

201009014A (1/2)

政策創薬総合研究事業

厚生労働科学研究費補助金

平成22年度

政策創薬総合研究

研究報告書

平成23(2011)年3月

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成22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	世界初の先天性中枢神経脱髄疾病の治療薬の開発に向けて	山内 淳司	……	1
KHA1002	B細胞の分化・増殖の異常に関連する稀少疾患の創薬を目的とした細胞分化・増殖、細胞死制御機構解明研究	清河 信敬	……	11
KHA1003	治療遺伝子発現用レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入細胞による難治性疾患の治療実施のための支援体制の構築	小野寺雅史	……	21
KHA1004	効果的な酵素補充療法を可能にするライソゾーム病の新たな診療体制の確立	奥山 虎之	……	25

B分野 医薬品開発のための評価科学に関する研究

KHB1005	医薬品製剤及び製造工程の科学的開発戦略を実現させるための製剤評価及び製造工程評価法の開発研究	川西 徹	……	29
KHB1006	統合型毒性試験系による安全性評価手法構築に関する研究	山田 雅巳	……	39
KHB1007	抗体医薬品の製造方法、品質特性解析法及び試験法の開発	川崎 ナナ	……	51
KHB1008	天然物医薬品の評価手法と標準化に関する研究	合田 幸広	……	61
KHB1009	アデノウイルスベクターを駆使した薬物誘発性肝障害モデル動物の開発	水口 裕之	……	71
KHB1010	神経免疫ネットワークの破綻・修復の基盤研究と評価法の確立	三宅 幸子	……	79
KHB1011	医薬品開発のための副作用予測法・評価法の開発	黒瀬 光一	……	86
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	……	96
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	……	105

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

KHC1012	C型肝炎ウイルス感染防止が可能なヒト型感染中和抗体の開発	脇田 隆宇	……	115
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	高橋 秀宗	……	122
KHC1014	臍帯血リンパ球を主成分とする細胞治療製剤の医薬品化に関する研究	藤原 成悦	……	130
KHC1015	インフルエンザウイルス型特異的および共通抗原に対する抗体の作成と迅速診断法の確立	横田 恭子	……	138
KHC1016	新興・再興感染症を標的としたプライムブーストワクチンの開発と有効性・安全性評価システムの構築	前山 順一	……	140
KHC1102	帯状疱疹ワクチン開発のための疫学研究	山西 弘一	……	150
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	……	166
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	……	172

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 ……	183
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 ……	188
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	倉根 一郎 ……	194
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・細胞の利用に関する研究			
KHD1017	ヒト細胞(初代培養細胞、ES/iPS由来分化細胞)を用いた生活習慣病(肥満、糖尿病、血管障害)に関する新規病態モデル系の構築と創薬への展開	佐伯久美子 ……	200
KHD1018	創薬支援のためのヒト肝薬物輸送と代謝を評価する安定かつ再現性に優れた細胞レベルでの試験系の提示と毒性評価への応用研究	石田 誠一 ……	208
KHD1019	心不全に対する再生医療と人工心臓の複合戦略—CD29 ^{high} CD34 ^{low} c-kit ⁺ CD140a ⁺ 骨髄細胞による臨床研究と基盤研究—	梅澤 明弘 ……	217
KHD1021	多能性幹細胞の新規的培養空間創出による幹細胞医薬研究の底上げ	阿久津英憲 ……	223
KHD1022	病原微生物の抗病原性タンパク質抗体を用いた新規検査薬の開発とその医療・公衆衛生への応用研究	鎌田 洋一 ……	227
KHD1023	創薬研究における人由来初代細胞および幹細胞の利用円滑化に向けた研究	絵野沢 伸 ……	242
KHD1024	国内におけるヒト正常細胞分譲システム網の確立	小島 肇 ……	251
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 ……	259
E分野 医療上未充足の疾患領域における医療品創製を目指した研究			
KHE1025	新規ステロール制御の代謝改善による次世代の動脈硬化予防治療薬の開発に関する基礎的研究	最上 知子 ……	266
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 ……	273
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 ……	280
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 ……	291
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 ……	299

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	……	307
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	……	317
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	……	328
全体の総括 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	……	341

重点研究

世界初の先天性中枢神経脱髄疾病の治療薬の開発に向けて

所 属 独立行政法人国立成育医療研究センター
研究所 薬剤治療研究部
研究代表者 山内 淳司

研究要旨 ペリチェウス・メルツバッハ病 (PMD) は、脳髄鞘の形成不全病で特異的治療薬がない。本研究は PMD 治療薬標的分子の探索研究方法を確立し、標的分子を明らかにすることを目的としている。本年はいくつかの標的候補を明らかにし、その評価系の確立に成功した。

研究分担者

- (1) 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 薬剤治療研究部 山内 淳司
- (2) 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 薬剤治療研究部 宮本 幸
- (3) 首都大学東京 理工学研究科 久永 眞市
- (4) 株式会社免疫生物学研究所 前田 雅弘

A. 研究目的

ペリチェウス・メルツバッハ病 (Pelizaeus-Merzbache disease, PMD) は中枢神経、とくに、脳のエリニン (髄鞘) 形成不全、髄鞘変性病である。PMD は、20 万から 30 万人に 1 人の割合で病因を有する遺伝性の稀少疾病であり、国内にはおよそ 100 家族いる。おもな原因遺伝子は、四回膜貫通型構造を有すると推定される PLP1 蛋白質をコードしている。この遺伝子が重複、欠損、変異をおこすことが病態発症の原因になる。これらの遺伝子変異のなかでも、重複型が一番多く、PLP1 蛋白質の発現も上昇していることが確認されている。重複型に関しては、PLP1 蛋白質の発現上昇が PLP1 蛋白質自体の細胞内凝集をまねき、結果として、髄鞘変性を引き起こすという病態発症仮説が最も有力である。これらの事象が明らかにされたにもかかわらず、現在も PMD の特異的治療薬がない。その理由は以下の点が考えられる。ひとつは治療薬標的分子が明らかにされていないことで、もうひとつはその評価系が確立されていないからである。

また、主要な病変組織である髄鞘の構造は複雑で、脳髄鞘形成グリア細胞であるオリゴデンドログリア細胞 (オリゴデンドロサイト) が神経軸索の周りを幾重にも巻いているのである。したがって、もし個々の細胞を用い再生医療を利用すると

しても、それは、きわめて難易度の高いものである。これも治療を難しくしている原因のひとつである。

さらに、病変対象の細胞、組織は多岐に渡り、オリゴデンドロサイトが変性する以外に、神経細胞の脱落、アストロサイトおよびミクログリアにの異常な活性化や変性がみられるという報告もある。

そこで、本研究は、PMD 治療薬を開発するために、とくに、その分子標的を明らかにすることを目的としており、独自の病態再現培養系を用い、それぞれ分担研究者が培った独自の研究技術を利用して、治療薬標的候補分子の探索研究を行う。また、これと同時に、動物実験レベルで、その候補分子の是非を評価するシステムの開発研究を行う。

以下、研究分担者間の研究の相関性を明らかにするために、**網文字**で、それぞれの分担研究 (本文中は略称で示す) の研究箇所を記載する。

B. 研究方法

【試験管内で神経組織を再現するための必要な初代オリゴデンドロサイトの単離】

オリゴデンドロサイトの単離はきわめて難しいが、研究代表者と研究分担者によって、安定した単離、培養法の確立に成功した。以下、ラット大脳からオリゴデンドロサイトの精製方法を順に述べる。

① 胎生 15 日のラット大脳 (小脳や視床領域を採取しないように注意する) 数個を摘出し、シグマ社の 0.25%トリプシンで組織を分解する。このとき、数分毎に組織が分解されているか注意深く観察する。

② 組織が完全に分解されてきたら、10%血清の入

った MEM 培養液を入れ分解反応を止め、遠心し、沈殿した細胞をシグマ社のポリリジン (PLL) でコートとした細胞培養皿にまく。

③ 1 週間後、0.05%トリプシンで細胞をはがし、再び PLL でコートとした細胞培養皿にまく。

④ さらに 1 週間後、0.05%トリプシンで細胞をはがし、細菌培養皿にまく。この過程で、オリゴデンドロサイト前駆細胞が 95%まで精製される。

⑤ 2 日後、10 ng/ml PDGF 及び 10 ng/ml bFGF の入った Raff 培地に換え、2 日間培養する (増殖因子はペプロテック社のものが良い)。この過程で、オリゴデンドロサイト前駆細胞が、劇的に増殖する。

⑥ 2 日後、10 ng/ml PDGF を抜き、10 ng/ml bFGF と 30 ng/ml T3 および 40 ng/ml T4 ホルモンを添加した Raff 培地に換え、成熟オリゴデンドロサイトへの分化誘導をかける。実験状況に応じ、1 日から 7 日間培養する。

以上の方法で、高純度のオリゴデンドロサイト前駆細胞およびオリゴデンドロサイトを得ることができる。

【試験管内で神経組織を再現するための必要な初代神経細胞の単離】

神経細胞の単離に関して述べる。神経細胞は、胎生中期のラットやマウスの神経節から実体顕微鏡を用いて単離する。神経節を用いる理由は他の神経細胞に比べて、10 倍以上の神経軸索を伸ばすことができるため、後述の共培養が長時間安定するためである。さて、神経節単離後、それを 0.25%トリプシンで処理し、細胞を分散させる。その後、コラーゲン基質でコートされた 25 mm カバーガラス上に神経細胞をまき、2 から 3 日おきに 100 ng/ml NGF と N2 サプリメントおよび 5%ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を交換する。このとき、交互に、フルオロウリジンを含む培養液を使用する。これによって、神経細胞以外の線維芽細胞などが除去される。2 から 3 週間培養すると高純度の神経細胞が得られる。この条件で、神経軸索を 10mm 以上伸ばす細胞もある。

【髄鞘変性を再現する試験管内共培養を用いた探索システム】

カバーガラス上に神経軸索を伸ばした神経節神経細胞に、およそ 300 万個のオリゴデンドロサイトをまく。これらは厳密に述べると、オリゴデンドロサイトの前駆細胞という分化段階である。さて、上述の分化培地で、およそ 5 日から 7 日間、共培養を行うと、オリゴデンドロサイト前駆細胞が神経軸索に沿って増殖する。その後、数週間す

ると、まず、オリゴデンドロサイト前駆細胞が髄鞘形態をもつオリゴデンドロサイトに分化し、*in vitro* で髄鞘組織が形成される。この場合、NGF 中和抗体などを用いて、髄鞘形成を積極的に誘導することもある。

オリゴデンドロサイト前駆細胞が神経軸索上で増殖するときに、PLP1 をコードするレトロウイルス (独立行政法人製品技術基盤機構の PLP1 DNA クローンをタカラ社の 5'、3' LTR をもつ IRES-ZsGreen ベクターの MCS にライゲーションし作成したコンストラクト由来のウイルスである) を感染させると、重複型 PMD の病態発症時に観察される髄鞘形成不全、髄鞘変性が *in vitro* で再現される。ただし、この実験条件下で PLP1 をコードするレトロウイルスを感染させても、本文中に一部、変性という表現を用いているが、オリゴデンドロサイトが浮遊または死滅することはない。さて、その後の髄鞘形成過程で、RNA 干渉作用をもつ核酸、低分子化合物、中和抗体などを添加して、それらの効果を検討する。これらの実験系は、研究代表者らが、以前、ヒューマンサイエンス振興財団の審査を経て同財団を通して、特許出願 (特願 2008-208155) された培養方法に若干の変更を加えたのである。

ここで重要なことは非増殖性のレトロウイルスを用いる点にある。レトロウイルスは増殖性のグリア細胞にのみ感染し、非増殖性の神経細胞にはいっさい感染しないという特性を有している。この特性通り共培養下でも、レトロウイルスはオリゴデンドロサイト前駆細胞にのみに感染する。したがって、神経細胞へのウイルスの影響を考慮に入れる必要はなくなり、毎回安定した実験結果を得ることができる。

【モデル細胞の培養】

RNA 干渉核酸、低分子化合物、中和抗体を用いた治療薬標的分子の探索研究は、現在まで蓄積された分子生物学的手法を比較的容易に応用することができる。その反面、細胞や組織に副作用を誘導することもある。そして、結果として、用いられる初代培養細胞の生存率を低下させることがある。したがって、確実な研究成果を得るためには、ラットやマウスの神経細胞とグリア細胞を用いた共培養系による探索研究と並行して、株化された細胞による探索研究を行う必要がある。

病変組織で変性がみられる標的細胞が多岐に渡るので、数種類の株化細胞を利用する。例えば、国内で株化され、現存するもののなかで唯一の完全分化能力をもつオリゴデンドロサイト細胞株 FBD-102b (一昨年、理研細胞バンクに登録された)

を用いている。この細胞は p53 のノックアウトマウスから 3T3 法でつくられたもので、オリゴデンドロサイトの多くの性質を保持している。また、一般的に用いられている株化神経細胞として PC12、N1E-115、NB1 細胞を、株化グリア細胞に関しても一般的なものを用いている。これらすべての細胞は通常の培養では、10%ウシ胎児血清を含む DMEM または F12 培養液を用いればよい。分化条件は細胞によって異なるが、基本的には、分化因子を添加した低血清培地を用いる。

【モデル細胞を用いた探索研究】

これらの細胞株に、PLP1 をリポフェクション試薬（インビトロジェン社またはタカラ社）またはエレクトロフェクションシステム（ロンザ社）で発現させ、分化抑制、細胞変性を誘導し、ここに RNA 干渉作用をもつ核酸、低分子化合物、中和抗体を作用させ、それらの効果を検討する。PLP1 を外部から遺伝子導入することは、PMD の最も多い *plp1* 遺伝子重複型の病態を再現することに相当する。ただし、PLP1 を発現させるだけで、少なくとも 48 時間以内で細胞死が誘導されることはなかった。

【治療薬標的分子の探索研究】

① RNA 干渉の利用（成育医セ 宮本）

PLP1 レトロウイルスと同時に、シグナル分子に関する線状型 RNA (shRNA) ライブラリーをレトロウイルスにパッケージングしたものを、ウイルス力価/MOI 値（タカラ社のキットで測定）0.3 から 1 の範囲内で、オリゴデンドロサイトに共感染させた。このスクリーニングの過程で、おのおののレトロウイルスに含まれる shRNA が細胞に感染することで、細胞内の標的 mRNA が分解し、標的蛋白が特異的にノックダウンされる。標的分子のノックダウンがポジティブな結果を示した場合、PLP1 によって誘導された髄鞘変性が改善される。

さて、shRNA ライブラリーから標的分子を明らかにする方法を後述する。レトロウイルスにコードされた shRNA ライブラリー中のおのおのの干渉配列の 5' 側と 3' 側は、哺乳動物ゲノムに存在しない人工配列を付加している。そのため、ポジティブな結果の得られた共培養に関して、そこから RNA を抽出し、RT-PCR およびダイレクトシーケンスを行うことで、標的となる分子を同定することが可能になる。

② 低分子化合物の利用（首都大学 久永）

独自に、十数年かけて集めたキナーゼに対する阻害剤ストックから髄鞘変性が改善される物質を探索する。このキナーゼ阻害剤は、最近になって

市販されたものも多いが、血球系キナーゼ以外ほぼすべてのキナーゼ阻害剤を網羅している。培養系には 1 と 10 μ M の低分子化合物を添加し、その効果を調べた。

③ 抗体の利用（免疫生物 前田）

株式会社免疫生物学研究所で長年蓄積された抗体、とくに表面抗原認識抗体やさまざまな中和抗体から、髄鞘変性が改善できる抗体を探索する。培養系には 1 と 10 μ g/ml の抗体を添加し、その効果を調べた。

【細胞変性の定性、定量化】

細胞変性のアッセイは、髄鞘変性の場合には蛍光標識した抗ミエリン塩基性蛋白質 (anti-MBP) などを用い、神経変性の場合には蛍光標識した抗神経線維 (anti-NF) などを用い、それらの変性の程度を測定する。その場合、コントロール培養と比較して、髄鞘変性、細胞変性の程度を、蛍光顕微鏡システムを用いて定性、定量的に測る。すなわち、それは蛍光強度の減少や蛍光ドットプロット法での強度の減少などによって判定することができる。また、蛍光ライブイメージで細胞形態変化を追い、細胞の乱雑さの減少（細胞分化抑制）で細胞変性を追跡した。

【トランスジェニック技術を基盤とした新規トランスジーン構築：以下の新規遺伝子改変動物作成に関しては成育医セ 山内が行う】

現存する多くの治療薬はその標的分子の活性阻害、機能阻害によって、その効果を示すと考えられている。したがって、治療薬標的候補分子の探索研究からも、このような性質をもつ標的分子が同定されると期待できる。したがって、それを動物実験レベルで評価する必要に迫られている。そこで、トランスジェニック技術を応用して遺伝子産物をマウス個体内部で発現抑制（RNA 干渉による発現抑制、つまりノックダウン）する新たな遺伝子改変技術を開発し、作成された遺伝子改変マウスと PMD 病態モデルマウスをかけあわせることで、PMD の病態が改善されるかどうかを評価するシステムの開発を行う。

さて、トランスジェニック技術を基本とする理由は、時間、簡便さ、コストの 3 点において優れているという点が挙げられる。つまり、いまだにノックアウトマウス作成には多くの時間を要するが、トランスジェニックマウスは作成から解析終了までおよそ半年以内である。さらに、ノックアウトの場合、作成したノックアウト用の遺伝子コンストラクトを用いても、必ずしも予想した相同組換えが起きる保証がない。また、コスト面で

も格段の差がある。

トランスジェニック用の新規トランスジーン
の構造を以下に記載する。それは全長およそ 6000
塩基対の線状型 DNA であり、以下の①、②の構成
配列を含んでいる。

- ① 5' 側の 1000 塩基には、線状型 RNA 干渉配列
(shRNA) を転写するために必要な配列がコード
されており、そこにマウス U6 プロモーターと
shRNA 転写終止配列が含まれる。ただし、標的分子
によって、shRNA の配列が変わるので、制限酵
素サイトで各 shRNA を入れ替えることができる。
- ② 残りの部分は緑色蛍光蛋白質 GFP を発現させ
るための配列であり、トランスジェニックマウス
を選択する作業を効率化するためにある。人工
FerH-EF1 複合型プロモーターと GFP 発現配列およ
び EF1 転写終了シグナルを含む。

実際は、これらの配列をアンチパラレルに配置
したものがインジェクションされるトランスジ
ーンである。ここで重要なことは、shRNA を発現
するために必要な U6 プロモーターとその転写終
止配列に改変を加え、強力なものにしたことにあ
る。図 1 にトランスジーンの概略図を示す。現在、
この新規トランスジーンに関する論文を投稿中
である。

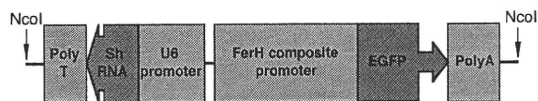


図 1 新規トランスジーンの様式図

この配列は、改変型マウス U6 プロモーター
下流に shRNA 配列を転写させる遺伝子配
列および効率的な転写停止配列をもち、マ
ーカーとして発現し、動物の選択を容易に
させる GFP 蛍光蛋白質の発現配列をアンチ
パラレルに配置したトランスジーンであ
る。

【新規 shRNA トランスジェニックマウスの作成方 法】

ShRNA を含むトランスジーンを、一般的なト
ランスジェニックマウス作成方法に従い、マウス受
精卵にインジェクションし、トランスジェニック
ラインを確立した。

【新規 shRNA トランスジェニックマウスの開発研 究】

まず、試験的に新規の遺伝子改変マウスを作成
するために、shRNA を用いた探索研究から治療薬
標的の候補分子として明らかにされた DQ118680

蛋白質を標的とした shRNA トランスジェニック
(ノックダウン) マウスを作成した。

【新規トランスジーンが染色体に存在している かの判定方法】

判定方法も通常のトランスジェニックマウス
の場合と同じで、トランスジーンが生殖ライン
(F1) にのるかどうかの判定は GFP 配列をプロー
ブに用いたサザンブロットで行った。

それ以降の世代 (F2 以降) は 2 種類のプライマ
ー (GFP と mU6) を用いたゲノム PCR で簡易判定
し、一部サザンブロットを並行して解析した。

GFP プライマーペア：
5' -CAATCATGAGCAAGGGAGAAGAAGCTCTTTACTGGTGTG
TC-3'

お よ び
5' -TTTACTTGACAGCTCATCCATCCAGAGTAATTCCTG
C-3'

mU6 プライマーペア：
5' -CGCACAGACTTGTGGGAGAAGCTCGGCTACTC-3'

お よ び
5' -GCTTGCATACTTCTGCCTGTGGGAGCCTG-3'。実
験を簡易化するために、これらのプライマーは、
標的分子が異なった shRNA をコードしたトランス
ジーンでも用いることができる。また、インター
ナルコントロールとしては Oct3/4 プライマー

(5' -CCGGGATCCAAGCTTTGTGAAGTGGCGGCTCCAAG
TCG-3' お よ び
5' -CCGGGATCCCATTACTGGCCTGGTGCTTAGTTATCTTTG
-3') を用いた。

さらに、必要に応じて、世代に渡って、染色体
にトランスジーンが維持されているかを判定す
るために、定法に沿い、染色体に対する蛍光 in
situ ハイブリダイゼーションも行った。

【新規 shRNA トランスジェニックマウスでの標的 分子のノックダウン効果の判定方法】

標的蛋白質 DQ118680 特異的抗体を作成し (免
疫生物 前田)、ウエスタンブロットの定法に従
って、shRNA トランスジーンによるノックダウンの効
果を、蛋白質レベルで判定した。これは、宮本の
RNA 干渉の利用した探索研究から明らかにされた
標的候補分子に関する情報をいち早く前田に知
らせた結果、一年以内に達成することができた成
果のひとつである。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験や非増殖性レトロウイルスの感
染実験に関しては、独立行政法人国立成育医療研
究センター研究所、首都大学東京、株式会社免疫

生物学研究所の組換え DNA 実験委員会を通して承認を得ており、その規則を遵守し実験を行っている。また、研究代表者は国立成育医療研究センター研究所組換え DNA 実験委員会の常任委員でもあり、所内全体の組換え DNA 実験に関して慎重に対処している。

また、実験動物及び遺伝子改変動物の取り扱いに関しても独立行政法人国立成育医療研究センター研究所、首都大学東京、株式会社免疫生物学研究所の動物実験委員会で承認を得ており、3Rs を遵守し実験を行っている。

C. 研究結果

【試験管内共培養を用い、病態を再現するシステムを用いた探索研究（成育医セ 宮本、首都大学久永、免疫生物 前田）】

治療薬標的候補分子の探索研究の過程で観察された髄鞘形成の改善効果を示す写真の典型例を図1に載せる。

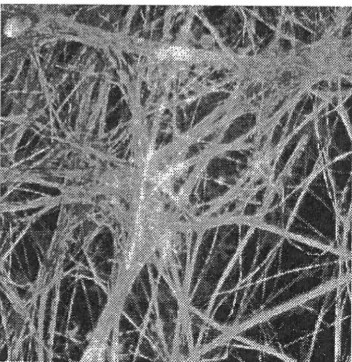
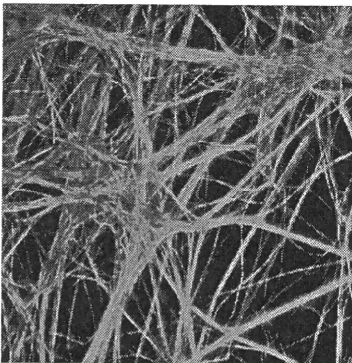
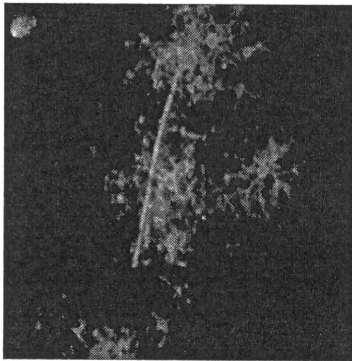


図1 試験管内での髄鞘形成不全の回復。治療薬標的候補分子のひとつ DQ118680 蛋白質に対する shRNA でのノックダウンによる髄鞘形成不全の回復。実際の写真は蛍光写真である。上の図は髄鞘マーカーである MBP に対する抗体での染色、中央の図は神経線維マーカーである NF に対する抗体での染色、下の図はこれらを合わせたものを示す。神経繊維上に髄鞘が形成されていることが分かる。

PLP1 を PMD における主要病変細胞であるオリゴデンドロサイトに発現させると、図1で観察される髄鞘マーカーの発現はまったく観察されなくなる。しかし、治療薬標的候補分子の機能阻害などで、それが改善される。つまり、髄鞘マーカーが発現し、試験管内で髄鞘が形成されるのである。したがって、この病態再現培養系は治療薬標的の探索研究に適したものであることが分かる。

以下、探索研究の途中ではあるが、順番にそれぞれの研究手法で明らかにされた結果を記載する。とくに強い効果を示したのもののみを記載することとする。

① ShRNA ライブラリーでの RNA 干渉実験から

- (1) キナーゼ型神経栄養因子受容体 TrkC
- (2) キナーゼ型神経栄養因子受容体 TrkB
(一部の標的配列が TrkC と重複している)
- (3) キナーゼ型ヘレグリン受容体 ErbB2
- (4) 非キナーゼ型ヘレグリン受容体 ErbB3
(一部の標的配列が ErbB2 と重複している)
- (5) DQ118679 蛋白質
- (6) DQ118680 蛋白質
- (7) DQ124295 蛋白質
- (8) DQ309763 蛋白質

のノックダウンが病態改善効果を示した。

② 低分子化合物を用いた実験から

- (1) 非受容体型チロシンキナーゼ Src ファミリー阻害剤 PP2 (オリゴデンドロサイトでは Fyn が主要な Src ファミリーであるため、PP2 は Fyn を特異的に阻害していると推定される)
- (2) キナーゼ型神経栄養因子受容体阻害剤 K252a
- (3) キナーゼ型 ErbB1 および ErbB2 型受容体阻害剤 AG825

が病態改善効果を示した。ただし、これらの結果は、現存で唯一の完全に分化する能力をもっているオリゴデンドロサイト細胞株 FBD-102b に PLP1 を発現させ、それによって

引き起こされた分化抑制を改善するという培養系から明らかにされたものである。

③ 抗体を用いた実験から

(1) 細胞表面神経栄養因子受容体分子群に対する中和抗体

(2) 細胞表面ヘレグリン分子群に対する中和抗体

が病態改善効果を示した。また、RNA 干渉実験から明らかにされた機能未知の分子に関する抗体を作成した。

(3) DQ118679

(4) DQ118680

(5) DQ124295

(6) DQ309763

これは新規 shRNA トランスジェニックマウスの開発研究で、標的となる分子の発現を確認するためでもある。

【DQ118680 shRNA トランスジェニックラインの判定と遺伝子改変の検定 (成育医セ 山内)】

新規遺伝子改変技術を開発するために、DQ118680 蛋白質を標的とした shRNA トランスジェニック (ノックダウン) マウスを作成した。尾部のバイオピシーで抽出されたゲノム DNA を用い、GFP 配列を放射性標識してプローブとし、サザンブロットを行ったところ、予測数の塩基をもつ、およそ 4500 に、一本の放射活性を有するバンドが検出できた (図 2)。

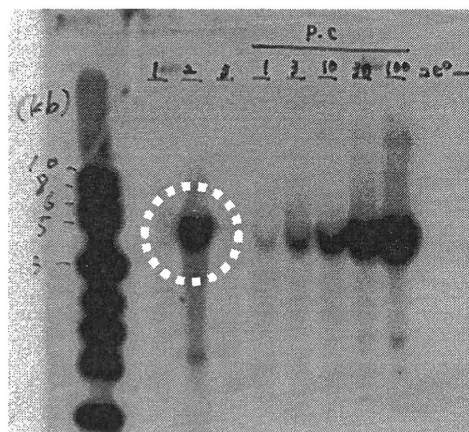


図 2 サザンブロットによる DQ118680 shRNA トランスジェニックマウスの確認。ライン 2 がトランスジェニックラインであることが判明した。また、コピー数は 30 コピー (円で囲った部分) であることが明らかにされた。

また、ゲノム PCR による判定から、図 2 のライン 2 は、GFP プライマーペアを用いて PCR した場

合はおよそ 750 塩基に、mU6 プライマーペアを用いて PCR した場合はおよそ 600 塩基に、それぞれ一本のバンドが確認でき、これらはそれぞれの予測されたバンド塩基数と一致した。

次に、トランスジーンが挿入された染色体の位置を、GFP 配列を蛍光標識してプローブとした蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法を用いて検討した。結果として、ライン 2 (図 2 と同じトランスジェニックライン) ではトランスジーンは第 12 番目の染色体 B1 領域に存在していることが判明した。この染色体領域における疾病関連遺伝子は現在のところ報告はない。したがって、このマウスの表現系はトランスジーン染色体挿入箇所によるものではないと考えられる。

サザンブロット、ゲノム PCR、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法で確認されたトランスジーンは、現在 (2011 年 3 月 9 日) まで、すくなくとも 4 世代以上、染色体に安定して存在していることが判明している。

さて、DQ118680 shRNA トランスジェニックマウスは、外見上、同腹の野生型コントロールマウスと比較して目立った差は確認されなかった。しかし、神経組織における DQ118680 蛋白質は、ほぼ完全に抑制されていた (図 3)。

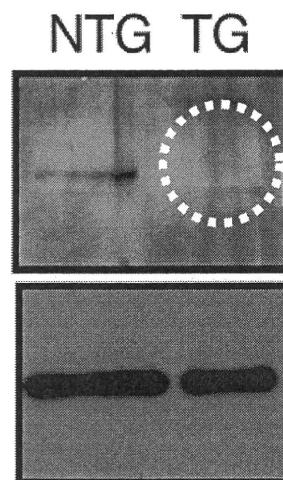


図 3 神経組織において、トランスジェニックライン 2 (TG) はコントロール (NTG) と比べ、DQ118680 蛋白質の発現が優位に抑制された (上図)。下図はインターナルコントロールとしてのアクチンを示している。目的とする蛋白質の発現が完全に抑制されていることが分かる (円で囲ったところ)。

D. 考察

【試験管内共培養を用い、病態を再現するシステ

ムを用いた探索研究 (成育医セ 宮本、首都大学久永、免疫生物 前田)】

大変興味深いことに、まったく異なった3種類のPMD治療標的候補分子の探索研究から、いくつかの共通した標的分子が同定された。神経栄養因子受容体とヘレグリンリガンドとその受容体であり、すべて細胞表面に存在するリガンドや受容体であるため、治療薬の標的分子としては有用であると考えられる。ただし、これらの分子はいくつもの分子種から構成されているため、今後どの分子の機能阻害が重要な効果を示すかを慎重に判断しなければならない。

さらに、PMDにおける主要病変細胞であるオリゴデンドロサイトでFynキナーゼを阻害することでPMD病態を改善したことから、そのリン酸化基質であるCdk5キナーゼに着目し、研究を進めた。その結果、Cdk5はPMDの治療用組成物及び治療剤であることが判明した。これは、昨年、ヒューマンサイエンス振興財団の審査を経て、同財団を通して、特許出願(特願2010-209899)されたものである。さて、Fynキナーゼではなく、その基質のCdk5に着目した理由は、Fynキナーゼには多くの類似分子があり、それを化合物などで特異的に機能修飾することはできないが、Cdk5はゲノム上に一種類の分子しかいないため、特異的に機能修飾が可能であると考えられたからである。また、この研究成果は、研究分担者間の情報が有機的に結合した結果、達成できた一例であった。

【DQ118680 shRNA トランスジェニックラインの判定と遺伝子改変の検定 (成育医セ 山内)】

また、機能未知の分子がいくつか同定されているため、それらが治療標的として相応しいかどうか判断する必要がある。したがって、新規shRNAトランスジェニックマウス開発技術を完成されるためにも、これをshRNAの標的としてノックダウンさせるマウスを作成した。

まず、ここで作成された新規トランスジーンは発生毒性を示さず、数世代にわたり安定して染色体に維持され、その効果も神経組織から抽出された蛋白質レベルにおいて有効であることが実証された。ただし、今後の注意すべき点としては、治療薬標的遺伝子のノックダウンがマウスの発生に負の影響を及ぼす可能性があるため、すべてのshRNAトランスジェニックマウスの作成が成功するとは限らないことである。

しかしながら、この技術は、遺伝子改変マウスの作成にかかる時間、作業の簡便さ、比較的安価に作成できるという点において、優れている。つまり、治療薬標的分子が動物実験レベルで有効か

どうかを評価するために適していることが確認できた。

E. 結論

【PMD型不完全髄鞘形成を改善する治療標的分子の同定 (成育医セ 宮本、首都大学久永、免疫生物 前田)】

探索研究の途中ではあるが、RNA干渉、化合物、抗体を用いた探索研究すべてから共通して同定されたものがある。これらがPMDの治療薬標的分子として有力な候補であることは間違いない。それは、

(1) 神経栄養因子受容体

(2) ヘレグリン受容体とそのリガンド

である。これらの分子群の機能阻害によって、試験管内でPMD型不完全髄鞘形成が改善された。ただし、これらはそれぞれ数種類の分子種からなるため、今後、正確な分子種の同定が必要になる。

一方、1種類の探索研究から、

(3) DQ118679 蛋白質

(4) DQ118680 蛋白質

(5) DQ124295 蛋白質

(6) DQ309763 蛋白質

(7) Fynキナーゼとそのリン酸化基質Cdk5

が同定された。

【新規遺伝子改変動物作成技術を用いた治療標的分子の評価システムの開発研究 (成育医セ 山内)】

さて、機能未知な標的分子が治療標的として重要かどうかを明らかにするために、とくに、動物実験レベルでの評価試験が必要になった。それは、新規shRNAトランスジェニックマウスである。本年、この技術開発に成功し、以下の利点があることが分かった。

(1) まず、その新規トランスジーン DNAコンストラクトは発生毒性を示さず、数世代に渡り安定して染色体内に存在している。

(2) ShRNAトランスジェニック(ノックダウン)マウスは時間、作業の簡便さ、コスト面において優れた治療薬評価システムを提供することが結論付けられた。

今後、この技術を用いて標的分子の遺伝子改変マウスとPMDモデルマウスを交配することによって、脳髄鞘形成不全が改善、回復されるかどうかを検証する。

F. 研究発表

1. 論文発表

【独立行政法人国立成育医療研究センター研

【研究所 山内、宮本】

(1) Junji Yamauchi*, Tomohiro Torii, Shinji Kusakawa, Atsushi Sanbe, Kazuaki Nakamura, Shou Takashima, Hajime Hamasaki, Shogo Kawaguchi, Yuki Miyamoto, and Akito Tanoue (2010) The mood stabilizer valproic acid improves defective neurite formation caused by Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant Rab7 through the JNK signaling pathway. *J. Neurosci. Res.* 88, 3189-3197:

*Corresponding author

(2) Shinji Kusakawa, Kazuaki Nakamura, Yuki Miyamoto, Atsushi Sanbe, Tomohiro Torii, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue (2010) Fluoxetine promotes gliogenesis during neural differentiation in mouse ES cells. *J. Neurosci. Res.* 88, 3479-3487

(3) Reiko Mizutani, Kazuaki Nakamura, Shigetoshi Yokoyama, Atsushi Sanbe, Shinji Kusakawa, Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Hiroshi Asahara, Haruo Okado, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue (2010) Developmental expression of sorting nexin 3 in the mouse central nervous system. *Gene Expr. Patterns* 11, 33-40

(4) Yuki Miyamoto, and Junji Yamauchi* (2010) Cellular signaling of Dock family proteins in neural functions. *Cell. Signal.* (Review Article) 22, 175-182:

*Corresponding author

(5) 宮本 幸、鳥居知宏、草川森士、中村和昭、三部 篤、山内淳司*、田上昭人: バルプロ酸は Arf/cytohesin 経路を介して神経分化過程を制御している *日本小児臨床薬理学雑誌* 印刷中: *Corresponding author

【首都大学東京 久永】

(1) Hisanaga, S., and Endo, E. (2010) Regulation and role of Cdk5 kinase activity in neuronal survival and death. *J. Neurochem.* 115, 1309-1321

(2) Minegishi, S., Asada, A., Miyauchi, S., Fuchigami, T., Saito, T., and Hisanaga, S. (2010) Membrane association facilitates degradation and cleavage of the cyclin-dependent kinase 5 activators p35 and p39. *Biochemistry*, 49, 5482-5493

(3) Takano, T., Tsutsumi, K., Saito, T., Asada, A., Tomomura, M., Fukuda, M.,

Hisanaga, S. (2010) AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the recycling endosome pathway. *Genes Cells* 15, 783-797

(4) Tsutsumi, K., Takano, T., Endo, R., Fukuda, M., Ohshima, T., Tomomura, M., and Hisanaga, S. (2010) Phosphorylation of AATYK1 by Cdk5 suppresses its tyrosine phosphorylation. *PLoS ONE*, 5, e10260

(5) Hosokawa, T., Saito, T., Asada, A., Fukunaga, K., and Hisanaga, S. (2010) Quantitative Measurement of *In Vivo* Phosphorylation States of Cdk5 Activator p35 by Phos-tag SDS-PAGE. *Mol. Cell. Proteomics*. 9, 1133-1143

(6) Asada, A., Takahashi, J., Taniguchi, M., Yamamoto, H., Kimura, T., Saito, T., and Hisanaga, S. (2010) Neuronal expression of two isoforms of mouse Septin 5. *J. Neurosci. Res.* 88, 1309-1316

【株式会社免疫生物学研究所 前田】

(1) Inami, K., Abe, M., Takeda, K., Hagiwara, Y., Maeda, M., Segawa, T., Suyama, M., Watanabe, S., Hino, O. (2010) Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody in vivo. *Cancer Sci.* 101, 969-974

(2) Kondo, M., Shiono, M., Itoh, G., Takei, N., Matsushima, T., Maeda, M., Taru, H., Hata, S., Yamamoto, T., Saito, Y., Suzuki, T. (2011) Increased amyloidogenic processing of transgenic human APP in X11-like deficient mouse brain. *Mol. Neurodegener.* 15, 5:35

(3) Toda, T., Noda, Y., Ito, G., Maeda, M., Shimizu, T. (2011) Presenilin-2 mutation causes early amyloid accumulation and memory impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:617974

2. 学会発表

【独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 山内、宮本】

(1) Junji Yamauchi, Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, and Akito Tanoue: The mood stabilizer valproic acid improves defective neurite formation caused by Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant Rab7. *Society for Neuroscience Annual*

Meeting. November 2010, San Diego, USA

(2) Yuki Miyamoto, Tomohiro Totii, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi: Cdk5 regulation of oligodendrocyte precursor cell migration. Society for Neuroscience Annual Meeting. November 2010, San Diego, USA

(3) 山内淳司、宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人: The mood stabilizer valproic acid activates the cytohesin-2-Arf6 signaling unit and induces abnormal neuriteogenesis. 日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会 2010 年 9 月・神戸

(4) 草川森士、宮本 幸、三部 篤、中村和昭、鳥居知宏、田上昭人、阿久津英憲、梅澤明弘、山内淳司: Fluoxetine promotes gliogenesis during neural differentiation in mouse ES cells. 日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会 2010 年 9 月・神戸

(5) 宮本 幸、鳥居知宏、草川森士、田上昭人、山内淳司: Establishment of a retrovirus-mediated PLP1-expression system in primary oligodendrocyte precursor cell provides the new *in vitro* model for Pelizaeus-Merzbacher disease. 日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会 2010 年 9 月・神戸

(6) 鳥居知宏、宮本 幸、山内淳司、田上昭人: The mood stabilizer valproic acid upregulates neurofibromatosis 2 (merlin) and JNK to induce aberrant neurite extension. 日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会 2010 年 9 月・神戸

(7) 山内淳司、宮本 幸、山盛奈月、濱崎 一、鳥居知宏、田上昭人: The mood stabilizer valproic acid upregulates neurofibromatosis 2 tumor suppressor to induce aberrant neuronal differentiation. 日本生化学会・日本分子生物学会合同年会 2010 年 12 月・神戸

(8) 宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司: Establishment of a PLP1-expression system in oligodendrocyte precursor cells provides the new *in vitro* model for demyelinating disorder. 日本生化学会・日本分子生物学会合同年会 2010 年 12 月・神戸

(9) 鳥居知宏、宮本 幸、川口祥吾、濱崎 一、西村浩二、山内淳司、田上昭人: The focal adhesion scaffold protein paxillin binds to the Arf6 activator cytohesin-2/ARNO and controls cell migration. 日本生化学会・日本分子生物学会合同年会 2010 年 12 月・神戸

【首都大学東京 久永】

(1) Hisanaga, S., Asada, A., and Saito, T: Cdk5 and neuron cell death. Pep Con-2010, Mar. China Baijin.

(2) Takano, T., Tsutsumi, K., Saito, T., Asada, A., Tomomura, M., Fukuda, M., Hisanaga, S: AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the recycling endosome pathway. 第 62 回日本細胞生物学会 2010 年 5 月・大阪

(3) Kimura, T., Tsutsumi, K., Ishiguro, K., Taro, T., Akiko, A., Uchida, T., Hasegawa, M., Hisanaga S: Interaction of peptidyl-prolyl isomerase Pin1 with Tau at the Cdk5 phosphorylation sites 第 62 回日本細胞生物学会 2010 年 5 月・大阪

(4) Takano, T., Tsutsumi, K., Saito, T., Asada, A., Tomomura, M., Fukuda, M., Hisanaga, S: AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the recycling endosome pathway. 第 53 回日本神経化学会 2010 年 9 月・神戸

(5) 小林弘侑、佐藤亘、細川智永、斉藤太郎、久永眞市: Cdk5 (Tyr15) のリン酸化. 第 53 回日本神経化学会 2010 年 9 月・神戸

(6) 佐藤亘、岩田修永、高野二郎、斉藤太郎、浅田明子、川原裕之、西道隆臣、久永眞市: Cdk5 活性化サブユニット p35 のプロテアソームによる分解はカルシウムによって誘導される. 第 53 回日本神経化学会 2010 年 9 月・神戸

(7) Kimura, T., Tsutsumi, K., Ishiguro, K., Saito, T., Asada, A., Uchida, T., Hasegawa, M., Hisanaga S: Interaction of peptidyl-prolyl isomerase Pin1 with Tau at the Cdk5 phosphorylation sites 第 53 回日本神経化学会 2010 年 9 月・神戸

(8) 細川智永、木村妙子、Florian Plattner、鈴掛雅美、長谷川成人、久永眞市: 異常リン酸化タウの Phos-tag SDS-PAGE による解析. 認知症学会 2010 年 9 月・名古屋

(9) Hisanaga, S: Normal and abnormal phosphorylation of Tau by Cyclin-dependent kinase 5. Aging, Tau Protein and Dementias. 2010, Oct. Tokyo.

(10) Takano, T., Tsutsumi, K., Saito, T., Asada, A., Tomomura, M., Fukuda, M., Hisanaga, S: AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the recycling endosome pathway -A role of AATYK1 in axon outgrowth-. Society for Neuroscience 2010, Dec. San Diego

(11) Takano, T., Tsutsumi, K., Saito, T., Asada, A., Tomomura, M., Fukuda, M., Hisanaga, S: AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the neurite outgrowth via recycling endosome pathway. 第33回日本分子生物学会 2010年12月・神戸

(12) 小林弘侑、佐藤亘、斉藤太郎、浅田明子、久永眞市: Cdk5はチロシン15のリン酸化によって本当に活性化されるか?-再検証 第83回日本生化学会 2010年12月・神戸

(13) 石田愛美、斉藤太郎、浅田明子、久永眞市: 抗躁剤バルプロ酸によるCdk5-p35の活性制御. 第33回日本分子生物学会 2010年12月・神戸

(14) 三橋真海子、浅田明子、種坂祐次郎、斎藤太郎、鎌田真司、久永眞市: Cdk5は結合する制御サブユニット、p35、p39又はCyclinI、により異なった細胞内局在を示す. 第33回日本分子生物学会 2010年12月・神戸

(15) 佐藤亘、嶺岸正治、岩田修永、高野二郎、斉藤太郎、浅田明子、川原裕之、西道隆臣、久永眞市: カルパスタチン遺伝子改変マウスを用いたCdk5活性化サブユニットp35の分解機構解明. 第83回日本生化学会 2010年12月・神戸

(16) 浅田明子、斎藤太郎、久永眞市: p35/Cdk5とp39/Cdk5の細胞内局在に及ぼすCdk5キナーゼ活性の影響. 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月・神戸

(17) Shahpasand, K., Uemura, I., Saito, T., Asada, A., Hisanaga, S: Effect of tau phosphorylation on inter-microtubule distances and mitochondrial movement. 52th Japanese Society for biochemistry and Molecular Biology 2010年12月・神戸

(18) Kimura, T., Tsutsumi, K., Ishiguro, K., Saito, T., Asada, A., Uchida, T., Hasegawa, M., Hisanaga, S: Cdk5-regulated interaction between Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 and microtubule-associated protein Tau. 第34回日本分子生物学会 2010年12月・神戸

物及び治療剤 特願 2010-281777 出願日
2010年12月17日

2. 実用新案登録
該当無し。

3. その他
該当無し。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

【独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 山内、宮本】

(1) 山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏:
末梢神経軸索の再生剤及び再生方法 特願
2010-209899 出願日 2010年10月4日

(2) 山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏、
友岡康弘: 中枢神経髄鞘形成不全の治療用組成

B細胞の分化・増殖の異常に関連する稀少疾患の創薬を 目的とした細胞分化・増殖、細胞死制御機構解明研究

所属 (独) 国立成育医療研究センター 研究所
小児血液・腫瘍研究部

研究者 清河 信敬

研究要旨: BAFF のパーキットリンパ腫細胞に対するアポトーシス抑制作用を明らかにし、抗体作製に用いる蛋白標品の調整を行った。DAP3 の機能解析を行い、会合分子 DELE を見出し、TMF- α 、FasL、TRAIL 誘導性アポトーシスシグナル伝達経路への関与を明らかにした。CIA 関節炎モデルを用いて、オステオポンチンおよびその受容体である $\alpha 9$ インテグリンの機能を検討した。

研究分担者

- (1) 北海道大学遺伝子病制御研究所 病因
研究部門・分子免疫分野 上出利光
- (2) 北海道大学人獣共通感染症リサーチ
センターバイオリソース部門 宮崎忠
昭
- (3) 株式会社免疫生物研究所 前田雅弘

A. 研究目的

B細胞には、外来抗原に対して高い特異性を持った抗体を産生するクローンを効率的に増やすとともに、同時に発生してくる自己反応性や低親和性抗体産生クローンを排除するため、B細胞抗原受容体 (BCR) を中心とした独自の増殖・分化制御機構が存在する。自己免疫疾患やB細胞性腫瘍は、上記機構が破綻

し、B細胞の分化や増殖に異常が生じる結果発生すると想定されており、稀少ではあるが、医学的に重要な克服対象疾患である。このB細胞の独自性に着目してその制御機構を分子レベルで解明し、得られた知見を基礎にB細胞に対する選択的な新規増殖制御法を開発することによって、上記稀少疾患に対する新規治療法開発へと結びつくことが期待される。

B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF) は、TNFファミリーに属するB細胞生存因子として同定され、B細胞の分化段階に応じて、その生存 (アポトーシス抑制)、増殖、分化因子として様々な機能を示すことが明らかにされており、その過剰作用が自己

免疫疾患やB細胞性腫瘍の発症に関与することが示唆されている。BAFF 受容体 (-R) の会合分子とその下流のエフェクター分子が複数同定されており、そのアポトーシス制御機能について解析が行われている。

Death associated protein 3 (DAP3) は、リンパ球において TNF family 分子 TRAIL のアポトーシスシグナルに重要で、その過剰発現がリンパ球にアポトーシスを誘導することが明らかにされており、やはり B 細胞のアポトーシス制御にかかわる分子である。

オステオポンチンは $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンのリガンドで、細胞接着、細胞遊走、増殖、生存、遺伝子発現を誘導する。オステオポンチン上の $\alpha 9 \beta 1$ インテグリン結合配列に対する抗体阻害が関節リウマチモデルである抗コラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) 及びコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) を顕著に抑制する事が知られており、自己免疫疾患の1つである関節リウマチにおける $\alpha 9 \beta 1$ インテグリン機能の重要性が明らかにされつつある。

三者はいずれも B 細胞の分化・増殖制御や B 細胞が関与する免疫応答において重要な役割を担っており、その解析が、B細胞の分化・増殖の異常によって発症する自己免疫疾患やB細胞性腫瘍の治療において有効な新規標的分子の発見につながる可能性が期待される。

そこで、本研究では、“BAFF”、“DAP3”、“オステオポンチン” 三者の機能的関

連性に着目して B 細胞の増殖・分化制御機構を分子レベルで解明し、その成果を応用してこれらを連携して調節することでより効果的な B 細胞の増殖制御法開発に結びつけ、B 細胞の分化・増殖の異常に起因する自己免疫疾患や B 細胞性腫瘍に対する新規治療法開発へ発展させることを目指す。

B. 研究方法

1. BAFF によるバーキットリンパ腫細胞のアポトーシス制御と、抗体作製に用いる組み替え型蛋白の調整

Burkitt リンパ腫由来細胞株の BAFF 受容体の発現を蛍光標識した特異抗体を用いてフローサイトメトリーにより解析した。Burkitt リンパ腫由来細胞株のアポトーシスは抗 IgM (μ 鎖) 抗体単独、抗 CD20 抗体+抗マウス Ig 抗体(いずれも $5 \mu\text{g/ml}$) あるいはデキサメサゾン、エトポシドを添加培養して誘導し、アネキシン-V との結合性によりフローサイトメトリーにより検出した。細胞増殖については、トレパンブルーアッセイ、WST-1 細胞増殖アッセイにより検討した。細胞内蛋白の活性化は、それぞれの活性化特異抗体を用いてイムノプロット法で検出した。

RT-PCR によってヒト BAFF の cDN を増幅し、pENTR 11 (Invitrogen) にサブクローニングした。GATEWAY システムを用い、BAFF 発現ベクターを構築し、ヒト胎児腎由来培養細胞株 HEK293 に遺伝子導入して BAFF を発現させた。

2. DAP3 によるアポトーシス制御機構の

解析

DAP3 を発現するレトロウイルスベクターを作出し、マウス胸腺から単離した T 細胞に感染させた。この T 細胞をマウス胸腺細胞と共培養し(RTOC システム; 図 1)、その後、各 T 細胞亜集団の細胞数について FACS を用いて解析を行った。

HeLa 細胞に DELE 特異的 siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に、TRAIL (30 ng/ml)、TNF- α (10 ng/ml) および anti-Fas (10 ng/ml) により刺激を加えた。caspase-8、caspase-9 については 3 時間後、caspase-3 については 4.5 時間後に、活性化 caspase の酵素活性を caspase-glo assay system (Promega) を用いて測定した。

3. CIA 関節炎モデルを用いたオステオポンチンの作用の解析

CAIA は BALB/c マウスに抗 Type II コラーゲン抗体混合液と LPS を併用投与することによって誘導した。サイトカインおよびケモカインの発現量については CAIA マウスの後肢足関節病変部から採取した細胞を用いて、リアルタイム RT-PCR 法により解析を行った。CIA は DBA/1 マウスに Type II コラーゲンと CFA を併用投与することによって誘導した。免疫後、所属リンパ節を用いて、CIA マウスの関節炎発症に関与すると考えられる Th1、Th17、Treg 細胞群の産生や、そのサイトカイン分泌を組織免疫染色、FACS、リアルタイム RT-PCR 法により経時的に観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、関連法規を遵守

して動物愛護と動物福祉の観点に立った倫理的配慮をおこない、あらかじめ当該研究施設の動物実験委員会へ実験の実施について申請し、承認を得てから行った。

C. 研究結果

1. BAFF によるバーキットリンパ腫細胞のアポトーシス制御と、抗体作製に用いる組み替え型蛋白の調整

バーキットリンパ腫由来細胞株 7 株中 6 株で BAFF 受容体 (-R) の発現を認め (1 株は弱陽性)、PCR でもこれに一致した mRNA 発現を認めた。BAFF の添加により、濃度依存的に、また各株の BAFF-R の発現量に応じて、細胞増殖が亢進し、BCR や CD20 の架橋刺激やステロイドによって誘導されるアポトーシスが抑制されることが明らかとなったが、BAFF-R 陰性株ではこの効果を認めなかった。一方、VP-16 によるアポトーシスに対しては、抑制効果を認めなかった。BAFF-R 陽性株を用いて、BAFF によって誘導される刺激伝達について検討したところ、NF κ B1、NF κ B2 の双方の経路が活性化されたが、その活性化の状況は比較的弱く、一過性であった。

ヒト由来細胞株から BAFF の cDNA をクローニングして発現ベクターを構築し、ヒト胎児腎由来培養細胞株 HEK293 に遺伝子導入して一過性発現させ、イムノブロット解析により、その蛋白発現を確認した。

2. DAP3 によるアポトーシス制御機構の解析

T 細胞のネガティブセレクションの *in vitro* モデル系 RTOC システムを用いた検討で、DAP3 の発現により、CD4+CD8+T 細胞の数が有意に低下するもの他の T 細胞亜集団の数には影響を認めないことから、DAP3 が T 細胞のネガティブセレクションにおけるアポトーシスの亢進に働くことが示された。

DAP3 の会合分子 DELE の機について siRNA による遺伝子ノックダウンにより解析し、TNF- α 、FasL および TRAIL 刺激によって誘導されるカスパーゼ 3、カスパーゼ 8 およびカスパーゼ-9 の活性化が顕著に抑制される事から DELE がこれら TNF スーパーファミリーに属するサイトカインにより誘導されるアポトーシスの亢進に働く分子であることが明らかとなった。

3. CIA 関節炎モデルを用いたオステオポンチンの作用の解析

自己免疫疾患関節リウマチのモデルである CAIA マウスに対して、抗 α 9 インテグリン抗体 55A2C が顕著な予防効果、治療的効果を示すことを確認した。その作用機構は、55A2C が病変部の α 9 インテグリンを発現する滑膜線維芽細胞やマクロファージのオステオポンチンおよびテネイシン-C (α 9 インテグリンのリガンド) 刺激による炎症性サイトカイン/ケモカイン分泌を抑制するためと考えられた。ヒトにおける関節リウマチでも、病変部滑膜組織の細胞に α 9 インテグリンが発現していることを、新たに作製したモノクローナル抗体を用

いて明らかにした。

CIA モデルにおいても、55A2C は CIA 発症に係る Th17 細胞の分化および増殖を著明に阻害することで、その発症に対して予防的効果を示すことが明らかとなった。さらに、効果細胞の増殖、分化の場である所属リンパ節において、主に conventional dendritic cell (cDC) に α 9 インテグリンとテネイシン C の双方が発現し、autocrine and paracrine のメカニズムにより cDC の α 9 インテグリンが刺激され、各種サイトカインの分泌を促進し、これが Th17 細胞の分化に寄与している事が明らかになった。

D. 考察

今回の検討により、BAFF-R が一部のバーキットリンパ腫細胞に発現していること、BAFF が BAFF-R 陽性のバーキットリンパ腫細胞に対して細胞増殖を亢進し、CD20 および BCR を介するアポトーシス誘導や、ステロイドの作用によるアポトーシス誘導に対して抑制効果を示すことが明らかとなった。この結果は、BAFF が特異的に BAFF-R 陽性の B-precursor ALL 細胞の細胞増殖を亢進し、アポトーシス誘導を抑制することを示している。バーキットリンパ腫においても、BAFF-R の発現や BAFF がその病態と関連している可能性が考えられる。しかし、バーキットリンパ腫では、細胞内で惹起される刺激伝達が他の B 細胞性腫瘍とは異なる可能性が示される。今後のさらに解析を進め、バーキットリン