

は、CRH アンタゴニストを利用出来る可能性がある (Endocrinology, 2010)。

便秘、下痢、筋萎縮は、このマウスの定常状態では、観察されなかった。

D 考察

今後も引き続き、他の症状についても探索するとともに、グルココルチコイド補充によって、回復するかどうか検討する必要がある。さらに、グルココルチコイドの補充以外の治療法の開発を進める必要がある。性周期異常が CRH アンタゴニスト投与によって、回復することが明らかになったことから、MC2R KO マウスの表現型には、CRH 過剰による効果とグルココルチコイド欠乏による効果が合わさっていると考えられる。

E 結論

MC2R KO マウスは、先天性副腎低形成症のモデルマウスとして、有用である。グルココルチコイド補充に加えて、CRH アンタゴニストが症状の改善に有用な可能性がある。カテコールアミン補充やオピオイドアンタゴニストの効果も検討する価値がある。

F 研究発表

1、論文発表

- ① Chida D*, Miyoshi K, Sato T, Yoda T, Kikusui T, Iwakura Y. The role of glucocorticoids in pregnancy, parturition, lactation, and nurturing in melanocortin receptor 2- deficient mice. Endocrinology 2011 152: 1652-1660. *Corresponding author
- ② Sato, T., Chida D., Iwata, T., Usui, M., Hatori K., Abe, T., Takeda S., Yoda, T. Non-neuronal regulation and repertoire of cholinergic receptors in organs. BioMolecular Concepts. Volume 1, Issue 5-6, Pages 357- 366, ISSN (Online) 1868-503X, ISSN (Print) 1868-5021, DOI: 10.1515/BMC.2010.034, December 2010
- ③ Sato Y, Suzuki H, Sato T, Suda T, Yoda T, Iwakura Y. Chida D* The role of endogenous glucocorticoids in lymphocyte development in melanocortin receptor 2-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Dec

17:403(3-4):253-7. *Corresponding author

- ④ Matsuwaki T, Nishihara M, Sato T, Yoda T, Iwakura Y. Chida D* Functional hypothalamic amenorrhea due to increased CRH tone in melanocortin receptor 2- deficient mice. Endocrinology 2010 151: 5489-5496. *Corresponding author
- ⑤ Sato, T., Abe, T., Chida D, Nakamoto, N., Hori, N., Kokabu, S., Sakata, Y., Tomaru, Y., Iwata, T., Usui, M., Aiko, K., Yoda, T., Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts, FEBS Lett. 2010 584(4):817-824.

2、学会発表

- ① 松脇貴志、西原真杉、岩倉洋一郎、千田大、ACTH 受容体遺伝子欠損マウスを用いたストレス性生殖障害機構の解析、第15回日本生殖内分泌学会、2010年11月 大阪
- ② 千田大、三好圭子、佐藤毅、菊水健史、岩倉洋一郎、ACTH 受容体遺伝子欠損マウスを用いた妊娠、出産期におけるグルココルチコイド役割の解析、第15回日本生殖内分泌学会、2010年11月 大阪
- ③ Dai Chida, Yoshinori Sato, The role of endogenous glucocorticoids in neuroendocrine and immune systems in melanocortin receptor 2 (MC2R) deficient mice, 7th World Congress on Stress, Leiden, The Netherlands, 25-27 August (2010, 8)

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

先天性副腎低形成症に対する治療法の開発

所属 国立国際医療研究センター研究所 室長
研究者 千田 大

研究要旨

先天性副腎低形成症は、難治性疾患克服総合研究事業「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」の中で、研究が進められている。根治不可能で、治療が遅れば生命の危険にさらされる。ACTH 受容体は、先天性副腎低形成症の原因遺伝子のひとつであり、研究代表者は、世界に先駆けて ACTH 受容体 (MC2R) KO マウスを作成、解析し、先天性副腎低形成症モデルとして有用であることを示してきた。本研究では、モデルマウスの解析を通して、先天性副腎低形成症の治療法を開発することを目的として、MC2R KO マウスの病態解明と治療法を開発を進める。

A 研究目的

副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査によると、副腎酵素欠損症の患者は、全体で 5 年間に 1,462 例で、その内の多く (87%) が 21-水酸化酵素欠損症であり、先天性副腎低形成症の推定患者数は 7% である。先天性副腎低形成症の多くは、副腎の発生・分化に関わる転写因子の異常によるものであり、その他、家族性グルココルチコイド欠乏症 (ACTH 受容体遺伝子異常、MRAP 異常) がある (図 1)。先天性副腎低形成症は、根治不可能であり、急性副腎不全の発症時には、グルココルチコイドとミネラルコルチコイドの速やかな補充と、水分・塩分・糖分の補給が必要であり、治療が遅れば生命にかかわる病気である。また、先天性副腎低形成症の疫学調査によると、グルココルチコイドの補充による治療を受けている患者の QOL は、必ずしも良くない。

研究代表者は、世界に先駆けて、ACTH 受容体 (MC2R) 遺伝子改変マウス (MC2R KO) を作成、解析してきた。ACTH 受容体は、家族性グルココルチコイド欠損症の原因遺伝子として知られており、MC2R KO マウスは、家族性グルココルチコイド欠損症と同様に、低グルココルチコイド、高 ACTH、低血糖を示し、モデルマウスとして有用であることを示して来た (Chida et al. PNAS 2007, MCE 2009) (図 2)。本研

究では、MC2R KO の解析を通して先天性副腎低形成症の病態を明らかにし、患者さんの QOL を高めるために有用な治療法を開発を目的として、研究開発を進める。

図1 ACTH 不能症

- ACTH受容体に対する自己抗体
- 家族性グルココルチコイド欠乏症(FGD)
 - 遺伝形式は常染色体性劣性遺伝
 - 1. FGD1 melanocortin-2 receptor (MC2R)
 - 2. FGD2 melanocortin-2 receptor accessory protein (MRAP)
 - Trafficking of the MC2R from the ER to the cell surface
 - 3. FGD3 the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)
- Low circulating serum cortisol, increased ACTH levels.
- Unresponsiveness to ACTH
- Mineralocorticoid production and RAS system is usually unaffected

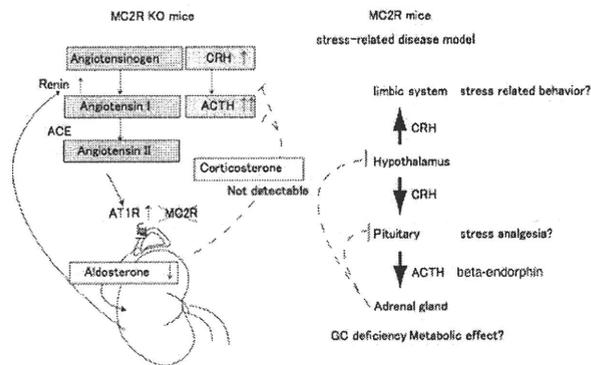


図2 MC2R KOマウスの血中コルチコステロンレベルは、検出限界以下で、CRH、ACTHが亢進していた。先天性副腎低形成症モデルマウス(アジソン病)として、有用。

B 研究方法

副腎皮質機能低下症では、1、免疫異常、貧血、2、食欲不振、体重減少（成人）、失神低血糖症状、筋萎縮、易疲労、衰弱、耐寒性低下、低血圧、3、体重増加不良（小児）、4、貧血、5、月経異常、腋毛、恥毛脱落（女性）、6便秘、下痢、7、精神異常（抑うつ傾向）、不安感、8、色素沈着などの様々な症状が報告されている。本年度は、副腎皮質機能低下症モデルマウス、ACTH 受容体遺伝子改変マウス (MC2R KO) において、これらの症状が起こっているどうか検討し、これらの症状が観察されれば、グルココルチコイド、CRH antagonist によって、症状が回復するかどうか検討した。

MC2R KO マウスを B6 マウスに 8 回戻し交配した。MC2R KO (N8) では、離乳まで生き残ったホモマウスは、得られなかった。B6 背景の MC2R^{+/-} (N8) ヘテロを Balb/c マウスと交配し得られたヘテロマウス同士の掛け合わせを行ない B6/Balb 背景のマウスを実験群として解析を行った。B6/Balb 背景の MC2R^{-/-} マウスでは、約半分が離乳まで生き残り、解析に用いた。

C 研究結果

副腎皮質機能低下症モデルマウス、ACTH 受容体遺伝子改変マウス (MC2R KO) において、体重増加不良、易疲労、哺育不良、貧血、尿量の減少などの副腎皮質機能低下症の症状を検討した。

MC2R KO マウスでは、12 週令までの体重に違いが見られないが、高齢でみ、♀共にコントロールと比べて、痩せていることが明らかになった。さらに、体重に違いが見られない 12 週令においても、脂肪重量が減少していることが明らかになった (図 3)。

MC2R KO マウスの脂肪組織を組織学的に解析したところ、MC2R KO マウスでは、脂肪細胞の大きさには、違いがなかった。このことから、脂肪細胞の数が減少している可能性が推測された。

さらに、MC2R KO マウスに高脂肪食を与えて飼育しても、コントロールと比べて、体重の増加率、脂肪量の増加率が低下しており、高イン

スリン血漿になりにくい事が明らかになった。さらに、血清蛋白の網羅的な解析から、MC2R KO マウスでは、グルココルチコイドによって制御されている IGF-1 が低下している事を見いだした。

MC2R KOマウスの代謝異常

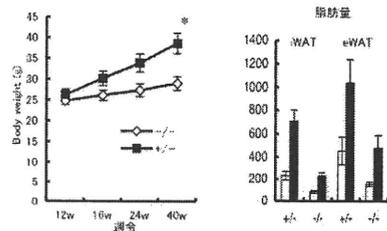


図3 MC2R KOマウスは、高齢で痩せており、高脂肪誘導性肥満に対して抵抗性を示す

副腎皮質機能低下症で見られる易疲労に着目し、トレッドミル解析を行った。MC2R KO マウスをトレッドミルに慣らした後に、回転速度を徐々に増加させ、最高走行速度を検査した。また、一定の回転速度で、走れなくなるまでの時間、耐久時間を検査した。MC2R KO マウスは、最高速度、対九時間の両方で野生型よりも劣っている事を明らかにした。握力については、大きな違いがなかったことから、MC2R KO マウスは、筋萎縮ではなく易疲労であると考えられ、副腎皮質機能低下症の症状に合致した興味深い知見である。運動中の血糖値を計時的に測定した所、糖新生の異常により血糖値レベルを維持出来ていない事が明らかになった。グルココルチコイド補充は、トレッドミルの成績を回復させたが、この効果は、グリコーゲン蓄積増加によるものであり、糖新生自体は、回復しなかった。カテコールアミン補充を検討する価値がある。

睡眠異常の可能性について予備的な検討を行ったが、睡眠脳波に大きな違いが見出せなかった。CRH 過剰モデルマウスでは、断眠後の睡眠に異常があることが報告されているので、何らかのストレス下の状態における睡眠恒常性に役割を果たしているのかもしれない。

末梢血の解析から、MC2R KO マウスでは、赤血球数がコントロールマウスと比べて、有意に低下している事を見いだした。約 40% の副腎不全の患者において、貧血が起こっている事が報告されている。MC2R KO マウスの赤血球数が減少している事から、副腎不全に加えて、遺伝的背景の影響により、貧血が起こっていると考えられる。グルココルチコイドを補充すると、

赤血球数はコントロールマウスのレベルまで回復した(BBRC 2010 Sato Y et al.)。

MC2R KO ♀マウスから生まれたMC2R KO マウスは、妊娠可能で出産出来るが、肺胞形成不全によって、生後まもなく死亡することが明らかになった(図4)。一方、MC2R KO マウスから生まれたヘテロマウスは、成体まで成長する事が出来なかった。MC2R KO マウスから生まれたヘテロマウスを里親に育てさせると正常に成体まで成長する事から、母親の哺育不全に伴う出生生存率低下である事が明らかになった(図5)。グルココルチコイド補充は、出生生存率を回復させたが、離乳時の体重は、減少していた。MC2R KO マウスの乳腺を解析したところ、乳腺上皮細胞の増殖が低下しており、乳銃タンパクの発現低下が起こっていた(図6)(Endocrinology, 2011)。

グルココルチコイドの肺胞形成における役割

♂^{+/-} × ♀^{-/-} ホモの子

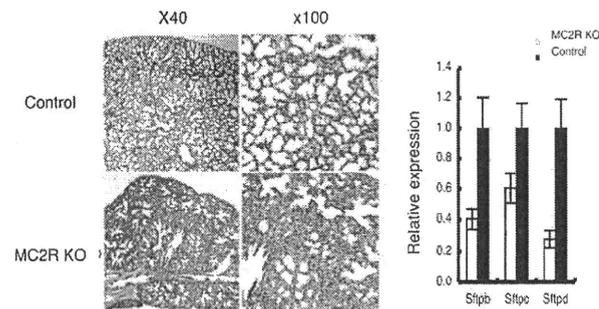


図4 ♂ヘテロとの交配による♀ホモマウスから産まれたホモの子は、無気肺を呈し、産まれてすぐにすべてが死亡

D. Chida et al. Mol. Cell Endocrinol 2009

図5 MC2R KOマウス交配のまとめ

Mating pairs	Offspring
♂ ^{+/-} × ♀ ^{+/-}	+/-, +/+ 正常 -/- 低血糖(50%-75%)が死亡(①)
♂ ^{-/-} × ♀ ^{+/-}	-/- 低血糖(50%-75%)が死亡(①)
♂ ^{+/-} × ♀ ^{-/-}	-/- 肺胞形成不全(②) +/- 母獣の乳腺形成不全(③)
♂ ^{-/-} × ♀ ^{-/-}	妊娠後期の胎生致死(④)

- グルココルチコイドの、
- ① 糖新生における役割
 - ② 胎児肺胞形成における役割
 - ③ 乳腺発達、ミルクタンパク発現制御における役割
 - ④ 胎盤機能における役割

D. Chida et al. Endocrinology 2011

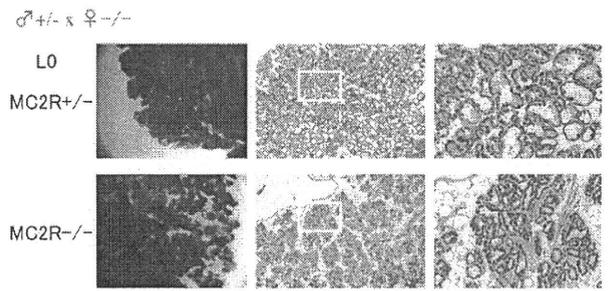


図6 MC2R KOマウスでは、乳腺の発達に形態的な異常はないが、fat padに占める上皮の割合が低下している。

D. Chida et al. Endocrinology 2011

♀のMC2R KOマウスが性周期異常を起こす事を見出し、副腎皮質機能低下症患者の月経異常と合致したものであった。MC2R KO マウスの卵巣は、携帯学的に異常がなく、正常な排卵能を保っていた。一方、血清中のLHレベルは、低下傾向で、GnRHの発現量が低下していたことから、視床下部性の性周期異常であった。MC2R KO マウスでは、グルココルチコイド欠乏により、慢性的に視床下部のCRH発現が亢進しており(図7)、CRHアンタゴニストの投与により性周期異常が回復することが明らかになった。GnRHパルス状分泌に関わるARCキスペプチンの発現に異常はなかったが、AVPVキスペプチンの発現が低下していた。副腎皮質機能低下による月経異常の治療には、CRHアンタゴニストを利用出来る可能性がある(図8)(Endocrinology, 2010)。

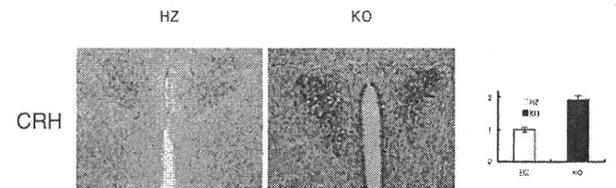


図7 CRHの発現上昇

T. Matsuwaki, D. Chida et al. Endocrinology 2011

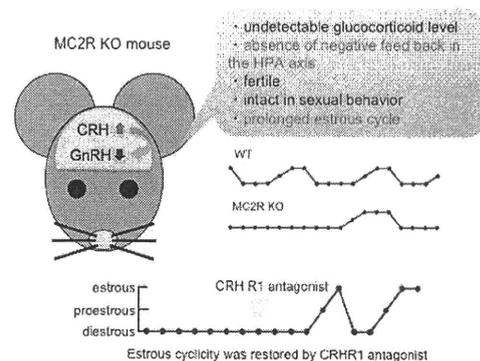


図8 CRHの発現上昇がMC2R KOマウスにおける性周期異常の主要な原因である。

Matsuwaki, T et al. Endocrinology 2010

便秘、下痢、筋萎縮は、このマウスの定常状態では、観察されなかった。

D 考察

今後も引き続き、他の症状についても探索するとともに、グルココルチコイド補充によって、回復するかどうか検討する必要がある。さらに、グルココルチコイドの補充以外の治療法の開発を進める必要がある。性周期異常がCRH アンタゴニスト投与によって、回復することが明らかになったことから、MC2R KO マウスの表現型には、CRH 過剰による効果とグルココルチコイド欠乏による効果が合わさっていると考えられる。

E 結論

MC2R KO マウスは、先天性副腎低形成症のモデルマウスとして、有用である。グルココルチコイド補充に加えて、CRH アンタゴニストが症状の改善に有用な可能性がある。カテコールアミン補充やオピオイドアンタゴニストの効果も検討する価値がある。

F 研究発表

1、論文発表

- ① Chida D*, Miyoshi K, Sato T, Yoda T, Kikusui T, Iwakura Y. The role of glucocorticoids in pregnancy, parturition, lactation, and nurturing in melanocortin receptor 2- deficient mice. Endocrinology 2011 152: 1652-1660. *Corresponding author
- ② Sato, T., Chida D., Iwata, T., Usui, M., Hatori K., Abe, T., Takeda S., Yoda, T. Non-neuronal regulation and repertoire of cholinergic receptors in organs. BioMolecular Concepts. Volume 1, Issue 5-6, Pages 357- 366, ISSN (Online) 1868-503X, ISSN (Print) 1868-5021, DOI: 10.1515/BMC.2010.034, December 2010
- ③ Sato Y, Suzuki H, Sato T, Suda T, Yoda T, Iwakura Y. Chida D* The role of endogenous glucocorticoids in lymphocyte development in melanocortin receptor 2-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Dec 17;403(3-4):253-7. *Corresponding author
- ④ Matsuwaki T, Nishihara M, Sato T, Yoda T, Iwakura Y. Chida D* Functional hypothalamic amenorrhea due to increased CRH tone in melanocortin receptor 2- deficient mice.

Endocrinology 2010 151: 5489-5496.

*Corresponding author

- ⑤ Sato, T., Abe, T., Chida D., Nakamoto, N., Hori, N., Kokabu, S., Sakata, Y., Tomaru, Y., Iwata, T., Usui, M., Aiko, K., Yoda, T., Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts, FEBS Lett. 2010 584(4):817-824.

2、学会発表

- ① 松脇貴志、西原真杉、岩倉洋一郎、千田大、ACTH 受容体遺伝子欠損マウスを用いたストレス性生殖障発症機構の解析、第15回日本生殖内分泌学会、2010年11月 大阪
- ② 千田大、三好圭子、佐藤毅、菊水健史、岩倉洋一郎、ACTH 受容体遺伝子欠損マウスを用いた妊娠、出産期におけるグルココルチコイド役割の解析、第15回日本生殖内分泌学会、2010年11月 大阪
- ③ Dai Chida, Yoshinori Sato, The role of endogenous glucocorticoids in neuroendocrine and immune systems in melanocortin receptor 2 (MC2R) deficient mice, 7th World Congress on Stress, Leiden, The Netherlands, 25-27 August (2010, 8)

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

軸索保護に基づく神経変性疾患治療薬の開発

所 属 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第5部
研究者 若月 修二
研究期間 平成21年4月～平成23年3月

研究要旨 本研究では多くの神経変性疾患に認められる軸索変性の分子メカニズムを詳細に理解し、これを制御する方法を明らかにすることにより、軸索保護シグナルの分子基盤の整備を行い、難治性神経疾患に対する治療薬の開発に繋げることを目指す。

A. 研究目的

パーキンソン病や筋萎縮側索硬化症などの難治性神経疾患に関する治療研究では、これまで神経細胞死に焦点を当てた研究が精力的に行われ、現在もその主流であるが、多く場合、細胞死は病態後期に観察される不可逆なプロセスであることから、より有効性の高い治療方法の開発には細胞死とは別の、病態の発症、進行メカニズムを踏まえた新たなアプローチが必要である。軸索変性は神経変性疾患を含む脳神経疾患において神経細胞死の前段階として観察されるが、多くの脳神経疾患モデルにおいて神経細胞死を抑制しても軸索変性を抑制できないことから、その進行には細胞死とは独立した軸索自律的なメカニズムが存在すると考えられる。また、パーキンソン病モデル、末梢神経障害モデルなどにおいては、軸索変性を抑制、あるいは大幅に遅延させることにより症状の軽減や寿命の延長が認められている(Annu.Rev.Neurosci. 2011, 33: 245-267)。これらのことから、軸索変性過程を分子レベルで理解し、これを制御する方法を確立することは、神経変性疾患の治療に有効である可能性が高い。

一方、*wlds* (Wallerian degeneration slow) と呼ばれる自然発症マウスは物理的傷害、あるいは薬剤による化学的傷害が誘導する軸索のワーラー変性が著しく遅延しており、脳虚血などの実験モデルの適用、遺伝的な疾患モデルとの交配による

検証から、さまざまな軸索変性に対して抵抗性を示す結果、疾患による症状の軽減、寿命の延長などを認める。同マウスにはユビキチン鎖伸長因子 Ufe4b (Ufd2a) とニコチンアミドモノヌクレオチドアデニル転移酵素 Nmnat1 のキメラタンパク質 Wld^Δが発現する。前者はユビキチン・プロテアソーム経路によるタンパク質分解に関わり、後者はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) の生合成に関わる酵素である。軸索変性を指標とした培養神経細胞を用いた解析から、Wld^Δタンパク質あるいは Nmnat1 を導入することにより軸索変性が遅延するが、Ufe4b を導入し発現レベルの改変を行った場合には遅延効果が得られていない (Science 305, 1010-1013.)。したがって、Nmnat1 活性によって産生された NAD が軸索変性を遅延させると考えられるが、タンパク質分解系、特にユビキチン・プロテアソーム経路の阻害によりワーラー変性が抑制されることが別の研究により明らかにされており、Ufe4b の関与を主張する研究者も少なくない (Neuron 39, 217-225.)。何れにしても、神経細胞、もしくは神経軸索に内在するシグナル伝達系を改変することで軸索変性を抑制できること、すなわち軸索保護活性を賦与できることは明らかではあるが、その分子メカニズムについては十分な理解が得られていない。

本研究では、このような背景のもとに *in vitro* 軸索変性モデル (Science 2004, 305:1010-1013.) を

評価系とした、主要な細胞内反応に関わる酵素群の阻害剤を用いたスクリーニングを行い、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β (GSK3β) 阻害剤が軸索変性を著明に遅延させることを突き止めた (平成 19 年度 HS 若手研究 課題番号 KHC3309)。軸索変性過程では変性の進行に伴う GSK3β の活性化を認め、これと並行して GSK3β の活性調節に直接関わるセリン・スレオニンキナーゼ Akt の軸索における存在量が減少した。これらの一連の変化はユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) 阻害下では抑制され、かつ Akt がポリユビキチン化されることなどから、UPS 依存的な Akt-GSK3β シグナルの制御が軸索変性の進行と強く相関することが示唆された。

これらを踏まえて、本研究では、軸索変性における ZNRF1-Akt-GSK3β シグナルの生理的意義を明らかにすることを主軸に、軸索保護の観点から神経変性疾患に対する最適な治療、および効果を得るための分子基盤を整備することを目的とした。

B. 研究方法

軸索変性過程における ZNRF1-Akt-GSK3β の活性制御機構を明らかにするため、

1) 軸索変性における Akt-GSK3β シグナルの生物学的意義付け

2) Akt をユビキチン化に導くユビキチンリガーゼの同定

3) ZNRF1-Akt-GSK3β シグナルの *in vivo* 軸索変性モデルへの適用に関する解析を行った。

上記 1) に関しては、主として *in vitro* 軸索変性モデルを用いた。同モデルでは、マウス胚より調製した後根神経節を培養し軸索を伸長させた後、神経節を除去することで軸索変性を経時的に観察し (Science 2004, 305: 1010-1013.)、変性抑制効果の判定は画像解析ツールを用いて定量的な評価を行った。さらに、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入により、Akt ならびに GSK3β、それぞれについて、構成的活性型、優性不活性型分子などの変異分子を作製し、抑制効果の有無についての評価を行った。また、GSK3β の基質として、collapsin response mediator protein 2 (CRMP2)

を含む複数の分子について検討した。

上記 2) に関しては、E3 ユビキチンリガーゼ zinc and ring finger 1 (ZNRF1) を候補分子として、Akt をユビキチン化し得る条件の検討を行った。ZNRF1 は末梢神経傷害後に神経繊維を構成する神経軸索の持ち主である神経節において発現が上昇する遺伝子のスクリーニングにより、RING フィンガー領域に E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つタンパク質 ZNRF1 として我々が同定した分子である (J.Biol.Chem. 276, 34131-34141)。アミノ酸配列欠失変異分子を作製し、免疫沈降試験により、結合様式に関する検討を行った。また、E3 ユビキチンリガーゼとしての機能不全分子 C184A (184 番目のシステインをアラニンに置換してユビキチンリガーゼ活性に重要な RING フィンガー領域を破壊した変異分子) は軸索変性を抑制する可能性があるため、これを作製し、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入により、*in vitro* 軸索変性モデルにおける抑制効果の有無を検討した。

上記 3) に関しては、視神経変性モデルを対象に検討した。同モデルでは、GSK 3β 阻害剤に加えて、ZNRF1-Akt-GSK 3β シグナルに係る分子群を導入できるウイルスベクターを眼球に直接注入した後、眼球のごく近傍で視神経を切断し、切断部位から視交叉までの部分の変性の進行を免疫組織化学的に評価した。視神経変性は 1 週間程度で完了することから、その時点での対照群との比較により投与群での治療効果を判定した。

(倫理面への配慮)

本研究はその成果を神経変性疾患治療薬開発に応用することを目的とするが、研究期間内においては臨床応用の前段階までの解析につき実験動物を用いて行うため、人権保護に関する特記事項はない。また、実験動物の使用に際しては、動物愛護等の法令、および国立精神・神経医療研究センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会の定める規則を遵守して行い、研究計画はすべて同委員会で審議され承認を受けた。

C. 研究結果

1) 軸索変性における ZNRF1-Akt-GSK3β シグナルの生物学的意義付け

アデノウイルスなどのウィルスベクターを用いた遺伝子導入により培養後根神経節神経細胞に導入した後、*in vitro* 軸索変性モデルによりその効果を検討した結果、野生型、および構成的活性変異型 Akt を導入した場合には軸索変性の進行が抑制された。これとは反対に GSK3 β に関しては優性不活性変異分子を導入した場合にのみ軸索変性の進行を抑制された。また、GSK3 β の基質について検討した結果、軸索変性の過程で CRMP2 が GSK3 β 依存的にリン酸化され、非リン酸化型 CRMP2 (GSK3 β によってリン酸化される 514 番目のスレオニンアラニンに置換した T514A 変異体) の導入により軸索変性が抑制されることが明らかになった。

上記に加えて、複数の異なる GSK3 β 阻害剤が軸索変性の進行を抑制することを明らかにした。

2) Akt をユビキチン化に導くユビキチンリガーゼの同定

HEK293 細胞などの株化細胞に対する強制発現系で検討した結果、シクロヘキシミド処理によるタンパク質合成阻害下における Akt の半減期は E3 ユビキチンリガーゼ ZNRF1 の存在下において著しく低下した。また、プロテアソーム阻害下におけるユビキチンリガーゼ活性試験では、ZNRF1 の存在下において Akt は顕著にポリユビキチン化された。

一方、ZNRF1 C184A を培養後根神経節神経細胞に導入した後、*in vitro* 軸索変性モデルによりその効果を検討した結果、軸索変性の進行を顕著に抑制された。

3) ZNRF1-Akt-GSK3 β シグナルの *in vivo* 軸索変性モデルへの適用

ZNRF1-Akt-GSK3 β シグナルに係る分子群の導入により視神経変性が抑制された。視神経変性の抑制は、ユビキチンリガーゼ ZNRF1 の機能不全分子 ZNRF1 C184A、非リン酸化型 CRMP2 T514A の導入によっても認められた。GSK3 β 阻害剤、プロテアソーム阻害剤の投与は抑制効果を認めなかった。

D. 考察

以上のように、軸索変性の進行には E3 ユビキチンリガーゼ ZNRF1 による Akt-GSK3 β シグナル

の活性制御が重要であることが示された。特に、視神経変性モデルを用いることにより、軸索変性の進行における同シグナルの生物学的意義について *in vivo* レベルでの検証を行うことができたことは、応用面での検討を考えるとその意義は大きい。このことは、同シグナルの活性制御が、軸索変性を伴う神経変性疾患モデル、例えば、緑内障モデルや変異型 SOD1 を発現する筋委縮硬化症モデルマウスなどに対する治療（進行抑制）に有効である可能性を強く示唆し、大変意義深いものとする。しかしながら、GSK3 β 阻害剤、プロテアソーム阻害剤の投与では抑制効果を認めなかった。今後は、薬剤の半減期や変性過程の軸索への浸透などを改良する必要があると考える。このように、研究課題開始時点の目標の多くを達成できたが、*in vivo* レベルで軸索変性を抑制できる小分子化合物の同定には至らなかった。

一方、未解明の重要な課題として ZNRF1 の活性制御がある。ZNRF1 は変性を開始していない定常状態の軸索にも存在することから、軸索変性に始まる何らかのメカニズムによって ZNRF1 自身の活性制御がなされると考えられる。軸索変性は細胞外からのイオンの流入やそれに伴う pH 環境の変化などによって開始されると考えられているが、これらと ZNRF1 の活性制御との関連については大変興味深いポイントであるとともに解明すべき課題のひとつである。さらに ZNRF1-Akt-GSK3 β -CRMP2 シグナルと並行する、あるいはこれを増強するシグナル伝達系を明らかにする既知小分子化合物のスクリーニングを行い、軸索変性の分子メカニズムの全貌を解明していきたい。

E. 結論

本研究は神経変性疾患の進展と症状形成に重要な役割をもつ軸索変性の分子メカニズムを理解することにより、得られた知見を手がかりに、軸索変性を抑制する方法論を確立し、これまで有効な治療法がなかった神経変性疾患の治療に役立てることを目的として開始された。本研究の推進により、次のことが明らかになった。

- ・ UPS を介した軸索変性の制御機構を分子レベルで明らかにした。

- *in vitro* レベルの解析から、軸索変性の進行を抑制する小分子化合物を複数同定した。
- ZNRF1–Akt–GSK3β–CRMP2 シグナルの活性制御により、軸索変性の進行を抑制できる可能性を *in vivo* レベルでの検証できた。

これらの成果は、軸索保護シグナルを調節する薬物治療、遺伝子治療など、神経変性疾患に対する最適な治療法、および効果を得るための分子基盤となると考える。

F. 研究発表

1) 国内

口頭発表 3件

原著論文による発表 0件

それ以外の発表 1件

総説:

若月修二, 湯本法弘, 瀬原淳子

神経系の細胞間シグナル伝達におけるメルトリンβの多面的な役割

蛋白質核酸酵素 (2009) 54, 1735-1741.

学会発表:

1. 若月修二, 齋藤文典, 荒木敏之

ユビキチンリガーゼ ZNRF1 はプロテアソームによる Akt の選択的分解を介して神経軸索変性の進行を制御する。

第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日 横浜

2. 若月修二, 荒木敏之

神経系におけるユビキチンリガーゼ ZNRF1 の機能解析。

第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会 2010年12月9日 神戸

3. 三橋 弘明, 林 由起子, 松田 知栄, 野口 悟, 若月 修二, 荒木 敏之, 西野 一三

筋ジストロフィー患者に特異的な A 型ラミン Ser458 のリン酸化

2) 海外

口頭発表 0件

原著論文による発表 2件

それ以外 0件

論文発表:

1. Wakatsuki, S., Yumoto, N., Komatsu, K., Araki,

T., Sehara-Fujisawa, A.

Roles of Meltrin β/ADAM19 in progression of Schwann cell differentiation and myelination during sciatic nerve regeneration. *J. Biol. Chem.* (2009) 284, 2957-2966.

2. Mitsuhashi, H., Hayashi, YK., Matsuda, C., Noguchi, S., Wakatsuki, S., Araki, T., Nishino, I.

Specific phosphorylation of Ser458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. *J. Cell Sci.* (2010) 123, 3893-3900.

※ 本研究の成果は国際誌に投稿し、平成23年4月現在、改訂稿の作製中である。

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

軸索保護に基づく神経変性疾患治療薬の開発

所 属 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第5部
研究者 若月 修二

研究要旨 本研究では多くの神経変性疾患に認められる軸索変性の分子メカニズムを詳細に理解し、これを制御する方法を明らかにすることにより、軸索保護シグナルの分子基盤の整備を行い、難治性神経疾患に対する治療薬の開発に繋げることを目指す。

A. 研究目的

パーキンソン病や筋萎縮側索硬化症などの難治性神経疾患に関する治療研究では、これまで神経細胞死に焦点を当てた研究が精力的に行われ、現在もその主流であるが、多く場合、細胞死は病態後期に観察される不可逆なプロセスであることから、より有効性の高い治療方法の開発には細胞死とは別の、病態の発症、進行メカニズムを踏まえた新たなアプローチが必要である。軸索変性は神経変性疾患を含む脳神経疾患において神経細胞死の前段階として観察されるが、多くの脳神経疾患モデルにおいて神経細胞死を抑制しても軸索変性を抑制できないことから、その進行には細胞死とは独立した軸索自律的なメカニズムが存在すると考えられる。また、パーキンソン病モデル、末梢神経障害モデルなどにおいては、軸索変性を抑制、あるいは大幅に遅延させることにより症状の軽減や寿命の延長が認められている(Annu.Rev.Neurosci. 2010, 33: 245-267)。これらのことから、軸索変性過程を分子レベルで理解し、これを制御する方法を確立することは、神経変性疾患の治療に有効である可能性が高い。

一方、*wlds* (Wallerian degeneration slow) と呼ばれる自然発症マウスは物理的傷害、あるいは薬剤による化学的傷害が誘導する軸索のワーラー変性が著しく遅延しており、脳虚血などの実験モデルの適用、遺伝的な疾患モデルとの交配による検証から、さまざまな軸索変性に対して抵抗性を

示す結果、疾患による症状の軽減、寿命の延長などを認める。同マウスにはユビキチン鎖伸長因子 Ufe4b (Ufd2a) とニコチンアミドモノヌクレオチドアデニル転移酵素 Nmnat1 のキメラタンパク質 Wld^Δが発現する。前者はユビキチン・プロテアソーム経路によるタンパク質分解に関わり、後者はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) の生合成に関わる酵素である。軸索変性を指標とした培養神経細胞を用いた解析から、Wld^Δタンパク質あるいは Nmnat1 を導入することにより軸索変性が遅延するが、Ufe4b を導入し発現レベルの改変を行った場合には遅延効果が得られていない (Science 305, 1010-1013.)。したがって、Nmnat1 活性によって産生された NAD が軸索変性を遅延させると考えられるが、タンパク質分解系、特にユビキチン・プロテアソーム経路の阻害によりワーラー変性が抑制されることが別の研究により明らかにされており、Ufe4b の関与を主張する研究者も少なくない (Neuron 39, 217-225.)。何れにしても、神経細胞、もしくは神経軸索に内在するシグナル伝達系を改変することで軸索変性を抑制できること、すなわち軸索保護活性を賦与できることは明らかではあるが、その分子メカニズムについては十分な理解が得られていない。

このような背景のもとに *in vitro* 軸索変性モデル (Science 2004, 305:1010-1013.) を評価系とした、主要な細胞内反応に関わる酵素群の阻害剤を用いたスクリーニングを行い、グリコーゲン合成酵

素キナーゼ 3 β (GSK3 β) 阻害剤が軸索変性を著明に遅延させることを突き止めた (平成 19 年度 HS 若手研究 課題番号 KHC3309). 軸索変性過程では変性の進行に伴う GSK3 β のキナーゼ活性の上昇 (活性化) を認め、これと並行して GSK3 β の活性調節に直接関わるセリン・スレオニンキナーゼ Akt の軸索における存在量が減少した. これらの一連の変化はユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) 阻害下では抑制され、かつ Akt がポリユビキチン化されることなどから、UPS 依存的な Akt-GSK3 β シグナルの制御が軸索変性の進行と強く相関することが示唆された.

これらを踏まえて、本研究では、軸索変性における Akt-GSK3 β シグナルの生理的意義を明らかにすることを主軸に、軸索保護の観点から神経変性疾患に対する最適な治療、および効果を得るための分子基盤を整備することを目的とした.

B. 研究方法

昨年度までに本研究では Akt をユビキチン化に導く E3 リガーゼとして zinc and ring finger 1 (ZNRF1) を同定した. 本年度は軸索変性過程における ZNRF1 に依存した Akt-GSK3 β の活性制御機構を明らかにするため、

1) 軸索変性における ZNRF1-Akt-GSK3 β シグナルの生物学的意義付け

2) ZNRF1-Akt-GSK3 β シグナルの *in vivo* 軸索変性モデルへの適用に関する解析を行った.

上記 1) に関してはこれまでと同様に、主として *in vitro* 軸索変性モデルを用いた. 同モデルでは、マウス胚より調製した後根神経節を培養し軸索を伸長させた後、神経節を除去することで軸索変性を経時的に観察し (Science 2004, 305: 1010-1013.), 変性抑制効果の判定は画像解析ツールを用いて定量的な評価した. さらに、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入により、Akt ならびに GSK3 β , それぞれについて、構成的活性型、優性不活性型分子などの変異分子を作製し、抑制効果の有無についての評価を行った. また、ZNRF1 については、E3 ユビキチンリガーゼとしての機能不全分子 C184A (184 番目のシステインをアラニンに置換してユビキチンリガーゼ活性

に重要な RING フィンガー領域を破壊した変異分子) を作製し、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入により、*in vitro* 軸索変性モデルにおける抑制効果の有無を検討した. さらに、GSK3 β には複数のリン酸化標的分子 (リン酸化される基質となるタンパク質分子) が報告されている (Nat.Rev.Neurosci. 2010, 11: 539-551.) ので、軸索に発現する幾つかの候補分子を対象に、軸索変性に伴う発現量の変化などの検討を行った.

一方、UPS 阻害剤によって軸索変性を阻害したときに観察される UPS による分解を免れた Akt がキナーゼ活性を持つかどうかを、抗 Akt 抗体による免疫沈降物に含まれる Akt のキナーゼ活性を基質となる合成ペプチドへのリン酸基の取り込み能を指標として調べた.

上記 2) に関しては、視神経変性モデルを対象に検討した. 同モデルでは、GSK3 β 阻害剤に加えて、ZNRF1-Akt-GSK3 β シグナルに係る分子群を導入できるウイルスベクターを眼球に直接注入した後、眼球のごく近傍で視神経を切断し、切断部位から視交差までの部分の変性の進行を免疫組織化学的に評価した. 視神経変性は 1 週間程度で完了することから、その時点での対照群との比較により投与群での治療効果を判定した.

(倫理面への配慮)

本研究はその成果を神経変性疾患治療薬開発に応用することを目的とするが、研究期間内においては臨床応用の前段階までの解析につき実験動物を用いて行うため、人権保護に関する特記事項はない. また、実験動物の使用に際しては、動物愛護等の法令、および国立精神・神経医療研究センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会の定める規則を遵守して行い、研究計画はすべて同委員会で審議され承認を受けた.

C. 研究結果

1) 軸索変性における ZNRF1-Akt-GSK3 β シグナルの生物学的意義付け

アデノウイルスなどのウイルスベクターを用いた遺伝子導入により培養後根神経節神経細胞に導入した後、*in vitro* 軸索変性モデルによりその効果を検討した結果、野生型、および構成的活性変異型 Akt を導入した場合には軸索変性の進行が

抑制された。これとは反対に GSK3 β に関しては優性不活性変異分子を導入した場合にのみ軸索変性の進行を抑制された。また、GSK3 β の基質については collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) を含む、軸索に発現する代表的な分子について検討した結果、CRMP2 が GSK3 β 依存的にリン酸化され、非リン酸化型 CRMP2 (GSK3 β によってリン酸化される 514 番目のスレオニンを変換した T514A 変異体) を導入により軸索変性が抑制されることが明らかになった。

一方、軸索における Akt のキナーゼ活性の変動を検討した結果、無処理では軸索変性の進行に伴う Akt 存在量の減少が示すように、これと矛盾のないキナーゼ活性の消失を認めたが、UPS 阻害下では Akt 活性は変性開始時とほとんど変動しないことが明らかになった (図 1)。

上記に加えて、複数の異なる GSK3 β 阻害剤が軸索変性の進行を抑制することを明らかにした。

2) ZNRF1-Akt-GSK3 β シグナルの *in vivo* 軸索変性モデルへの適用

ZNRF1-Akt-GSK3 β シグナルに係る分子群の導入により視神経変性が抑制された。視神経変性の抑制は、ユビキチンリガーゼ ZNRF1 の機能不全分子 ZNRF1 C184A、非リン酸化型 CRMP2 T514A の導入によっても認められた (図 2)。GSK3 β 阻害剤、プロテアソーム阻害剤の投与は抑制効果を認めなかった。

D. 考察

以上のように、軸索変性の進行には E3 ユビキチンリガーゼ ZNRF1 による Akt-GSK3 β シグナルの活性制御が重要であることが示された (図 3)。特に、視神経変性モデルを用いることにより、軸索変性の進行における同シグナルの生物学的意義について *in vivo* レベルでの検証を行うことができたことは、応用面での検討を考えるとその意義は大きい。このことは、同シグナルの活性制御が、軸索変性を伴う神経変性疾患モデル、例えば、緑内障モデルや変異型 SOD1 を発現する筋萎縮硬化症モデルマウスなどに対する治療 (進行抑制) に有効である可能性を強く示唆し、大変意義深いものと考えられる。しかしながら、GSK3 β 阻害剤、プロテアソーム阻害剤の投与では抑制効果を認め

なかった。今後は、薬剤の半減期や変性過程の軸索への浸透などを改良する必要があると考える。このように、研究課題開始時点の目標の多くを達成できたが、*in vivo* レベルで軸索変性を抑制できる小分子化合物の同定には至らなかった。

一方、未解明の重要な課題として ZNRF1 の活性制御がある。ZNRF1 は変性を開始していない定常状態の軸索にも存在することから、軸索変性に始まる何らかのメカニズムによって ZNRF1 自身の活性制御がなされると考えられる。軸索変性は細胞外からのイオンの流入やそれに伴う pH 環境の変化などによって開始されると考えられているが、これらと ZNRF1 の活性制御との関連については大変興味深いポイントであるとともに解明すべき課題のひとつである。さらに ZNRF1-Akt-GSK3 β -CRMP2 シグナルと並行する、あるいはこれを増強するシグナル伝達系を明らかにする既知小分子化合物のスクリーニングを行い、軸索変性の分子メカニズムの全貌を解明していきたい。

E. 結論

本年度の本研究の推進により、次のことが明らかになった。

- ・ UPS を介した軸索変性の制御機構を分子レベルで明らかにした。
- ・ ZNRF1-Akt-GSK3 β -CRMP2 シグナルの活性制御により、軸索変性の進行を抑制できる可能性を *in vivo* レベルでの検証できた。

これらの成果は、軸索保護シグナルを調節する薬物治療、遺伝子治療など、神経変性疾患に対する最適な治療法、および効果を得るための分子基盤となると考える。

F. 研究発表

1) 国内

口頭発表 2 件

原著論文による発表 0 件

それ以外の発表 0 件

1. 若月修二, 荒木敏之

神経系におけるユビキチンリガーゼ ZNRF1 の機能解析.

第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本

生化学会合同大会 2010 年 12 月 9 日 神戸

2. 三橋 弘明, 林 由起子, 松田 知栄, 野口 悟,
若月 修二, 荒木 敏之, 西野 一三

筋ジストロフィー患者に特異的な A 型ラミン
Ser458 のリン酸化

2) 海外

口頭発表 0 件

原著論文による発表 1 件

それ以外 0 件

論文発表:

1. Mitsuhashi, H., Hayashi, YK., Matsuda, C.,
Noguchi, S., Wakatsuki, S., Araki, T., Nishino, I.

Specific phosphorylation of Ser458 of A-type
lamins in LMNA-associated myopathy patients.

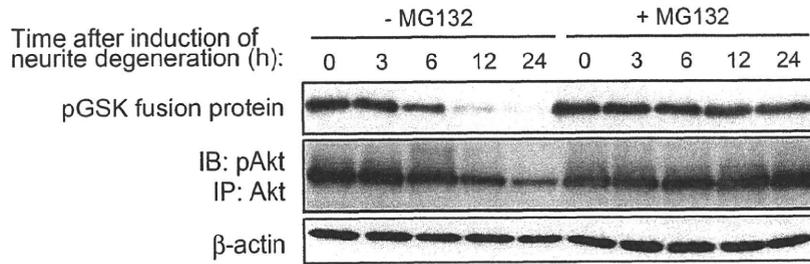
J. Cell Sci. (2010) 123, 3893-3900.

※ 本研究の成果は国際誌に投稿し, 平成 23 年
4 月現在, 改訂稿の作製中である。

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

a



b

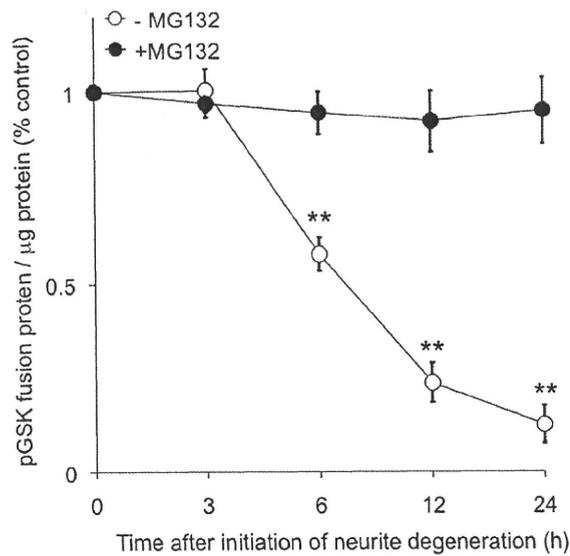
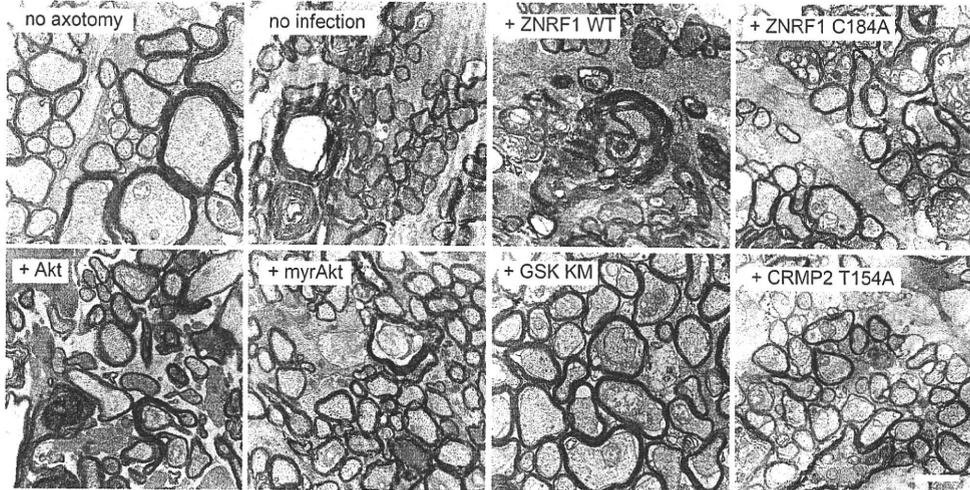


図1. UPS 阻害により軸索変性を抑制すると軸索における Akt キナーゼ活性の減少が抑制される。変性開始後の軸索に含まれる Akt のキナーゼ活性を測定し, UPS 阻害(+MG132)が与える影響について調べた。変性開始後経時的に軸索より調製した細胞抽出液から抗 Akt 抗体を用いて Akt を免疫沈降した免疫沈降物に対して, Akt のリン酸化標的アミノ酸配列を含む合成ペプチド(GSK3 β の Akt リン酸化標的アミノ酸配列に基づく合成ペプチド)を基質として試験管内リン酸化反応を行い, 反応物を電気泳動後に抗リン酸化 GSK 抗体(pGSK fusion protein), 抗リン酸化 Akt 抗体(pAkt)によるウェスタンブロットにより検出した(a)。Akt キナーゼ活性は, 検出された pGSK fusion protein のバンド強度を画像解析により測定し, 反応に用いた合成ペプチド 1 μ g あたりのバンド強度をリン酸基導入能として算出した(b)。

a



b

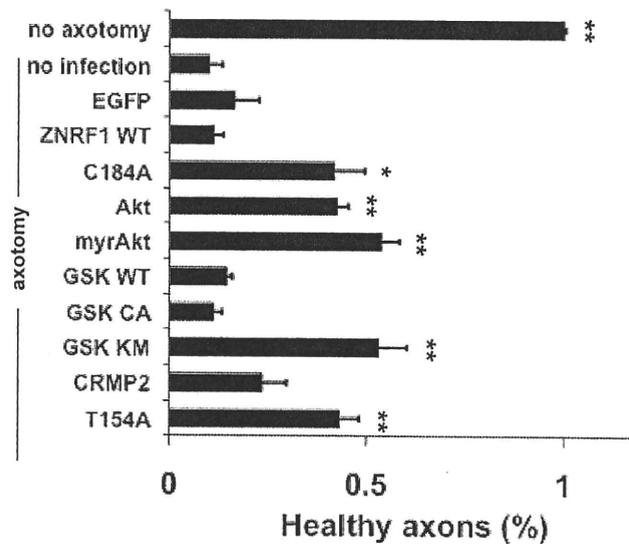


図2. ZNRF1-Akt-GSK3 β -CRMP2 シグナルを阻害することにより、視神経変性を抑制できる。

視神経変性モデルを用いて ZNRF1-Akt-GSK3 β -CRMP2 シグナルの阻害による軸索変性抑制効果を検討した。精製したアデノウイルスベクターを眼球内へ注入することによって網膜神経細胞への遺伝子導入を行い、5日後に視神経を切断して変性を開始した。変性開始5日後に切断部から視交叉までの視神経繊維を取り出し、その中央部分を超薄切し、電子顕微鏡による観察を行った(a)。未変性の軸索は精緻な微小管の配列がドット状に観察され、ミエリン化されている軸索像として観察される(no axotomy)。これを healthy axons と定義して、視野に含まれるその割合を定量した(b)。

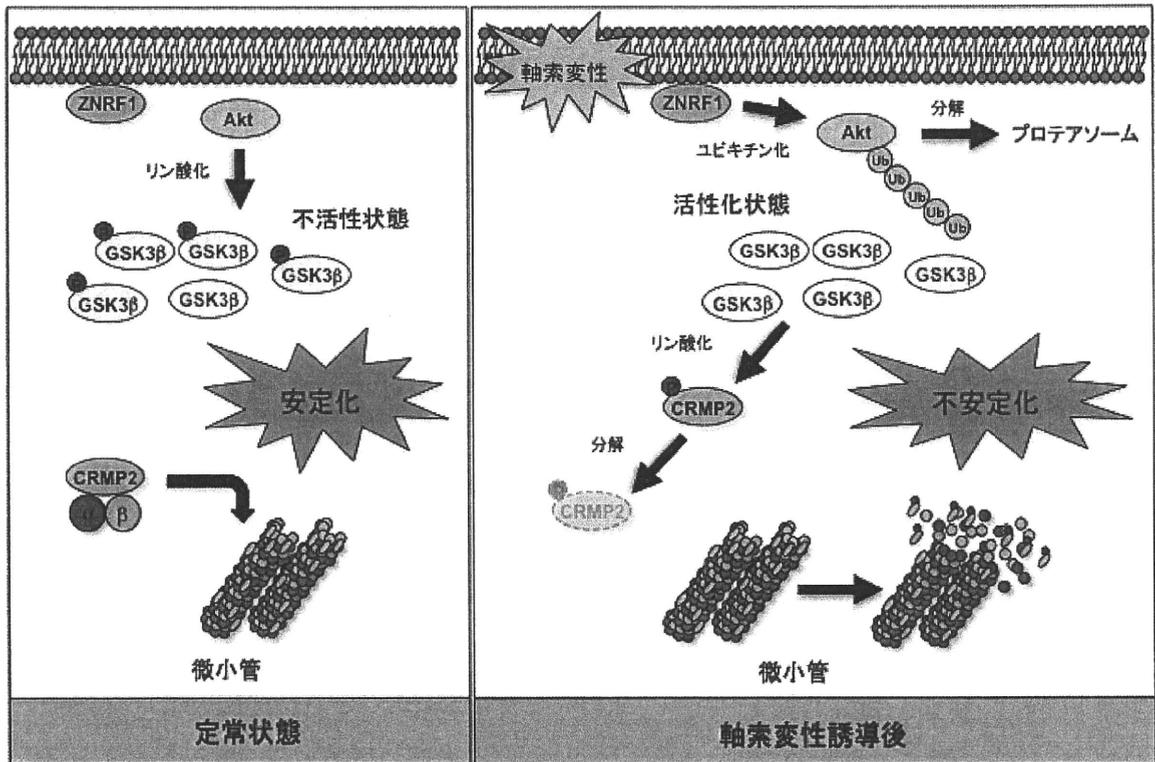


図3. ZNRF1-Akt-GSK3β-CRMP2 シグナルは軸索変性を制御する。

本研究により明らかになった軸索変性の分子メカニズムを図示した。

軸索変性が誘導されていない定常状態の軸索では、グリコーゲン合成酵素 3β(GSK3β)はセリン・スレオニンキナーゼ Akt の活性によりリン酸化されて不活性な状態が保たれているため、CRMP2 によって微小管が維持される(左側:定常状態)。一方、軸索変性が開始されると E3 ユビキチンリガーゼ ZNRF1 のはたらきにより Akt がプロテアソームを介して選択的に分解されるため Akt による GSK3β の活性抑制が失われる。その結果、活性化した GSK3β により CRMP2 がリン酸化されて活性を失い、微小管が崩壊する(右側:軸索変性誘導後)

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

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部

研究者 田辺 公一

研究期間 平成21年4月～平成23年3月

研究要旨 病原真菌の ATP-binding cassette (ABC) タンパク質は、抗真菌薬に対する薬剤耐性化の主要な原因となっている。申請者は、新規 ABC タンパク質が細胞外からコレステロールを取り込んで、病原真菌をステロール合成阻害剤に耐性化することを見出した。この新規薬剤耐性化メカニズムを解明し、効率が高く耐性化を引き起こさない新規抗真菌薬の開発に応用する。

A. 研究目的

真菌症は、現代社会において Immunocompromised host の増加とともに増加傾向にある感染症の1つであるが、国内で認可されている抗真菌薬は少なく、予防投与に伴う菌の薬剤耐性化が臨床において問題となっている。現在使用されている抗真菌薬の多くは、真菌の細胞膜を構成するエルゴステロール合成経路を標的としているため、真菌のステロール代謝の研究は、耐性化を引き起こしにくく、さらに効果の高い抗真菌薬開発のための重要な研究領域である。

病原真菌 *Candida glabrata* は、好気条件でエルゴステロールを合成する一方で、血清などの生体成分からステロールを大量に取り込む (Antimicrob Agents Chemother 44:2411-8, 2000; Antimicrob Agents Chemother 45:3037-45, 2001)。また、*C. glabrata* は血清存在下でステロール合成を阻害する抗真菌薬アゾールに高度耐性化することから (Antimicrob Agents Chemother 45:3037-45, 2001)、真菌のステロール取り込み機構とアゾール耐性には何らかの相関があることが推測された。我々は 2007 年に、ATP-binding cassette タンパク質遺伝子 *CgAUS1* が血清添加で発現が誘導され、コレステロールの取り込みを担うこと、さらに *CgAUS1* 遺伝子を破壊すると血清によるアゾール系抗真菌薬耐性化が起こらなくなることを明らかにした (J Antimicrob Chemother 60:1264-72, 2007)

(図1、2)。

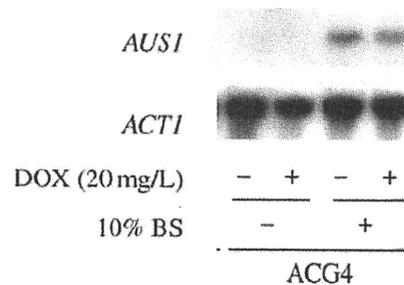


図1 ノザンプロットによる遺伝子発現解析 *C. glabrata* ACG4 株において血清の添加は *CgAUS1* 遺伝子の発現を強く誘導する

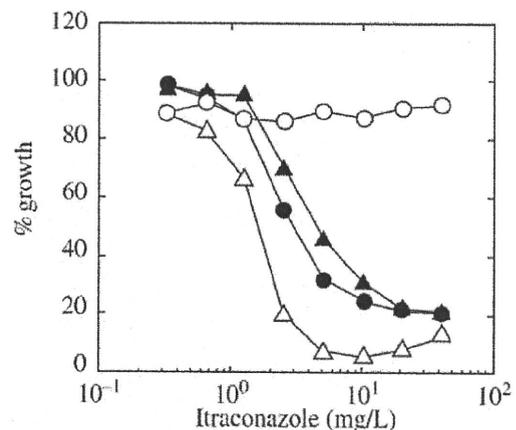


図2 血清添加によるアゾール非感受性化 tet-*AUS1* (ドキシサイクリン添加で *CgAUS1* の発現を選択的に抑制できる株) において血清を添加するとイトラコナゾールによる生育阻害が減弱するが (o)、ドキシサイクリンによって *CgAUS1* の発現を抑制すると血清の効果が失われる (□)。

本研究では、ステロールトランスポーター CgAus1p の細胞内局在と基質特異性を明らかにする。また、*C. glabrata* に取り込まれたステロールの細胞内代謝と細胞内分布を、従来の脂質分析手法と質量顕微鏡を用いて分析する。以上の結果から、血清添加によるアゾール剤耐性化メカニズムを解明する。

また、ステロールトランスポーター CgAus1p の病原性において果たす役割を明らかにする。*C. glabrata* マウス感染モデルにおける *CgAUS1* 遺伝子発現低下変異株の病原性の評価を行った。

B. 研究方法

<脂質分析実験> *C. glabrata* は血清や胆汁の添加によってアゾール系抗真菌薬耐性になるが、コレステロール単独では血清と同程度の薬剤耐性化は認められなかった。血清をゲルろ過カラムで分画して培地に添加することで、アゾール系抗真菌薬耐性に必要な要素の同定を試みる。また、上記培養条件における細胞内ステロールを薄層クロマトグラフィーおよび HPLC によって分析した。また、質量顕微鏡に関する、情報収集を行い、研究計画をたてた。

<マウス感染実験> ドキシサイクリンで *CgAUS1* 遺伝子の発現を特異的に抑制できる変異株 (tet-CgAUS1) を作製し、マウス感染実験に供した。酢酸コルチゾンとシクロフォスファミドによって免疫抑制した CD-1 マウス (1 群 5 匹) に tet-CgAUS1 を尾静脈より接種し、通常の飲料水 (*CgAUS1* の発現あり) またはドキシサイクリンを含む飲み水 (*CgAUS1* の発現が抑制される) で飼育した。感染直後、1 週後、2 週後のそれぞれのマウスから摘出した腎臓をホモジネートし、寒天培地に塗布した。寒天培地に発育するコロニー数から臓器定着率を算出し、病原性の指標として比較検討した。

(倫理面への配慮)

マウス感染実験に関しては、国立感染研の動物実験委員会の規定に従って行った。環境への拡散

も遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律にのっとり、十分に配慮して研究を行っている。

C. 研究結果

血清を陰イオン交換カラムによって分画し、アゾール非感受性化を引き起こす画分の特定を試みた。40mg/L FLC を含む合成最小培地に、血清を DEAE 陰イオン交換カラムによって分画したフラクションを添加し *C. glabrata* の生育を調べた。血清によるアゾール非感受性化活性はフラクション#1-3 (50mM-300mM NaCl 溶出) に、それぞれ同程度認められた。フラクション#1-3 にどのようなタンパク質が含まれるのかを明らかにするために、SDS-PAGE を行った。その結果、フラクション#1-3 には血清に含まれるほとんどのタンパク質が含まれていた。そのため、どのようなタンパク質にアゾール非感受性化活性があるのかを特定することはできなかった。

次に血清添加時の細胞内ステロールの定量を行った。野生型と *aus1*Δ 変異株を血清やアゾールを含む培養条件において細胞から Bligh Dyer 法によって総脂質を抽出し HPLC によってステロールを検出定量した。またフリーとエステル化されたステロールを別個に検出するためにケン化したサンプルと非ケン化サンプルを別々に解析した。コレステロールエステルは野生型と *aus1*Δ 変異株のいずれの細胞からも大量に検出された (図 3、4)。また、アゾール系抗真菌薬の標的分子 CYP51A の機能障害の指標であるラノステロールの蓄積は野生型、*aus1*Δ 株のいずれにも同程度認められた (図 4)。以上の結果はアゾールが野生型、*aus1*Δ 株のいずれにおいても標的分子である CYP51A を同様に阻害していることが明らかになった。

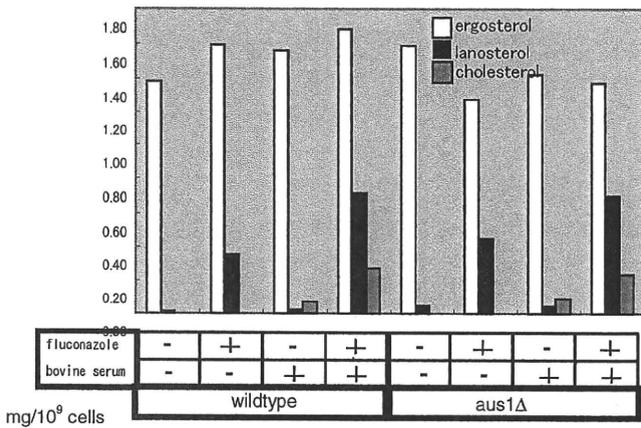


図3 *C. glabrata* 内ステロールの定量

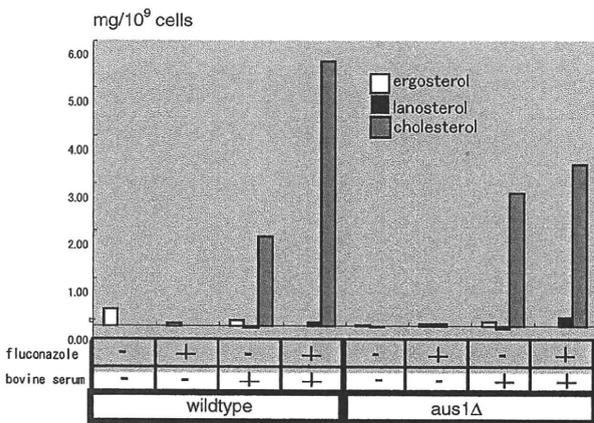


図4 *C. glabrata* 内ステロールエステルの定量

<マウス感染実験>

tet-CgAUS1 およびリファレンス株 ACG4 感染マウスの感染後 6 時間での腎臓定着菌数は $1 \sim 5 \times 10^3$ CFU/kidney となり、各実験群で顕著な差は認められなかった。また 1 週間後の腎臓内菌数に関しては tet-CgAUS1 接種マウスのほうが ACG4 接種マウスよりも最大で約 5 倍高い値を示したが、感染直後からの劇的な菌数の増加という点においては、共通していた。

一方、感染 2 週間後で ACG4 接種マウスではドキシサイクリン投与群と通常飲料水群には約 3 倍の菌数の差異しか認められなかった。一方、tet-CgAUS1 接種マウスにおいてはドキシサイクリン投与群で通常飲料水群の約 1000 倍の菌数の

減少が認められた。

D. 考察

本研究では、血清によるアゾール系抗真菌薬非感受性化機構を明らかにすることを目的とした。

血清を陰イオン交換カラムで分画し、活性画分を分離しようと試みたが、活性はタンパク質を含む画分に広範囲に分布し、どのようなタンパク質が活性を担っているのかを明らかにすることはできなかった。その理由として大量の BSA がカラムの分離能を低下させていることが考えられるため、BSA の除去をまず試みるのが先決かもしれない。

血清添加が細胞内ステロール含量におよぼす影響を明らかにするために、血清添加時の野生型、aus1Δ 株の細胞内ステロールの定量を行った。血清中のリポタンパク質由来のコレステロールエステルがどの細胞からも大量に検出されたことから、リポタンパク質は *C. glabrata* に AUS1 に関係なく取り込まれているあるいは、酵母細胞表面に非特異的に吸着することが示唆された。アゾールが細胞内で機能していることを示すラノステロールが野生型、aus1Δ 株のいずれからも同程度検出されたことから、フルコナゾールの効果を減弱させることが血清によるアゾール系抗真菌薬非感受性化を引き起こしているのではないことが示唆された。以上の結果は、血清によるアゾール系抗真菌薬非感受性化は、これまでの薬剤排出や CYP51A の変異などのような既知の薬剤耐性機構とは全く異なる薬剤耐性化機構であることが推測される。少なくとも細胞外ステロールトランスポーターである AUS1 がこの耐性化に関係することは明らかであるので、今後詳細なステロール分析を行う予定である。

マウス感染実験の結果より、CgAUS1 の発現量が減少すると *C. glabrata* のマウスに対する病原性が減弱することが示唆された。CgAus1p は細胞外ステロールの取り込みに必要なタンパク質であることから、*C. glabrata* は感染時に細胞

外のステロールを取り込まなければ、宿主体内での増殖すなわち病原性を発揮できないと推測できる。

エルゴステロール合成に必須である *ERG9* 遺伝子の発現を抑制すると *in vitro* では *C. glabrata* の生育は抑制される。一方、マウス感染実験における腎臓での菌数には *ERG9* の発現抑制は影響を及ぼさないことが、共同研究者らによって明らかにされている (*Antimicrob Agents Chemother* 44:2411-8, 2000)。この結果は、*C. glabrata* が宿主体内で細胞外からステロールを獲得して増殖することを示唆しており、本研究結果の考察を支持するものである。また、*in vitro* ではほとんど発現しない *CgAUS1* の発現量がマウス腎臓内で増加することも生体内での *CgAus1p* の役割を示唆している。

宿主体内（マウスも人も）は酸素分圧が低く、*C. glabrata* を含む病原真菌は *in vitro* とは異なり嫌気条件で生育すると考えられる。嫌気条件では脂肪酸とステロールを添加しないと真菌は増殖できない。*CgAUS1* の発現低下は *in vivo* での増殖に必須な細胞外ステロールの獲得を阻害し、マウス感染実験における病原性低下につながったのかもしれない。

現在、再現実験を試みているが結果が安定しないため、再現性を得るために異なるマウス感染実験が必要であると考えている。

E. 結論

病原真菌 *C. glabrata* は血清添加によって抗真菌薬アゾールに低感受性になる。脂質分析の結果、アゾールによる静菌効果の指標であるラノステロールは、血清の有無にかかわらず検出された。この結果は、血清存在下でもアゾールが効果的に細胞内の標的分子を阻害しており、*C. glabrata* が既知の薬剤耐性メカニズムとは異なる機構で薬剤耐性を獲得していることを明らかにした。

また、ステロールトランスポーター *CgAUS1* の発現を抑制すると病原真菌 *C. glabrata* のマウス

に対する病原性が減弱した。*CgAUS1* はアゾール系抗真菌薬の効果を増強させることから、*CgAus1p* は抗真菌薬治療効果に大きな影響を及ぼす分子であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 22(2), 291-321, 2009
- 2) Nagi M, Tanabe K, Takano Y, Kikuchi K, Miyazaki Y, Niimi M. Serum or bile affects the *in vitro* azole susceptibilities of *Candida* spp. *Jpn J Infect Dis* 62(4), 306-308, 2009
- 3) Nagi M, Nakayama H, Tanabe K*, Bard M, Aoyama T, Okano M, Higashi S, Ueno K, Chibana H, Niimi M, Yamagoe S, Umeyama T, Kajiwara S, Ohno H, Miyazaki Y. Transcription factors *CgUPC2A* and *CgUPC2B* regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. *Genes Cells*. 2011 Jan;16(1):80-9. (*Corresponding author)
- 4) Nakayama H, Ueno K, Uno J, Nagi M, Tanabe K, Aoyama T, Chibana H, Bard M. Growth defects resulting from inhibiting *ERG20* and *RAM2* in *Candida glabrata*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011, 317(1):27-33

2. 学会発表

- 1) Koichi Tanabe, Minoru Nagi, Erwin Lamping, Brian C Monk, Richard D Cannon, Yoshitsugu Miyazaki and Masakazu Niimi : Domain-shuffled chimeras of *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p reveal structural determinants affecting substrate and inhibitor specificities International Society of Animal