

## エイズの粘膜ワクチンの創製と評価系の基盤構築

所 属 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部

研究代表者 三隅 将吾

研究要旨 SIV とその持続感染細胞を精液に混合後、膣内接種することで経膣感染を模倣できると結論づけた。さらに、腸管および膣内に抗 CCR5 抗体および抗 ENV 抗体を誘導できること、さらに長期的に免疫応答を維持するための交叉抗原を特定できた。

### 研究分担者

- (1) 国立感染症研究所 仲宗根 正
- (2) 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部 庄司省三
- (3) 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部 高宗暢暁
- (4) 株式会社 新日本科学 高橋義博

### A. 研究目的

HIV 初発感染部位である粘膜を標的とした粘膜ワクチンの評価系の基盤構築を目指し、実際に構築した霊長類モデルで粘膜を標的とした新規治療戦略開発を試みることを目的とする。その背景として、主な HIV 標的細胞である CD4 陽性 T 細胞のみならず、粘膜に局在する CD4 陽性マクロファージ・樹状細胞や CD4 陽性 NKT 細胞等もまた重要な HIV の標的であり、これらの細胞における HIV 感染を制御することもエイズワクチン開発のためには重要であると考えられていることや HIV 感染伝播の大半が異性間性交渉による感染であるためである。しかし、本邦において HIV の初発感染部位である粘膜における HIV 感染標的の実態に関する研究は十分であるとはいえないため、粘膜を標的とした抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発が望まれている。実際、粘膜を標的としたワクチン開発にあたり、それら进行评估する霊長類

モデルは、一般的なワクチンに対する霊長類モデル評価系と比べ、本邦では十分整備されていない。例えば、SIV をモデルウイルスとして用いた場合の感染条件の検討（ウイルス摂取量・回数等・感染源の種類）、使用する霊長類の種類と生息地の違いによるチャレンジウイルスの感染効率の差違、粘膜感染ルートの実態把握、粘膜における感染標的の解明等を含めた早期基盤整備が求められるといえる。したがって、本研究では中国産霊長類を用いて HIV 初発感染部位である粘膜を標的とした粘膜ワクチンの評価系の基盤構築と粘膜を標的とした新規ワクチン開発を試みている。以下に本年度得られた知見について報告したい。

### B. 研究方法

#### 1) M細胞標的粘膜免疫ワクチン基材と粘膜ワクチンの改良(庄司)

Gallic acid と D-Lysine からなる新規 M 細胞標的分子 TGDK を固層法により独自の方法で作製した。(Fmoc)<sub>4</sub>-D-MAP-ethylendiamine-Trt-resin (0.51 mmol/ml) から Fmoc を脱保護し、DMF で 5 回洗浄し、7 mmol の Triethylamine (TEA) を加えて攪拌しながら、1 mmol の 3,4,5-trimethoxybenzoic acid chloride を加え 40°C で 120 分間攪拌した。さらに、1% の TEA を含む DMF、および DMF で洗浄することにより (MeO-Galloyl)<sub>4</sub>-D-MAP-ethylendiamine-Trt-resin を得た。次に、メトキシ基の脱

保護と resin からの切り出しを行うことにより、TGDK を得ることができた。この一連の反応を TGDK の合成の反応系として確立できていたが、さらに、TGDK の液相大量合成法の確立を目指し改良を加え実験を行った。熊本大学法人を介して特許申請（特願 2011-175781）は、すでに完了している。

## 2) CCR5 由来環状抗原 cDDR5、外被糖タンパク質 gp140 及び粘膜アジュバント CpGODN 2006 を結合させた粘膜ワクチン抗原の調製と改良および交叉免疫抗原の調製（三隅、仲宗根、庄司）

コア抗原(高分子 PEG)に M 細胞標的分子 TGDK、アカゲザル CCR5 をミミックした cDDR5、B 細胞活性化粘膜アジュバント CpG-ODN 2006、組換え SIVmac239 gp140 をコンジュゲートさせた基礎抗原を調製した。経口投与させるために、すべてをコンジュゲート後、溶液中に賦形剤として乳糖を加え凍結乾燥し得られた粉末を特注の腸溶性カプセルに封入した。アカゲザル CCR5 をミミックした cDDR5 の合成に関しては、CCR5 の細胞外第二ドメインをミミックするように設計し、Cys<sub>178</sub> を除いた R<sub>168</sub>S<sub>169</sub>Q<sub>170</sub>R<sub>171</sub>E<sub>172</sub>G<sub>173</sub>L<sub>174</sub>H<sub>175</sub>Y<sub>176</sub>T<sub>177</sub> 配列に spacer-armed dipeptide(Gly-Lys)を挿入し CCR5 の細胞外第二ドメインの立体構造を模倣した。cDDR5 の合成は、Fmoc chemistry にしたがって合成し、得られた側鎖保護直鎖の C 末端 Gly のカルボキシル基と N 末端 Lys のアミノ基を酸アミド結合により縮合し、環状化した。環状側鎖保護は、Peptide 約 1mg に 12 µl の m-cresol、72 µl の thioanisol、及び 400 µl の TFA を加え、水中で 5 時間攪拌して、その後さらに 36ml の ethane dithiol、80ml の TMBS(Trimethylbromosirane)を加えて 2 時間攪拌し、脱保護を行った。CpG-ODN の合成に関しては、アミノ末端に一級アミンを有するように 6-aminohexanol を結合させたものを

使用した。最後に組換え SIVmac239 gp140 に関しては、SIVmac239 の molecular clone を鋳型として、エンベロープ gp160 から細胞外領域の部分である gp140 を PCR で増幅しサブクローニング後、SIVmac239 gp140 コンストラクトを作製した。gp160 は宿主性因子 furin により切断されることにより maturation することが知られ、また、エンベロープを発現させて調製する際に収量が低下することが知られている。したがって、調製した SIVmac239 gp140 コンストラクトの 2 ヶ所 (R512E, K523E) の点突然変異により組換え体 gp140 を調製し、さらに、発現後の精製のため FLAG 及び MAT の配列をタグとして加えた変異導入 SIVmac239 gp140 を用いた。最終的に調製した組換え体エンベロープ gp140 を African green monkey の腎上皮由来の培養細胞を用いて発現させ、培養上清から組換え体エンベロープ gp140 を精製し、ワクチン抗原として使用した。

次に基礎免疫によって誘導される抗 CCR5 抗体および抗 ENV 抗体を維持するための交叉抗原を調製するにあたり、コア抗原と TGDK を結合させる過程までは従来通り行い、最後に交叉抗原をパイプライン合成によって結合させたものを用いた。なお、交叉抗原に関しては分子量がやく 55kDa のタンパク質で、糖鎖を翻訳後修飾として受けるタンパク質である。

## 3) 粘膜ワクチンおよび交叉抗原の投与及び採取したサンプルの調製（高宗）

2) で調製した粘膜ワクチンの免疫原性を確認するために、雌アカゲザルの鼠径部への皮下注射にて行った。対照群として PEG 3,500 Da を使用した。0、1、および 6 weeks の 3 回投与した。経口投与は、調製した経口用粘膜ワクチンと対照群として BSA、PBS (-)由来の塩を含有した 3,500kDa

の PEG をそれぞれ雌アカゲザル 5 頭ずつに経口投与した。初回免疫前から血清、糞便を回収し、血清は血液を採取後分離し、糞便は約 3 g をアセトンパウダー化しそれぞれ-80°C で保存した。得られたアセトンパウダーから、1% MPC を含む PBS (-) を用いて抗体画分を調製した。また、交叉免疫抗原そのものを経口接種することにより、交叉免疫抗原に対する免疫応答が粘膜に誘導されるかに関しても霊長類を用いて検討した。なお、交叉免疫抗原の接種には腸溶カプセルを用いて 1 mg を週に 2 回経口接種し、粘膜に誘導される IgA の誘導能を ELISA によって確認した。

#### 4) ELISA (高宗)

アカゲザルから回収したサンプルの Rh-cDDR5 及び gp140 に対する抗体の解析は ELISA を用いて行った。ELISA には、一次抗体として採取した血清から IgG 精製カラムを用いて精製した IgG 画分もしくは糞便抽出液中の IgA を用いた。

#### 5) *in vitro* におけるウイルス感染阻害効果の検討 (高宗)

SIVmac239 を IgG 画分または糞便抽出溶液を前処理し、カニクイザル由来 HSC-F 細胞またはインジケーター細胞である MAGIC-5 細胞もしくは Tzm-bl 細胞に感染させた。なお、抗 Rh-cDDR5 抗体のみの効果を検討するために gp140 抗原を、一方抗 gp140 抗体のみの効果を検討する場合は Rh-cDDR5 を前処理した。感染阻害の評価は proviral DNA 量を qPCR assay で行う方法と、MAGIC-5 細胞を X-gal で染色してカウントする方法、もしくは Tzm-bl 細胞可溶化物中の LUC 活性を測定した。

#### 6) ENV ELISA plate の作製 (高宗)

COVALINK™ NH MODULE (Nunc) に PEG を用いて AB-NTA を結合させ、さらに AB-NTA と Ni の錯体形成を利用して調製した SIVmac239 gp140 を結合させた。gp140 のプレートへの結合そのものは、gp140 の C 末端に付加された MAT-tag に依存することになる。プレートのボトムから 3 量体 ENV が露出することを想定したデザインとなっている。

#### 7) cDDR5 Multi-Pin ELISA (高宗)

詳細は、*J. Immunol.* (2009) 182(10):6061-70. を参照願いたい。

#### 8) 抗体精製 (高宗)

温度溶出型 Protein A カラムを用いて IgG 画分の精製をかけ本年度の研究に用いた。温度変化のみで抗体の結合・溶出を制御できるプロテイン A 変異体を、アガロース樹脂担体にカップリングさせた Byzen A は pH 6~8 の中性条件での抗体精製が可能のため、抗体の活性低下や凝集などのリスクを回避できるため本研究に用いた。

#### 9) B-cell elispot assay (高宗)

U-Cytech 社の抗体産生 B 細胞の計数・同定ができる ELISpot キットを用いて測定した。

#### 10) IFN- $\gamma$ elispot assay (高宗)

U-Cytech 社のキットを用いて、CD8+ T 細胞から産生される IFN- $\gamma$  を検出した。

#### 11) western immunoblot analysis (高宗)

ワクチン接種によって誘導された抗血清中の抗 ENV 抗体が実際に、ENV タンパク質に反応するかを検討した。ENV タンパク質は、NIH の AIDS reagent program から提供を受け、CHO 細胞で調製した SIVmac239 由来の ENV タンパク質を

SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、抗血清を用いて解析を行った。

#### 12) 中国産旧世界サル末梢血の採取及び PBMC 調製 (高橋)

中国産旧世界サル末梢血を密度勾配遠心する事により、PBMC を単離した。末梢血は、共同研究先である株式会社 新日本科学にて1頭あたり 10 mL 回収し、ヘパリン血として実験に用いた。

#### 13) SIVmac239 Nef 変異体及び Nef/Env 変異体の作製 (高橋)

Nef 変異体は親株である SIVmac239 にコードされている Nef タンパク質の MHC class I のダウンレギュレーション能といった機能を向上させた変異を導入している。さらに Nef/Env 変異体は、Nef 領域の変異に加え、ウイルス粒子内にウイルスのスパイクタンパク質の取り込みが向上する変異を Env 領域に導入している。各変異体のプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、その培養上清からウイルスを回収した。また、SIVmac239 Nef 変異体をアカゲザルに持続感染させ、QIAGEN の QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて末梢血よりウイルス RNA を調製後、SuperScript III First-Strand Synthesis System を用いてウイルス DNA を調製後、5' LTR および 3' LTR を各々 PCR にて増幅後、間の部分を増幅することによって馴化ウイルスのクローニングを行った。

#### 14) PBMC への SIV 感染及び培養上清回収 (高橋)

PBMC  $1.0 \times 10^7$  cells あたり 120 ng p27 量のウイルスを IL-2 入りの培地で 500  $\mu$ L までメスアップしたものを用いた。ウイルス溶液で懸濁した PBMC を 3,800 rpm (1,200 $\times$ g) 1 時間遠心した (spinoculation)。遠心後、IL-2 入りの培地を 1.5

mL 加え、合計 2 mL ( $5.0 \times 10^6$  cells/mL) で培養した。以降、24 時間毎に上清を回収し、感染後 12~14 日間培養を続けた。

#### 15) MAGIC-5 assay を用いた感染価評価 (高橋)

MAGIC-5 細胞を 96 well plate に  $1 \times 10^4$  cells/well で細胞を播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。次に、PBMC の培養上清を PBMC culture media containing DEAE 20  $\mu$ g/mL で 40  $\mu$ L まで希釈した後、その溶液を MAGIC-5 細胞の上清と置換した。37°C で 2 時間インキュベート後、culture media を添加して 48 時間培養した。培養後に感染細胞数を計数した。

(倫理面への配慮)

1. 国立感染症研において、同研究所内に設置されてある実験動物倫理委員会の規則に従ってサルに対する実験を実施した。
2. 新日本科学において、同研究所にある動物実験倫理指針の規則に従い、実験動物倫理委員会の指導のもと、実験を実施した。
3. 熊本大学実験動物倫理委員会の指針に則って動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に最大限努力し行った。

#### C. 実験結果

##### 1) 霊長類粘膜感染モデルの評価と改良と AIDS 粘膜感染霊長類モデル開発に関する研究について (三隅、仲宗根、高橋) :

宿主性防御因子の一つである遺伝子をホモで有する中国産旧世界サル個体の性周期をホルモン療法によりコントロールし個体間の性周期を同期化後、生理的条件下で子宮頸部の単層上皮細胞が露出している状態で SIVmac239 Nef 変異体とその持続感染細胞を精液とともに膣内へ曝露すると、ヒトにおける経膣感染を模倣したモデルの構築が可能であるという結論に現時点で至っている。なお、本年度 1) SIV に対する感受性を考

慮するとアカゲザルを使用したいが、よりヒトにおける経膣感染をミミックする観点からするとカニクイザルの方が、よりヒトの性周期に近く、年間を通して妊娠可能であるため、カニクイザルの方が適していると判断した。2) カニクイザルの膣部及び子宮頸部、子宮体部の組織解析をする限り、ヒトにおける感染をミミックできると考えられる。膣部、子宮頸部、子宮体部の代表的な組織染色図に関しては、H23 仲宗根委託研究報告書を参照願いたい。さらに 3) 実際にカニクイザルを用いた場合、膣に接種できる感染源の量は 2ml 以下にすべきであると判断される。また、ウイルスと感染細胞を混合後、体温程度に加温し、その後精液を混合すべきであることが判った。4) なお、Marx PA, Spira AI, Gettie A, Dailey PJ, Veazey RS, et al. (1996) Progesterone implants enhance SIV vaginal transmission and early virus load. Nat Med 2: 1084-1089. に性周期を調製し、SIV の経膣感染を促進する方法として Medroxyprogesterone acetate を用いることがレポートされたが、細胞性免疫を誘導するようなワクチンを評価する際には、適切でないという評価もあるため、評価対象であるワクチンがどのようなタイプの免疫を誘導できるワクチンであるか十分考慮して使用すべきであると考えられる。5) 今後本研究グループで使用するモデルでは、ウイルス 10000 TCID<sub>50</sub>/ml (1ml) を感染細胞及び精液とともに複数回接種することにより感染させることにより、ヒトによる経膣感染をミミックしたモデルとして使用できると判断した。

## 2) M 細胞標的粘膜免疫ワクチン基材と粘膜ワクチンの改良と交叉免疫抗原の経口免疫最適化と攻撃接種ウイルスの馴化・調製 (三隅、庄司、高宗) :

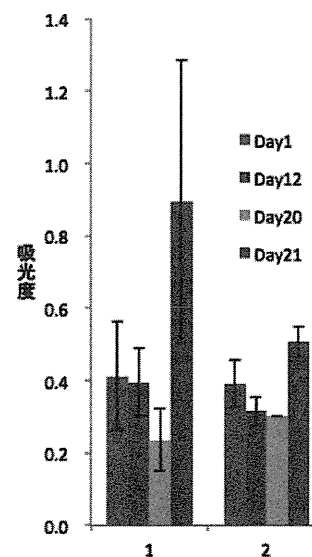
これまでの研究から HIV の経膣感染を粘膜ワクチンで防ぐためには最低限以下の 4 点に留意する必要があると考えている。

- ワクチンによって HIV の感染を阻害できる粘膜免疫応答を賦活化できること。
- 抗 CCR5 抗体をワクチンにより粘膜部位に誘導でき、CD4+CCR5+細胞への感染を防止し保護できること。
- HIV の粘膜からの進入を阻止できる広域中和能

を有する抗 ENV 抗体を粘膜に誘導できること。

d) HIV の粘膜面からのスピーディな進入に対応するために、基礎免疫後誘導された抗 ENV 抗体が HIV が膣内に進入してきた時点ですでに誘導されていること。

a)-c) に関しては、TGDK により粘膜免疫応答を活性化できること、抗 CCR5 抗体を誘導できることを証明している環状ペプチド抗原をワクチン抗原として使用できること、さらに本研究でもちいた三量体 ENV 抗原により粘膜面に抗 ENV 抗体を誘導できることをすでに確認できている。本年度は、特に粘膜免疫誘導の決め手となる TGDK の大量合成法を確立できた(特願 2011-175781)。d) に関しては、22 年度の研究遂行中に基礎免疫後抗 ENV 抗体を継続的に誘導するための交叉免疫抗原を発見できたために、どのようにこの交叉免疫抗原を定期的に経口接種するだけで、粘膜面に抗 ENV 抗体の誘導を維持できるかを明らかにする必要があった。この交叉抗原に関しても既に特許申請が完了した(特願 2011-177385)。なお、この交叉抗原を腸溶カプセルに入れ、霊長類に経口接種させるだけで抗原特異的な IgA が粘膜面に誘導できることも確認できた。下図に示すように 2 1 日目



(紫) に抗原特異的な IgA の産生が見られることが判る。さらに本年度、この交叉免疫抗原によって誘導される抗体が、CCR5 および外被糖タンパク質を特異的に認識することを FACS レベルで明らかにすることができた。このことは、基礎免疫によって誘導された抗 CCR5 抗体及び抗 ENV 抗体が交叉免疫抗原を接種することで維持され、いつウ

ウイルスが腔に侵入してきたとしても、粘膜面から体内へ侵入させないということにつながると考えている。また、コア抗原（高分子 PEG）に M 細胞標的分子 TGDK と交叉免疫抗原を結合させた抗原を接種された個体では、ENV の配列と相同性のある交叉抗原由来のペプチド刺激により CD8+ T 細胞から IFN- $\gamma$  が産生されることが示され、TGDK ラベル化交叉抗原が cross-priming できることが示唆された。

#### D. 考察

現在の HIV 経腔感染モデルにおいて、問題視されている点は、動物モデルで用いられる cell-free virus をどの程度のコピーのウイルスを使用するかであったが、今年度の評価によりウイルス 10000 TCID<sub>50</sub>/ml (1ml) を持続感染細胞および精液とともに接種することが望ましいと判断できた。実験系のコントロール群に完全に経腔感染させる目的で、かなり高いコピー数のウイルスを接種する必要があると考えられたが、少なくとも 10-13 回の接種によって感染が成立すると思われる、ヒトにおける粘膜感染をミミックしたモデルに近づいていると判断できる。なお、現在最終的に、中国産霊長類において馴化させた病原性ウイルスをクローニング中で、クローニングが完成すれば、より適したモデルの作製に使用したいと考えている。

#### E. 結論

本研究の支援により、HIV 粘膜ワクチンの開発を推進するための経腔感染霊長類モデルの構築に寄与できたとともに、M 細胞標的分子 TGDK を用いた抗 CCR5 抗体および抗 ENV 抗体の粘膜面における誘導と交叉抗原を用いた免疫応答の維持という一つのコンセプトが提唱できると考えている。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Nishi K., Komori H., Kikuchi M., Uehara N., Fukunaga N., Matsumoto K., Watanabe H., Nakajou K., Misumi S., Suenaga A., Maruyama

T., Otagiri M.

Effect of recipient-derived cells on the progression of familial amyloidotic polyneuropathy after liver transplantation: a retrospective study.

*J. Pharm. Sci.* 101, 1599-606 (2011)

- 2) Misumi S.

Biochemical analyses of HIV-1 uncoating process based on proteome analysis.

*Seikagaku* 83, 846-850 (2011)

- 3) Ohtsuka K., Sato S., Sato Y., Sota K., Ohzawa S., Matsuda T., Takemoto K., Takamune N, Juskowiak B., Nagai T., Takenaka S.

Fluorescence imaging of potassium ion in living cells using a fluorescent probe based on a thrombin binding aptamer-peptide conjugate.

*Chem. Comm. in press* (2012)

- 4) Takamune N, Irisaka Y, Yamamoto M, Harada K, Shoji S, and Misumi S.

Induction of extremely low protein expression level by fusion of C-terminal region of Nef.

*Biotechnology and Applied Biochemistry* 9 (2012)

##### 学会発表

1. HIV に対する粘膜免疫応答を誘導するワクチンの開発

八城勢造、三隅将吾、高橋義博、大坪靖治、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三

第 10 回 次世代を狙う若手ファーマバイオフ

オーラム PBF2011 講演要旨集 p. 34  
(2011)

2. 交叉免疫抗原を介した抗 CCR5 抗体と抗 Env 抗体の誘導

八城勢造、三隅将吾、高橋義博、大坪靖治、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三  
日本エイズ学会誌 Vol 13, No. 4, p352, (2011)

3. HIV 感染抵抗者から学ぶ HIV ワクチン創製

八城勢造、三隅将吾、高橋義博、大坪靖治、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三  
平成 23 年度日本薬学会九州支部大会講演要旨集 p. 46 (2011)

4. HIV 感染を制御する細胞性因子の探索と経膈感染防止を目的とした HIV 粘膜ワクチン開発  
三隅将吾

日本薬学会第 132 年会 プログラム集 p. 52  
(2011)

5. HIV 粘膜ワクチン評価系構築のための中国産霊長類における宿主性防御因子 TRIM5 $\alpha$  の多型解析

城戸 啓嗣、工藤 康史、大坪 靖治、高橋 義博、増山 光、宗岡 篤信、杉本 幸彦、高宗暢暁、庄司 省三、三隅 将吾  
日本薬学会第 132 年会 プログラム集 p. 144  
(2011)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1) 産業財産権の名称：分子擬態粘膜エイズワクチン

発明者：三隅将吾、庄司省三、高宗暢暁  
権利者：熊本大学

産業財産権の種類、番号：特許、特願  
2011-177385

出願年月日：2011 年 8 月 15 日

国内・外国の別：国内

2) 産業財産権の名称：腸管免疫制御剤

発明者：三隅将吾、庄司省三

権利者：熊本大学

産業財産権の種類、番号：特許、特願  
2011-175781

出願年月日：2011 年 8 月 11 日

国内・外国の別：国内

## 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  
研究期間 平成22年4月～平成24年3月

**研究要旨** 特異的治療薬がないペリチェウスメルツバッハ病 (PMD) は、典型的な先天性の稀少疾病であり、民間製薬企業のみでの創薬研究が難しい状況にある。本研究では、PMD 治療薬の標的分子を、独自の *in vitro* 髄鞘変性システムを用いて探索し、いくつかの積極的な標的候補分子を明らかにした。

### 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 宮本 幸
- (2) 首都大学東京 理工学研究科 久永 眞市
- (3) 株式会社免疫生物学研究所 前田 雅弘

### A. 研究目的

家族性アルツハイマー病や家族性パーキンソン病のような神経細胞それ自体が変性する病気の他に、その神経細胞の機能を補助し神経を保護する役割をもつグリア細胞が変性するような先天性の病気がある。後者の場合、神経細胞変性しているのは神経細胞死が起こり、重篤になるケースも知られている。

20 万人から 30 万人にひとりの割合で病因を有する稀少な中枢神経、とくに脳のエリン(髄鞘)形成不全疾患であるペリチェウスメルツバッハ (Pelizaeus-Merzbacher) 病 (PMD) は、現在、国内にはおよそ 100 家族いる。

その主要な原因遺伝子産物は四回膜貫通型構造を有すると推定される PLP1 蛋白質である。しかし、この主要な原因遺伝子が同定されたにもかかわらず、今日に至っても、その特異的治療薬が開発されていない。

その理由のひとつは、治療標的分子が明らかにされていないことである。また、治療の難易度を高めているのは、その組織構造にも、その理由がある。主な病変組織は髄鞘であるが、その構造が複雑なためである。それは希突起膠細胞 (オリゴデンドロサイトまたはオリゴデンドログリア細胞) が神経軸索の周りを幾重にも巻くという構造をとっている。もし再生医療技術を応用としても、きわめて難易度の高いものになることが予

想される。

先にも述べたが、この疾患の難治性を高めている要因は、髄鞘変性から始まり、最終的には、神経変性がおきることにある。さらに、その病変組織は次第に脳の広範囲の組織に広がり、ミクログリア細胞などの他の細胞にも病変が観察されるようになる。つまり、病態進行過程がきわめて複雑で、その治療対象は多岐に渡るのである。

本研究では、まず、オリゴデンドロサイト変性に焦点を焦点をあて、PMD 治療薬開発を目的とした PMD 治療の分子標的を明らかにすることを試みている。

それぞれの分担研究においては、研究グループ独自で開発した *in vitro* 髄鞘変性システムを利用して、その変性を改善することを指標に、さまざまな PMD 標的分子の探索研究が行われている (国立成育 宮本、首都大学 久永、免疫生物前田)。さらに、並行して、動物実験レベルでのそれら標的分子の評価試験を行うための新たな遺伝子改変技術の開発を遂行している (国立成育山内)。

### B. 研究方法

【*in vitro* で神経組織を再現するための必要な神経細胞の単離】

まず、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% トリプリン (シグマ社が良い) で処理し、細胞を分散させる。その後、I 型コラーゲン基質



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。

#### 【in vitro で神経組織を再現するための必要なグリア細胞の単離】

次に、グリア細胞の単離に関して述べる。オリゴデンドロサイトの単離はきわめて難しいが、研究分担者と研究代表者によって、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、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、沈殿した細胞をポリリジン (PLL) (シグマ社が良い) 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 (シグマ社が良い) 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。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、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。

#### 【in vitro で髄鞘変性を再現するシステム】

精製され、十分に神経軸索を伸ばした神経節神経細胞上に、およそ  $3 \times 10^6$  個のオリゴデンドロサイト（正確に述べると、オリゴデンドロサイト前駆細胞）をまく。さて、上述の分化培地で、およそ 5 から 7 日間、2 細胞間の接触培養を行うと、

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、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を感染させる（タカラ-クロンテック社由来のレトロウイルスシステムによるウイルス作成）と、生理的にみられる髄鞘形成不全（および髄鞘変性）が in vitro で再現される。この実験系は、研究分担者らが 2008 年に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）した培養系に若干の変更を加えたシステムである。

#### 【in vitro 髄鞘変性システムを利用して、それを改善する治療薬標的分子のスクリーニング研究】

PLP1 発現により誘導された髄鞘変性を改善または抑制する標的分子を明らかにするために、研究代表者と研究分担者によって作成された線状型 RNA (shRNA) ライブラリーを、レトロウイルス（タカラ-クロンテック社）にパッケージングしたものを、ウイルス力価/MOI 値（タカラ-クロンテック社キットで測定）0.3 から 1 の範囲内で、PLP1 と同時に、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。

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、この新しい標的遺伝子探索の実験系では、神経細胞へのサイドエフェクト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（国立成育 宮本）。

一方、PLP1 のみをオリゴデンドロサイトに感染させ変性させた髄鞘を、低分子化合物ライブラリーや抗体ライブラリーを利用して、そのなかから改善するものを探索する研究も並行して行われている（首都大学 久永、免疫生物 前田）。

#### 【細胞変性のアッセイ】

細胞変性のアッセイは、髄鞘変性の場合、抗ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) などを用い、それら

の変性の程度を測定する。つまり、抗 MBP 抗体に蛍光基質をつけ、髄鞘が形成されていれば強い蛍光は測定され、変性していれば蛍光は測定されない。この場合、髄鞘の変性の程度を蛍光顕微鏡システムを装備したマイクロプレートリーダーを用いて、蛍光強度の減少や蛍光ドットの強度の減少などによって判定することができる。これらの測定プログラムはデフォルトでマイクロプレートリーダーに装備された一般的なものを用いている。

#### 【治療薬標的分子の評価のための新規遺伝子改変技術の開発】

一方、治療薬標的分子を動物実験レベルで評価するために、多大な作成時間を要するノックアウト技術とは異なった新規遺伝子改変技術、shRNA トランスジェニック（発現抑制またはノックダウン）技術の開発研究を行う（国立成育 山内）。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。特に、マウスの受精卵への効率的な遺伝子導入には免疫生物学研究所の技術が導入されている。

#### （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、研究代表者は独立行政法人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

【*in vitro* 髄鞘変性システムを利用して、それを改善する探索研究（国立成育 宮本、首都大学久永、免疫生物 前田）】

以下、順番に、それぞれの研究手法で髄鞘変性を改善する標的分子を記載する。とくに強い効果を示した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) 神経栄養因子受容体 TrkB
- (2) 神経栄養因子受容体 TrkC
- (3) ヘレグリン受容体 ErbB2
- (4) ヘレグリン受容体 ErbB3
- (5) DQ118679 蛋白質
- (6) DQ118680 蛋白質
- (7) DQ124295 蛋白質
- (8) DQ309763 蛋白質
- (9) Akt1 蛋白質

の各分子のノックダウンが、改善効果を示した。

### ② 低分子化合物を用いた実験から

- (1) 神経栄養因子受容体阻害剤
- (2) ヘレグリン受容体阻害剤
- (3) Src ファミリー阻害剤
- (4) Akt 阻害剤

が改善効果を示した。

### ③ 抗体を用いた実験から

- (1) 神経栄養因子受容体に対する中和抗体
- (2) ヘレグリン受容体に対する中和抗体

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。

- (4) DQ118679
- (5) DQ118680
- (6) DQ124295
- (7) DQ309763

これは 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。

#### 【治療薬標的分子の評価のための新規遺伝子改変技術の開発（国立成育 山内）】

新規の shRNA トランスジェニックマウスの作成に用いる shRNA トランスジーンのコストラクトの開発に成功した。このトランスジーンは、効率よく shRNA 配列を転写させるプロモーター配列と強くその転写を停止させる配列を含んでいる点が新しい。

この技術開発は、試験的に DQ118679 と DQ118680 を標的としたマウスを作成することで達成され

た。

これらを選んだ理由としては、他の標的分子のノックアウトマウスや抑制変異型分子の発現するマウスは既存であり、その全てが胎生または発生致死の表現を示すためである。したがって、shRNA トランスジェニックマウスの技術開発研究には不向きであると考えられたためである。

この技術はトランスジェニック技術をベースにしているため、ノックアウトマウスの作成と異なり、遺伝子改変マウスの作成時間、実験方法の簡便さ、コスト面で優れたものであった。とくに、作成時間はきわめて短く、探索研究で明らかにされた分子を生体レベルで検定するのに適した系であると考えられる。

#### D. 考察

異なった3種類の探索研究から、髄鞘変性を改善する標的分子を単離することに成功した。なかでも注目すべきことは、異なったスクリーニング方法から、同じ分子が同定されたことである。したがって、これらの分子はすくなくとも *in vitro* においては、髄鞘変性を改善できる、確かな標的分子である。

新規遺伝子改変技術の開発に成功した。マウスの作成時間、実験方法の簡便さ、コスト面で優れたものであった。そのため、標的分子を動物レベルで評価するのに適したものであることが示唆された。今後、これらのマウスを用い、PMD モデルマウスと交配させ、PMD 型髄鞘変性が生体レベルで改善されるかどうか検討したい。

#### E. 結論

髄鞘変性を改善する標的分子を単離することに成功し、そのなかで3種類の探索研究から、神経栄養因子受容体とヘレグリン受容体が共通の標的分子として獲得された。

また、機能未知の新規遺伝子もいくつか単離され、今後これらの標的分子が動物レベルで、髄鞘変性に対して改善効果があるかどうか検討する予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Junji Yamauchi\*, Yuki Miyamoto, Hajime Hamasaki, Atsushi Sanbe, Shinji Kusakawa, Akane Nakamura, Hideki Tsumura, Masahiro Maeda, Noriko Nemoto, Katsumasa Kawahara, Tomohiro Torii, and Akito Tanoue (2011) The atypical guanine-nucleotide exchange factor, Dock7, negatively regulates

Schwann cell differentiation and myelination. *J. Neurosci.* 31, 12579-12592:

\*Corresponding author

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

\*Corresponding author

(代表的な2発表のみを記載した。)

#### 2. 学会発表

(1) 山内淳司: ダイナミックな形態分化を伴い、神経軸索のミエリン化を制御するマウス Rho 活性化因子 Dock7 (日本生化学会企画シンポジウム 細胞の形態・運動を制御するシグナル伝達ネットワーク: 企画/座長 加藤裕教、山内淳司) 日本生化学会大会 2011年9月・横浜

(2) 宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司: Ras/ERK 経路は中枢神経ミエリン形成不全を誘導する (トークセッション) 日本生化学会大会 2011年9月・横浜

(代表的な2発表のみを記載した。)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

(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物及び治療剤 特願 2010-281777 出願日 2010年12月17日 (HS 振興財団を通して、財団の指導のもと申請されたものである。)

(3) 山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏、前田雅弘「ペリチェウス・メルツバッハ病治療方法及びそれに用いる治療剤」特願 2012-021272 出願日: 2012年2月2日

##### 2. 実用新案登録

該当無し。

##### 3. その他

該当無し。

## 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** 先天性の脳の髄鞘変性疾病であるペリチェウスメルツバッハ病（PMD）には特異的な治療薬がない。本研究では、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。当該年度においては、新たな標的候補分子を明らかにすることに成功した。

### 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 宮本 幸
- (2) 首都大学東京 理工学研究科 久永 眞市
- (3) 株式会社免疫生物学研究所 前田 雅弘

### A. 研究目的

先天性の脳の神経変性症には、家族性アルツハイマー病や家族性パーキンソン病のように比較的早期に発症し、神経細胞それ自体が変性する疾患の他に、神経軸索を保護し電気伝導効率を上昇させる役割をもつ髄鞘が変性し、その結果として、神経細胞を含む神経組織全体を変性、萎縮させる種類の疾患も存在する。

どちらの場合も、その治療には神経保護が重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、現在のところ、臨床応用された神経変性、髄鞘変性に有効な治療薬はきわめて少ない。

さて、後者の髄鞘が変性する疾患に関してはあまり知られていないので補足する。遺伝性の中枢神経、とくに脳組織の髄鞘変性疾患（脊髄より脳重篤な変性を生じることが知られている。）はペリチェウスメルツバッハ病（Pelizaeus-Merzbache disease, PMD）とよばれ、20、30 万人にひとりの割合で病因を有する稀少疾病である。

症状として、頭部の振戦、眼振、歩行時のふらつき、運動障害、言語障害、精神運動発達退行などがみられる重篤なものである。病気が進行すると髄鞘がほとんど消失してしまうため、生命が危険に曝される。

PMD の主要な原因は四回膜貫通型構造を有すると推定されている *p1p1* 遺伝子の重複、欠損、変異などの異常によるものであるが、その発症の分

子機構に関しては不明な点が多い。

しかしながら、PMD は、このように重篤な症状を示すにもかかわらず、その治療は対処療法のみである。その理由は、特異的な治療標的分子および、その治療薬が存在しないことが最大の原因である。

このことは、他の神経変性症の場合と同じであり、神経変性、髄鞘変性を伴う病気に関する共通した問題でもある。総じて、これらの基礎医学研究は国内外を問わず、非常に遅れているという指摘がある。

さらに、病変対象の細胞、組織は多岐に渡り、神経細胞や脳髄鞘形成を担うオリゴデンドログリア細胞（オリゴデンドロサイト）の他に、アストロサイトおよびミクログリアにも異常があると報告されている。

本研究は、まず、オリゴデンドロサイト治療に焦点を絞り、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 *in vitro* 髄鞘変性システムを用い、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

#### 【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 (理研細胞バンクに登録されている) 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。

#### 【In vitro 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。

#### 【In vitro 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%トリプリンで処理し、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 in vitro 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。

これらのシステムの正確な名称は in vitro 髄鞘変性システムというのが妥当である。

#### 【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おのこの干渉配列の 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シングを行うことで、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  $\mu$ 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  $\mu$ 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（テカン社 Infinite M200 マイクロプレートリーダーシステム）。

#### 【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（成育医セ 山内）】

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交配させること

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。

#### 【新規 shRNA トランスジェニックマウスの開発研究 (成育医セ 山内)】

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。

まず、新規の遺伝子改変マウス技術を開発するために、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) マウスを作成することにした。結果として、当該年度で、その開発に成功した (研究代表者ら J. Neurosci. 2011)。

#### 【新規トランスジーンが安定して生殖ラインにのるかどうかの判定方法】

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' -CAATCATGAGCAAGGGAGAAGAACTCTTTACTGGTGTGTC-3'

お よ び  
5' -TTTACTTGTACAGCTCATCCATCCCAGAGTAATTCCTGC-3'

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

お よ び  
5' -GCTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTG-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' -CCGGGATCCAAGCTTTGTGAAGTGGCGGCTCCAAGTCG-3' お よ び 5' -CCGGGATCCCATTACTGGCCTGGTCTTAGTTATCTTTG-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 のノックダウンの効果を、蛋白質レベルで判定した。

(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

【モデル細胞を用いた探索研究（主として首都大学 久永）】

いくつかの低分子化合物が、PLP1 を発現させ変性させたオリゴデンドロサイト FBD-102b モデル細胞細胞を改善する効果を示した。その典型的な形態を以下に示す（図1）。

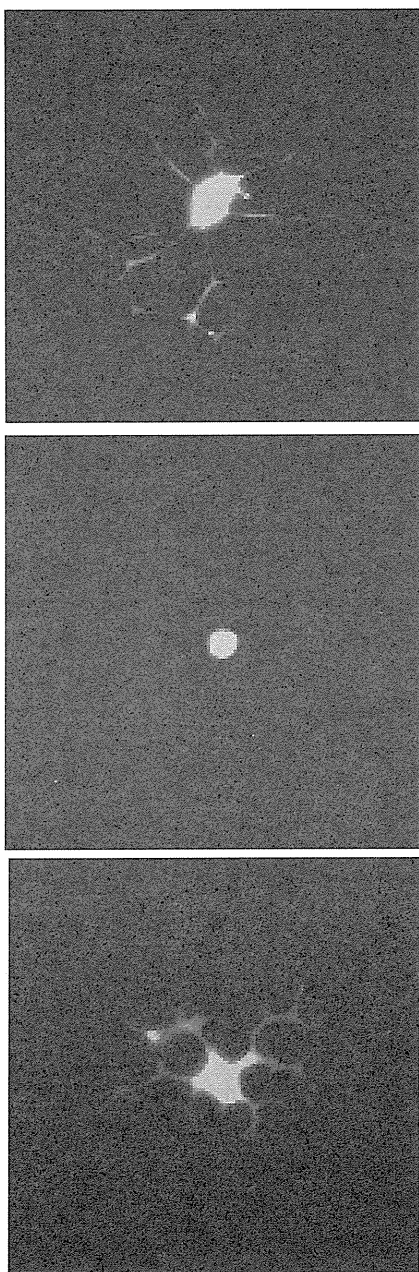


図1 低分子化合物が、PLP1 によって引き起こされた FBD-102b 細胞の髄鞘

様突起構造の変性を抑制する典型的な例を示す。上図は FBD-102 細胞にコントロール IRES-ZsGreen を導入した（実際は緑色蛍光を発している）ものである。上の図は、変性していない正常な髄鞘様突起構造をもつ分化細胞を示し、真ん中の図は PLP1-IRES-ZsGreen を導入したもので、髄鞘様突起構造がほとんど消失し、変性した状態を示す。一方、下の図では PLP1-IRES-ZsGreen は導入されているが、低分子化合物の処理で、髄鞘様突起構造がほぼ回復した。

【In vitro 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2に載せる。

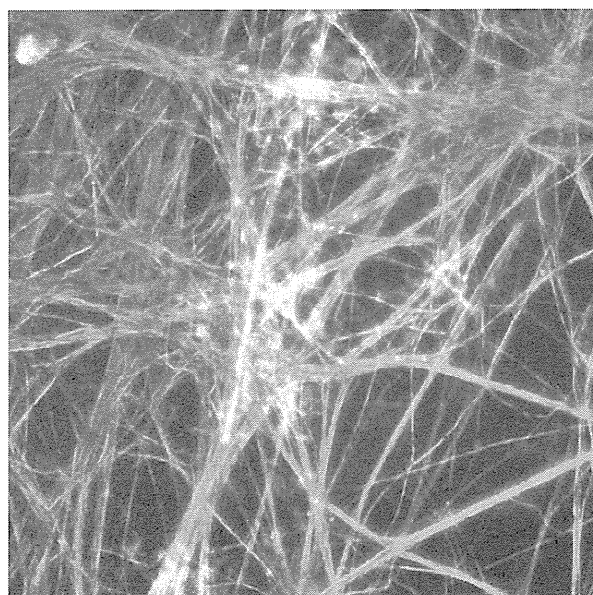


図2 PLP1 をコードするレトロウイルスと shRNA ライブラリーをコードするレトロウイルスを共感染させ、PLP1 による髄鞘形成不全を改善した例（実際は蛍光染色画像である）。髄鞘が形成されたことを示すミエリン塩基性蛋白質（MBP）と神経線維を共染色した。神経軸索上に多数の髄鞘が形成されていることが分かる。

【これらの培養系を用い、当該年度に明らかになった治療薬標的の候補分子（成育医セ 宮本、首都大学 久永、免疫生物 前田）】



① ShRNA ライブラリーを用いた研究

- (1) ヘレグリン受容体 ErbB2
- (2) ヘレグリン受容体 ErbB3
- (3) Akt1 キナーゼ

のノックダウンで髄鞘変性の改善効果を示した。

② 阻害剤ライブラリーを用いた研究

- (1) Akt キナーゼ
- (2) ErbB 型キナーゼ
- (3) Src キナーゼ

の阻害でモデル細胞での髄鞘変性の改善効果を示した

③ 抗体を用いた研究

スクリーニングの途中であるため、新たな標的は同定されなかった。しかし、以前単離した以下の機能未知の標的分子がリン酸化蛋白質であるということが判明したため、その特異的リン酸化抗体を作成した。これらの抗体作成で、それぞれの蛋白質に対して 2 種類の抗体が作成できたため、これらを用い、今後、さまざまな局面で活躍すると考えられるサンドイッチ型 ELISA システムが開発できると考えられる。

- (1) pDQ118679
- (2) pDQ118680
- (3) pDQ124295
- (4) pDQ309763

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

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。

もしこのマウス作成法が完成すれば、それと PMD 病態モデルマウスを交配させることで、*in vivo* で PMD の病態が改善されるかどうかを評価できるシステムが開発できる。

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、この過程で技術確立を行う。そこで、この新規 ShRNA トランスジェニックマウス作成技術が通常のトランスジェニックマウスと等しいレベルの品質で作成されているかということ、作成成功の確

率、ゲノム内での維持、特異的蛋白質のノックダウンの効果の 3 種類のクライテリアから判断していきたい。

① ShRNA トランスジェニックマウスの作成確率に関して。ShRNA 干渉配列を有するトランスジェンを受精卵にインジェクションし、生まれてきた目的のマウスが生殖ラインに維持される確率はほぼ 100%であった。このトランスジェニックマウス作成の維持率は通常のトランスジェニックマウスの作成成功率と高いことが分かった。つまり、この新規トランスジェニック配列の骨格配列 (ただし、ShRNA 自体は標的配列が挿入されている) はマウス受精卵および発生過程においても、有毒性を示さないことが分かった。

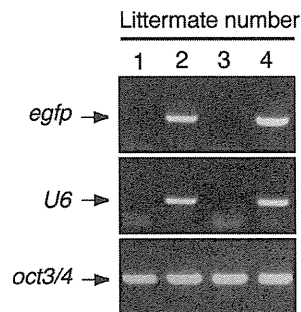


図 3 ゲノム PCR によるトランスジェニックの検出と典型的な遺伝子変位マウス作出率に関して。マウスの尾部からゲノムを抽出し、それをトランスジェニック特異的なプライマーを用いたゲノム PCR 法により、産出されたマウスがトランスジェニックポジティブかどうかを判定した一例である。トランスジェニック特異的 *egfp* 及び *U6* プロモータープライマーとポジティブコントロールである *oct3/4* プライマーが示されている。この実験例ではライン #2 と #4 がトランスジェニックポジティブである。

② マウスゲノムへのトランスジェニックの挿入に関して。また、マウスのゲノム内で維持されるのトランスジェニックの個数であるが、サザンブロットによる定量から、現在作成中のもも含めて、いくつか ShRNA トランスジェニックマウスで、30 個前後であること (図 4) が明らかになった。この数値も、通常のトランスジェニックマウスでの数値とほぼ一致している。したがって、極端に多くのトランスジェニックが染色体内に挿入されることも、その骨格自体が自己複製することもないことが

分かった。

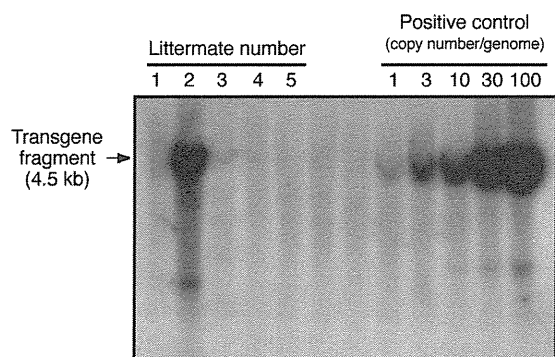


図4 サザンブロットによるマウスゲノム(染色体)でのトランスジーンのコピー数に関して。左側の矢印の箇所がトランスジーンのコピー数を比較するために置いた陽性コントロールである。この典型的なサザンブロットでもトランスジーンのコピー数が30個であることが分かる。

また、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)法を用いた解析から、トランスジーンが染色体の複数の箇所ではなく、一箇所にのみ挿入されていることが判明した。図5にその一例を示す。

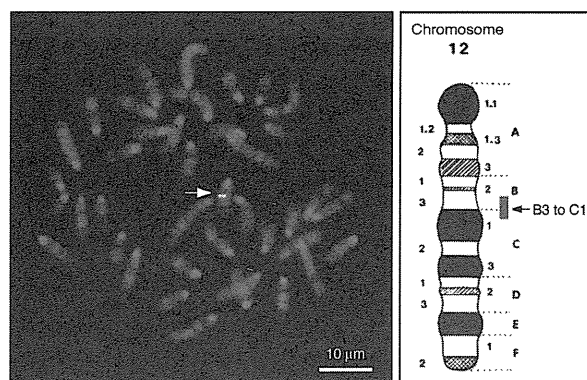


図5 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)によるマウスゲノム(染色体)でのトランスジーンを検出。左図の矢印の箇所が染色体内で維持されているトランスジーンである。一箇所に挿入されていることが分かる。この写真では、染色体の濃淡バンドの分布の形状から、トランスジーンがマウス第12番染色体の一箇所に存在していることが分かった。

③ 実際の生体内でのノックダウン効果に関して。生体レベルで十分なノックダウン効果が観察されている(新たに投稿準備中)。

以上、このShRNA トランスジェニックマウス作成技術の品質は、通常のトランスジェニックマウスの品質と同等か、もしくはそれ以上であることが明らかになった。

#### D. 考察

【探索研究から同定された共通の標的分子(成育医セ 宮本、首都大学 久永、免疫生物 前田)】

興味深いことに、まったく異なった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。それらは、(1)ヘレグリン受容体 ErbB2 (2)ヘレグリン受容体 ErbB3 (3)Akt1 キナーゼである。これらの分子は標的候補である可能性が高いと考えられる。一方で、ヘレグリン受容体は以前の探索研究からも単離されているものである。

【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)】

治療薬標的分子の候補として期待される分子の多くは、その機能を阻害することで治療効果が期待される。したがって、生体内で標的分子を阻害し、期待される成績が得られるかどうかを判断するのに適したシステムの確立が必要不可欠であった。

本研究では、その確立に挑戦し、そのシステムをほぼ完成させた。そのシステムとは、新たに構築された生体ノックダウン用のトランスジーン配列内のShRNAの箇所に、それぞれの治療薬候補分子をノックダウンする遺伝子配列を挿入し、それぞれのトランスジーンをマウス受精卵にインジェクションさせるという系である。これは通常のトランスジェニックマウス作成方法を利用しているため、それぞれのマウスの作成に要する時間が短く、作成にかかる費用が比較的安価である。

また、重要なことは、このShRNAの標的遺伝子の配列は、並行して行われている研究グループ内のスクリーニング研究から得られ、in vitroで脱髄抑制、髄鞘促進効果を示した標的配列とまったく同じであるということである。つまり、in vitroで取得できた結果を生体レベルでも適用可能であることが実証でき、実験の相関性が容易に得ら

れることが判明した。

さらに、この技術は受託研究の目的である中枢神経脱髄疾病や他の神経変性疾患以外にも多くの疾病における治療薬開発研究で、in vitro スクリーニングと in vivo 検証研究を繋ぐ実験系になるのではないかと期待できる。

## 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、阻害剤、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が示唆される。それは、

- (1) ヘレグリン受容体 ErbB2
  - (2) ヘレグリン受容体 ErbB3
  - (3) Akt1 キナーゼ
- である。

【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)】

治療効果が期待される治療薬標的分子は、それが機能阻害されることで、治療効果が発揮されることが多い。したがって、治療薬標的候補分子の治療効果が期待できるかを生体レベルで評価できるような創薬標的機能をもつマウス作成技術の確立が重要な問題であった。これを解決するために、受託研究では、トランスジェニック技術を応用した新規の遺伝子改変マウス作成技術を開発することに成功した。

その技術の特性をまとめると、

- (1) 開発したトランスジーンで ShRNA トランスジェニックマウスを作成することができ、その遺伝子配列はマウス受精卵や発生過程で毒性を示さない優秀なものであった。
- (2) そのトランスジーンはマウスゲノム内で安定に維持され、自己複製することなどはなく、遺伝子改変過程で起こるゲノムへの二次的影響は現在のところ認められない。
- (3) マウス生体レベルでの ShRNA による特異的蛋白質のノックダウン効果は、in vitro でのノックダウン効果とほぼ等しいレベルであった。
- (4) in vitro で期待された髄鞘形成を促進するという治療効果が、ShRNA トランスジェニックマウ

ス由来の髄鞘組織でも観察された。

(5) この ShRNA トランスジェニックマウス作成技術は、関与する他の神経疾患ばかりではなく、他の多くの疾患に関する新しい治療標的分子を生体レベルで評価することにも応用できることが期待される。

が挙げられる。

また、この技術が、特に上述の小括(3)と小括(4)から、簡便なものであり、小括(1)と小括(2)から迅速性にも経済性にも優れていることが判明した。

## F. 健康危険情報

稀少疾病研究であるため、該当しないと考えられる。

## G. 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究所 山内、宮本】

- (1) Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Hajime Hamasaki, Atsushi Sanbe, Shinji Kusakawa, Akane Nakamura, Hideki Tsumura, Masahiro Maeda, Noriko Nemoto, Katsumasa Kawahara, Tomohiro Torii, and Akito Tanoue (2011) The atypical guanine-nucleotide exchange factor, Dock7, negatively regulates Schwann cell differentiation and myelination. *J. Neurosci.* 31, 12579-12592
- (2) Kazuaki Nakamura, Natsuko Kato, Kazuko Aizawa, Reiko Mizutani, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue (2011) Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with a nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. *J. Toxicol. Sci.* 36, 625-633
- (3) Kazuaki Nakamura, Reiko Mizutani, Shigetoshi Yokoyama, Atsushi Sanbe, Shinji Kusakawa, Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Hiroshi Asahara, Haruo Okado, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue (2011) Evaluation of drug toxicity with hepatocytes cultured in a micro-space cell culture system. *J. Biosci. Bioenz.* 111, 78-84

(4) Atsushi Sanbe, Tetsuro Marunouchi, Junji Yamauchi, Kouichi Tanonaka, Hideo Nishigori,

and Akito Tanoue (2011) Cardioprotective effect of nicorandil, a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener, prolongs survival in HSPB5 R120G transgenic mice. *PLoS One* 6, e18922

(5) Kazuaki Nakamura, Tatsuya Yamashita, Hiroyuki Fujiki, Toshinori Aoyagi, Junji Yamauchi, Toyoki Mori, Akito Tanoue (2011) Enhanced glucose tolerance in the Brattleboro rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 64-67

(6) Reiko Mizutani, Kazuaki Nakamura, Shigetoshi Yokoyama, Atsushi Sanbe, Shinji Kusakawa, Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Hiroshi Asahara, Haruo Okado, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue (2011) Developmental expression of sorting nexin 3 in the mouse central nervous system. *Gene Expr. Patterns* 11, 33-40

#### 【首都大学東京 久永】

(1) Hayashi, Y., Nihonmatsu-Kikuchi, N., Yu, X., Ishimoto, K., Hisanaga, S., Tatebayashi, Y. A novel rapid, quantitative cell-counting method reveals oligodendroglial reduction in the frontopolar cortex in major depressive disorder. *Mol. Psychiatry* 16, 1156-1158

(2) Sato, K., Minegishi, S., Takano, J., Plattner, F., Saito, T., Asada, A., Kawahara, H., Iwata, N., Saido, T., Hisanaga, S. (2011) Calpastatin, an endogenous calpain-inhibitor protein, regulates the cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25. *J. Neurochem.* 117, 504-515

(3) Yoshioka, N., Kimura-Kuroda, J., Saito, T., Kawamura, K., Hisanaga, S., Kawano, H. (2011) Small molecule inhibitor of type I transforming growth factor-beta receptor kinase ameliorates the inhibitory milieu in injured brain and promotes regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons. *J. Neurosci. Res.* 89, 381-393

#### 【株式会社免疫生物学研究所 前田】

(1) 同 *J Neurosci* 31, 12579-12592

(2) Hasegawa M, Segawa T, Maeda M, Yoshida T, Sudo A (2011) Thrombin-cleaved Osteopontin Levels in Synovial Fluid Correlate with Disease Severity of Knee Osteoarthritis. *J Rheumatol* 38 129-135

(3) Zhang D, Kobayashi T, Kojima T, Kanenishi K, Hagiwara Y, Abe M, Okura H, Hamano Y, Sun G, Maeda M, Jishage K, Noda T, Hino O (2011) Deficiency of the Erc/mesothelin gene ameliorates renal carcinogenesis in Tsc2 knockout mice. *Cancer Sci* 102 720-727

(4) 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

(5) Hata S, Fujishige S, Araki Y, Taniguchi M, Urakami K, Peskind E, Akatsu H, Araseki M, Yamamoto K, Martins RN, Maeda M, Nishimura M, Levey A, Chung KA, Montine T, Leverenz J, Fagan A, Goate A, Bateman R, Holtzman DM, Yamamoto T, Nakaya T, Gandy S, Suzuki T (2011) Alternative processing of  $\gamma$ -secretase substrates in common forms of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: evidence for  $\gamma$ -secretase dysfunction. *Ann Neurol* 69 1026-1031

(6) Shiomi K, Shiomi S, Ishinaga Y, Sakuraba M, Hagiwara Y, Miyashita K, Maeda M, Suzuki K, Takahashi K, Hino O (2011) Impact of renal failure on the tumor markers of mesothelioma, N-ERC/mesothelin and osteopontin. *Anticancer Res* 31 1427-1430

#### 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) 鳥居知宏、宮本 幸、田上昭人、山内淳司 : Mood-stabilizer, valproic acid, exhibits enhanced neuronal