を用いたヒト血漿蛋白及びウイルス粒子の大量産生法の開発	相崎 英樹 ……	376
KHC1203	自己免疫疾患、アレルギー疾患の治療を目標としたヘルパーT細胞の分化に関わる因子の探索	浅原 弘嗣 ……	382
KHC1204	細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性、有効性及び生産性に関する研究	大隈 邦夫 ……	387
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 ……	394
D分野 医薬品等開発のための画期的創薬方法の開発、および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 ……	408
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 ……	426
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 ……	447
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 ……	462
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 ……	476
KHD1205	小児成長疾患に対するトランスレーショナルリサーチにおける技術的基盤の創成	宮戸 健二 ……	509
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			
KHA3361	先天性副腎低形成症に対する治療法の開発	千田 大 ……	513
KHA3362	軸索保護に基づく神経変性疾患治療薬の開発	若月 修二 ……	516

B分野 医薬品開発のための評価科学に関する研究

KHB3363 細胞外ステロール取り込みによる抗真菌薬耐性機構の解明 田辺 公一 …… 521

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

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 …… 525

KHC3332 Fc γ 受容体を介したデング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 …… 531

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 …… 537

KHC3364 C型肝炎ウイルスの粒子形成過程を標的とした新規治療法の萌芽的
研究 政木 隆博 …… 543

重点研究

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 第一製造部
研究者 銀永 明弘
研究期間 平成 19 年 4 月～平成 22 年 3 月

研究要旨：ボツリヌス毒素はその重鎖が受容体に対するきわめて高い親和性をもち、運動ニューロンや脊髄・脳への drug delivery system としての可能性を持っている。この特性を利用し難治性てんかんや筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの希少難病についての有効な治療法を開発するための基礎実験を行った。C型、D型毒素の受容体の解明を行い、これら毒素の臨床応用の可能性を探った。複合筋活動電位(CMAP)を用いた毒素力価測定法を開発し、それを用いて我々が開発した低分子量ボツリヌス毒素(A2NTX)の有効性・安全性を従来の毒素製剤(BOTOX)と比較した。てんかんのモデル動物についてボツリヌス毒素がてんかん発作を抑えることを証明することができた。ALSについては重鎖を単離し drug delivery systemとして将来利用できる基盤をつくることができた。今後、安全性が高い低分子量ボツリヌス毒素 A2NTX の痙縮等の大量の毒素が必要な疾患への臨床応用を図る。難治性てんかんへの臨床応用へむけた基礎研究、及び ALS 治療薬のシーズ開発へ展開する。

研究分担者：

- (1) 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部
梶 龍児
- (2) 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
小崎 俊司
- (3) 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
加藤 啓子
- (4) 国立精神・神経センター病院 神経内科
坂本 崇

A. 研究目的

ボツリヌス毒素はその重鎖がきわめて高い受容体に対する親和性をもち、運動ニューロンや脊髄・脳への drug delivery system としての可能性を持っている。この特性を利用し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その他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(ALS)などの希少難病についての治療法の開発についても検討する。また従来の A 型や B 型とは異なる C 型、D 型毒素の受容体の解明を行いこれら毒素の臨床応用の可能性を探る。複合筋活動電位(CMAP)を用いた毒素力価測定法を開発し、それを用いて我々が開発した低分子量ボツリヌス毒素(A2NTX)の有効性・安全性を従来の毒素製剤(BOTOX)と比較する。

B. 研究方法

毒素受容体の解明

C型およびD型 Hc リコンビナント蛋白を発現させ精製した。リコンビナント Hc と受容体分子との結合部位に関わるアミノ酸残基を同定し相互作用を解析した。BoNT/C および DC モザイク神経毒素(BoNT/DC)の作用発現におけるガングリオシドの影響を調べ BoNT の中和能を有するモノクローナル抗体(mAb)の性状解析することにより C 型・D 型の受容体を解析した。

ALS の治療薬の開発

重鎖ならびに重鎖 C 末端領域のリコンビナント蛋白を発現させ A 型ボツリヌス毒素重鎖 C 末端領域だけでも神経細胞内へ侵入するとの報告があり、カーゴ蛋白として重鎖(H_c+H_v)と重鎖 C 末端領域(H_c)の 2 通りを作成し、発現用大腸菌 BL21Codonplus をトランスフォーメーションし、GST 融合リコンビナント蛋白として発現させる。重鎖や重鎖 C 末端領域の活性は、型特異的な蛋白受容体(A型:SV2、B型:StgII)との結合をBiacore(GE Healthcare社)で調べる。insulin like growth factor 1(IGF-1)のリコンビナント蛋白を発現、カーゴ蛋白に結合させる低分子蛋白として、神経保護作用があるとされる IGF-1 を選択した。これを元に His-tag を付加した IGF-1 リコンビナント蛋白の発現・精製条件を検

討した。カーゴ蛋白と IGF-1 の結合には SH 基と Ni²⁺ を介するヒスチジンの架橋剤 (Maleimid-C3-NTA : Dojindo) を用いた。

難治性てんかんの治療薬の開発

側頭葉てんかんモデルとして、扁桃体キンドリングマウス、Pentylentetrazol (PTZ) 腹腔内持続注入てんかん重積モデルマウス、カイニン酸海馬内注入てんかん重積モデルマウスを選択し、各てんかんモデルへのボツリヌス毒素 A2NTX の治療効果を検証する。

扁桃体キンドリングマウスをカイニン酸海馬内注入により作成し、てんかん発作獲得後、A2NTX を海馬内注入し、効果を判定した。ボツリヌス毒素 A2NTX を 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、てんかん発作波をモニターした。

毒素力価測定法の開発と製剤間の比較

ICR マウスの左上肢に、我々の開発した分子量 15 万のボツリヌス神経毒素製剤 A2NTX と分子量 90 万の既存製剤 BOTOX をそれぞれ 0.01U~0.5U 投与する。体部を補定し、上肢の牽引力を測定する。ICR マウスの左後肢に 0.03U~1U の BOTOX を投与し、経時的に CMAP を測定する。投与側・非投与側の CMAP が 50% に低下する ED50 と SD50 から SD50/ED50 を治療域と定義し、安全性の指標とする。ICR マウスの左上肢に、A2NTX と BOTOX をそれぞれ 0.01U・0.05U・0.1U 投与する。直径 23cm のボウルに深さ 10cm 程度水を入れたプールの中心にマウスを入れ、ボウルの淵にたどり着くまでの時間を経時的に測定・観察する。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、動物実験規程に従い、動物福祉に配慮し実施した。

C. 研究結果

毒素受容体の解明

C 型および D 型毒素の受容体だけではなく、毒素分子内の受容体結合に関わるアミノ酸残基まで特定し、SPR 解析による相互作用モデルの理論カーブから C 型および D 型毒素の結合様式が異なることを明らかにした。A 型神経毒素の軽鎖を認識する mAb は毒素のサブタイプや複合体毒素構造の有無に関わらず、安定して BoNT と結合することが分かった。BoNT/C は GT1b と 1:1 に結合し、BoNT/D は 2 カ所の結合部位により PE と結合すると考えられた。ボツリヌス毒素の受容体の構成にタンパク質が関与する A, B, E, G 型に対し、C 型および D 型は異なる膜構成成分を認識し、それに関わるアミノ酸残基も型により様々であることから、C 型および D 型が他の型とは異なる受容体認識機構を有することが予想された。

ALS の治療薬の開発

A 型毒素重鎖や重鎖 C 末端領域を PCR で増幅した。様々なプラスミドベクターを試したがクローニングが困難であったり、発現しなかったりと重鎖や重鎖 C 末端領域の発現・精製にはまだ成功していない。現在はプラスミドに pGEX-6P-1 を選択し、ライゲーションを試みている。ヒト IGF-1 遺伝子を含む市販プラスミドを鋳型にし、PCR で IGF-1 部分を増幅、pET151-D-TOPO vector (Invitrogen 社) にクローニングし、シークエンスを確認した後、発現用大腸菌 BL21Codon plus (DE3) に導入して His-tag 融合蛋白の形で産生を試みたがほとんど発現しなかった。これらの知見は将来の治療薬開発の基礎となると考えられる。

難治性てんかんの治療薬の開発

約 50% のてんかん発症マウスに、A2NTX 投与後、転倒発作とてんかん後発射 (脳波) を完全に消失するマウスが観察された。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み行動が残る傾向が強かった。すなわち、A2NTX の海馬内投与が、50% の側頭葉てんかん発症マウスに治療効果を示すことが実証できた。

毒素力価測定法の開発と製剤間の比較

複合筋活動電位 (CMAP) と施注肢の牽引力による毒素作用の測定法を確立し、それを用いて従来型 A 型毒素 (BOTOX) と我々の開発した低分子神経毒素 (A2NTX) を比較した。毒素投与側では毒素量依存的に牽引力は低下するが、非投与側の牽引力の低下は中等量 (0.05U, 0.1U) で有意に BOTOX の方が低くなった。A2NTX は BOTOX に比べて明らかにその拡散性が低く安全性が高いことが示された。

D. 考察

CMAP を用いた毒素力価評価法の開発を完了し、C 型・D 型の受容体の詳細について解明することができた。てんかんのモデル動物についてボツリヌス毒素がてんかん発作を抑えることを証明することができた。ALS については重鎖を単離し drug delivery system として将来利用できる基盤をつくることができた。しかし、実際の治療薬の開発までには至っていない。

今回の研究でその安全性が確認された低分子量毒素 A2NTX は大量に使用する必要のある脳卒中後の痙縮などに臨床応用が可能である。実現すれば現在 60 万人存在する脳卒中後の痙縮患者が自立できるきっかけになると期待される。てんかんは 100 人に 1 人が罹患する頻度の高い神経疾患であるが十分に治療に反応しない難治性てんかんはその約 10% に見ら

れる。モデルにおいて、A2NTX の治療効果をすでに検証したことから、てんかん患者への貢献を考えた場合、社会的意義は非常に大きい。また、難治てんかんの発症機序は、いまだ不明な点が多く、A2NTX がてんかん発作を抑制する本知見は、てんかん発症機構の解明に A2NTX を利用する手段を提案し、学術的にも非常に意義が大きい。さらに、A2NTX の治療効果は、世界初の知見であることから、国際的にも意義は大きい。

ALS に対するシーズの検索はさらに続ける価値があると考えられる。A2NTX の痙縮に対する臨床開発が可能であり期待される。

E. 結論

ボツリヌス毒素のてんかんや ALS など中神経疾患に対する臨床応用の基礎が確立された。

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.* 44, 484-493, 2008
- 3) Kato K., Iwamori, M., and Hirabayashi Y. Increase of Gq1b in the hippocampus of mice following kindled-seizures. *Neurosci Lett.* 441:286-290, 2008
- 4) 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.
- 5) Mukai Y, Kaji R. Use of botulinum neurotoxin for spasticity. *Brain Nerve.* 60:1421-1426, 2008
- 6) 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.* 105:12551-12556, 2008
- 7) 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.*

23:240-245, 2008

- 8) Sakamoto T., Torii Y., Takahashi M., Ishida S., Goto Y., Nakano H., Harakawa T., Ginnaga A., Kozaki S., Kaji R.: Quantitative determination of the biological activity of botulinum toxin type A by measuring the compound muscle action potential (CMAP) in rats. *Toxicon* 54: 857-861, 2009
- 9) Nakamura, K., Kohda, T., Kozaki, S., et al. Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan. *Vet Microbiol.* 140(1-2): 147-54, 2009
- 10) 加藤啓子, 幸田知子, 小崎俊司:ボツリヌス毒素によるてんかんの治療 Application of botulinum neurotoxin in the treatment of epilepsy —BRAIN and NERVE—神経研究の進歩— 医学書院 61:939-948, 2009.8
- 11) Umeda, K., Seto, Y., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S. Genetic characterization of *Clostridium botulinum* associated with type B infant botulism in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2720-2728, 2009
- 12) Kato K., Suzuki M, Hiroki Kanno H, Sekino S, Kusakabe K, Okada T, Mori T, Yoshida K, and Hirabayashi Y. Distinct Role of Growth Hormone on Epilepsy Progression in a Model of Temporal Lobe Epilepsy: *J Neurochem.* 110:509-519, 2009
- 13) 加藤啓子. てんかん発症機構に関わる分子基盤の構築 Elucidation of molecular basis involved in kindling-epileptogenesis てんかん治療研究振興財団研究年報; 20 : 31-38, 2009
- 14) Nakao, S., S. Takata, Kaji R., et al. Relationship between Barthel Index scores during the acute phase of rehabilitation and subsequent ADL in stroke patients. *J Med Invest* 57(1-2): 81-8, 2010
- 15) Torii Y., Goto Y., Takahashi M., Ishida S., Harakawa T., Sakamoto T., Kaji R., Kozaki S., Ginnaga A.: Quantitative determination of biological activity of botulinum toxins utilizing compound muscle action potentials (CMAP), and comparison of neuromuscular transmission

blockage and muscle flaccidity among toxins. *Toxicon* 55: 407-414, 2010

- 16) Torii Y., Takahashi M., Ishida S., Goto Y., Nakahira S., Harakawa T., Kaji R., Kozaki S., Ginnaga A.: Quantification of potency of neutralizing antibodies to botulinum toxin using compound muscle action potential (CMAP). *Toxicon* 55: 662-665, 2010

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), 6th 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, 6th 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 Coordinating Committee Meeting. 2007年10月 アメリカ カリフォルニア州.
- 4) 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 1 F 多目的ホール 2008. 8. 18 (poster P-059)
- 5) 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)

- 6) 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)
- 7) 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 回国際バイオフィォラム 平成 20 年 7 月 4 日 東京ビッグサイト西展示棟
- 8) 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
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 趙海洋、中村佳司、幸田知子、向本雅郁、小崎俊司 ボツリヌス神経毒素中和能を有するモノクローナル抗体の性状 第62回日本細菌学会関西支部総会 (2009)
 - 13) 加藤啓子 てんかん発症過程に関わる成長ホルモンの役割 関西実験動物研究会第104回研究会 2009.12.11「みやこめっせ」(口頭)
 - 14) 加藤啓子 てんかん及びうつ病の治療薬スクリーニング法の開発 『大阪府立大学/大阪市立大学 新技術説明会』(独)科学技術振興機構 JSTホール 2009.7.28(口頭)
 - 15) 加藤啓子、鈴木雅和、日下部健、岡田利也、平林義雄 側頭葉てんかんモデル(扁桃体キンドリング)マウスにおけるてんかん発症に関わる成長ホルモンの役割 (1P0-048) 第56回日本実験動物学会 大宮ソニックホール 2009.5.14(口頭)

G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) Title: The method for quantification of titer of neurotoxin-neutralizing antibody、出願番号:PCT/JP2008/064813(平成20年8月20日出願)、国際公開番号:W02009/025290 A1(特願2007-213889を基とした国際出願)

「特願2007-213889、出願日:2007.8.20、名称:神経毒素中和抗体価の定量法」

- 2) Title: Preparation of type A2 botulinum neurotoxin、出願番号:PCT/JP2009/056613(平成21年3月31日出願)、国際公開番号:W02009/123174 A1(特願2008-092145を基とした国際出願)

「特願2008-092145、出願日:2008.3.31、名称:A2型ボツリヌス神経毒素製剤」

- 3) Title: Pharmaceutical composition containing highly purified botulinum neurotoxin therapeutic agent as active ingredient, and use thereof、出願番号:PCT/JP2009/003664(平成21年7月31日出願)、国際公開番号:W02010/013495 A1(特願2008-092145を基とした国際出願)

「特願2008-199069、出願日:2008.7.31、名称:高度精製ボツリヌス毒素治療剤を有効成分として含有する薬学的組成物およびその利用」

- 4) 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 PCT/JP2009/050626(平成21年1月19日出願) ●国際公開番号●W02009/091059

- 5) 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 特開2009-201501

- 6) 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 PCT/RO/JP0-PAS0362(整理番号2009F224)平成22年2月5日

- 7) 特願2009-235309 出願日:2009.10.9 名称:抗不安薬または抗うつ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

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（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を開発を行う。てんかんのモデル動物を作成して、実際にA2NTXの脳室内投与によりてんかん放電を減少させる可能性を見出した。代表的な神経難病である筋萎縮性側索硬化症（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の可能性を探った。C型とD型の毒素の受容体についても解明し臨床応用の可能性を探った。またボツリヌス毒素の品質管理法や定量法を開発を行い臨床応用した。

研究分担者

- (1) 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部
梶 龍児
- (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・神経センター病院 神経内科
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ALS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、イソフルラン麻酔下で、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（ブレグマ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（ブレグマ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（ブレグマ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。また脳室内投与の可能性についても探った。

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が附加した形で産生された。菌体を遠心により回収し、可溶性 (B-PER, Pierce) に懸濁後、超音波破砕し、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

昨年度と同様に、

(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ST3GalIV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。ST3GalIV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

昨年度に引き続き毒素はボツリヌス神経毒素 (以下、

A2NTX) 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0.5w/v%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で階段希釈しLD₅₀用量を調製した。ラット (雌性SD系、4週令、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A2NTX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、25mA、0.2msecで行った。CMAP振幅値の解析にはStatistical Analysis for Neurotoxin (SAN ver2.1、自社開発ソフト) を用いた。

5. 毒素の薬効評価法の開発

昨年度と同様に、

毒素の調製及び投与

BOTOX[®]はICR/CD-1マウス (雌性、4W、チャールスリバー) を用いてipLD₅₀試験を行い、1マウスipLD₅₀=1Uとして力価を算出した。BOTOX[®]は0.5w/v%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で階段希釈し、0.3、1、3、10、17、34、68及び136U/mLに調製した後、各毒素溶液0.1mL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、0.03~1U/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、1.7~13.6U/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。また脳室内投与の予備実験も行った。

昨年度同様に、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。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。

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が、毒素重鎖と IGF を結合させるには至っていない。

3. C, D 型毒素の受容体の解明

C 型 D 型毒素の受容体についてさらに検証を行いそれぞれ GT1b とフォスファチジルエタノールアミン (PE) であることを確認した。

すなわち C 型および D 型毒素の受容体だけではなく、毒素分子内の受容体結合に関わるアミノ酸残基まで特定し、SPR 解析による相互作用モデルの理論カーブから C 型および D 型毒素の結合様式が異なることを明らかにした。A 型神経毒素の軽鎖を認識する mAb は毒素のサブタイプや複合体毒素構造の有無に関わらず、安定して BoNT と結合することが分かった。BoNT/C は GT1b と 1:1 に結合し、BoNT/D は 2 カ所の結合部位により PE と結合すると考えられた。ボツリヌス毒素の受容体の構成にタンパク質が関与する A, B, E, G 型に対し、C 型および D 型は異なる膜構成成分を認識し、それに関わるアミノ酸残基も型により様々であることから、C 型および D 型が他の型とは異なる受容体認識機構を有することが予想された。

4. 毒素定量法・薬効評価法の開発

複合筋活動電位 (CMAP) と施注肢の牽引力による毒素力価の測定法を確立し、それを用いて従来型 A 型毒素 (BOTOX[®]) と我々の開発した低分子神経毒素 (A2NTX) を比較した。毒素投与側は毒素用量依存的に牽引力は低下するが、未投与側の牽引力の低下は中等量 (0.05U, 0.1U) で有意に BOTOX[®] の方が低くなった。A2NTX は BOTOX[®] に比べて明らかにその拡散性が低く安全性が高いことが示された。

D. 考察

CMAP を用いた毒素力価評価法の開発を完了し、C 型・D 型の受容体の詳細について解明することができた。てんかんのモデル動物についてボツリヌス毒素がてんかん発作を抑えることを証明することができた。ALS については重鎖を単離し drug delivery system として将来利用できる基盤をつくることができた。しかし、実際の治療薬の開発までには至っていない。

今回の研究でその安全性が確認された低分子量毒素 A2NTX は大量に使用する必要のある脳卒中後の痙縮などに臨床応用が可能である。実現すれば現在 60 万人存在する脳卒中後の痙縮患者が自立できるきっかけになると期待される。てんかんは 100 人に 1 人が罹患する頻度の高い神経疾患であるが十分に治療に反応しない難治性てんかんはその約 10% に見られる。モデルにおいて、A2NTX の治療効果をすでに検証したことから、てんかん患者への貢献を考えた場合、社会的意義は非常に大きい。また、難治てんかんの発症機序は、いまだ不明な点が多く、A2NTX がてんかん発作を抑制する本知見は、てんかん発症機構の解明に A2NTX を利用する手段を提案し、学術的にも非常に意義が大きい。さらに、A2NTX の治療効果は、世界初の知見であることから、国際的にも意義は大きい。

ALS に対するシーズの検索はさらに続ける価値があると考えられる。A2NTX の痙縮に対する臨床開発が可能であり期待される。

E. 結論

ボツリヌス毒素のてんかんや ALS など中神経疾患に対する臨床応用の基礎が確立された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Torii Y., Goto Y., Takahashi M., Ishida S., Harakawa T., Sakamoto T., Kaji R., Kozaki S., Ginnaga A.: Quantitative determination of biological activity of botulinum toxins utilizing compound muscle action potentials (CMAP), and comparison of neuromuscular transmission blockage and muscle flaccidity among toxins. *Toxicon* 55: 407-414, 2010
- 2) Torii Y., Takahashi M., Ishida S., Goto Y., Nakahira S., Harakawa T., Kaji R., Kozaki S., Ginnaga A.: Quantification of potency of neutralizing antibodies to botulinum toxin using compound muscle action

potential (CMAP). *Toxicon* 55: 662-665, 2010

- 3) Nakao, S., S. Takata, Kaji R., et al. Relationship between Barthel Index scores during the acute phase of rehabilitation and subsequent ADL in stroke patients. *J Med Invest* 57(1-2): 81-8, 2010
- 4) Sakamoto T., Torii Y., Takahashi M., Ishida S., Goto Y., Nakano H., Harakawa T., Ginnaga A., Kozaki S., Kaji R.: Quantitative determination of the biological activity of botulinum toxin type A by measuring the compound muscle action potential (CMAP) in rats. *Toxicon* 54: 857-861, 2009
- 5) Nakamura, K., Kohda, T., Kozaki, S., et al. Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan. *Vet Microbiol.* 140(1-2): 147-54, 2009
- 6) 加藤啓子, 幸田知子, 小崎俊司: ボツリヌス毒素によるてんかんの治療 Application of botulinum neurotoxin in the treatment of epilepsy —BRAIN and NERVE—神経研究の進歩— 医学書院 61:939-948, 2009.8
- 7) Umeda, K., Seto, Y., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S. Genetic characterization of *Clostridium botulinum* associated with type B infant botulism in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2720-2728, 2009
- 8) Kato K., Suzuki M, Hiroki Kanno H, Sekino S, Kusakabe K, Okada T, Mori T, Yoshida K, and Hirabayashi Y. Distinct Role of Growth Hormone on Epilepsy Progression in a Model of Temporal Lobe Epilepsy: *J Neurochem.* 110:509-519, 2009
- 9) 加藤啓子. てんかん発症機構に関わる分子基盤の構築 Elucidation of molecular basis involved in kindling-epileptogenesis てんかん治療研究振興財団研究年報; 20 : 31-38, 2009

2. 学会発表

- 1) 趙海洋、中村佳司、幸田知子、向本雅郁、小崎俊司 ボツリヌス神経毒素中和能を有するモノクローナル抗体の性状 第62回日本細

菌学会関西支部総会 (2009)

- 2) 加藤啓子 てんかん発症過程に関わる成長ホルモンの役割 関西実験動物研究会第104回研究会 2009.12.11 「みやこめっせ」(口頭)
- 3) 加藤啓子 てんかん及びうつ病の治療薬スクリーニング法の開発 『大阪府立大学/大阪市立大学 新技術説明会』(独)科学技術振興機構 JSTホール 2009.7.28 (口頭)
- 4) 加藤啓子、鈴木雅和、日下部健、岡田利也、平林義雄 側頭葉てんかんモデル(扁桃体キンドリング) マウスにおけるてんかん発症に関わる成長ホルモンの役割 (IPO-048) 第56回日本実験動物学会 大宮ソニックホール 2009.5.14 (口頭)

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 PCT/JP2009/050626 (平成21年1月19日出願) ●国際公開番号●WO2009/091059
- 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 特開 2009-201501
- 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 PCT/RO/JP0-PAS0362 (整理番号 2009F224) 平成22年2月5日
- 4) 特願 2009-235309 出願日: 2009.10.9 名称: 抗不安薬または抗うつ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

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

研究期間:平成 19 年 4 月～平成 22 年 3 月

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
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
研究センター
(4)今泉 和則 宮崎大学医学部
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
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

ハンチントン舞踏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。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。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た。その目的のため、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

合物の効率よいスクリーニング法を開発した。また、自閉症患者や言語障害などの発達障害の病態と小胞体ストレスとの関係について、細胞培養、モデルマウスを用いて解析した。

B. 研究方法

1. 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 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。

2. 細胞染色法

小胞体ストレス試薬およびリゾソ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+/+MEF 細胞および Atg5-/-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℃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℃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。

3. 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 μM 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。

(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、深いエーテル麻酔の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(桃井)

正常ジスフェルリンはユビキチン/プロテアソームに關与する品質管理機構(小胞体AD)により分解排出されるのに対し、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、その凝集により小胞体ストレスに關係する eIF2 α 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 型への変換が促進される。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 α 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、さらに、ラパマイシンを添加し、eIF2 α 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された。

2. MM-1 のオートファジーにおける役割(有賀)

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。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 と PFD 各サブユニットは PolyQ72 を取り囲むように(隔離するように)局在した。MM-1/PFD5, PFD2, PFD3 に対する siRNA を Neuro-2a 細胞に導入したところ、いずれの siRNA 導入細胞でもオリゴマー形成、大きな凝集体形成が増加した。従って、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。

3. 小胞体膜ユビキチンリガーゼ gp78 と RMA1 による協調的 ERAD (徳永)

CFTRF508 の ERAD における HRD1 と gp78 の寄与を確認したところ、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。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。CFTRF508 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き CFTRF508 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。

4. ケミカルシャペロン(今泉 桃井)

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 GRP94, calreticulin, CHOP mRNA を誘導したが、他の遺伝子の発現には影響がなかった。この3つの遺伝子の上流には転写因子 ATF6 が作用する ERSE (ER stress response element) があり、化合物 BIX は ATF6-ERSE の経路に働いている可能性が示唆された。また、10 万個の化合物ライブラリーをスクリーニングし、プロテアソーム阻害剤 MG132 存在下での凝集を抑制する、複数の小胞体分子シャペロン活性をもつ化合物 (Endoplasmic reticulum molecular chaperon chemicals; 以下 ERCC) を見出した。このうち、ERCC-1。ERCC-1 はジスフェルリンの小胞体内での凝集を抑制した。

5. 自閉症患者における CADM1 変異(桃井真、桃井)

自閉性障害治療の候補分子の開発を目的に、(1)自閉性障害患者における候補遺伝子の変異解析と、(2)自閉性障害候補遺伝子のノックアウトマウスの解析による、自閉性障害の病因遺伝子同定と病態解明研究を行い、C739A (H246N) と A755C (Y251S) の2ミスセンス変異を検出した。両変異は CADM1 蛋白の3番目の Ig ドメイン上に局在した。正常と異なり、

自閉症でこれまで見つけられている変異 **CADM1** と変異 **NLGN3** は **CHOP** を増大させることが明らかとなった。今後、自閉症の病態と変異蛋白による **Loss-of-function** か **Gain-of-function** が原因かをマウスを用いて検討する必要がある。

6. 言語障害変異 **Foxp2(R552H)**マウスの解析 **KE** ファミリーの 3-4 世代にわたる言語障害は常染色体優性の遺伝形式をしめし、**FOXP2** の **R553H** の変異が存在する。**FOXP2** は DNA 結合配列である **Forkhead Box domain** をもつ遺伝子群であり、N 末端にポリグルタミンの領域をもち、中央にタンパク結合領域である **Zinc finger** 領域とロイシンジッパーの領域をもち、さらに C 末端にある **Forkhead** 領域の両端には核移行シグナルが存在する。**R553H** の変異は **Forkhead** 領域の真ん中に位置し、**R553H** の変異は DNA 結合の低下以外に、**FOXP2** の核移行をも著しく阻害する。ヒト言語障害の **FOXP2(R553H)** の変異に対応したマウス **Foxp2(R552H)** の変異をもつノックインマウスを作成し、超音波音声 (**USV**) を解析した。**USV** の障害と小脳発達障害をもたらすことが明らかになった。このことは **Foxp2** が転写制御する遺伝子産物によるヒト言語とマウス **USV** に共通な分子機構が存在することを示唆している。ヘテロ、ホモの **Foxp2(R552H)-KI** マウスは **USV** 障害をしめしたが、ホモ **Foxp2(R552H)** 仔マウス (生後 8-12) はプルキンエ細胞の発達障害と行動障害を示した。**Foxp2(R552H)-KI** マウスのホモの仔は母親との **USV** コミュニケーション障害と行動異常により、母マウスから授乳されず、生後 3 週で餓死する。

4. ストレス保護マウス (日比野)

SCCA1 (squamous cell carcinoma antigen 1) はセルピン B3 と呼ばれセルピンプロテアーゼ阻害物質セルピンの仲間である。**SCCA1** は他の仲間と異なり、システイン酵素に対して強い阻害活性を有する。**SCCA1** の生理的機能を明らかにするため、我々はインボルクリンプロモーターにより、表皮上層に **SCCA1** を過剰発現させた **Tg** マウスを作製した。無毛の **HR-1** マウスと交配を繰り返し、インボルクリン・**SCCA1** ヘアレスマウスを作製した。**SCCA1 Tg** マウスの一部は年齢とともに皮膚のたるみが顕著となってきた。組織学的検査では、それらのマウスは表皮肥厚を示し、**BrdU**

の取込試験では、基底細胞のかかなりの部分が陽性であり、明らかな増殖亢進を示した。

D. 考察

1. 小胞体シャペロン

BIP を発現させる化合物が小胞体ストレスによる細胞死を抑制することから、**BIP** 遺伝子、**CHOP** 遺伝子の発現を制御する小胞体ストレス誘導、小胞体シャペロンを誘導する化合物が治療薬として有効と考えられる。**Dysferlin-EGFP** の蛍光をモニターすることにより、変異蛋白凝集がもたらす **ERAD** の抑制および小胞体ストレス誘導を可視化が可能となり、小胞体ストレスを制御する化合物のスクリーニングが可能となった。こうしたモニター系を利用することで、**BIX**、**ERCC** などの小胞体分子シャペロン化合物やストレス細胞死を抑制する **SSCA1** などの存在が本研究により明らかになった。

2. **CADM1** 変異と自閉性障害

シナプス接着蛋白の 1 つである **CADM1** に変異が 2 種検出されたことは、自閉性障害の基本的分子病態がシナプス形成障害、または機能障害であることを指示する点で意味がある。遺伝子変異と自閉性障害の病態は必ずしも一致しないことに関しては、**Cadm1-KO** マウスが自閉性障害の病態を全て呈しないことから示唆される。変異 **CADM1** は細胞膜上への移動が障害され、**ER** に留まることで、シナプス形成不全を来すことが推定される。この変異蛋白の局在異常は、これらの変異が疾患と関連していると考えられる。

3. **FoxP2(R553H)** 変異と言語獲得

Broca 領域と **Orofacial** の領域である **Motor Cortex** の回路の障害により、うまく調音 (**articulation**) できないことが、文法の判断、言語の理解を困難にしている。現在、小脳特異的なプロモーターを用いて、ヒト型正常 **FOXP2** を **Foxp2(R552H)-KI** マウスの小脳に発現させたマウスを作製しており、こうした脳特異的なプロモーターを用いて、**USV** 障害の回復を解析することで、ヒト言語 (マウス **USV**) に関与する領域 (神経回路網) を特定していくことができるのではと計画している。しかし、言語獲得の機構解明には、他の言語障害をともなう自閉症などの疾患での、障害者の **fMRI** の解析と遺伝子変異解析など総合的な解析が不可欠である。

E. 結論

1.小胞体ストレスをモニターする系を確立するとともに、制御する化合物のスクリーニング系として応用することが可能になった。

2.BIXはATF6の下流に作用してBiP mRNAを誘導することが明らかになった。実際に BIXを投与した細胞ではGRP94やcalreticulinが誘導されていた。

しい知見である

3.ヒト言語障害のFOXP2(R553H)の変異に対応したマウスFoxp2(R552H)の変異をもつノックインマウスを作成し、USVを解析した。USVの障害と小脳発達障害をもたらすことが明らかになった。Foxp2が転写制御する遺伝子産物によるヒト言語とマウスUSVに共通な分子機構が存在することを示唆された。

F. 研究発表

主任研究者

桃井 隆

1)Fujita E, Dai H, Tanabe Y, Yamagata T, Miyakawa T, Tanokura M, Momoi MY, Momoi T. Autism Spectrum Disorder is related to endoplasmic reticulum stress induced by mutations in the synaptic cell adhesion molecule, CADM1 Cell death Disease, 2010, in press.

2)Momoi T, Fujita E, Senoo H, Momoi M. Genetic factors and epigenetic factors for autism: endoplasmic reticulum stress and impaired synaptic function. Cell Biol Int. 2009;34:13-19.

3)Tanabe Y, Kasahara T, Momoi T, Fujita E. Neuronal RA175/SynCAM1 isoforms are processed by tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE)/ADAM17-like proteases. Neurosci Lett. 2008, 17:16-21.

4)Fujita E, Tanabe Y, Shiota A, Ueda M, Suwa K, Momoi MY, Momoi T. Ultrasonic vocalization impairment of Foxp2 (R552H) knockin mice related to speech-language disorder and abnormality of Purkinje cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008,26:3117-3122.

5)Fujita E, Tanabe Y, Hirose T, Aurrand-Lions M, Kasahara T, Imhof BA, Ohno S, Momoi T. Loss of partitioning-defective-3/isotype-specific interacting protein(par-3/ASIP) in the elongating spermatid of RA175 (IGSF4A/SynCAM) deficient mice. Am. J. Pathol. ,2007, 171,1800-1810.

6)Uchio N, Oma Y, Toriumi K, Sasagawa N, Tanida I, Fujita E, Kouroku Y, Kuroda R, Momoi T, Ishiura S. Endoplasmic reticulum stress caused

by aggregate-prone proteins containing homopolymeric amino acids. FEBS J. ,2007, 274,5619-5627.

7)Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagi H, Matsuda C, Hayashi Y, Momoi T. Two Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Systems (ERAD) for the Novel Variant of the Mutant Dysferlin; Ubiquitin/ Proteasome ERAD (I) and Autophagy/ Lysosome ERAD (II). Hum. Mol.Genet. 2007, 16,618-629.

8) Takai Y, Matikainen T, Jurisicova A, Kim MR, Trbovich AM, Fujita E, Nakagawa T, Lemmers B, Flavell RA, Hakem R, Momoi T, Yuan J, Tilly JL, Perez GI. Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. Apoptosis. 2007,12, 791-800.

分担研究者

磯合 敦

1)Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagi H, Matsuda C, Hayashi Y, Momoi T. Two Endoplasmic Reticulum- Associated Degradation Systems (ERAD) for the Novel Variant of the Mutant Dysferlin; Ubiquitin/ Proteasome ERAD (I) and Autophagy/ Lysosome ERAD (II). Hum. Mol.Genet. 2007, 16,618-629.

2)Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T. ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. Cell Death Differ. 2007, 14,230-239.

上田 正次

1) Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Abe MA, Nakayama H, Takahashi R, Ueda M, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Kanda T. Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. J Cell Physiol.2008, 217:388-399.

2)Takahashi R, Kuramochi T, Aoyagi K, Hashimoto S, Miyoshi I, Kasai N, Hakamata Y, Kobayashi E, Ueda M. Establishment and characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line. Transgenic. Res. 2007, 16,115-120.

4)Kitada K, Ishishita S, Tosaka K, Takahashi R, Ueda M, Keng V.W, Horie K, Takeda J. Transposon-tagged mutagenesis in the rat. Nature Method. 2007, 4,131-133.

日比野 利彦

1) Zheng B, Matoba Y, Kumagai T, Katagiri C, Hibino T, Sugiyama M. Crystal structure of SCCA1 and insight about the interaction with JNK1. Biochem Biophys Res Commun. 2009,380:143-147.

2) Nukui T, Ehama R, Sakaguchi M, Sonogawa H,

Katagiri C, Hibino T, Huh NH. S100A8/A9, a Key Mediator for Positive Feedback Growth Stimulation of Normal Human Keratinocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008,104:453-464.

徳永 文穂

1) Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Asahara T, Tokunaga F, Iwai K, Igarashi K. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. *Mol. Cell. Biol.* 2007, 27, 6962-6971.

今泉 和則

1) Kudo T, Kanemoto S, Hara H, Morimoto N, Morihara T, Kimura R, Tabira T, Imaizumi K, Takeda M. A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell death differ.* 2008, 15,364-375.

2) Kondo S, Saito A, Hino S, Murakami T, Ogata M, Kanemoto S, Nara S, Yamashita A, Yoshinaga K, Hara H, Imaizumi K. BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of ER stress transducer. *Mol. Cell. Biol.* 2007, 27,1716-1729.

3) Morimoto N, Oida Y, Shimazawa M, Miura M, Kudo T, Imaizumi K, Hara H. Involvement of endoplasmic reticulum stress after middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience*. 2007,147,957-967.

有賀 寛芳

1) Yoshida T, Kitaura H, Hagio Y, Sato T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. Negative regulation of the Wnt signal by MM-1 through inhibiting expression of the wnt4 gene. *Exp. Cell Res.* 2008,314:1217-1228.

2) Yoshida T, Kitaura H, Hagio Y, Sato T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. DJ-1-binding compounds prevent oxidative stress-induced cell death and movement defect in Parkinson's disease model rats. *J. Neurochem.* 2008,105:2418-2434. 1-12700.

3) Nagashima R, Sugiyama C, Gotoh Y, Yoneyama M, Kuramoto N, Taira T, Ariga H, Ogita K. Altered expression of DJ-1 in the hippocampal cells following in vivo and in vitro neuronal damage induced by trimethyltin. *Neuroscience Lett.* 2008,440:232-236.

4) Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H, Yanagida T, Takata K, Kobayashi Y, Taniguchi T, Yoshimoto K, Kaneko M, Okuma Y, Taira T, Ariga H, Shimohama S. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *J. Neurochem.* 2007, 101,1491-1504.

桃井 真里子

1) Zhiling Y, Fujita E, Tanabe Y, Yamagata T, Momoi T, Momoi MY. Mutations in the gene encoding CADMI are associated with autism spectrum disorder. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008, 377:926-929.

2) Mizutani A, Matsuzaki A, Momoi MY, Fujita E, Tanabe Y, Momoi T. Intracellular distribution of a speech/language disorder associated FOXP2 mutant. *Biochem Biophys Res. Commun.* 2007, 353,869-874.

2.学会発表

主任研究者

桃井 隆

Fujita E, Kouroku Y, Momoi M, Momoi M. PERK/eIF2alpha-MSDIATED ONSTITUTIVE AUTOPHAGY/LYSOSOME REGULATES ER STRESS_CELL DEATH BY DEGRADING ABNORMAL PROTEIN AGGREGATES AS ERAD-II. 15th Euroconference on Apoptosis, October,27-30, 2007.Portoros,Slovenia.

分担研究者

日比野 利彦

Katagiri C, Nakanishi J, Iketani M, Hibino T. SCCA1 contributes to inflammatory cytokine production and accelerates keratinocyte proliferation. The 5th International Investigative Dermatology (IID) 2008, Kyoto.

有賀 寛芳

Ariga H. Function of DJ-1 and its pharmaceutical application to Parkinson's disease. 韓国薬学会シンポジウム、10/24/08、ソウル、韓国

桃井 真里子

Nakashima,N.,et al. Genes relating synaps formation in 7q31 as candidate genes for autism. The 58th annual American Society of Human Genetics, Philadelphia, Nov. 14, 2008.

G. 健康危機情報

なし

H. 知的所有権の取得状況

特許取得

有賀寛芳

名称:神経変性疾患治療薬

出願番号: PCT/JP2006/322977

公開番号: WO2007/060886

出願人: 北海道大学、

発明者: 有賀寛芳

実用新案登録

なし

その他

なし