

**(独) 科学技術振興機構
戦略的創造研究推進事業
チーム型研究(CREST)
追跡評価用資料**

研究領域「脳を守る」

(1997-2004)

研究総括 杉田 秀夫

2011.1.26

目次

第 1 章 調査概要.....	3
1-1 調査の対象と調査方法	3
1-1-1 研究領域の概要	3
1-1-2 調査方法	5
1-2 全研究課題の調査の纏め.....	9
1-2-1 研究者情報	9
1-2-2 研究助成金	10
1-2-3 論文	13
1-2-4 特許	16
1-3 抽出事例について	19
第 2 章 研究領域における研究の継続・発展状況.....	20
2-1 研究領域としてのねらいと達成状況.....	20
2-2 研究課題ごとの研究のねらいと研究期間中の達成状況および研究終了後の継続・発展 の状況	21
2-2-1 遅発性神経細胞死の分子機構（研究代表者：桐野 高明）	21
2-2-2 精神分裂病(統合失調症)における神経伝達の異常（研究代表者：須原 哲也）	22
2-2-3 Ca チャネル遺伝子の変異と神経疾患（研究代表者：田邊 勉）	23
2-2-4 脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析（研究代表者：辻本 賀英）	24
2-2-5 神経細胞における増殖制御機構の解明（研究代表者：中山 敬一）	25
2-2-6 老化脳における神経の可塑性制御の分子基盤（研究代表者：森 望）	26
2-2-7 脳関門排出輸送に基づく中枢解毒（研究代表者：寺崎 哲也）	27
2-2-8 脳虚血により引き起こされる神経細胞死防御法の開発（代表研究者：遠山 正彌）	28
2-2-9 ウイルス性脳障害の発症機構の解明と治療法の開発（研究代表者：長嶋 和郎）	30
2-2-10 活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構（研究代表者：中別府 雄作）	31
2-2-11 DNA チップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明（研究代表者：西野 一三）	32
2-2-12 神経変性の分子機構解析に基づく新しい治療戦略の開発(研究代表者：垣塚 彰)	33
2-2-13 プリオン複製に関与する新しい因子の同定とプリオン病治療法開発への応用 （研究代表者：金子 清俊）	34
第 3 章 研究成果から生み出された科学技術的、社会的および経済的な波及効果.....	36
3-1 概要.....	36
3-2 脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析（研究代表者：辻本 賀英）	37

3-2-1 本研究期間中における状況	37
3-2-2 本研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況.....	38
3-2-3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果	39
3-3 神経細胞における増殖制御機構の解明（研究代表者：中山 敬一）	41
3-3-1 本研究期間中における状況	41
3-3-2 本研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況.....	42
3-3-3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果	44
3-4 脳関門排出輸送に基づく中枢解毒（研究代表者：寺崎 哲也）	45
3-4-1 本研究期間中における状況	45
3-4-2 本研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況.....	46
3-4-3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果	47
3-5 DNA チップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明（研究代表者：西野 一三）	50
3-5-1 本研究期間中における状況	50
3-5-2 本研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況.....	50
3-5-3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果	51
3-6 神経変性の分子機構解析に基づく新しい治療戦略の開発（研究代表者：垣塚 彰）	53
3-6-1 本研究期間中における状況	53
3-6-2 本研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況.....	54
3-6-3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果	56

第1章 調査概要

1-1 調査の対象と調査方法

1-1-1 研究領域の概要

(1) 戦略目標

「脳機能の解明」

脳は多くの画期的な発見が行われる可能性を秘めている研究対象であり、21世紀に残された数少ない巨大フロンティアのひとつである。また、脳科学の進歩は、人間たる所以の根元である脳を知ることにつながり、脳を知るとは即ち人間を理解することにつながる。また、脳科学研究の成果は、脳の老化の防止、アルツハイマー病等脳・神経系の困難な病気の克服、脳の原理を生かしたコンピュータやロボットの開発による新技術・新産業の創出につながる。このような意味で脳科学の推進を図り、脳機能の解明を行うことは、正に人類課題となってきた。

したがって、戦略目標を、人間の理解の基礎として脳の働きを知るとともに、新技術・新産業の創出にもつながることを念頭においた「脳機能の解明」とする。

なお、この脳機能の解明を行うためには、脳の働きの理解を目指す「脳を知る」、脳の老化、疾病のメカニズムの理解と制御を目指す「脳を守る」、脳型の情報処理システムの理解と構築を目指す「脳を創る」といった研究領域において、明確な研究目標を設定し、計画的に取り組む必要がある。

(2) 領域名称

「脳を守る」

(3) 領域の概要

脳機能の解明のうち、脳の老化、疾病のメカニズムの理解と制御を目標とする研究を対象とする。具体的には、「脳の発達障害の制御」、「脳の老化の制御」、「神経・精神障害の機構の解明」、「神経・精神障害の修復法の開発」を目標とする。

(4) 研究総括

研究総括は、戦略目標達成に向けた研究を推進するため、バーチャルインスティテュートとなる研究領域の長として、採択課題の決定、研究計画（研究費、研究チーム編成を含む）の調整、研究代表者との意見交換、研究への助言、課題評価、その他必要な手段を通じて研究領域の研究マネジメントを行う。本領域の研究総括の所属機関等を表1に示す。

表 1 研究総括（敬称略）

氏名	所属（当時）	所属（現）
杉田 秀夫	国立精神・神経センター 名誉総長	国立精神・神経センター 名誉総長 （財）精神・神経科学振興財団 会長

(5) 研究代表者と研究課題一覧

表 2～表 4 に、本調査の対象とした各研究課題の研究代表者名と研究課題名を、採択年度ごとに一覧の形に纏めて示す。採択年度は平成 9 年度から平成 11 年度までの 3 年間に亘っており、研究期間は各々平成 9 年 11 月～平成 14 年 10 月、平成 10 年 12 月～平成 15 年 11 月、平成 11 年 11 月～平成 17 年 3 月（垣塚研究代表者の課題のみ、平成 16 年 10 月まで）であった。

表 2 研究代表者と研究課題一覧（平成 9 年度採択分）

No.	研究代表者名	研究課題名
1	桐野 高明	遅発性神経細胞死の分子機構
2	須原 哲也	精神分裂病（統合失調症）における神経伝達の異常
3	田邊 勉	Ca チャネル遺伝子の変異と神経疾患
4	辻本 賀英	脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析
5	中山 敬一	神経細胞における増殖制御機構の解明
6	森 望	老化脳における神経の可塑性制御の分子基盤

表 3 研究代表者と研究課題一覧（平成 10 年度採択分）

No.	研究代表者名	研究課題名
7	寺崎 哲也	脳関門排出輸送に基づく中枢解毒
8	遠山 正彌	脳虚血により引き起こされる神経細胞死防御法の開発
9	長嶋 和郎	ウイルス性脳障害の発症機構の解明と治療法の開発
10	中別府 雄作	活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構

表 4 研究代表者と研究課題一覧（平成 11 年度採択分）

No.	研究代表者名	研究課題名
11	荒畑 喜一 （西野 一三）	DNA チップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明
12	垣塚 彰	神経変性の分子機構解析に基づく新しい治療戦略の開発
13	金子 清俊	プリオン複製に関与する新しい因子の同定とプリオン病治療法開発への応用

各研究課題の性格を表わすキーワードとして「トランスポーター・受容体」、「発生・分化」、「遺伝子変異」、「アポトーシス・細胞障害」、「感染」の 5 つを選択して各研究課題をグルーピングし、それらを「正常細胞に関する研究」、「疾患に関する研究」に分類した。作成したマップを図 1 に示す。

神経細胞機能を守るための研究視点

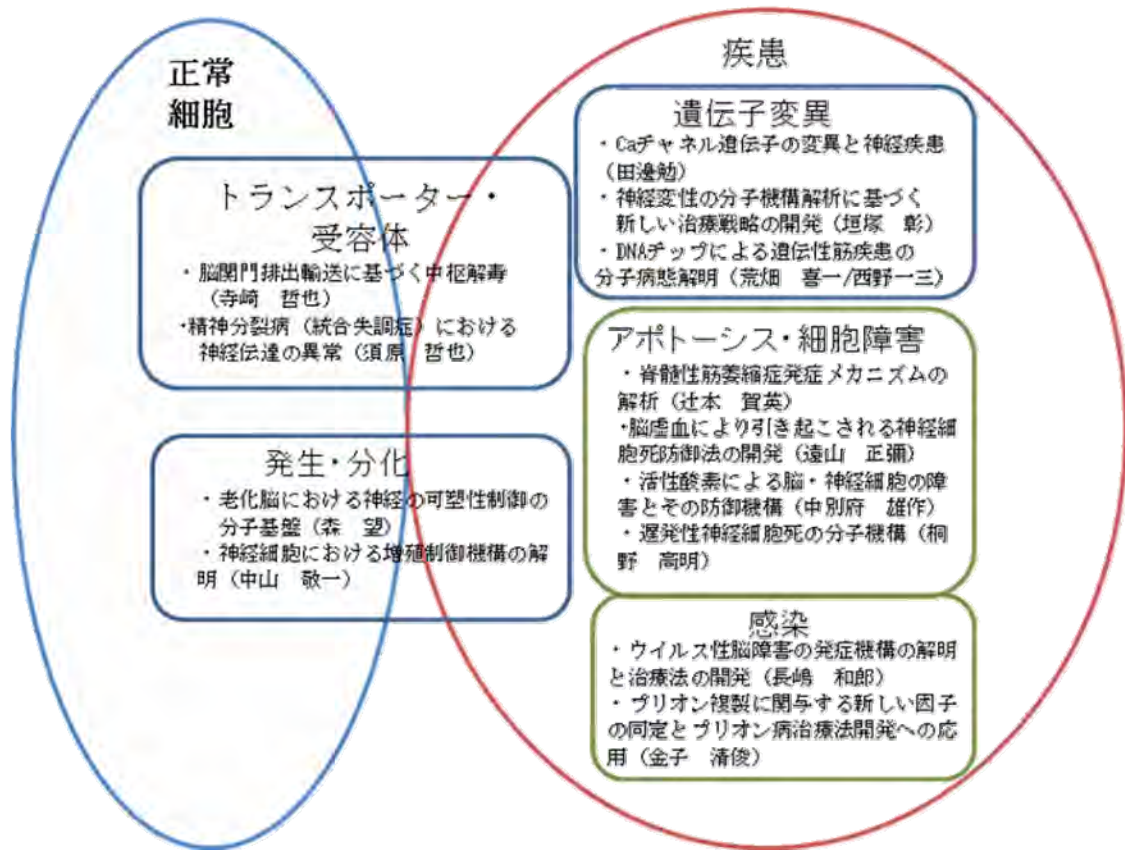


図 1 神経細胞機能を守るための研究の視点

1-1-2 調査方法

図 2 は調査手順をフローチャートの形に纏めたものである。まず、(1)調査を実施するに当たって必要な事前情報を把握する目的で事前調査を行い、(2)事前調査結果を中間報告として取り纏め、(3)研究総括へのヒアリングを実施した。目的は、研究領域全体を俯瞰するのに相応しい課題の抽出、および本領域全体としての成果・意義等を明らかにすることである。次いで、(4)抽出課題について、本研究終了後の継続・発展の状況や、研究成果から生み出された波及効果等を詳細に調査する目的で、研究代表者へのインタビューを実施し、(5)上述の調査結果を取り纏めて、最終的に追跡調査報告書を作成した。

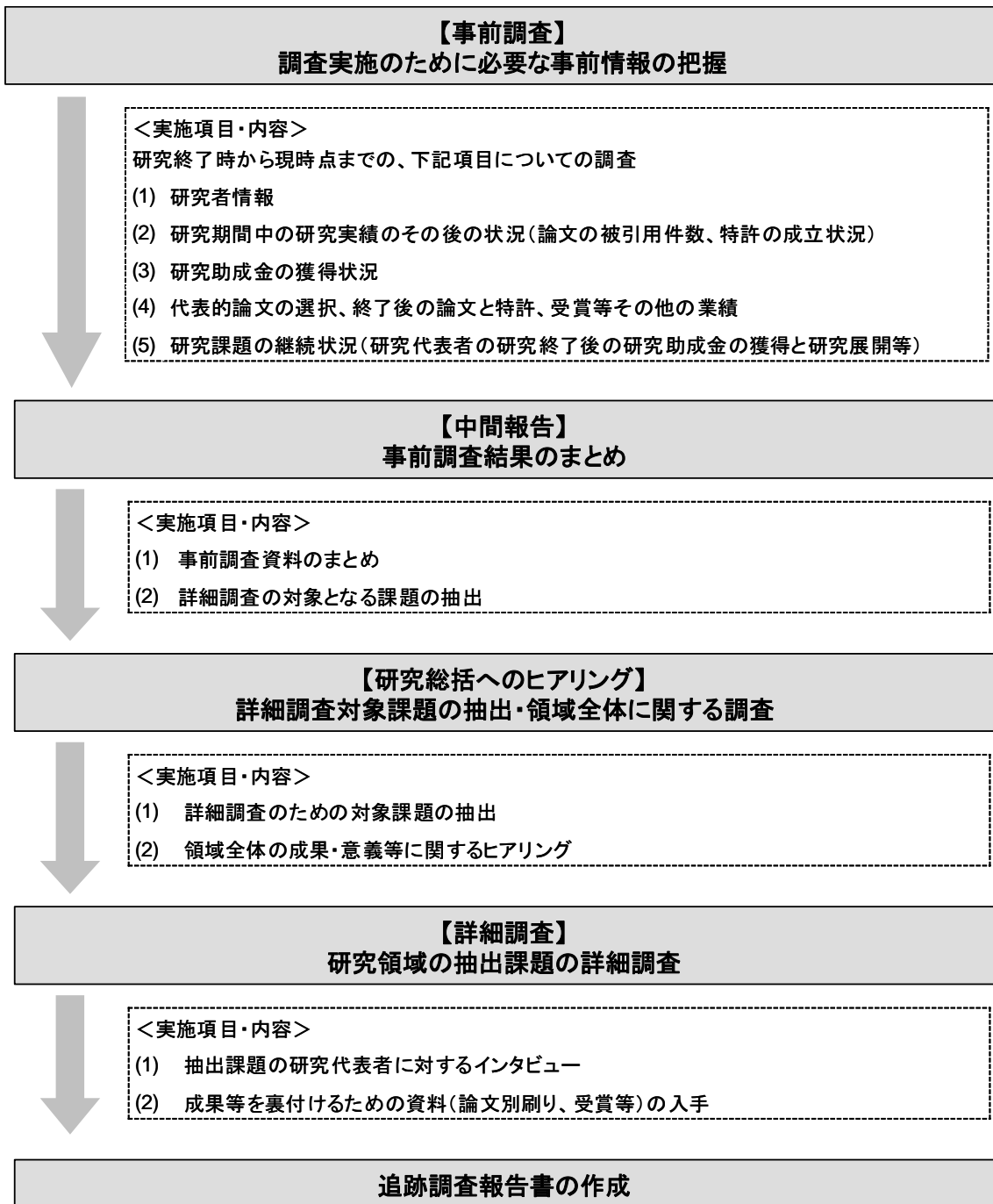


図 2 追跡調査の実施フローチャート

(1) 事前調査

事前調査として、研究領域終了から本調査時点までの概要を把握するための文献調査、研究業績を把握するための各種データベースによる調査を行った。

A. 文献調査

調査対象とした文献は、研究領域に関連する報告書、研究領域の参加研究者による解説文献、原著論文等であった。

研究領域に関連する報告書としては、事後評価報告書、研究終了報告書を主たる調査対象とした。その他、中間評価報告書、研究年報、CRESTのホームページも適宜参照した。

解説文献、原著論文等については、研究終了報告書に掲載されている論文、文献の中から選ぶことを基本としたが、場合によってはWeb上での調査も行い、研究代表者のホームページを参照した。

B. 各種データベース調査

論文、特許、受賞、競争的資金獲得状況等について、Web情報、各種データベース等を参照して調査した。

①研究者情報

各研究課題の研究代表者については、本研究採択時、本研究終了時、および調査時点での所属・役職、連絡先等を調査した。情報ソースとしては、研究領域に関連する報告書、科学技術振興機構(以下、JSTと略記)提供資料、研究代表者のホームページを参照した。

②研究助成金

各研究課題の研究代表者が、本研究以降に獲得した研究助成金について調査した。内閣府の競争的研究資金制度一覧¹に掲載されている制度名を対象として、それぞれの制度のデータベースを参照した。

③発表論文

本研究に関連して発表された論文の被引用件数は、トムソン・ロイター社のWeb of Scienceを用いて調査した。調査対象の論文は、本研究期間中の発表論文、本研究終了後の論文に大別される。本研究期間中の論文としては、各研究課題の終了報告書で「主な研究成果」としてリストアップされている論文を調査対象とした。本研究終了後の論文としては、研究代表者が著者となっている論文に限定し、更に本研究との関連性があるものを調査対象とした。具体的には、研究代表者名と本研究のキーワード、および本研究終了後の期間を検索条件としてWeb of Scienceを用いた検索を行った。得られた論文リストについて書誌事項および抄録をチェックし、同姓同名の他者の論文などのノイズを排除した。

¹ <http://www8.cao.go.jp/cstp/compefund/index.html>

本研究と関連性がある論文に絞り込むに当たってのポイントはキーワードの選択であった。キーワードは事後評価報告書、研究終了報告書および本研究期間中論文の検索結果として得られる抄録を参考にして、本研究期間中の論文が全て検索できるようなキーワード群を選定し、それらを「OR」で連結した。

論文の被引用件数については、被引用件数上位1%に含まれているか否かについても調査した。トムソン・ロイター社のESI (Essential Science Indicator)²では、直近の11年間に発表された論文について、論文の発表年、論文の属する学術分野ごとに被引用件数の上位1%にあたる被引用件数を公表している。この値以上の被引用件数を得ている論文を、被引用件数上位1%に含まれる論文として抽出した。

④特許

本研究期間中の出願特許および本研究終了後の出願特許について、海外等への関連出願の有無、調査時点におけるそれらの登録状況を調査した。本研究期間中の出願特許としては、各研究課題の終了報告書で「主な研究成果」としてリストアップされている出願特許を調査対象とした。本研究終了後については、研究代表者が発明者となっているもので、本研究終了時点から調査時点までの期間に出願された特許を調査対象とした。

使用したデータベースは、国内出願特許については、日本国特許庁の電子図書館の検索データベース³、国際出願特許については、欧州特許庁の esp@cenet⁴であった。先ず国内出願特許について登録状況等を調査し、各々の国内出願特許に対して優先権主張関係で関連のある国際出願特許を esp@cenet で調査した。国内出願特許と、優先権主張関係で関連のある出願特許の群を1つのパテントファミリーとして整理した。

⑤受賞

本研究期間中については、各研究課題の終了報告書で「主な研究成果」としてリストアップされている受賞を整理した。さらに研究代表者のホームページを参照して、本研究期間中および本研究終了後の受賞を追加調査した。

(2) 研究総括へのヒアリング

本研究領域発足当時の脳の研究の現状と本領域のねらい、個々の研究課題の成果、また、研究領域としての成果と意義を伺った。さらに、事前調査資料を基に、終了後の研究の継続・発展の状況、社会的あるいは経済的な波及効果等についても意見を求め、主要な研究課題を抽出した。

(3) 抽出課題の詳細調査

² <http://www.thomsonscientific.jp/products/esi/>

³ <http://www.ipdl.inpit.go.jp/homepg.ipdl>

⁴ http://ep.espacenet.com/advancedSearch?locale=jp_EP

事前調査結果ならびに研究総括との相談の上、本研究領域全体を俯瞰するにふさわしく、詳細調査の対象とする課題 5 件を抽出した。5 課題の研究代表者の研究室を訪問し、本研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況や、研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果、研究成果から生み出された社会的、経済的な効果・効用および波及効果等をインタビュー形式で調査した。調査時には事前調査結果を取り纏めた資料を提供し、研究代表者の参考に供した。

1-2 全研究課題の調査の纏め

1-2-1 研究者情報

各研究課題の研究代表者について、本研究採択時、本研究終了時、および調査時点での所属および役職を表 5 に纏めた。

表 5 研究者情報

No.	採択年度	研究代表者	所属（本研究採択時）	所属（本研究終了時）	所属（現在）
1	H09	桐野高明	東京大学 医学部 教授	東京大学 大学院医学系研究科 教授	国立国際医療センター 総長
2		須原哲也	(独)放射線医学総合研究所 高度診断機能研究ステーション 主任研究官	(独)放射線医学総合研究所 特別上席研究員	(独)放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター グループリーダー
3		田邊勉	東京医科歯科大学 医学部 教授	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授	東京医科歯科大学 大学院認知行動医学系細胞薬理学教室 教授
4		辻本賀英	大阪大学 医学部バイオメディカル教育研究センター 教授	大阪大学 大学院医学系研究科 教授	大阪大学 大学院医学系研究科 教授
5		中山敬一	九州大学 生体防御医学研究所細胞学部門 教授	九州大学 生体防御医学研究所 教授	九州大学 生体防御医学研究所分子発現制御学分野 教授
6		森 望	国立長寿医療研究センター 分子遺伝学研究部 部長	国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 部長	長崎大学 医歯薬学総合研究科 教授
7	H10	寺崎哲也	東北大学 薬学部 教授	東北大学 未来科学技術共同研究センター 教授	東北大学 薬学研究科・薬学部 総長特任補佐・副研究科長・副学部長・教授
8		遠山正彌	大阪大学 大学院医学系研究科 教授	大阪大学 大学院医学系研究科 教授	大阪大学 大学院医学系研究科神経機能形態学講座 教授

9		長嶋 和郎	北海道大学 医学部 教授	北海道大学 大学院医学研究科 教授	札幌東徳洲会病院 病理部 部長
10		中別府 雄作	九州大学 生体防御医学研究所生化学 部門 教授	九州大学 生体防御医学研究所 教授	九州大学 生体防御医学研究所個体 機能制御部門 教授
11	H11	荒畑 喜一	国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第一部 部長		
		西野 一三	荒畑氏 H12.12 逝去のため 西野氏に交代	国立精神・神経センター 部長	国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第一 部 部長
12		垣塚 彰	(財) 大阪バイオサイエン ス研究所 第4 研究部 部長	京都大学 大学院生命科学研究所 教授	京都大学 大学院生命科学研究所 教授
13		金子 清俊	国立精神神経センター 疾病研究第七部 部長	国立精神・神経センター 部長	東京医科大学 医学部神経生理学講座 教授

1-2-2 研究助成金

各研究課題の研究代表者が本研究開始以降に獲得した研究助成金のうち、当該研究助成金の代表者となっており金額が 10 百万円以上のものについて、表 6 に集計した。また本研究開始時点から調査時点（現在）までの経過期間が採択年度ごとに異なることを考慮し、採択年度ごとにグラフ化したものを図 3～図 5 に示す。

表 6 研究助成金の獲得数（研究代表者が、本研究開始以降、代表者として獲得した 10 百万円以上のファンド）

No.	採択年度	研究代表者名	JST 助成金		科研費	その他	合計
			CREST	SORST			
1	H9	桐野 高明	0	1	3	1	5
2		須原 哲也	0	0	2	1	3
3		田邊 勉	0	0	2	0	2
4		辻本 賀英	0	1	5	0	6
5		中山 敬一	2	0	8	1	11
6		森 望	0	0	2	1	3
7	H10	寺崎 哲也	0	1	7	0	8
8		遠山 正彌	0	0	3	1	4
9		長嶋 和郎	0	0	1	0	1
10		中別府 雄作	0	0	4	0	4
11	H11	荒畑 喜一	0	0	0	0	0
		西野 一三					
12		垣塚 彰	0	1	5	0	6
13		金子 清俊	0	0	1	2	3

領域全体では科研費の獲得件数が多かった。内訳は JST の CREST、SORST が合わせて

6件、科研費が43件、その他が7件であった。

個人別に見ると、平成9年度採択の中山研究代表者（以下、中山（敬称略）、他も同様）（合計11件）、平成10年度採択の寺崎（合計8件）、平成9年度採択の辻本（合計6件）、平成11年度採択の垣塚（合計6件）が多くの資金を獲得していた。特に中山は本研究終了後も2件のCREST領域に切れ目無く採択されており⁵、継続して大型資金を獲得して研究を継続・展開させていた。また平成9年度採択の桐野、辻本、平成10年度採択の寺崎、平成11年度採択の垣塚の4名は発展研究SORSTに採択され、文字通り本研究を継続・発展させていた。これらは本研究成果が評価されていることの反映と考えられる。

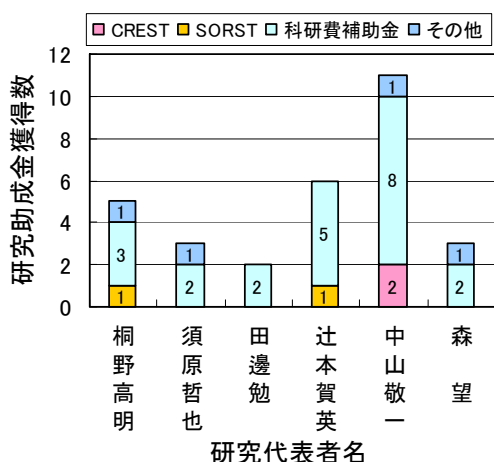


図3 研究助成金獲得数（H9採択課題）

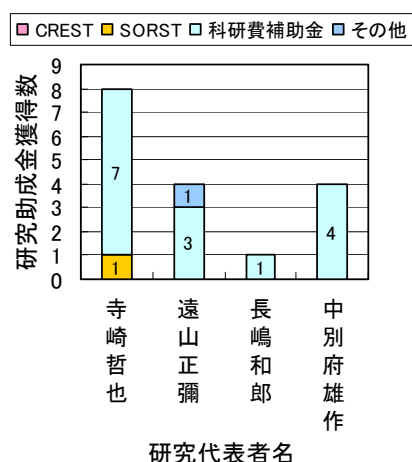


図4 研究助成金獲得数（H10採択課題）

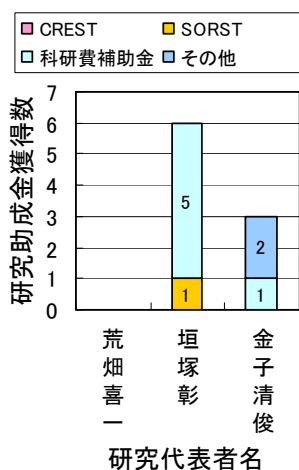


図5 研究助成金獲得数（H11採択課題）

⁵①「生物の発生・分化・再生」領域 第3期 課題名「細胞周期の再活性化による再生能力の賦活化」（2002-2006年度）

②「生命システムの動作原理と基盤技術」領域 第2期 課題名「ユビキチンシステムの網羅的解析基盤の創出」（2007-2011年度）

表 7 発表論文に関する研究課題別の各種指標

No.	採択年度	研究代表者	原著論文														
			研究期間中の論文							期間終了後の研究代表者の論文							
			全論文数 (和文、 検索対象 外論文を 含む)	論文数 (検索 対象)	被引用 件数/ 年 の 平均	平均被 引用件 数	最高被 引用件 数	被引用 件数 ≥100 の論文 数	50≤被 引用件 数<100 の論文 数	Top1% に入る 論文数	論文数	被引用 件数/ 年 の 平均	平均被 引用件 数	最高被 引用件 数	被引用 件数 ≥100 の論文 数	50≤被 引用件 数<100 の論文 数	Top1% に入る 論文数
1	H9	桐野 高明	63	63	4.68	44.5	598	5	11	2	14	1.55	8.3	45	0	0	0
2		須原 哲也	98	68	2.03	17.8	69	0	5	0	91	1.90	8.3	112	1	2	1
3		田邊 勉	93	43	4.04	40.1	409	2	7	2	19	0.81	4.2	15	0	0	0
4		辻本 賀英	62	60	10.52	116.6	1133	20	17	6	39	9.58	54.3	367	8	1	4
5		中山 敬一	90	89	7.10	67.9	533	22	11	6	131	4.43	23.5	156	7	14	1
6		森 望	45	29	3.56	34.0	197	2	2	1	31	1.32	7.2	28	0	0	0
7	H10	寺崎 哲也	84	58	3.56	30.1	133	3	3	0	84	1.67	7.3	57	0	1	0
8		遠山 正彌	22	22	6.14	60.9	389	2	5	2	52	3.13	18.7	206	2	3	2
9		長嶋 和郎	114	106	3.33	29.2	267	6	13	2	35	1.40	6.1	37	0	0	0
10		中別府 雄作	64	58	3.89	36.1	175	5	8	1	70	1.96	8.8	48	0	0	0
11	H11	荒畑 喜一 (西野 一三)	77	49	4.40	36.1	275	2	10	1	85	1.40	6.1	91	0	2	0
12		垣塚 彰	129	71	10.63	93.8	502	23	19	6	11	2.05	8.8	31	0	0	0
13		金子 清俊	122	37	3.85	32.7	284	2	5	2	20	0.62	2.1	13	0	0	0

- 注 1) 全論文数とは、研究終了報告書に掲載されている論文の数
 2) 論文数とは、検索 DB (Web of Science) に収録されている論文の数
 3) 被引用件数/年 の平均とは、2)で定義した各論文についての被引用件数を、当該論文の発表年から調査時点までの経過年数で除したもの(被引用件数/年)を、
 2)で定義した全論文について平均したもので、各論文の経過年数の差を補正したもの
 4) 平均被引用件数とは、2)で定義した各論文の被引用件数を単純平均したもの
 5) 最高被引用件数とは、2) で定義した全発表論文の中で最高の被引用件数を示した論文の、その被引用件数
 6) Top1%に入る論文数とは、2) で定義した全発表論文の中で、ESI 定義による被引用件数上位 1%に含まれる論文数 (8 ページ参照)

1-2-3 論文

本研究期間中および終了後の発表論文に関する各種指標を表 7 に示す。なお、本研究終了後の発表論文は、1-1-2.A.文献調査に示したとおり、研究代表者の発表論文のうち本研究に関連のある論文のみを抽出したものである。

(1) 発表論文数

発表論文数は、研究活動の度合いを示す指標と考えられる。本研究期間中の全論文数および終了後の論文数について、採択年度ごとにグラフ化したものを図 6～図 8 に示す。

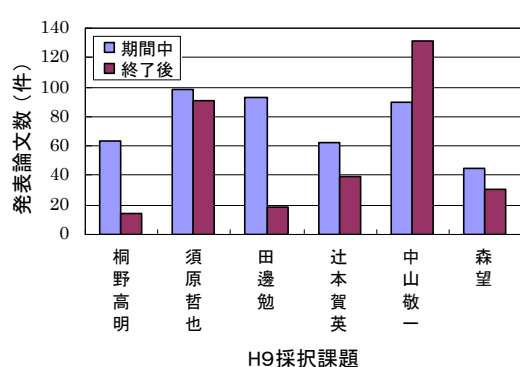


図 6 発表論文数 (H9 採択課題)

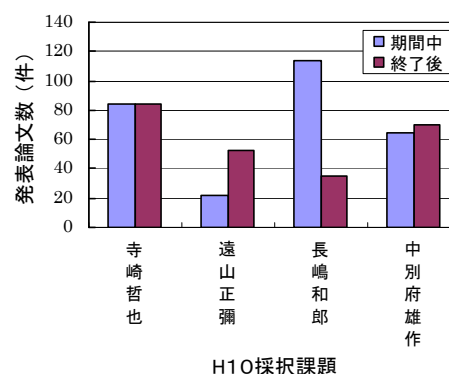


図 7 発表論文数 (H10 採択課題)

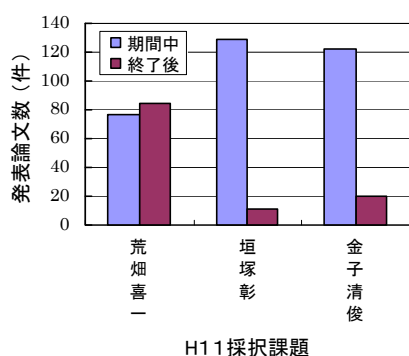


図 8 発表論文数 (H11 採択課題)

本研究期間中の全論文数は、研究終了報告書に掲載されている全論文の数（和文も含む）であり、研究代表者が著者になっていない論文も含んでいるのに対して、本研究終了後の論文数は、キーワード検索により抽出された論文の数（原則として和文を含まない）で、研究代表者が著者に含まれる論文に限定されている。従って本研究期間中と終了後との論文数の比較には注意が必要である。その上で本研究期間中と終了後とを比較すると、領域全体の発表論文数は、本研究期間中の 1063 報に対して終了後は 682 報で期間中の 64% に相当しており、終了後も活発な論文発表が行われたことがわかる。研究課題あたり発表論文数は、本研究期間中が 81.8 報、終了後が 52.5 報であった。

研究課題ごとに比較すると、平成9年度採択課題では、本研究期間中は須原（98報）、田邊（93報）、中山（90報）の論文数が多く、終了後では中山の131報が最も多く、須原の91報がそれに次いでいた。中山の本研究終了後の発表論文数は期間中のそれよりも多くなっており、終了後も特に活発な研究活動を行ったと見られる。平成10年度採択課題について見ると、本研究期間中は長嶋のみが100報を超えており（114報）、終了後では寺崎の84報が顕著であった。また長嶋以外の3課題では、本研究終了後の発表論文数が期間中のそれと同等かそれ以上となっており、平成9年度採択の中山と同様に終了後の研究活動が活発であったと推測される。平成11年度採択課題では、本研究期間中は垣塚（129報）、金子（122報）の発表論文数が多く、終了後は荒畑（西野に引継）の発表論文数（85報）が多かった。本研究期間中より終了後の発表論文数が多いのは荒畑（西野）の研究課題であった。

(2) 平均被引用件数

被引用件数は、発表論文のインパクトを計る判断基準として考えられるが、研究の質に対する指標とも見ることが出来る。従って平均被引用件数は、本研究に関連して発表された全論文のインパクトあるいは研究の質を平均したものの意味合いを持つが、一般に論文発表後の経過年数が長くなるほど被引用件数が大きくなると考えられるために、単純平均では経過年数による誤差を排除できない。ここでは1年間当りの被引用件数〔被引用件数/年〕の平均値を採用して比較した。各研究課題の〔被引用件数/年〕の平均を、採択年度別に図9～図11に示す。

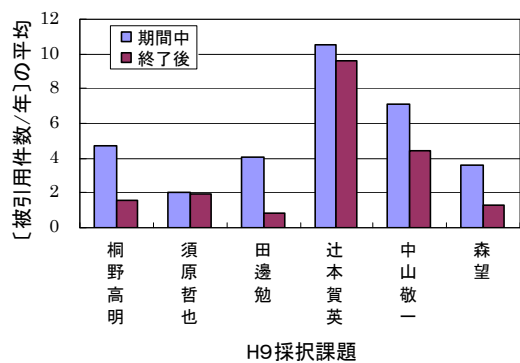


図9 [被引用件数/年]の平均(H9採択課題)

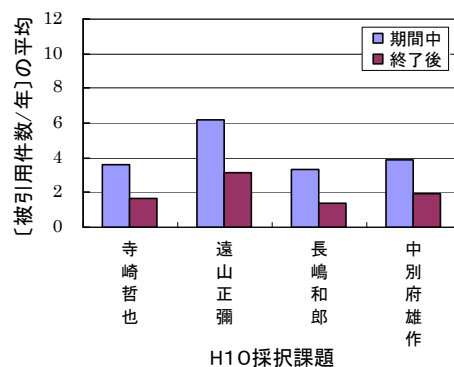


図10 [被引用件数/年]の平均(H10採択課題)

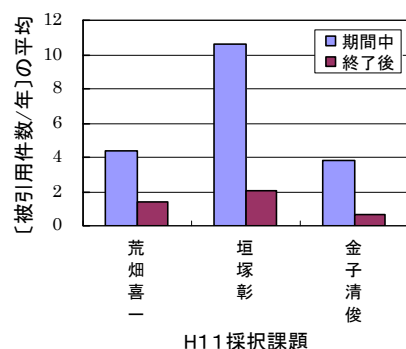


図11 [被引用件数/年]の平均(H11採択課題)

須原を除く全研究課題で、本研究期間中の〔被引用件数/年〕の平均が、終了後のそれを上回っていた。被引用件数は、論文発表後徐々に増加し、数年後に極大を示した後減少するのが一般的な傾向である。本研究終了後の〔被引用件数/年〕の平均が低かったのは、論文発表後の経過年数が少なく極大を示す前の状態にある論文が多い可能性もあるが、平成9年度採択課題では、本研究終了後既に6年以上経過しており、経過年数が少ないことによる影響は限定的なものと考えられる。本研究期間中は、終了後と比較して、注目度の高い論文がより多く発表されたと考えられる。このことは表7の「被引用件数 \geq 100の論文数」、「 $50 \leq$ 被引用件数 $<$ 100の論文数」にも現れている。本研究期間中の「被引用件数 \geq 100の論文数」は領域全体で94報、「 $50 \leq$ 被引用件数 $<$ 100の論文数」は116報であるのに対して、終了後は、各々18報、23報であった。

研究課題別に見ると、本研究期間中では平成11年度採択の垣塚が10.63件/年と最も多く、平成9年度採択の辻本（10.52件/年）もほぼ同等の引用を受けていた。平成9年度採択の中山（7.10件/年）、平成10年度採択の遠山（6.14件/年）がそれに次いでいた。本研究終了後は辻本の9.58件/年が顕著であった。領域全体の平均値が2.4件/年であることを踏まえると中山の4.43件/年もかなり大きな値である。本研究期間中の垣塚および期間中・終了後を通じての中山は発表論文数の面でも顕著な値を示しており、研究活動の状況および研究の質の両面で、優れた成果を挙げていると言えよう。

(3) Top1%論文

Top1%論文は、同一の学術分野、同一の年に発表された論文の中で、被引用件数が上位1%に入る論文であり、非常に注目度の高い重要な論文ということが出来る。また学術分野の異なる論文間の注目度を相対的に比較するには便利な指標である。本研究のように複数の学術分野にまたがる課題群を含むケースでは、特に有用な指標と考えられる。本調査では、トムソン・ロイター社のESI (Essential Science Indicator) で公表された2009年9月18日時点でのデータを用いた。ただしこの指標には、対象論文がWeb of Scienceに収録されている雑誌に限定されていること、対象期間が直近の11年間（今回の調査に於いては1999年から2009年）に限られていること等の制限がある。従って平成10年（1998年）以前に発表された論文や、Web of Scienceに収録されていない和文誌は、例え被引用件数が多くてもこの指標では捉えられない。

図12～図14に、各研究課題（研究代表者）から発表された論文のうち、被引用件数が上位1%に入る論文の数を、採択年度別に示した。



図 12 Top1%に入る論文数(H9 採択課題)

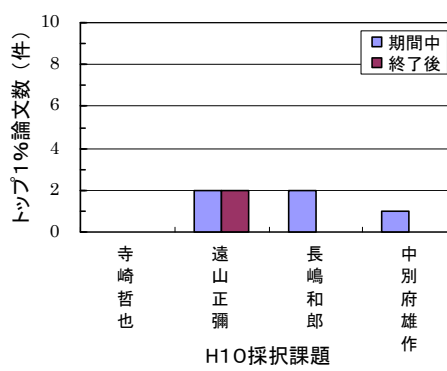


図 13 Top1%に入る論文数(H10 採択課題)

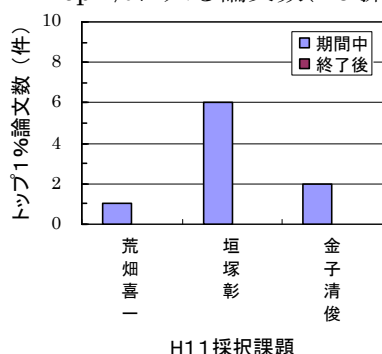


図 14 Top1%に入る論文数(H11 採択課題)

本研究期間中で Top1%論文の数が最も多かったのは、平成 9 年度採択の辻本、中山、平成 11 年度採択の垣塚の 3 名で、6 報で並んでいた。本研究における Top1%論文の多寡を論じる場合、本研究から発表された論文のうち何%の論文が Top1%以上の被引用件数を示しているかが一つの尺度になると考えられる。辻本、中山、垣塚が本研究期間中に発表した検索対象論文数（表 7 の第 2 列目）は各々 60 報、89 報、71 報であり、発表論文数に対する Top1%論文数の比率は 10.0%、6.7%、8.5%と 1%に対して非常に高い割合を示していた。領域全体の Top1%論文数は 31 報に上っていた。領域全体の検索対象論文数 753 報に対する比率は 4.1%に相当しており、本領域では水準以上の Top1%論文が発表されていた。注目度の高い論文の発表数の面では、本領域は優れた成果を挙げたと言えよう。

本研究終了後では、平成 9 年度採択の辻本の 4 報が最高で、そのほかでは平成 10 年度採択の遠山（2 報）、平成 9 年度採択の須原（1 報）、中山（1 報）が Top1%論文を生み出していた。領域全体で見ると、本研究終了後の全発表論文 682 報のうち 8 報（1.2%）の論文が Top1%に入っていた。1.2% > 1.0%であり、本研究終了後も水準以上の Top1%論文が発表されていると言えるが、期間中ほどではなかった。また辻本は本研究期間中、終了後の両期間に亘って多数の Top1%論文を発表し続けており、注目度の高い研究成果が継続的に得られていると考えられる。

1-2-4 特許

本研究期間中および終了後の出願特許に関する各種データを表 8 に示す。パテントファ

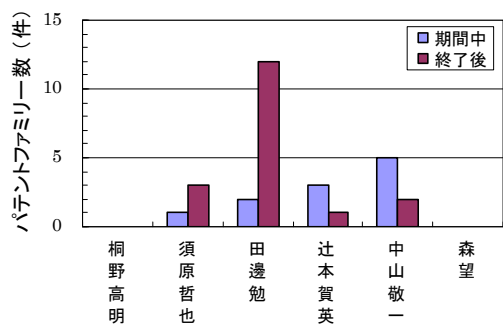
ミリーとは、優先権主張関係で関連付けられる国内、海外出願特許の群のことであり、総出願数とはパテントファミリーを構成する各出願特許を夫々1件と数えた数値である。

表 8 出願特許に関する研究課題別の各種指標

No.	採択年度	研究代表者	特許出願					
			研究期間の出願特許			期間終了後の研究代表者の出願特許		
			パテントファミリー数	総出願数	成立特許数	パテントファミリー数	総出願数	成立特許数
1	H9	桐野 高明	0	0	0	0	0	0
2		須原 哲也	1	1	0	3	13	1
3		田邊 勉	2	3	1	12	30	3
4		辻本 賀英	3	13	7	1	2	0
5		中山 敬一	5	11	1	2	12	0
6		森 望	0	0	0	0	0	0
7	H10	寺崎 哲也	7	12	4	6	13	0
8		遠山 正彌	5	19	8	4	13	2
9		長嶋 和郎	5	10	1	6	7	2
10		中別府 雄作	2	2	2	0	0	0
11	H11	荒畑 喜一 (西野 一三)	1	1	0	2	2	0
12		垣塚 彰	6	14	3	0	0	0
13		金子 清俊	2	5	2	0	0	0

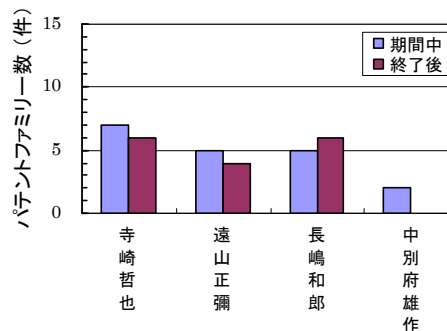
(1) パテントファミリー数

パテントファミリー数は、優先権主張関係で関連付けられる出願特許群を1件と数えるものであるから、研究活動により生み出された独立の発明の数と考えることが出来る。研究課題毎のパテントファミリー数を、採択年度別に図15～図17に示す。



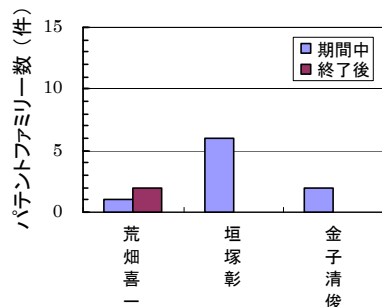
H9採択課題

図 15 パテントファミリー数(H9 採択課題)



H10採択課題

図 16 パテントファミリー数(H10 採択課題)



H11採択課題

図 17 パテントファミリー数(H11 採択課題)

本研究期間中で出願特許の Patent ファミリー数が多かったのは、平成 9 年度採択課題では中山（5 件）、平成 10 年度採択課題では寺崎（7 件）、遠山（5 件）、長嶋（5 件）、平成 11 年度採択課題では垣塚（6 件）であった。また本研究終了後では、平成 9 年度採択の田邊が 12 件と群を抜いていた。その他では平成 10 年度採択の寺崎および長嶋の 6 件が多かった。

領域全体で見ると、本研究期間中の Patent ファミリー数は 39 件で、1 課題あたりでは 3.0 件、本研究終了後は各々 36 件、2.8 件となっていた。本研究期間中、終了後の差は小さく、終了後にも活発な出願活動が維持・継続されているとの結果であった。

(2) 総出願数

研究課題毎の総出願特許数を、採択年度別に図 18～図 20 に示す。

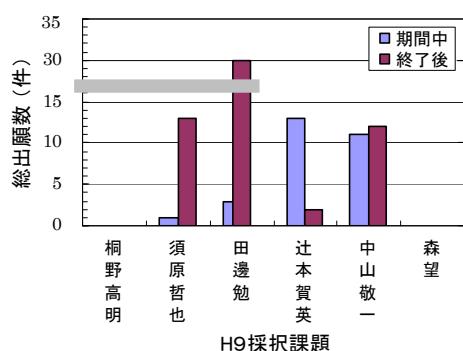


図 18 総出願特許数 (H9 採択課題)

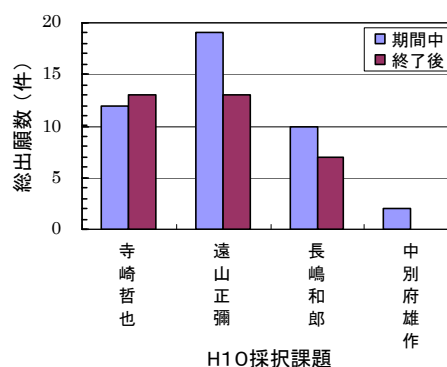


図 19 総出願特許数 (H10 採択課題)

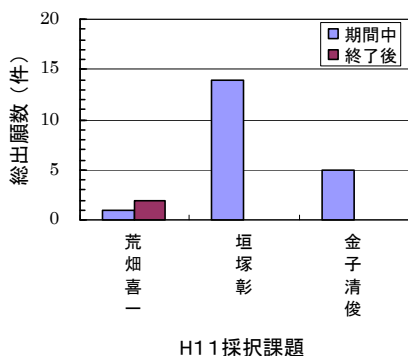


図 20 総出願特許数 (H11 採択課題)

領域全体の総出願数は、本研究期間中が 91 件、終了後は 92 件とほぼ同数であった。1 研究課題あたりでは、各々 7.0 件、7.1 件の出願となっていた。

総出願数と Patent ファミリー数の差は、特に同一発明に関する海外展開の度合を表わしていると考えられる。図 15～図 17 と、図 18～図 20 とを比較すると、本研究領域では全般的に海外出願が活発に行われたことがわかる。

研究課題別に見ると、本研究期間中では、平成 10 年度採択の遠山（19 件）、平成 11 年度採択の垣塚（14 件）、平成 9 年度採択の辻本（13 件）、平成 10 年度採択の寺崎（12 件）の総出願数が多かった。本研究終了後では、平成 9 年度採択の田邊の 30 件が群を抜いて多かった。次いで平成 9 年度採択の須原、平成 10 年度採択の寺崎、遠山が 13 件で並んでお

り、平成9年度採択の中山が12件で続いていた。

(3) 成立特許数

研究課題毎の成立特許数を、採択年度別に図21～図23に示す。

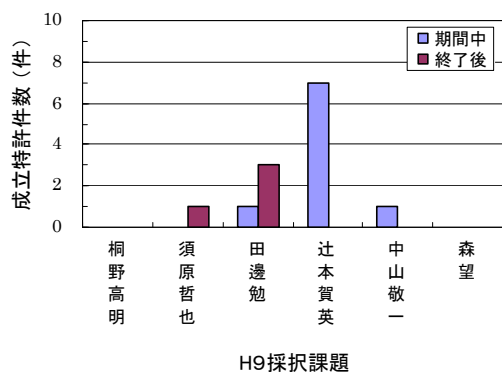


図21 成立特許数 (H9採択課題)

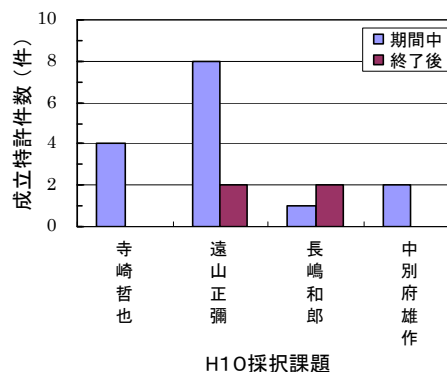


図22 成立特許数 (H10採択課題)

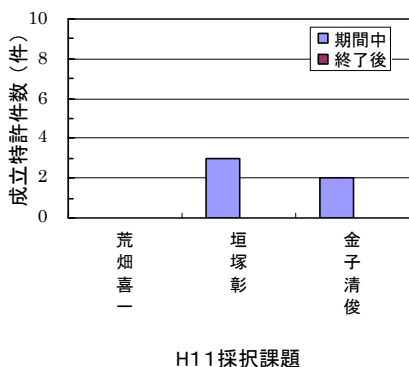


図23 成立特許数 (H11採択課題)

領域全体での成立特許数は、本研究期間中が29件であるのに対して、終了後は8件となっていた。1研究課題当たりでは、本研究期間中が2.2件、終了後で0.6件の特許が成立したことになる。パテントファミリー数、総出願数では本研究期間中、終了後の差は少なかったが、成立特許数では終了後の数値が大きく減少していた。特許成立までにはある程度の経過時間が必要であり、出願後の経過時間の差が影響している可能性もある。

研究課題別に見ると、本研究期間中では、平成10年度採択の遠山が8件、平成9年度採択の辻本が7件の特許を成立させていた。本研究終了後は、平成9年度採択の田邊の3件が最多であり、残りは平成10年度採択の遠山、長嶋の2件、平成9年度採択の須原の1件であった。

1-3 抽出事例について

前節に示した調査結果および研究総括ヒアリング結果を基にして、詳細調査の対象となる5課題を抽出した。それら5課題を研究代表者名で示すと、辻本、中山、寺崎、西野、垣塚である。

第2章 研究領域における研究の継続・発展状況

2-1 研究領域としてのねらいと達成状況

「脳を守る」の研究領域において、企画者である伊藤正男のストラテジック基礎研究という方針に沿って研究を進めることを目指し、杉田秀夫研究総括が選考委員会の構築から担当した。

基礎研究分野では立石潤、木村淳、永津俊二、臨床分野では金澤一郎、竹下研三、高橋清久が選考委員を勤めた。研究者の採用は多数決により決められ、オープンで公平に行われた。従来脳研究は生化学および生理学にもとづく基礎医学者の研究が主体であり、疾患の解明と治療を考慮した臨床研究者との共同研究は少なかった。本研究領域においては、臨床の研究者の参加を得たことは画期的であり、多面的な脳研究が実施されたのは、有意義なことであった。また、心理学的なアプローチを排し、脳の基礎医学的なアプローチを行った点も特徴的であった。当時は日本でこのような研究ができるかについて懐疑的な意見もあったが、結果として非常に良い成果を挙げた。

個別の研究成果としては、先ず血液脳関門（BBB）の研究を担当した寺崎哲也が大きな成果を挙げた。血液外に分子を排出する機序を巧みに考案した測定法を駆使して、新たな発見をするとともに詳細な機能を解明した。同様な機能が複数存在することを世界に先駆けて見出した。また、その過程で蛋白質の多種類・同時測定法を開発し、実用化した。荒畑喜一と西野一三の研究も 1985 年頃米国のグループが達成した遺伝子同定⁶には遅れをとったが、企業と共同で抗原ペプチドを合成し、抗体を作成することによりジストロフィンの局在が細胞膜表面であることを解明し、彼らの間違いを明らかにし、大きな成果となった。垣塚彰はマシャド・ジョセフ病の遺伝子解析に大きな成果を挙げた。引き続きポリグルタミン病の概念を確立し、この遺伝子変異が各種疾患に関係することの解明と疾患の生化学的メカニズムを明らかにした。辻本賀英はアポトーシス抑制蛋白質 Bcl-2 と脊髄性筋萎縮症遺伝子 Snn の結合の研究から Bcl-2 部分構造 BH4 を同定し、そのペプチドがアポトーシス抑制のみならず心筋梗塞など各種疾患における細胞死の抑制に効果があることを見出し、薬物治療につながる成果を挙げた。中山敬一も分化・再生の角度から細胞周期の研究を行い、細胞周期ブレーキ分子 p27Kip1 および p57Kip2 の役割を解明した。細胞周期の研究ががん治療や免疫にも関連することを明らかにし、独自の成果を挙げた。遠山正彌は虚血と小胞体内分子シャペロン ORP150 との関係を見出し、小胞体ストレスと細胞死が密接に関連していることを見出した。同様な過程がアルツハイマー病における小胞体内シャペロン CRP78/BiP にもあることを見出し、アルツハイマーの研究に移ったが、小胞体ストレスと細胞死の研究に発展した。いずれの研究も細胞死を抑制する手がかりとなる研究であり、広い意味で「脳を守る」につながる成果を挙げた。

⁶ Kunkel L, et al., "Genetic analysis of Duchenne dystrophy", Adv. Exp. Med. Biol., 182, 287-294, 1985

2-2 研究課題ごとの研究のねらいと研究期間中の達成状況および研究終了後の継続・発展の状況

2-2-1 遅発性神経細胞死の分子機構（研究代表者：桐野 高明）

遅発性神経細胞死（delayed neuronal death）とは、脳梗塞などの脳循環不全の時に起こるごく短時間の脳虚血の後に海馬 CA1 錘体細胞に発生する神経細胞の死であるが、短時間の虚血の後には神経細胞はほぼ完全に元の状態に回復し、脳血流・エネルギー（ATP）代謝・グルコース代謝などの代謝パラメータも復旧し、神経電気活動や形態学的に見ても細胞死を示す所見は少なくとも虚血の 24 時間後までは認められない。しかし mRNA から蛋白質への翻訳は強く抑制され、虚血から 3-4 日経過すると海馬 CA1 錘体細胞の大部分は死んで消滅する。ここで見られる海馬遅発性神経細胞死は受動的破壊による細胞死とは異なり、神経細胞特有の機構による細胞死の決定機構が働き、ある時点までは可逆性で治療可能であるが、アポトーシス共通の経路に到達すると回復不能になると考えられる。アポトーシスに至る神経細胞特有の分子機構、特にカルシニューリンおよびプロテアソームによる細胞死制御の分子機構を解明し、その過程を阻害して神経細胞あるいは脳を保護し脳梗塞の後遺症の軽減法を開発することが本研究のねらいであった。

本研究では、神経細胞においてカルシニューリンを高レベル発現させると種々の刺激に対して脆弱性が増大し、弱い刺激に対しても容易にアポトーシスをおこすようになること、カルシニューリンを強制発現させるとそれだけでアポトーシスが誘導され、これには転写因子 p53 のリン酸化が必須であることなどを明らかにした。また、これらのアポトーシスは FK506 およびシクロスポリン A などのカルシニューリン阻害剤で抑制されることも明らかになった。さらにマウス遅発性神経細胞死モデルを開発し *in vivo* で検討した結果、海馬遅発性神経細胞死が FK506 によって抑制されることが明らかになった。これらの結果はアポトーシス阻害薬開発のヒントになると期待された。また海馬 CA1 領域において、一過性前脳虚血後の遅発性神経細胞死に先駆けて同部の遊離ユビキチンが減少し、結合ユビキチンが蓄積することを見出した。さらに、一過性前脳虚血の後、前脳全域で一過性にプロテアソーム機能（26S 機能）が低下するが、海馬 CA1 領域ではこれが低下したまま回復せず遅発性神経細胞死にいたることが明らかになった。このアポトーシスにおいても p53 が必須であり、p53 ノックアウトマウスでは遅発性神経細胞死が有意に抑制されることを明らかにした。

本研究終了後の研究では、本研究で開発した海馬 CA1 障害のマウスモデルを用いた遺伝子解析の研究を行い、虚血脳において MAP kinase 情報伝達系、熱ショック蛋白質遺伝子、Caspase-2,3 などのアポトーシス関連プロテアーゼ遺伝子の発現が亢進する一方、細胞の増殖や生存に必要とされる PI3 kinase、DAG/PKC などの情報伝達に関与している遺伝子の発現が抑制されていることを発見した。この研究は SORST プロジェクトに受け継がれ、内

在性神経幹細胞による神経再生療法の試みに挑戦する研究⁷につながった。一方、ラット虚血モデルにおいて、EGF、FGF-2 混合投与により虚血後の神経細胞再生に成功し、生理活性分子によるアポトーシス抑制も可能であることを明らかにした。以上の成果は、脳梗塞後の機能障害の拡大を防止する治療のためのターゲット分子を明らかにしたことで、薬剤開発の手掛かりを与えらるる。

2-2-2 精神分裂病(統合失調症)における神経伝達の異常(研究代表者: 須原 哲也)

精神分裂病(統合失調症)は若年期に発症し、幻覚妄想などの陽性症状、感情鈍麻や意欲の減退といった陰性症状を発現して次第に悪化すると考えられてきた。

近年抗精神病薬の開発によって多くの精神分裂病患者が社会へ復帰しているが、疾患の病態生理には不明な点が多く、薬剤の開発や臨床応用も経験的な方法によるところが多いのが当時の状況であった。本研究では主にポジトロン CT(PET)を非侵襲的画像解析に用いて、精神分裂病と神経伝達機能の異常の関連について検討し、脳内のドーパミン神経伝達に関わる受容体や、神経伝達を修飾する神経系の測定を行った。さらに抗精神病薬による脳内受容体の占有率測定による症状との関連や、脳移行性を改善した新しいポジトロン標識リガンドの開発・評価を行った。このように脳内の神経伝達物質受容体を PET で直接評価すること、その手法を改善することによる病態の詳細の解明が本研究のねらいであった。

PET による脳内の神経伝達物質受容体の測定では、精神分裂病においては高次機能を司っている前部帯状回におけるドーパミン D2 受容体の結合能が低く、陽性症状と負の相関があることを見出した。また、精神分裂病患者において、脳内の前部帯状回における D2 受容体結合能が正常者と比較して低く、幻覚や妄想、興奮といった陽性症状が強いほど D2 受容体結合能が低いという結果を得た。ドーパミン受容体の 5 つのサブタイプのうち、精神分裂病の陽性症状との関係が指摘されている D2 受容体の大脳皮質における量を抗精神病薬服用中の患者で測定した結果では、側頭葉の D2 受容体の約 80%が薬剤で占有され、経時的に占有率が減衰する事が明らかになり、血中濃度から脳内濃度を推定することが可能であることを示した。また、精神分裂病患者において、セロトニン 1A 受容体とベンゾジアゼピン受容体について検討し、扁桃体でセロトニン 1A 受容体が減少しており、不安・抑うつ症状と負の相関があることを見出した。須原らは PET を用いて、精神分裂病患者の脳内のグルタミン酸作動性神経系について調べるため、NMDA 受容体に結合する薬剤で、脳への移行性を改善させた Acetyl- [11C]L-703,717 を開発した。これを用い、マウスおよびラットの NMDA 受容体を *in vivo* で測定した結果、今までの死んだ脳の凍結切片における実験結果である、海馬や大脳皮質への集積とは異なり、小脳に多く集積した。さらに脳内取り込みを改良するため、構造を変えた Methoxy-L- 698532 は、結合能が大きく変わり大脳皮

⁷ Nakatomi H et al., Cell, 110(4), 429-41, 2002

質に高い取り込みを示し、大脳皮質の NMDA 受容体の測定に応用可能となった。

本研究は「PET による気分障害患者の病態と治療法の作用機序に関する研究」(科研費基盤研究(B)、2002~2005 年度)に引き継がれ、抗うつ剤によるセロトニントランスポーター占有率の経時的変化と血中濃度の経時的変化の関係などの研究が行われ、抗うつ薬の用法用量決定の新しい方法の提案につながった。また、精神分裂病患者における高プロラクチン血症と向精神薬の下垂体ドーパミン D2 受容体占有率の関係の研究から、高プロラクチン血症の予測法の開発などにもつながった。以上のような脳内の神経伝達物質受容体を直接評価する試みは、将来の治療薬の開発と、現在経験的に使用されている抗精神薬の使用法に科学的な裏付けを与える点で、将来の精神科医療に貢献できるものと考えられる。

2-2-3 Ca チャネル遺伝子の変異と神経疾患 (研究代表者: 田邊 勉)

本研究の目的は、ふらつきなど運動機能障害を進行性に発症する脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6: spinocerebellar ataxia type 6) の病態と Ca チャネル遺伝子変異との関係を明らかにするとともに、変異 $\alpha 1A$ チャネル及び共存する他のタイプの Ca チャネルの発現調節、制御機構の活用により、神経細胞の変性脱落のメカニズムを解明することであった。これらの研究を通じて、未解明な SCA6 については同様な神経変性疾患の治療法を開発することをねらいとしていた。

我が国における常染色体性優性遺伝性の純粋脊髄小脳失調症の家系を対象として連鎖解析⁸を行い、それらが遺伝的に異質な複数の疾患より成ること、その約半数が第 19 番染色体 13.1 に遺伝子座を有することを明らかにした。また SCA6 の患者プルキンエ細胞の細胞質内に P 型 Ca チャネルの凝集体を見出した。一方、多くのプルキンエ細胞の細胞質内と核内に顆粒状の小封入体が見出され、これらの観察により、組織切片のみでも SCA6 の確定診断が可能になった。SCA6 患者の臨床症状の分析の結果、他の脊髄小脳失調症にはあまりない特徴として、めまいや動揺視を伴う垂直性眼振が多いことや反復発作性の症候が多いことが明らかになった。患者由来 P 型および Q 型スプライズバリエーション Ca チャネルを作製してその電気生理学的特性を解析したところ、ポリグルタミンの伸長に伴い P 型チャンネルが不活性化しやすくなるのに対し Q 型は不活性化しにくくなることが明らかとなった。このことは、小脳失調を特徴とする SCA6 では、P 型チャンネルを多く発現するプルキンエ細胞の脱落が見られることと呼応していた。従ってこれらチャンネルを通して細胞内に流入する Ca 量の変動が SCA6 の疾患症状の原因であることが示唆された。また SCA6 同様難治性疾患である反復発作性失調症 2 型 (EA2) および家族性片麻痺性偏頭痛 (FHM) について EA2 モデルマウス、FHM モデルマウスを作製した。モデル動物においては発症前段

⁸ 遺伝子座間の 2 遺伝子座間で起こる、減数分裂 1 回あたりの交叉の回数の期待値である遺伝地図距離を、交叉が起こる確率を一定として、組換え値の推定に基づいて推定する手法。

階から老齢に至るまで詳しく解析が可能であり、モデル動物に様々な負荷をかけることにより、発症誘引因子を同定することが可能になった。

本研究終了後の研究として、SCA6 ノックインマウスを作製し、小脳プルキンエ細胞の Ca 電流量を測定したところ、電流量がノックインマウス（ポリグルタミン 28 リピート）と野生型マウス（ポリグルタミン 13 リピート）で差は認められず、上述した患者由来の P 型 Ca チャンネル遺伝子を導入した細胞における P 型 Ca チャンネルでの測定結果とは異なる結果であった。従って、SCA6 は Ca チャンネルの機能障害というよりも、ポリグルタミンの長さの差により発症する疾患として捉えたほうが適切と考えられる⁹。SCA6 ノックインマウスおよび SCA6 変異チャンネルの発現する培養細胞などを用いてさらに解析を続けている。本チャンネルの他の部分の変異でおこる EA2、FHM などについても同様な研究を続けている。以上の研究は Ca チャンネル起因疾患遺伝子変異を有するヒトにおいて、発症を回避する方法の開発につながる成果であると考えられる。

2-2-4 脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析（研究代表者：辻本 賀英）

脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy: SMA）は運動神経細胞の脱落に起因する筋萎縮で特徴づけられる常染色体劣性疾患であり、治療法がない難病であった。その原因遺伝子として Smn（survival motorneuron）が同定されていた。本研究以前の研究で Smn 蛋白質が Bcl-2¹⁰に結合し、そのアポトーシス抑制活性を増大させることを見出していた。これらの蛋白質の解析を通して SMA の発症メカニズムを解明することで、神経変性による運動機能不全の治療応用への可能性をさぐることを本研究のねらいとした。

本研究では、Bcl-2/Smn の結合に必要な領域として、細胞死抑制に必須のドメインである BH4 を含む Bcl-2 の N 末領域と Smn のエキソン 6 領域が相互作用に必須であることを明らかにした。Bcl-2 遺伝子異常がミトコンドリア膜透過性を変化させ、外膜からチトクローム C などのアポトーシス蛋白質が漏出することにより、SMA における運動神経細胞のアポトーシスを誘起することを示した。また、BH4 ペプチドに膜透過性を付与した tat-BH4 ペプチドはマウスやラットにおいて細胞死抑制機能を示し、疾患治療薬剤の開発の可能性を示した。細胞死の別経路として、脳梗塞などの虚血性変性疾患における細胞死の分子メカニズムを、低酸素・低グルコース誘導性の細胞死の解析を通して検討した。さらに siRNA を用いた機能的遺伝子ノックアウト法により、アラキドン酸遊離酵素 iPLA2 分子が低酸素・低グルコース誘導性の細胞死と核収縮に必須であることを示した。アポトーシスにおいてクロマチン凝集を担う分子である Acinus を同定した。以上は、脊髄性筋萎縮症を含む神経変性疾患の発症メカニズムの一部を解明したものであり、Bcl-2 の制御による SMA の

⁹ Saegusa H, et al., Mol. Cell Neurosci., 34(2), 261-270, 2006

¹⁰ アポトーシス抑制というユニークな生理活性を有するがん遺伝子産物

治療の可能性を示したという観点からも重要であった。

本研究終了後の研究で、Bcl-2 はアポトーシスと異なる細胞死経路すなわちオートファジー細胞死にも関連していることが明らかになり、Bcl-2/Bcl-x(L)に結合能を持つ自己食蛋白質 APG5 と Beclin-1 により惹起され、3-methyl adenin のようなオートファジー死拮抗薬で抑制されることが明らかになった¹¹。また、Bcl-2 遺伝子が過剰発現したマウスにおいて、虚血再灌流による尿細管の細胞障害が抑制されることが明らかになった¹²。この研究は、虚血再灌流障害が Bcl-2 の機能を増強することにより防止可能であることを明らかにしている。以上、一連の研究は細胞死に様々な経路が存在し、その制御により予防可能であることを示している。また、Bcl-2 と結合する蛋白質の阻害薬を設計することにより、細胞死の抑制薬の開発が可能であることを示唆している。

2-2-5 神経細胞における増殖制御機構の解明（研究代表者：中山 敬一）

がん・心虚血性疾患・脳血管障害は全て細胞増殖の問題であると考えられる。がんは細胞増殖が無制限に起こることがその原因であり、心虚血性疾患と脳血管障害では欠損した組織再生が起こらないことが治療を不能にしていた。本研究のテーマは、「なぜ神経細胞は分裂しないか」という点にあり、その本質的なメカニズム、特に神経細胞等の非分裂性細胞で喪失している細胞周期における G0 期（静止期）からの脱出機構の分子メカニズムを明らかにすることがねらいであった。

本研究では、細胞周期のブレーキ分子の代表格である p27Kip1 と p57Kip2 の発現パターンを詳細に解析したところ、脳の発生過程において、神経細胞の増殖時期・部位においては両分子が全く発現されていないが、増殖が止まって分化が始まるときに両分子が発現してくることを明らかにした。また p27Kip1 と p57Kip2 のノックアウトマウスを作製し、個体における両ブレーキ分子の役割を明らかにした。即ち p27Kip1 と p57Kip2 の両者を欠損させたマウスでは、胎盤形成が障害されて胎仔の成長が止まることを観察した。p27Kip1 を T 細胞に強制発現したトランスジェニックマウスを作製し、T 細胞機能を検討した結果、免疫機能が低下し分化にも影響することを明らかにした。

p27Kip1 の発現の調節について研究した結果、p27Kip1 は増殖期の細胞には発現しておらず、非増殖期の細胞には高発現していることが分かった。非増殖期にある細胞が再び増殖を開始する際には、p27Kip1 は急速に分解される。p27Kip1 の分解機構の生化学的解析を行い、未知のユビキチンリガーゼを生化学的に精製することに成功し、新規分子である KPC (Kip1-ubiquitylation Promoting Complex) を得た。また、その遺伝子を単離した。KPC の発現をコントロールすることによって p27Kip1 の分解は変化したため、最終的に

¹¹ Shimizu S et al., Nature Cell Biol., 6, 1221-1228, 2004

¹² Suzuki C et al., Cell Transplant., 17, 223-229, 2008

G0-G1 移行期の p27Kip1 の分解に関わっている責任分子は KPC であることを証明した。これによって、細胞周期におけるブレーキ分子 p27Kip1 の発現制御機構の全貌がほぼ解明された。この分子の制御は神経再生を可能にすると考えられる。

本研究終了後の研究で、p27Kip1 ノックアウトマウスでは、膵島の肥大が起こり、高血糖になりにくいこと¹³、p27Kip1 の S10A ノックインマウスでは G0 期の安定性が極度に低くなっていることを発見した。また、KPC1 とともに KPC を形成する KPC2 は UBA (ユビキチン会合) 蛋白質と結合して p27Kip1 の制御をしていることを見出した¹⁴。さらに、p27Kip1 の核外移行がサイクリン D2 に依存していることを発見した¹⁵。p57Kip2 遺伝子の代わりに p27Kip1 をノックインしたマウスを作製し、生体内における大部分の p57Kip2 の機能は p27Kip1 によって置き換えられることが可能であることを見出した¹⁶。しかし、p57Kip2 ノックアウトマウスで見られるいくつかの欠陥は残ったことから、p57Kip2 に独自の機能があることを見出した。以上の結果は細胞分化のメカニズムの詳細を明らかにするものであり、がん細胞の無限増殖や心筋細胞の再生法の開発に貢献し、新しい抗がん剤や再生治療の手がかりとなるものと考えられる。

2-2-6 老化脳における神経の可塑性制御の分子基盤 (研究代表者: 森 望)

老化脳の機能低下に対処するには、神経可塑性とその背後にある遺伝子制御のメカニズムを理解することが重要である。それには神経の突起伸長に関連する分子の機能、その遺伝子発現制御の機構および活性制御の機構を知る必要がある。本研究では神経の突起伸長の制御因子である神経特異的な nGAPs 誘導にかかわる神経特異的なシグナル伝達分子 N-Shc と、神経細胞に特異的な遺伝子発現を統括制御する転写抑制因子 NRSF/REST、さらに NGF/ニューロトロフィン等の神経栄養因子による nGAPs 誘導に関する研究を総合して、神経細胞に特徴的なシグナリング、遺伝子発現、および可塑性制御の分子機構を明らかにし、「脳を守る」につなげることをねらいとした。

研究の結果、神経特異的遺伝子の多くは NRSF あるいは REST とよばれる神経選択的サイレンサー (NRS) 制御因子の支配下にあり、NRSF による神経選択的転写制御がヒストン脱アセチル化酵素を介して起こることを明らかにした。また、神経突起伸長因子であるスタスミン (stathmin)、それと類似の蛋白質 SCG10、そのホモログ SCLIP (SCG10-like protein) および RB3 について微小管崩壊活性を確認し、これらの分子の発達期や神経障害における挙動を明らかにした。N-Shc の生理機能を知るために、網膜視神経系の発達と視神経切断後の再生応答の過程を検討した結果、N-Shc が、in vivo で神経栄養因子 BDNF 刺

¹³ Uchida T, et al., Nat. Med., 11(2), 175-182, 2005

¹⁴ Hara T, et al., Mol. Cell Biol., 25(21), 9292-9303, 2005

¹⁵ Susaki E, et al., Mol. Cell Biol., 27(13), 4626-4640, 2007

¹⁶ Susaki E, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106(13), 5192-5197, 2009

激下に活性化されることを明らかにした。一方、N-Shc 活性化によりアクチン骨格系の再編成が誘起されるが、N-Shc には従来知られていなかった新たなシグナルアウトプット領域があり、そこにアクチン骨格再編成へのシグナルを流す Crk アダプターが結合することを明らかにした。さらに、N-Shc に特異的に結合する分子を探索した結果、新たな GTPase 活性化因子 RhoGAP を単離し、Grit (GTPase Regulator Interacting with TrkA) と命名した。この蛋白質は C 末で神経栄養因子の受容体 TrkA にも結合する。Grit の発現は神経栄養因子シグナル等膜上の活性化シグナルを、N-Shc, Crk を介してアクチン骨格制御へとつなげる新規分子と考えられる。さらに、N-Shc の遺伝子欠損マウスを入手して行動学的解析を進めた結果、水迷路探索学習行動などの向上が見られ、N-Shc が、生理的に TrkB-Ras/MAPK シグナリングのみならず、NMDA 機能抑制を担っている可能性が明らかになった¹⁷。

本研究終了後の継続研究において、神経特異的な微小管崩壊因子である SCG10 やその関連分子のリン酸化により微小管崩壊活性が消失することが確認され、神経突起伸長制御への関与の詳細が明らかになった¹⁸。他の研究者の最近の研究では、NRSF/REST が ES 細胞からの分化制御の鍵分子となる可能性¹⁹と、スタスミン関連分子が扁桃体での恐怖識別のような脳高次機能²⁰や、小脳のプルキンエ細胞の樹状突起の分岐（ブランチング）の制御に関わっていることも明らかになり²¹、本研究で発見した微小管崩壊制御分子の重要性はますます高まり、種々の細胞分化の鍵分子となっている。

2-2-7 脳関門排出輸送に基づく中枢解毒（研究代表者：寺崎 哲也）

脳内には微細な血管である毛細血管が密な網の目を形成しており、血液脳関門(BBB)すなわち、この脳毛細血管を構成している内皮細胞が血液から脳方向への供給輸送過程と脳から血液方向への排出輸送過程を厳密に制御している。本研究では、「BBB は、脳から血液方向に多様なトランスポーターが働いて脳内の不要な親水性物質を排出することで中枢解毒という生理的役割を果たしている」という仮説をたて、その分子機構を解明し、精神神経疾患や痴呆症などにおいて BBB が「脳を守る」という生理的役割をはたしていることの解明および、脳疾患治療法開発の糸口を見出すことをねらいとした。

BBB 研究を行うには *in vitro* で機能を保持した培養細胞系の開発が必要不可欠であった。温度感受性 tsA58 SV40 large T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスおよびラットから、不死化脳毛細血管内皮細胞株(TM-BBB, TR-BBB)を初めて樹立した。この細胞株は各

¹⁷ Miyamoto Y, et al., J. Neurosci., 25(7), 1826-1835, 2005

¹⁸ Morii H, et al., J. Neurobiol., 66(10), 1101-1114, 2006

¹⁹ Gupta SK, et al., Differentiation, 77(1), 19-28, 2009

²⁰ Shumyatsky GP, et al., Cell, 123(4), 697-709, 2005

²¹ Liu A, et al., Glia, 44(3), 264-274, 2003

種脳内物質の *in vivo* の輸送速度と同じ速さの輸送能を示し、*in vivo* BBB 機能を保持した培養細胞系であった。また脈絡叢上皮細胞による血液脳関門、血液脳脊髄液関門の細胞株も確立した。これらの細胞株の BBB 関門機能の研究により、 γ -アミノ酪酸 (GAT1)、アスパラギン酸 (ASCT2)、1-プロリン (ATA2) などの神経伝達物質とその調節物質の排出系、尿毒症物質排出系 (OAT3)、脳内ステロイド代謝物排出系 (oatp2) など、新規トランスポーターが存在することを発見した。さらに、血流から脳方向へ働くトランスポーターとして脳内に高濃度に存在するクレアチンのトランスポーター CRT の存在が明らかになった。脳内クレアチン低下による中枢障害が、このトランスポーターの異常に基づくことが示唆された。脳保護の重要分子であるグルタチオンを合成するための前駆体である、L-システインの脳への供給経路を明らかにするために、正常時と酸化ストレス下での BBB トランスポーターの変化を検討した結果、ジエチルマレイン酸により、正常時には見られなかった L-システインの取り込みが活性化されることを見出した。酸化ストレスを緩和するためにトランスポーターが発現し、L-システインの取り込みが増加することが明らかになった。また、脳内浸透圧や TNF- α による BBB トランスポーターの発現変動を検討した結果、タウリン輸送担体 TAUT および ATA2 の発現が誘導され脳毛細血管を防御していることが明らかになった。脳関門にある各種トランスポーターは脳障害を回避するために各種ストレスに対応して発現し、脳保護に寄与していることが、樹立した培養細胞系を用いた研究により明らかになった。

本研究終了後の研究において、本研究で樹立された細胞株を使って脳毛細血管内皮細胞の密着蛋白質の一つである occludin の発現誘導機構の一部を明らかにした²²。平成 15 年度からの SORST 研究においては、アルツハイマー病におけるアミロイドタンパクペプチドの脳内から BBB を通り排出される機序の研究²³および血液脳脊髄液関門、血液網膜関門などの機能について継続研究されている。

本研究の過程で LC-MS/MS による多種蛋白質一斉定量、同定法を開発したが、脳腫瘍患者の標本の BBB の機能をこの方法で研究している。さらに、大学発ベンチャー企業を立ち上げ、本方法の普及をはかっている。本方法による蛋白質の動態研究を行う薬動学の新領域として Pharmacoproteomics 研究会を立ち上げた。

2-2-8 脳虚血により引き起こされる神経細胞死防御法の開発 (代表研究者: 遠山 正彌)

脳虚血により神経細胞は低酸素状態になり容易に死に至るが、アストロサイトは低酸素刺激下でも生き残る事は良く知られていた。本研究では、アストロサイトが低酸素刺激下で生き残るための因子を探索し、その因子を神経細胞に発現することで虚血による神経細

²² Hori S et al., J. Neurochem., 89, 503-513, 2004

²³ Tamaki C et al., Mol. Pharmacol., 72, 850-855, 2007

胞死を救うことをねらいとした。研究の過程でアルツハイマー病（AD）における神経細胞死も虚血が関与することを見出し、その機序の解明も目指した。

研究の結果、アストロサイトに発現する因子は小胞体に局在する分子シャペロン ORP150 (Oxygen Regulated Protein150)であることをつきとめた。小胞体で ORP150 の発現を抑制したアストロサイトは、低酸素刺激により容易にアポトーシス様の死に至ることを明らかにした。また ORP150 の発現を抑制し低酸素刺激を加えると小胞体からゴルジ体への蛋白質輸送が障害されること、即ち ORP150 は低酸素刺激下で、小胞体からゴルジ体への蛋白質輸送を担うシャペロンであることを明かにした。これらの *in vitro* で得られた結果を *in vivo* で確認するために、神経細胞に特異的に ORP150 の発現上昇をきたすトランスジェニックマウスを作成し、その中で大脳動脈結紮虚血を起こした脳においては梗塞巣が著しく縮小することを見出した。これらの事実は、脳虚血時に ORP150 発現上昇を起こせば、脳虚血による神経細胞死を防御できる可能性を示唆している。この研究の過程で AD における神経細胞死も虚血が重要な因子である可能性を見出し、AD の神経細胞死の機序の解明とその防御法についても研究した。家族性 AD (FAD) では 14 番遺伝子上のプレセニリン 1 遺伝子 (PS1) の変異体が発現し、小胞体ストレスを受けたとき、折り畳み不良蛋白質を改善する小胞体内分子シャペロン GRP78/BiP の mRNA の発現が抑制され、ストレスに対する脆弱性が見られた。また、GRP78/BiP 導入細胞では小胞体ストレスに対する脆弱性は消失した。孤発性 AD (SAD) についても同様な機序が存在することを想定して研究した結果、1 番染色体上にある PS2 の変異体 (PS2V) が患者脳から検出された。PS2 が低酸素刺激を負荷した細胞で検出されること、PS2V を発現する細胞は小胞体ストレスに対して特に脆弱であることを見出した。その機序として PS2V が小胞体のストレス防御経路における最初の分子 IRE1 α に結合してリン酸化を障害し、その後の経路進行を抑制し、細胞死につながることを明らかにした。PS2 の正常なスプライシングを抑制する蛋白質を検索した結果、既知の蛋白質 HMG1a (high mobility group A protein 1a) が PS2 pre-mRNA の exon5 に結合し PS2V を誘導することを発見した。HMG1a が結合する配列を同定し、その配列を導入することで PS2V の産生と細胞死が抑制された。すなわち、HMG1a の抑制により SAD の抑制が可能であることを示した。

本研究終了後の研究においては、カスパーゼ 4 の分解がカスパーゼ 9 と 3 に伝わり、小胞体ストレスによる細胞死や β アミロイドによる細胞死を仲介していることなどの詳細な機序を解明した²⁴。また、ALS²⁵やパーキンソン病²⁶も小胞体ストレスが関与していることを見出し、小胞体ストレスから生じる異常蛋白質の蓄積が様々な病態や神経障害に深く関与していることを明らかにしている。細胞死が関連する種々の疾患に対して治療のヒントとなる研究と考えられる。

²⁴ Hitomi J, et al., J. Cell Biol., 165, 347-356, 2004

²⁵ Yamagishi S, et al., PLoS One, 2(10), e1030, 2007

²⁶ Bando Y, et al., Neurochem. Int., 46(1), 11-18, 2005

2-2-9 ウイルス性脳障害の発症機構の解明と治療法の開発（研究代表者：長嶋 和郎）

ウイルスによる脳の障害は多くの場合致命的であるが、ウイルス性脳障害の有効な治療法は確立されていなかった。本研究は、ウイルス性の脳障害発症機序を解明することにより、各種ウイルスから「脳を守る」方法を開発することをねらいとした。

JC virus (JCV) は、ヒト中枢神経系に特異的に脱髄を起こす疾患である進行性多巣性白質脳症 (PML) の原因ウイルスであり、感染初期は無症候性であるが腎・尿路系またはリンパ球に潜伏し、ウイルス性脳障害を発症する。JCV は外殻蛋白質 VP1 と膜上のシアル酸を受容体として細胞接着し、clathrin 経路を介して細胞内侵入し、細胞内小器官を用いて細胞内移送され、p53 の結合蛋白質である複製蛋白質 A を利用して増殖することを解明した。さらに JCV の siRNA および中和抗体を作製して、JCV 感染を抑制することに成功し、PML 治療への基礎的手法を確立した。加えて、AIDS の原因ウイルスである HIV に関して、細胞の DNA の複製関連因子がウイルスに結合後、RNA を切断、再結合して cDNA の合成を行っているという増殖の機構を解明し、HIV のゲノム RNA の再結合を抑制する薬剤を見出す試みを行った。HIV 感染およびその治療法の研究に基づき、インフルエンザウイルスについても予防法の開発を行った。インフルエンザウイルス感染モデルマウスを用いて、補体分子である CD3 とインフルエンザウイルスの分泌型ヘマグルチニンを融合させた蛋白質を作成して経鼻接種を行い、その IgA および IgG 誘導活性を確認した。この感染防御能は、従来の粘膜アジュバントであるコレラトキシン B サブユニットの活性と同等であった。また、神経系細胞の分化誘導時に重要な Rap1 の抑制因子 Rap1GapII の単離とその機能の解析およびウイルス感染等の刺激により生じる DNA 傷害時の p53 と Chk2 の機能の解析研究を行った。加えて、細胞内シグナル伝達の解析のため、Raichu プローブなどによるシグナル伝達物質の分子間相互作用の可視化を行い、視覚的にモニターすることに成功した。

本研究終了後の研究では、JCV の感染に対してサイクリン依存性キナーゼを、その阻害剤 Roscovitine で抑制すると JCV の増殖が抑えられ、Roscovitine が PML の抑制薬となりうることを証明した。JCV を構成する遺伝子である Agno を欠損させると、JCV 自体の増殖が抑制されるという基礎的事実に基づき、Agno に対する RNAi 法を用いて JCV の増殖が抑制されることを確認した²⁷。

また、研究期間中には完成しなかった JCV 感染動物モデルを、ヒト JCV 感染細胞をヌードマウス脳内に接種することにより作製し、これに siRNA を投与することにより感染細胞での JCV の増殖抑制作用を証明した²⁸。

JCV の Agno 蛋白質と宿主因子との関係を yeast two-hybrid assay を行って検討し、Agno が細胞因子と結合して、JCV 粒子の核外輸送を促進することを明らかにした²⁹。また Agno

²⁷ Orba Y, et al., J. Virol., 78, 7270, 2004

²⁸ Motoba T, et al., Neuropathology, 28(3), 286-294, 2008

²⁹ Suzuki T, et al., J. Biol. Chem., 280, 24948, 2005

が細胞因子の *intra cellular trafficking* に影響を与え、この作用が JCV によって中枢神経系に惹起される脱髄病変を形成するという機序を見出した。さらに、長嶋らは JCV の感染制御因子として神経系細胞に特異的に発現する RNA helicase である DDX 1 (DEAD box protein 1) を単離した³⁰。

JCV の性質の詳細をさらに研究することで PML の新しい治療法の開発につながると考えられる。

2-2-10 活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構 (研究代表者: 中別府 雄作)

神経前駆細胞は神経細胞に分化して神経回路網を構築すると分裂能を失う。神経細胞は分裂能を欠くため、加齢するにしたがいミトコンドリアの酸素呼吸に伴う活性酸素により障害され変性脱落する。本研究では「DNA の酸化障害」が神経細胞の寿命を決定する主要因の 1 つであると仮定し、「DNA の酸化障害に対する防御機構」の異常が各種神経変性疾患の危険因子となっている可能性を明らかにすることをねらいとした。

上記の作業仮説に基づき、DNA の酸化障害物としてグアニンの酸化体 8-オキシグアニン (8-oxoG) とアデニンの酸化体 2-ヒドロキシアデニンに注目して研究した結果、核ゲノム DNA およびミトコンドリアゲノム DNA に蓄積した酸化塩基の修復に関わる酵素 OGG1 および MYH を同定し、その遺伝子をヒト、マウスおよびラットからクローニングした。さらに、それらの遺伝子欠損マウスを樹立した。このマウスの生存率は野生型と変わらず、酸化体の蓄積量の経時的変化の測定が可能であるために、この分野の研究に有用である。ヌクレオチドの酸化体の中でプリンヌクレオシド三リン酸の酸化体と脱アミノ体は、ヌクレオシドリン酸への分解の過程を経てヌクレオチドプールが浄化されるが、酸化ヌクレオチドのゲノム DNA および RNA への取込みを抑制、脱リン酸化する酵素 MTH1、ITPA を同定し、その酸化ヌクレオチド認識機序を解明した。活性酸素による細胞障害の関与が示唆されているパーキンソン病 (PD)、アルツハイマー病 (AD)、脳出血 (SAH)、孤発性の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者と対照群の剖検組織を用いて、8-oxoG の蓄積の程度を酵素抗体法で検出して解析した結果、PD 患者の脳細胞の細胞質に顕著な 8-oxoG の蓄積を認めたが、コントロール群ではほとんど 8-oxoG の蓄積は見られなかった。また、SAH と ALS 患者の脊髄前角細胞の細胞質に顕著な 8-oxoG の蓄積を認めた。以上の結果から、PD、SAH、ALS における活性酸素障害の 1 つとしてグアニンの酸化が存在することが明らかになり、これらの疾患に DNA の酸化傷害が関与する可能性を示した。また中別府は、MAP キナーゼカスケード、特に FosB と結合して働く Jun をリン酸化する酵素 JNK の活性化を空間的に制御するスキャフォールド蛋白質として新規蛋白質 JSAP1 を発見し、JSAP1 が JNK 経路を介して個体の初期発生、特に脳の初期発生に必須である事を明らかにした。培

³⁰ Sunden Y, et al., *Microbiol. Immunol.*, 51(3), 327-337, 2007

養細胞を用いて FosB 遺伝子産物の機能解析を進め、 Δ FosB 蛋白質が細胞増殖・細胞分化・細胞死を制御する機能を持つことを明らかにした。さらに、この Δ FosB の下流で発現誘導される蛋白質として、神経軸索伸長因子あるいは軸索再生因子として機能する Galectin-1 α とその新規アイソフォーム Galectin-1 β を同定した。Galectin-1 β は軸索再生を促進するが、細胞死を誘導しない事から、神経再生を促進する治療薬への開発可能性が考えられる。

本研究終了後の研究においては核 DNA とミトコンドリア DNA に蓄積した 8-oxoG がそれぞれ独立の経路で細胞死を誘発すること、MTH1 が 3-ニトロプロピオン酸によって誘発される線条体変性を効率よく抑制することなどを明らかにした。さらに、JASP-1 や Δ FosB などの機能の詳細および疾患との関係の研究を続けている。DNA の酸化による神経障害の抗酸化剤による抑制や、Galectin 産生を促す方策を組み合わせることにより酸化障害に基づく各種疾患の発症の予防につながると考えられる。

2-2-11 DNA チップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明（研究代表者：西野 一三）

筋ジストロフィーの原因には極めて多岐にわたる分子が関与していることが明らかになっていった。一方でこのような多種・多様な遺伝子の異常がなぜ筋ジストロフィーという共通の病態像を示すのかについては解明されていない点が多かった。正常および疾患筋組織でどのような遺伝子群が優位に発現し、あるいは抑制されるかについての情報を全て知ることができれば、筋ジストロフィーに共通な病態像を特徴づける遺伝子発現プロファイル、即ち分子病理像を明らかにできる。また、まだ治療法が開発されていない本疾患について、ヒト骨格筋特異的 DNA チップによって、細胞内の全ての遺伝子発現を一気に解析して、その遺伝子発現調節機構を明らかにし、新たな治療戦略を立てる必要がある。以上の考えの下に大規模筋特異的 DNA チップを開発し、実用化することが本研究のねらいであった。本研究は荒畑を研究代表者として開始されたが、荒畑の死去により西野が引き継いだ。

本研究において大規模ヒト筋特異的 DNA チップが開発・作製され、 μ g 程度の RNA 量でも遺伝子発現プロファイルの解析が可能となった。本チップによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーの遺伝子発現を調べ、分子マーカーによる疾患組織の病理変化をモニターすることが可能であることを示した。また、患者の保存試料から肢帯型筋ジストロフィー、エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー、ミオチューブラーミオパチー、先天性筋強直性筋ジストロフィーなどの遺伝子発現変化を調べ、骨格筋遺伝子発現情報の分類を行った。筋ジストロフィー治療に有望である成長因子 IGF-1 を投与し、遺伝子変化を調べた結果、筋再生が確認され、MAPK 経路が標的経路であることが明らかになった。また、TGF β ファミリー分子であるマイオスタチンが培養筋分化に対して負の制御を行い、筋特異的発現遺伝子が発現阻害を受けることを確認した。

本研究終了後の研究においては、各種筋萎縮性疾患における遺伝子変異の研究を継続し

ている。また、本研究の過程でライソゾーム性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究として、新規に発見された縁取り空胞を伴う遠位型筋ミオパチー(DMRV)³¹の研究に基づき、DMRVの原因遺伝子が直接ライソゾーム機能と関係がない、シアル酸生合成経路の律速酵素 UDP-GlcNAc 2-epimerase(GNE)を産生する GNE 遺伝子であることを見出した³²。培養細胞において GNE 代謝産物はシアル酸合成の低下を抑制することが明らかとなった。筋疾患の治療に結びつく可能性があることから、DMRV および遺伝性封入体ミオパチー (HIBM) についてのマウスモデル動物を開発し、ヒトと同様な病態を発症することを見出した。このモデルマウスにシアル酸あるいはその前駆体 (N-アセチルマンノースアミン) を投与することにより治療効果があることを明らかにした。ヒトへ応用により、DMRV の治療を目指している。ヒトの筋ジストロフィーの治療に結びつく薬物開発の可能性につながる成果である。

2-2-12 神経変性の分子機構解析に基づく新しい治療戦略の開発 (研究代表者: 垣塚 彰)

ハンチントン病、マシャド・ジョセフ病(MJD)などの9つの遺伝性神経変性疾患は、原因遺伝子内の伸長した CAG リピートが作り出すグルタミンリピート (ポリグルタミン) によって発症すると考えられるためポリグルタミン病と呼ばれる。しかし何故ポリグルタミンが神経細胞変性や細胞死を引き起こすかは十分に解明されていなかった。本研究はポリグルタミンなどの異常蛋白質の蓄積・凝集が神経変性を引き起こしているとは仮定し、ポリグルタミン病をモデルに用いて神経変性疾患に共通する発症メカニズムの解析をねらいとした。

MJD の原因蛋白質からポリグルタミンを含む C 末端部分を切り出す (プロセッシング) 活性を持つ PC12 細胞の亜株を分離し、プロセッシングが約 220 番目のアミノ酸近傍で起こっていること、MJD 患者の罹患部位でも同様なプロセッシングが生じていることを明らかにした。また、ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死に関わる遺伝子について、ショウジョウバエを用いた遺伝学的な手法でスクリーニングし、ter94 (ショウジョウバエの VCP 相当遺伝子) が、細胞死に積極的に関わる遺伝子であることを明らかにした。多くの神経変性疾患に認められる異常蛋白質の蓄積を感知している分子の存在を想定し、培養神経細胞を用いてポリグルタミンが引き起こす細胞死シグナルを解析した結果、伸長したポリグルタミンをもつ MJD 蛋白質と相互作用する蛋白質を培養細胞から生化学的に精製し、その蛋白質が AAA(ATPase associated with various cellular activities)ATPase の family である VCP であり、神経変性疾患において凝集体と共局在することが判明した。また VCP の 6 量体が異常蛋白質と結合し、ATPase 活性が変化することにより異常蛋白質量を感じている

³¹ Nonaka K, et al., J. Neurol. Sci., 51, 141-155, 1981

³² Nishino I, et al., Hum. Mol. Genet., 16, 2669-2682, 2007

ることを明らかにした。この VCP の ATPase 活性は小胞体からユビキチン化された異常蛋白質を細胞質に引き出し、プロテアソームにより分解を受けるというプロセスを担っていることを明らかにした。小胞体に蓄積した異常蛋白質が大量になると、小胞体ストレスをもたらし、MAP キナーゼファミリーの JNKなどを介して細胞死誘導に至ることが明らかになった。

本研究終了後の研究においては、VCP の機能障害が種々の疾患を起こしていることを明らかにしている。家族性筋萎縮性側索硬化症において、VCP はユビキチン化した封入体にユビキチンリガーゼである *Dorfin* と共存していること、パーキンソン病のレビー小体にも VCP が存在し凝集体処理の過程に関与している可能性を明らかにし³³、VCP の D2 α ドメインが ATPase 活性制御ドメインとして働き、この部分の修飾により VCP の ATP 活性が制御されることなどを明らかにしている³⁴。これらの結果は、VCP が関与する神経変性疾患に対して有効な治療・予防法の開発につながる成果である。

2-2-13 プリオン複製に関与する新しい因子の同定とプリオン病治療法開発への応用（研究代表者：金子 清俊）

プリオン病はプリオンと呼ばれる感染性病原体に起因すると考えられる人獣共通感染症である。プリオンの本体は、正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) と構造の異なる感染型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) であり、特に我が国では脳外科手術において乾燥硬膜が使用されたため、硬膜移植が原因と考えられる例が多く、医原性プリオン病が大きな社会問題となっていた。こういった背景の中で、PrP^C から PrP^{Sc} に変化する過程で働く解きほぐしに関与する新しい因子の同定、すなわち、感染型への変換に関与する分子シャペロン様分子の同定により、プリオン病の進行阻止と治療法を開発することが本研究のねらいであった。

本研究で、金子らはトリプシン感受性を利用した独自の試験管内アッセイ系を確立し、出芽酵母から蛋白質を解きほぐす新しい分子シャペロン、アンフォルジンを発見した³⁵。アンフォルジンは、正常に畳まれた蛋白質分子を解きほぐすのみならず、プリオン蛋白質、アミロイド β ペプチド(1-42)、 α -シヌクレインなどの異常凝集体の高次構造も非特異的に解きほぐす活性を有していた。この時のアッセイ系を用いて、哺乳動物細胞からこのような解きほぐし活性を持つ分子の精製を試みたが、本研究期間中には同定できなかった。プリオン蛋白質は GPI アンカーを介して脂質二重膜に繫留されている膜蛋白質であるが、GPI アンカーが無い異常プリオン蛋白質でも異常プリオンを形成・伝播することを見出し、伝播には GPI アンカーが不要であることを明らかにした。プリオンの異常化に関与する蛋白質の検索とその結合特性を検討するために、培養神経芽細胞およびマウスに異常プリオン

³³ Mizuno Y, et al., *Neurosci. Lett.*, 343(2), 77-80, 2003

³⁴ Mori-Konya C, et al., *Genes to Cells*, 14, 483-497, 2009

³⁵ Hachiya N, et al., *Prions*, p 213, Springer Tokyo, 2005

膜画分を接種したマウス脳のプロテインの変動を解析し、脳組織からプリオン蛋白質に結合する物質を検索した結果、異常型プリオン蛋白質 PrP^{Sc}の増加に伴って、アストログリアの骨格蛋白質 FGAP および peroxiredoxin-6、peroxiredoxin-2 などの抗酸化ストレス蛋白質群、神経伸展に関与する CRMP-2 が増加することを明らかにした³⁶。細胞の酸性顆粒に存在するプロトンポンプである vATPase に関しては、A-subunit の量的減少が顕著であることから、異常プリオン蛋白質の蓄積が酸化ストレスを細胞に与えるとともに vATPase の A-subunit の離脱によりプロトンポンプの活性が低下し、PrP^{Sc}が酸性顆粒であるリソソームやエンドソームに蓄積すると思われる結果を得た。これらの結果は異常プリオン蓄積の機序を示唆している。

本研究終了後の研究においては、PrP^Cの働きを明らかにするために、マウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞および中央部分で切断した GFP 融合 PrP^Cを用いて、細胞内輸送機構を解析し、PrP^Cが微小管依存性に局在・移動していること、また、順方向性輸送がキネシンスーパーファミリー分子依存性であり、逆行性輸送はダイニン依存性であることを見出した。さらに神経成長因子 NGF による分化誘導前後での PrP^Cの細胞内輸送の解析では、別種のキネシンスーパーファミリーへの輸送蛋白質の乗り換えを推測させるような、神経突起内における顕著な順行性輸送速度の低下が見られた。一方、逆行性輸送速度には変化は見られなかった³⁷。これらの結果は異常プリオン伝播の機序を示すものであり、本研究で解明された異常プリオン蓄積による神経細胞のプログラム死の過程の解明とあわせて、プリオンによる細胞死の制御法開発可能性につながる結果と考えられる。

³⁶大内ら、第 80 回日本生化学会大会、横浜、2007

³⁷ Hachiya N, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 315, 802-807, 2004

第3章 研究成果から生み出された科学技術的、社会的および経済的な波及効果

3-1 概要

研究総括の意見と事前調査結果を基に、アポトーシスの観点からの研究では辻本、発生・分化から中山、トランスポーター・受容体から寺崎、遺伝子変異から荒畑・西野、垣塚の各研究課題を抽出して、その後の本研究領域の発展を俯瞰すべく詳細を追跡調査した。

辻本の研究は SORST「細胞死シグナル伝達分子を標的にした疾患治療薬の開発」に継承され、Bcl-2 及び細胞死の機序の研究を進展させた。すなわち、細胞死にはアポトーシスのみではなく、様々な細胞死経路が存在し、ホスホリパーゼ A2 (PLA2) およびオートファジーによる細胞死が細胞死の重要な経路であることを明らかにした。辻本の研究は日本におけるこの分野の研究の重要な一角をなすものであると考えられる。

中山の研究は、細胞周期の研究を通じて発生・分化の機序を解明し、究極的にはがんの制御を目指すものであるが、世界に先駆けて細胞周期における、増殖サイクルでの p27 と Skp2 の相互作用および G0 期での c-Myc と F-box 蛋白質である Fbw7 の相互作用がキープロセスであることを解明した。さらに、Fbw7 は発がん抑制因子として注目されており³⁸、今後も多くの研究が展開されると予想される。

寺崎の研究は BBB における物質排出機序を新規な測定法を案出することにより解明したところに独創性があり、その方法は高く評価されている³⁹。いくつかの新しいトランスポーターの発見も大きな業績である。また、細胞内発現蛋白質の多種類同時定量法は画期的であり、細胞内蛋白質の動態解明に大きな影響を与えると思われる。Pharmacoproteomics の概念の世界的な認識度はまだ不十分であるが、寺崎の蛋白質多種類同時定量技術が完成し普及すれば研究が進展し、大きな潮流になる可能性がある。

荒畑・西野の研究は、網羅的遺伝子検索 DNA チップの開発研究では先頭に立つことはできなかったが、その後の西野の研究により縁取り空胞を持つ遠位型ミオパチーの筋細胞の病理画像がシアル酸合成阻害により生じることを解明し、N-アセチルマンノースアミンおよびシアル酸そのものの投与により、筋障害の発生を抑制できることを発見したことは、新たな治療法の実現につながる大きな成果である。

垣塚のポリグルタミン病の概念の提唱と、VCP 蛋白質の MJD の病態との結びつきの発見は、この分野の大きな成果である。また、垣塚により見出された PCG-1 の変異と 2 型糖尿病の発症の関係も明らかになりつつある^{40,41}。

³⁸ Welcker M, et al., Nat. Rev. Cancer, 8(2), 83-93, 2008

³⁹ "A review of blood-brain barrier transport techniques in the blood-brain barrier: Biology and Research Protocols", Methods in Molecular Medicine, Vol 89, 193-208, 2003, Springer USA

⁴⁰ Patti ME, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 8466-8471, 2003

⁴¹ Skov V, et al., Diabetes, 56(9), 2349-2355, 2007

3-2 脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析（研究代表者：辻本 賀英）

3-2-1 本研究期間中における状況

辻本は、1985年頃米国において、がん遺伝子の解析を行った中でリンパ腫の原因遺伝子として *Bcl-2* を発見した（図 24）。その機能の研究を行った結果、この遺伝子は細胞死抑制機能に関連があることを見出した。その遺伝子の機能解析を続ける中で、脊髄性筋萎縮症（SMA）の原因遺伝子 *Smn* の産生する蛋白質に *Bcl-2* が結合すること、その結合により *Bcl-2* の機能が增強されることを明らかにし、SMA では *Smn* が欠損し細胞死を抑制する *Bcl-2* の機能が不十分であるために、疾患が発症するというモデルを提示した。

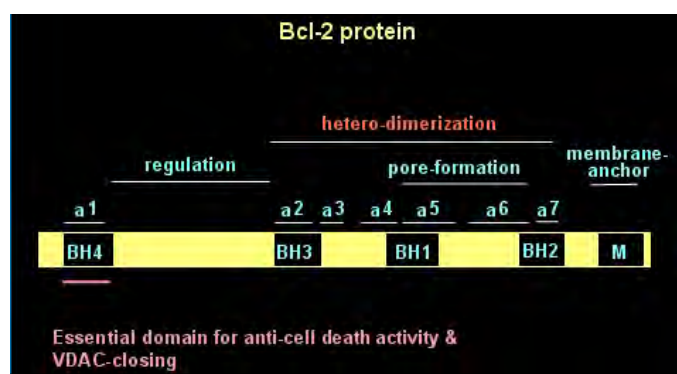


図 24 *Bcl-2* 蛋白質の詳細構造

（辻本研究室ホームページより⁴²⁾

辻本らは、*Bcl-2* の結合とアポトーシス抑制機能の詳細を解明する研究を行うべく、本研究領域に「脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析」の表題で応募した。本研究においては *Smn* と *Bcl-2* の結合機序の研究を行い、結合に関与する部分構造を BH4 ドメインに特定し、このドメイン単独でアポトーシス抑制活性を有することを見出した。その後、研究の重点は遺伝子変異と疾患の関係からアポトーシスの機序解明にシフトし、アポトーシス関連研究に注力することとなった。その過程で、1999年に、アポトーシス時に起こる核の凝縮に関与する遺伝子 *acinus* を発見し、その機能がアポトーシスにおけるクロマチン凝縮に必須であり⁴³⁾、*acinus* 遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死であることを見出した。さらに、*Bcl-2* がミトコンドリア膜の VDAC（電位依存性アニオンチャネル）を閉じ、チトクローム c の遊離抑制によりアポトーシスを抑制する機序を見出した^{44,45)}。さらに、*Bcl-2* ファミリー分子でありアポトーシスを促進する分子 *Bax*、*Bak* が VDAC 上において、*Bcl-2* に拮抗するとともに、アポトーシスにつながるチトクローム c の放出を制御していることを明らかにした^{44,45)}。

⁴²⁾ <http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gene/www/research/project.html#1>

⁴³⁾ Sahara S, et al., Nature, 401(6749), 168-179, 1999

⁴⁴⁾ Shimizu S, et al., Nature, 399(6735), 483-487, 1999

⁴⁵⁾ Shimizu S, et al., J. Cell Biol., 152829, 237-250, 2001

3-2-2 本研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況

研究資金	研究テーマ	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
CREST	脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析	1期												
科学研究費補助金基盤研究(B)	細胞死実行遺伝子ICEを発現するショウジョウバエを用いた細胞死の分子機構の解析													
科学研究費補助金特定領域研究(A)	神経細胞死の防御と機能修復													
科学研究費補助金特定領域研究	アポトーシスにおける細胞質から核への情報伝達メカニズム													
SORST	細胞死シグナル伝達分子を標的とした疾患治療薬の開発													
科学研究費補助金学術創成研究費	細胞死学の創成:非アポトーシス型細胞死を中心としたバイオロジー													
科学研究費補助金基盤研究(S)	細胞の持つ死のメカニズム解明に向けた新たな展開													

図 25 本研究以降に獲得した主な研究助成プログラム (辻本)

本研究以降に辻本が獲得した主な研究助成プログラムは図 25 のとおりであった。

BH4 ペプチドの研究を進めるべく SORST (課題名「細胞死シグナル伝達分子を標的とした疾患治療薬の開発」、2002-2008 年度) に応募し採択された。HIV の tat 蛋白質由来の protein transduction ドメインペプチドを結合した tat-BH4 を作成し、X-線照射したマウスに投与すると腸管障害が抑制されることを見出した⁴⁶。また、心筋梗塞モデルにおいても虚血後の心機能回復促進機能があることを証明した(図 26)。

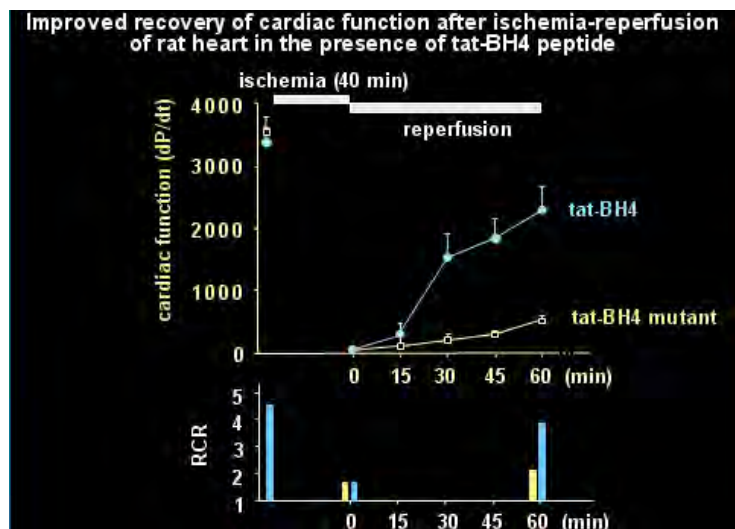


図 26 tat-BH4 ペプチドのラット心筋梗塞モデルにおける改善効果
(辻本研究室ホームページより⁴⁷)

これらの研究は、Bcl-2 の部分構造である BH4 ドメインに対応するペプチドを合成すれ

⁴⁶ Sugioka R, et al., Oncogene, 22, 8432-8440, 2003

⁴⁷ <http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gene/www/research/project.html>

ば、Bcl-2の機能を代替しアポトーシスを抑制する医薬になると考え、ペプチド誘導体の研究として製薬企業との共同研究に発展したが、途中で製薬企業の方針転換があり中断した。

またアポトーシスと異なる細胞死の機序の研究を進め、ホスホリパーゼA2 (PLA2)の関与が明らかになりつつある。PLA2にはいくつかのファミリーがあり、そのうちCa非依存型PLA2(iPLA2)に属するiPLA2 β が細胞死に関与することを明らかにしている。低酸素、低グルコース条件(虚血モデル)において、PLA2の活性化が起こり核の収縮を伴った細胞死を惹起することを見出し、アポトーシスと異なる機序の細胞死であることを明らかにした⁴⁸。また、siRNAによりiPLA2- β の産生を抑制すると虚血による細胞死は起こらない。この現象は脳梗塞における細胞死と類似の細胞死であり、核の収縮凝縮と細胞膜の破綻を伴う点がアポトーシスと異なっている。さらに、iPLA2- β ノックアウトマウスを作製した結果、神経軸索変性が生じ、行動異常を起こすことを見出した⁴⁹。時を同じくして、ヒトにおいてiPLA2 β 遺伝子の変異が乳児性神経軸索ジストロフィーおよび鉄沈着性脳神経変性症で報告され、iPLA2- β ノックアウトマウスは、これらヒトの神経軸索変性症⁵⁰の良い実験モデルであることが分かった。

SORST研究終了後は、多様な細胞死に関する研究を継続している。現在、成体組織での細胞のターンオーバーに関わる細胞死、たとえば小腸絨毛上皮細胞の細胞死やマウスの発生期に起こる形態形成に関わる細胞死について組織像からのアプローチも取り入れた研究を行っている。抗がん剤による細胞死もオートファジーで起こることが分かっており、細胞死には様々な経路が存在し、異なる機序があることが明らかになってきている。そのような多様な細胞死の過程を可視化する試みとして、色素を用い、マウスの個体内で起こる細胞死を観察する研究も計画している。アポトーシスが細胞死のすべてであるように考えられているが、細胞死はそれだけではなく、今後も様々な細胞死の機序を解明してゆく計画である。現在は、「細胞死学の創成：非アポトーシス型細胞死を中心としたバイオロジー」の表題の下で研究(科研費学術創成研究費)を行っている。

3-2-3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果

(1) 科学技術の進歩に貢献する成果

細胞死を扱う学会において新しい細胞死の様式とその機序の提出により、新規研究領域の拡大に貢献していると考えられるが、まだ、大きな研究組織ができるまでには発展していない。

(2) 応用に向けた発展と社会への波及効果

小腸絨毛の細胞死の研究における小腸細胞の器官培養系は、細胞死抑制作用を持つ低分

⁴⁸ Shinzawa K, et al., J. Cell Biol., 163(6), 1219-1230, 2003

⁴⁹ Shinzawa K, et al., J. Neurosci., 28(9), 2212-2220, 2008

⁵⁰ Morgan NV, et al., Nat. Genet., 38, 752-754, 2006

子の化合物の発見につながった。抗がん剤使用時における腸障害の抑制薬開発の可能性が考えられる。

辻本らの成果は日経産業新聞の先端技術欄にアポトーシスの先端研究として紹介された（'01.6.20）。読売新聞のサイエンス欄（'99.6.21）、日本経済新聞（'99.9.18）、朝日新聞の科学欄（'99.9.20）では Bcl-2 が紹介された。また科学新聞には JST の事業として本研究が紹介された。

(3) 人材育成状況

研究に参加した 10 人は助教（6 人）、研究所スタッフ（4 人）などに昇進した。博士研究員のうち、5 人は助教に、1 人はシニア研究者の地位を得た。清水重臣は医科歯科大教授に昇進しオートファジーの研究を発展させている。受賞では、清水が内田賞(2001)を、辻本は大阪科学賞（1999）を受賞している。

3-3 神経細胞における増殖制御機構の解明（研究代表者：中山 敬一）

3-3-1 本研究期間中における状況

中山は細胞の制御、ホメオスタシスに関心を持っており、本研究は特に神経細胞に絞った研究ではないが、本研究を通じて最終的には神経細胞の機能の解明に寄与できると考えた。さらに、細胞内部の制御の解明を通じて神経の発生、分化、再生およびがんの制御にもつながると考えて研究を行なった。神経細胞は分化後、細胞周期の G0 期にとどまり、ふたたび成長することがない性質を持つので、その停止のメカニズムを研究することにより発生、分化、増殖の解明につながると考えて研究した。すなわち、G0 期から増殖サイクルに戻るときには、p27 という CDK 阻害因子を Skp2（ユビキチンリガーゼ）が分解することが必要であり、逆に G0 期へ出るときは c-Myc という転写因子を Fbw7（ユビキチンリガーゼ）が分解することが重要だということを示した（図 27）。

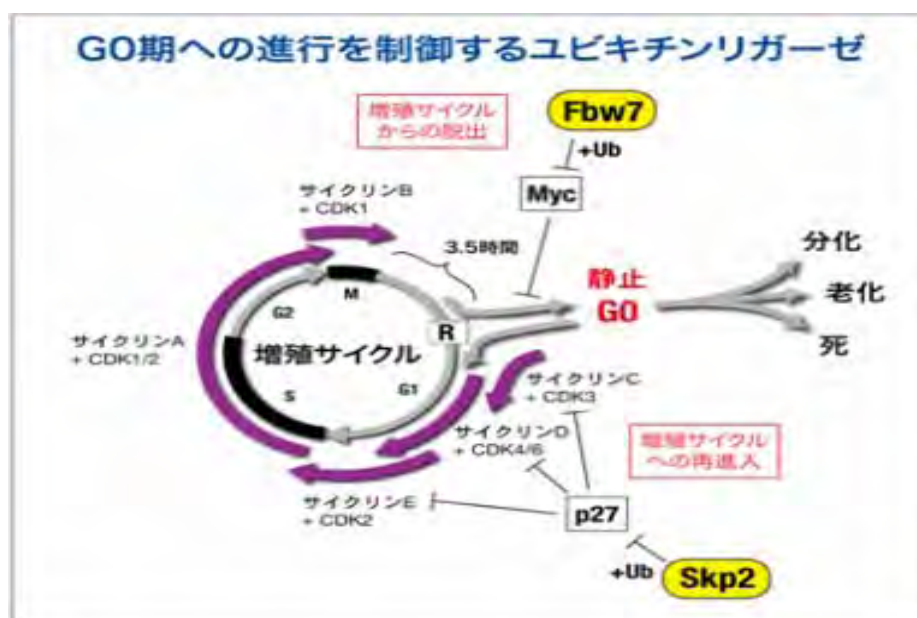


図 27 GO 期への進行を制御するユビキチンリガーゼ

増殖サイクル（細胞周期）への再進入には p27 を Skp2 がユビキチン化する必要があり、一方、増殖サイクルから静止期（G0 期）へ脱出する際には、Myc を Fbw7 がユビキチン化することが必要である。

（中山研究室ホームページより⁵¹）

⁵¹ <http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/project.html>

3-3-2 本研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況

研究資金	研究テーマ	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
CREST	神経細胞における増殖制御機構の解明	1期												
科学研究費補助金基盤研究(B)	PKC6ノックアウトマウス作成による細胞死(アポトーシス)シグナル伝達系の研究													
科学研究費補助金基盤研究(B)	神経変性疾患における封入体物質のユビキチン化に関わる因子の単離同定と解析													
科学研究費補助金特定領域研究	細胞増殖抑制分子p27の分解機構の研究													
科学研究費補助金基盤研究(B)	ポリグルタミン病における異常タンパク質の新規クリアランスシステムの研究													
科学研究費補助金基盤研究(B)	細胞内蛋白の特異的分解制御による癌治療法の確立・人工受容体を有するユビキチンリガーゼの作製と応用													
CREST	「生物の発生・分化・再生」領域細胞周期の再活性化による再生能力の賦活化						3期							
科学研究費補助金基盤研究(B)	発生工学プロテオミクスを用いたPKC-δシグナル伝達系の解明													
科学研究費補助金特定領域研究	タンパク質分解異常による発がん機構の研究													
科学研究費補助金基盤研究(S)	神経突起形成のマスター分子Protrudinの発見と機能解析													
文部科学省「産学共同シーズイノベーション推進事業」育成ステージ	ユビキチン化酵素の阻害による新規抗肥満薬の開発													
CREST	「生命システムの動作原理と基盤技術」領域ユビキチンシステムの網羅的解析基盤の創出											2期		

図 28 本研究以降に獲得した主な研究助成プログラム (中山)

本研究以降に中山が獲得した主な研究助成プログラムは図 28 のとおりであった。

細胞周期の制御は蛋白質のユビキチン化がキーププロセスであることが解明されたことから、3件目のCREST(「生命システムの動作原理と基盤技術」領域、課題名「ユビキチンシステムの網羅的解析基盤の創出」、2007-2011年度)では、どの蛋白質がどの蛋白質を分解するかを解明した。ユビキチン・プロテアソーム系による選択的蛋白質分解は、様々な生体反応において重要な役割を担っている。この系において最も重要な分子は、分解を受けるべき標的蛋白質を見分け、それにタイミング良くユビキチンを連結させる酵素ユビキチンリガーゼである。その中で最も良く研究されているファミリーのひとつSCF型リガーゼの基質認識ユニットのF-box蛋白質はヒトでは約70種存在するが、多くのF-box蛋白質は対応する基質分子が同定されていないため、機能未知のまま残されている。中山らはSkp2・p27ダブルノックアウトマウスを作成し、ダブルノックアウトマウスではp27単独ノックアウトマウスに近い表現型を呈し、Skp2ノックアウトマウスにおける異常は消失したことにより、Skp2の主要な標的はp27であり、Skp2ノックアウトマウスにおいてはp27の異常な蓄積が細胞・臓器・個体の異常を引き起こすものであることが示された。

さらに行ったいくつかの実験結果を総合すると、正常ではG1-S期移行はSkp2とKPCによってp27のユビキチン化・分解が行われているが、S-G2期においてはSkp2のみがp27

のユビキチン化を担当しており、Skp2 ノックアウトマウスでは、G1-S 期移行は KPC によって p27 のユビキチン化・分解が正常に行われるが、S-G2 期においては p27 の分解ができないため p27 が異常な蓄積を起こし、Cdc2 キナーゼと結合して、その活性を抑制してしまうために、G2-M 期停止を起こし、一部の細胞においてはエンドサイクルに入って倍数性の増加が起こるものと推定された (図 29)。

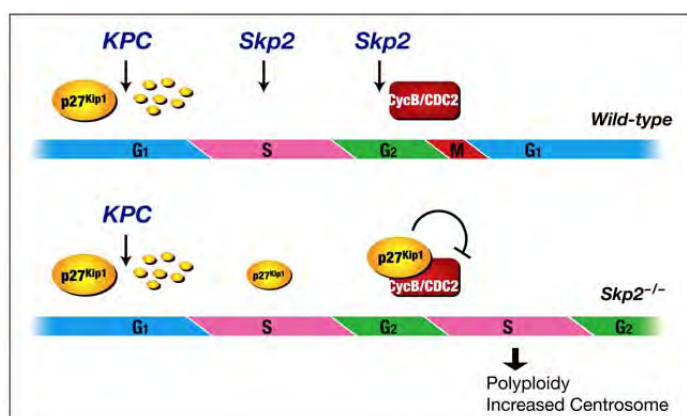


図 29 Skp2 ノックアウトマウスにおける異常を説明するモデル

正常では Skp2 と KPC が共同して p27 を分解しており、p27 は G1 期以降はずっと低レベルにあるが、Skp2 ノックアウトマウスでは S~G2 期において Skp2 の欠損により p27 が蓄積を起こし、Cdc2 キナーゼと結合する結果、その活性が阻害され、一部の細胞ではエンドサイクルに入って再び S 期へと進行する。最終的に倍数性が増加し、中心体が増える結果になる。(中山 CREST 報告書より)

中山らは p27 以外にも変異型 Skp2 と結合する多数の蛋白質を同定した。また、別の F-box 蛋白質である Fbw7 に結合する蛋白質として、既知の基質である c-Myc を同定した。この過程でイオン化効率の劣るリン酸化ペプチドの同定効率を改善するための IMAC (固相化金属アフィニティーカラムクロマト) 法に工夫を加え、1 万種類以上の蛋白質の同時測定を可能にし、有糸分裂期のリン酸化プロテオーム約 1000 種の変動を観察できることを確認した。その中のいくつかの基質蛋白質のなかの一つであるクロマチンモデリング因子 CHD8 を同定し、CHD8 のアポトーシスの制御の機序を解明した。

p27 は細胞周期のブレーキであり、多くのがんにおいて発現量が低下していることが知られている。この発現量低下はユビキチン化によって誘導されているとされ、実際に Skp2 の過剰発現や遺伝子増幅が認められている。このような事実から、Skp2 に対する阻害剤開発は p27 の分解を低下させ、がんの予後を改善させる効果があると考えられる。中山らは Skp2 の抑制物質を探索する試みを始めており、本研究において出願した特許⁵²と同様な方法で Skp2 阻害薬などのユビキチンリガーゼを阻害する化合物をスクリーニングしている。

⁵² 中山ら、特願 2004-508302 新規ユビキチンリガーゼ

3-3-3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果

(1) 科学技術の進歩に貢献する成果

細胞周期のブレーキ分子の代表格であるp27Kip1とp57Kip2の役割を明らかにし⁵³、それらのユビキチン化を司る分子であるKPC-1⁵⁴およびFbw7⁵⁵機能を解明した。細胞分化のメカニズムが、がん細胞の無限増殖や心筋細胞の再生の制御のみならず、免疫機能などにも影響することを明らかにした⁵⁶。中山は今後20年間にシステムバイオロジーを確立するとともに、がん幹細胞の性質を解明する研究を展開し、がんの治療に貢献したいと考えている。

(2) 応用に向けた発展と社会への波及効果

分化再生のメカニズムの解明は、新しい抗がん剤や再生治療が生まれる契機となるものと考えられる。中山がこの研究の過程で開発した全蛋白質を同時に定量するシステムは、ウエスタンブロットなどとは異なり蛋白質の生起を定量的に測定可能である。現在、蛋白質の部分構造の強いシグナルのデータベースを、産総研の協力のもとに構築中である。2010年3月頃に完成する見込みである。この技術が完成するとプロテオミクスが簡便に出来るようになり、生体の仕組みをコンピューターシミュレーションできるようになる。iPS細胞ができる仕組みも簡単に解析できるようになると考えられる。がん細胞、加齢、健康診断についても同様に適切なバイオマーカーが発見されれば、この方法はがんの早期発見や各種疾患の発見に有用である。

(3) 人材育成状況

以下の共同研究者が独立し、研究を発展させている。

北川雅敏(2000年、浜松医科大学医学部 生化学第一講座)は、細胞周期、ユビキチン・プロテアソーム、クロマチン制御などの切り口から細胞増殖、発生、分化、老化、アポトーシス、がん化といった「細胞の運命」の決定機構の研究を行っている。

中山啓子(2003年、東北大学附属創生応用医学研究センター 発生分化解析分野)は Skp2 および Fbxw7 に関する研究を続けるほか、染色体複製に関与する Geminin、新規ユビキチンリガーゼ RNF などを細胞周期や損傷治癒などの観点から研究している。

畠山鎮次(2004年、北海道大学大学院医学研究科 医学専攻 生化学講座 医化学分野)は蛋白質の翻訳後修飾であるユビキチン化を中心に蛋白質の分解制御をテーマとして研究を推進している。

嘉村巧(2005年、名古屋大学理学部生命理学専攻 情報機構学講座 分子修飾制御学)はユビキチンリガーゼ(E3)の基質の探索により、酵素・基質関係により制御される分子機構の研究を行っている。

⁵³ Susaki E, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106(13), 5192-5197, 2009

⁵⁴ Kamura T, et al., Nat. Cell Biol., 6, 1229-1235, 2004

⁵⁵ Yada M, et al., EMBO J., 23, 2116-2125, 2004

⁵⁶ Miyamoto A, et al., Nature, 416, 865-869, 2002

3-4 脳関門排出輸送に基づく中枢解毒（研究代表者：寺崎 哲也）

3-4-1 本研究期間中における状況

寺崎らはいくつかの血液脳関門（BBB）が血中からの物質の取り込みのみならず、排出機構も持つことに注目し、ヒトの BBB の仕組みの全容解明を目指した（図 30）。排出の新規な測定法 BEI（Brain Efflux Index）を開発し、脳からの分子排出を定量的にとらえることに成功した。

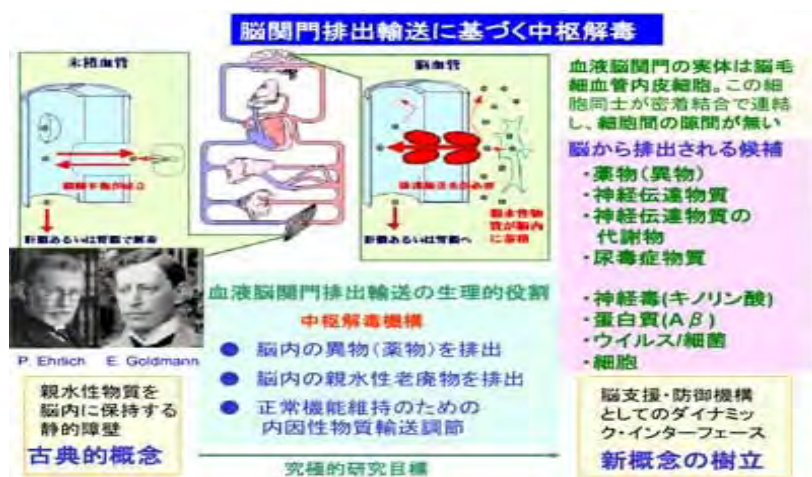


図 30 脳関門排出輸送に基づく中枢解毒（寺崎研究室ホームページより⁵⁷）

すなわち、ラットの脳毛細血管内皮細胞の条件的不死化細胞株を樹立し、種々の基質の輸送活性が *in vivo* 系における活性とほぼ同等の *in vitro* 測定系を開発することに成功し、この細胞を用いて BBB の解析を行い、BBB は脳から血液方向に多くの異なる輸送系が働いていることを明らかにした（図 31）。

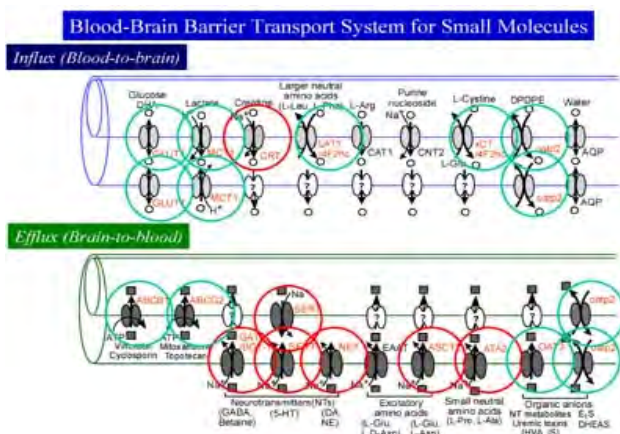


図 31 血液脳関門に発現するトランスポーター
○囲みは寺崎等の研究（寺崎研究室ホームページより）

⁵⁷ <http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~soutatsu/dds/index.htm>

これらの研究によって、BBBは脳内で作られるセロトニン、ノルエピネフリン、 γ -アミノイソブチル酸などの神経伝達物質・神経調節因子およびL-アスパラギン酸及びL-グルタミン酸などの神経伝達物質の代謝物を脳から血液方向に輸送する働きをもっていることを明らかにした。この事実は脳内の代謝産物で毒性的に働く物質を排出し、結果的に「脳を守る」働きをする。さらには病態におけるBBBの機能を解明することを最終目的として研究を継続し、アミロイド β 蛋白質の排出機構の研究につながった。

3-4-2 本研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況

研究資金	研究テーマ	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
CREST	脳関門排出輸送に基づく中枢解毒		2期											
科学研究費補助金基盤研究(B)	中枢解毒機構としての血液脳関門輸送系の多様性													
科学研究費補助金基盤研究(B)	温度感受性SV40T抗原遺伝子導入動物を用いた血液脳関門培養細胞実験系の開発													
科学研究費補助金基盤研究(B)	血液脳関門における神経伝達物質輸送担体遺伝子クローニングと生理機能解析													
科学研究費補助金基盤研究(B)	血液脳関門輸送担体遺伝子発現系を用いた新薬スクリーニング系の開発													
科学研究費補助金基盤研究(A)	血液脳関門機能障害と精神疾患に関する生体膜輸送生理学的研究													
SORST	脳関門排出輸送に基づくアルツハイマー型痴呆症の解明と創薬													
科学研究費補助金特定領域研究	血液脳関門トランスポートゾームの生理的役割													
科学研究費補助金基盤研究(S)	プロテオミクスの手法を用いた血液脳関門輸送機構の解明													

図 32 本研究以降に獲得した主な研究助成プログラム（寺崎）

本研究以降に寺崎が獲得した主な研究助成プログラムは図 32 のとおりであった。

本研究はSORSTに引き継がれたが、SORSTではアルツハイマーにおけるアミロイド β 蛋白質の排出機序の研究にシフトしており（図 33）、むしろ後述する蛋白質の一斉定量・同定法に顕著な進展を見た。



図 33 アミロイド脳内蓄積と血液脳関門排出輸送（寺崎研究室ホームページより）

2009年6月に5日間、寺崎の主催で第8回脳血管国際会議が開催された。国内外から脳外科、神経内科、解剖学など多彩な分野の研究者が参加しており、多くの専門分野を包括する研究領域となっている。

その後の研究においては、転移がんと原発がんの輸送担体や薬物標的蛋白質の発現に差があることが見出された。化学療法の治療効果を高めるための助けとなる知見である。

さらに、がん患者の発現蛋白質の違いによる再発時期の違いを予測するための研究が続けているが、再発時期が予測できれば再検査の時期の決定など臨床に貢献できるようになる。それを LC-MS/MS 法による蛋白質一斉定量・同定を行うことによって達成するべく LC-MS/MS システムの開発に力点を移している。このように、寺崎の研究対象は、LC-MS/MS 手法を用いた、がん患者の予後の推定へと変化している。

このシステムは、本研究及び SORST の BBB 研究を通じて、脳内に発現した機能性蛋白質の同定と定量を迅速にする必要性を痛感した結果、開発したものであり、LC-MS/MS とコンピュータソフトによる解析を組み合わせた、同時・多種類の蛋白質を測定する系である (図 34,35)。この方法を用いれば抗体による測定に匹敵する感度が得られる場合もあり、 $1 \mu\text{g}$ のサンプルの中の 10 アトモル ($10 \times 10^{-18}\text{M}$) の蛋白質を検出できる。さらに、抗体による測定と異なり、1個のアミノ酸が異なる蛋白質や1箇所のアミノ酸が化学修飾された蛋白質についても、異なる質量に基づいて高い選択性で測定できるところに優位性がある。

3-4-3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果

(1) 科学技術の進歩に貢献する成果

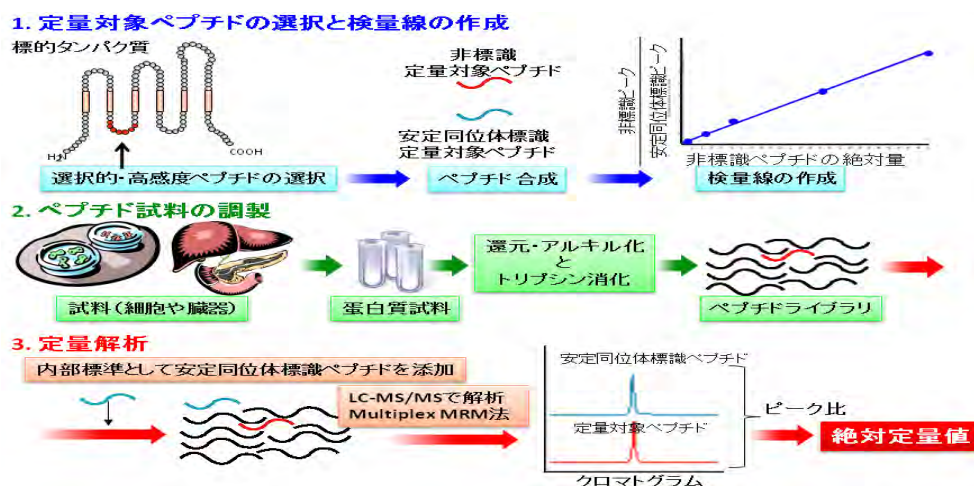


図 34 蛋白質絶対定量法の概略 (寺崎研究室ホームページより)

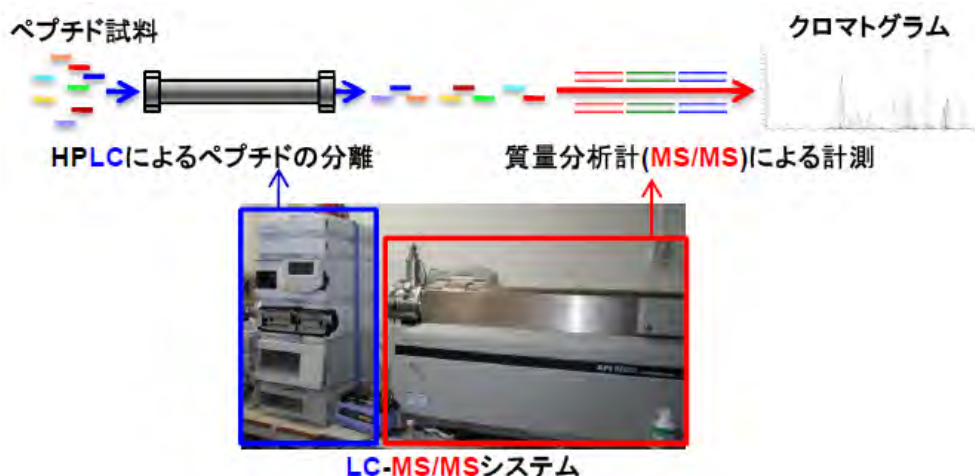


図 35 LC-MS/MS 法の概要（寺崎研究室ホームページより）

ヒト BBB の機能、蛋白質の発現をこの方法で追跡、測定している。その結果、薬物排出輸送担体などの輸送担体の発現が、マウスやラットから推定されていた、従来の結果と異なる結果を得ている。この手法で蛋白質の定量・同定を行い薬物の体内動態および薬効や毒性発現を定量的に解明する、**pharmacoproteomics** と呼ぶ新しい研究領域を開拓し、学問体系を構築することを目指している。すなわち蛋白質を主題とした定量的に **pharmacokinetics**、**pharmacodynamics**、**toxicokinetics** を扱う学問として、定量技術の世界的普及と創薬や臨床治療への応用など、その成果を社会に還元することを計画している。

(2) 応用に向けた発展と、社会への波及効果

蛋白質一斉定量・同定法は JST「独創的シーズ展開事業 大学発ベンチャー創出推進」の平成 20 年度採択課題に採用され、LC-MS/MS を使う測定法のための測定キット（オン・デマンド型の蛋白質絶対定量キット）を開発中である。

LC-MS/MS による蛋白質一斉定量・同定法は画期的であり、普及すれば **pharmacoproteomics** として学問的なインパクトだけでなく、蛋白質を扱う業界や医療での応用など、社会への影響も大きいと考えられる。この方法に関しては、国内、国際特許を出願している⁵⁸。

本方法に関して、日刊工業新聞（'00.6.16）に不死化細胞の薬剤スクリーニングと結びつけた紹介記事が掲載された。

(3) 人材育成状況

大槻純男は、「脳関門輸送の分子生物薬剤学的研究」で平成 16 年度薬学会奨励賞を、平成 20 年には「国際薬物動態学会(ISSX) New Investigator Award, Asian Pacific Region」を受賞した。

⁵⁸ 特願 2007-544097, PCT/JP2006/321577

共同研究者の細谷健一は富山大学（薬学部 製剤学 教授）に転出し、網膜における血液網膜関門に焦点を絞り、研究を発展させている。同じく玉井郁巳（金沢大学 薬学系 薬物動態学研究室 教授）は薬物トランスポーターの研究を行っている。中島恵美（慶應義塾大学薬学部薬剤学講座 教授）は血液組織関門とくに血液胎盤関門に焦点を当てて BBB 研究の成果を発展させている。

3-5 DNA チップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明（研究代表者：西野 一三）

3-5-1 本研究期間中における状況

代表研究者であった荒畑喜一は研究開始後、約 1 年で逝去し、本研究課題は西野に引き継がれた。当時の学問状況として、遺伝子を網羅的に調べることによって、生体機能の全容が解明できるという考えが主流であり、荒畑も骨格筋の全遺伝子を DNA チップ化して、筋ジストロフィーの病態の全貌を解明しようとしたと推測される。

DNA チップはかなり早く完成し筋ジストロフィーの研究に貢献することが期待されたが^{59,60}、その後、米国でヒトの全遺伝子を乗せた DNA チップが開発された^{61,62}結果、本研究の DNA チップの用途は限定されたものとなってしまい、市販もされなかった。しかし、ミオチューブラーミオパチーの遺伝子解析研究においては有力なツールとなった⁶³。

筋の病理学は熟練した病理学者が見て解釈する必要があり、DNA チップの遺伝子発現と比較して鏡検すると解釈が容易になり、筋ジストロフィーの患者の病態解析に役立つものであることが明らかになった。

3-5-2 本研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況

本研究の過程で西野らは、縁取り空胞を伴う遠位型筋ミオパチー(DMRV)の患者の筋細胞の病理画像が GNE 遺伝子の変異によるシアル酸合成の障害で生じることを明らかにした⁶⁴。DMRV はヒトでは 10 代後半から 30 代後半に発症し（図 36）、比較的緩やかに進行して約 10 年で歩行不能になる進行性疾患である。現在治療法がなく本邦では約 400 人と推測される患者が治療薬の開発を待ち望んでいる。

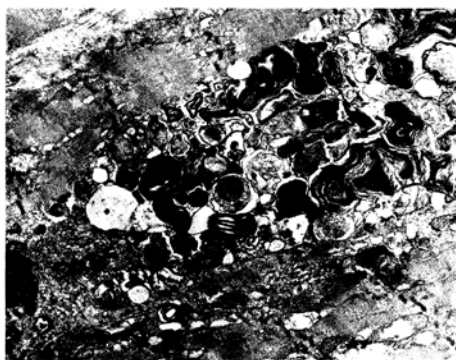


図 36 縁取り空胞組織像（Kumamoto T, et al., Arch. Neurol., 39, 367-371, 1982）

⁵⁹ 日経産業 2002 年 5 月 15 日号

⁶⁰ Noguchi S, et al., Hum. Mol. Genet., 12(6), 595-600, 2003

⁶¹ Fodor SP, et al., Science, 251,767-73, 1991

⁶² US Patent Nos. 5,445,934, 5,744,305, 5,800,992, 5,871,928, 6,040,193

⁶³ Noguchi S, et al., Neurology, 65, 732-737, 2005

⁶⁴ Noguchi S, et al., J. Biol. Chem., 279(12), 11402-11407, 2004

西野らは2007年にこの疾患のマウスモデルの作成に成功した⁶⁵。このマウスにおける病態の進行はヒトの患者と非常によく似ており、20週頃より筋萎縮と筋力低下が始まり、30週よりβアミロイド蓄積が、40週よりオートファジーによる縁取り空胞が観察された。ヒトと同様に、軽度のクレアチンキナーゼ上昇が認められた。このマウスにシアル酸あるいはシアル酸の前駆体であるN-アセチルマンノースアミンを経口投与すると、ほぼ完全に発症を抑制できることを証明した⁶⁶ (図37)。米国のグループにおいてもGNE遺伝子のノックインマウスを作製したが、症状はヒトと異なり、腎障害が重篤で致死的であり、西野らが作成したマウスと比較して実用的ではない。

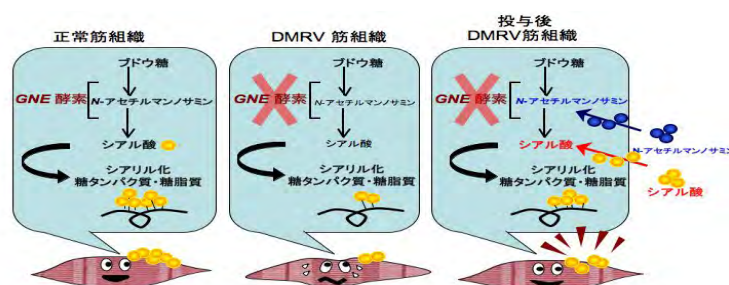


図37 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) モデルマウス筋組織でのシアル酸合成とシアル酸及びシアル酸合成中間体の投与による効果

(左) 正常筋組織ではいくつかのステップを経てグルコースからシアル酸が合成され、シアリル化された糖蛋白質・糖脂質は、筋線維の細胞膜上に運ばれ、機能する。このシアル酸合成経路で GNE 酵素は重要な機能を果たしている。(中) DMRV 筋組織では GNE 酵素の働きが悪く、細胞膜上のシアリル化された糖蛋白質・糖脂質が減少している。筋線維は萎縮し、筋力低下をきたしている。(右) GNE 酵素以降のシアル酸とシアル酸合成中間体を外部から投与すると、筋組織はこれらの物質を取込み、シアリル化糖蛋白質・糖脂質を合成する。その結果、細胞膜上の糖蛋白質・糖脂質のシアリル化は改善され、筋線維の萎縮、筋力低下も改善された。(国立精神・神経センター広報発表より⁶⁷)

現在、西野の研究室ではポスドク 10 人が、それぞれ独自の課題をもって研究しており、Polymerase-1 and transcript release factor(PTRF)の変異がリポジストロフィーを伴う新しい筋ジストロフィーに結びついていること⁶⁸などの筋ジストロフィー関連の成果が出ている。また、核膜の異常による筋ジストロフィーの原因遺伝子の研究、メダカを用いた蛍光色素による筋異常の視覚化の検討を開始している。

3-5-3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果

(1) 科学技術の進歩に貢献する成果

本研究の過程で DMRV の原因を解明し、そのマウスモデルを作成したことは学術的には大きな成果である。このマウスモデルにおいてシアル酸またはシアル酸前駆体の投与によ

⁶⁵ Melicdan MC, et al., Hum. Mol. Genet., 16, 2669-2682, 2007

⁶⁶ Melicdan MC, et al., Nat. Med., 15(6), 690-695, 2009

⁶⁷ http://www.ncnp.go.jp/nin/topics/DMRV_NatureMedicine.pdf

⁶⁸ Hayashi YK, et al., J. Clin. Invest., 119(9), 2623-2633, 2009

り DMRV の発症が抑制されることを証明したことは、DMRV 患者の治療可能性につながる成果である。

また、筋疾患患者からの筋病理標本は、1978 年には 10 検体/年程度であったが、西野らの努力により、最近では全国から年 500 検体以上集まるようになっていた。これまでの蓄積検体数は 1 万件以上になり、世界有数のヒト筋レポジトリを形成するに至っている。これらの標本は遺伝子解析だけでは分からない、種々の筋疾患の新たな知見の提供と病因解析のための強力な基盤となっている。

(2) 応用に向けた発展と社会への波及効果

DNA チップの研究は当初、筋ジストロフィーの全貌の解明に強力な武器となると思われたが、筋ジストロフィーの複雑で多様な病態の解明には遺伝子発現の最終段階のみのモニターでは不十分であることが明らかになった。また他機関での DNA チップの開発は、本研究開始当初の予想を越えて急ピッチで進み、病態解析のツールとしての DNA チップの開発から、それをを用いて行う予定であった、本来の目的である病態解析そのものに研究の比重が移っていった。その結果、DMRV の発見とその原因の解明および治療可能性に結びついたことは、結果的に大きな成果であったと考えられる。

その過程で見出した、筋無力症のマウスにシアル酸あるいはその前駆体を投与することで筋無力症の症状が改善される事実は、これらの化合物が筋無力症の治療薬として有望であることを示唆している。本化合物を医薬として開発するべく製薬企業と連携したが、患者数が少ないためと開発コストの問題で、実用化には至っていない。

DNA チップの成果は日経産業新聞(02.5.15)に高感度 DNA チップとして紹介の記事が発表された。ミオパチーに関する成果は、東京新聞(09.6.11)に、DMRV に対して N-アセチルマンノースアミン補充療法が有効との紹介記事と患者が治療薬として期待するコメントが掲載された。

(3) 人材育成状況

本プロジェクトに参加した、何名かの共同研究者が独立している。

塚原俊文は北陸先端科学技術大学院大学ナノマテリアルテクノロジーセンター教授(2003)に就任し、DNA Chip/microarray の開発とその他バイオデバイスの開発に従事している。野口悟は国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部室長(2003)に就任し、西野と共同で研究を進めている。伏見和郎は University of Calgary, で Associate Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology に就任した。

3-6 神経変性の分子機構解析に基づく新しい治療戦略の開発（研究代表者：垣塚 彰）

3-6-1 本研究期間中における状況

垣塚は、本研究応募以前に米国ソーク研究所で APL（急性前骨髄球性白血病）の研究を行っていた。その原因遺伝子を発見して APL の発症とレチノイン酸が著効を示す分子メカニズムを明らかにした⁶⁹。1992 年に日本に帰国し、京大医学部講師に就任し、難病である神経変性疾患の治療の研究を目指して、優性遺伝性の神経変性疾患の原因遺伝子の探索研究を立ち上げた。この時すでにハンチントン病が CAG リピートの伸長であることが明らかになっていたので、類似リピートの探索研究が盛んに行われ、辻省次らが脊髄小脳変性症(DRPLA)の遺伝子(1994 年)、脊髄小脳変性症 2 型(SCA2)の遺伝子(1996 年)、垣塚がマチャド・ジョセフ病(MJD)の遺伝子(1994 年)を発見した。CAG リピートによる疾患遺伝子の解明には日本人研究者の寄与が大きかった。

さらに垣塚は、伸長した CAG リピートから翻訳されるグルタミンのリピート（ポリグルタミン）を培養細胞内に発現させるとポリグルタミンは細胞内で凝集し、細胞死を引き起こすことを明らかにし（図 38）、加えて、マウスにおいてポリグルタミンが神経変性を起こすことを確認し、1996 年にポリグルタミン病と名付けて発表した⁷⁰。

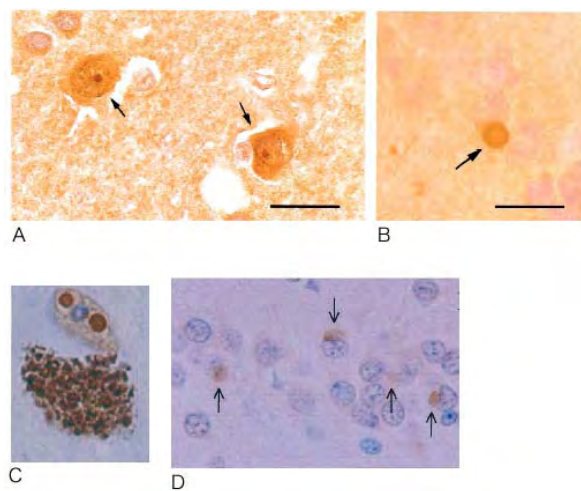


図 38 神経変性疾患に認められる細胞内の異常タンパク質の凝集体への VCP の集積。ハンチントン病の核内封入体 (A)、パーキンソン病のレビー小体 (B) とマリネスコ小体 (C) さらには痴呆を伴った運動神経病の神経細胞内の凝集体 (D) が抗 VCP 抗体で陽性に染色された (矢印)。(Hirabayashi M, et al., Cell Death Differ., 2001; Mizuno Y, et al., Neurosci. Lett., 2003)

その後、世界中で異常蛋白質の蓄積と神経変性疾患との関係に関する発表が続いて注目度が高まり（1998 年の Nature 主催のシンポジウムで発表）⁷¹、本研究領域の最終年度に研究課題として採択された。

本研究での成果は HeLa 細胞培養系から分子量が約 100kD のポリグルタミンと結合する

⁶⁹ Early E, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7900-7904, 1996

⁷⁰ Ikeda H, et al., Nat. Genet. 13(2), 196-202, 1996

⁷¹ Kakizuka A, Trend in Genet., 14(10), 396-402, 1998

VCP 蛋白質を発見したことである⁷²。また、ショウジョウバエにおいて VCP 相当の遺伝子がポリグルタミンの引き起こす神経変性を修飾することを発見した⁷³。すなわち、ポリグルタミンをショウジョウバエ複眼に発現させると複眼の構築の乱れ（変性）が起きるが、VCP 相当遺伝子の機能を低下させると複眼の異常構築が改善することを見出した（図 39）。

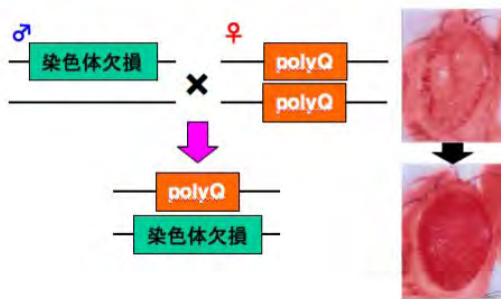


図 39 ter94 遺伝子(VCP ホモログ)の欠損（機能低下）はポリグルタミン病による細胞死を抑制し複眼の異常を改善する (Higashiyama H, et al., Cell Death Differ, 2002)

さらに、VCP の機能解析から、VCP はポリユビキチン化された異常蛋白質を細胞から除去する過程に関与すること⁷⁴、VCP の ATPase 活性が酸化によって失活すること、VCP が多くの部位でリン酸化やアセチル化を受ける蛋白質であることを見出した。一方、これらの研究と平行して核内エストロゲン関連核内受容体（ERR）を活性化する蛋白質リガンド PCG-1β を発見し⁷⁵、ERR の機能制御が細胞および個体レベルでのエネルギー代謝の調節に重要な役割を果たすことを明らかにした。

3-6-2 本研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況

研究資金	研究テーマ	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
CREST	神経変性の分子機構解析に基づく新しい治療戦略の開発			3期										
科学研究費補助金基盤研究(B)	神経変性疾患発症の分子メカニズムの解析													
科学研究費補助金特定領域研究	がん細胞におけるアポトーシスの分子解析													
科学研究費補助金基盤研究(B)	異常タンパク質の蓄積が引き起こす空胞形成及び細胞死の分子メカニズムの解析													
科学研究費補助金基盤研究(B)	神経細胞死におけるVCP蛋白質の機能解析													
科学研究費補助金特定領域研究	がん細胞の細胞死の制御機構													
SORST	VCP蛋白質の機能修飾を介した神経変性疾患の治療戦略の構築													

図 40 本研究以降に獲得した主な研究助成プログラム（垣塚）

⁷² Hirabayashi M, et al., Cell Death Differ, 8, 977-984, 2001

⁷³ Hirabayashi M, et al., Cell Death Differ, 9, 264-273, 2002

⁷⁴ Kobayashi T, et al., J. Biol. Chem., 277, 47358-47365, 2002

⁷⁵ Kamei Y, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(21), 12378-12383, 2003

本研究以降に垣塚が獲得した主な研究助成プログラムは図 40 のとおりであった。

本研究は SORST 研究（課題名：「VCP 蛋白質の機能修飾を介した神経変性疾患の治療戦略の構築」、2005–2009 年度）に引き継がれ、VCP の神経変性疾患に関わるいくつかの重要な機能とまったく新しい幾つかのストレス応答機能が明らかになった。すなわち、VCP は細胞内の異常蛋白質の量に応じて、異常蛋白質の凝集体形成とその分解の両方を仲介する蛋白質であること、また、分解しきれないほどの異常蛋白質が長期間蓄積すると VCP は特異的なアミノ酸修飾を受けて核内に移行する。この修飾 VCP は転写の抑制を介して、新規蛋白質の合成抑制を促す機能があることを明らかにした。実際、ショウジョウバエの複眼で VCP の核移行を阻害するとポリグルタミンによる複眼変性が抑制されたことから、このフィードバック機構が過剰（長期に）に働くことが神経変性の 1 つのキーイベントであることを突きとめた。また、ポリグルタミン発現細胞では、幾つかのリン脂質が著しく減少していることを新たに発見し、神経変性と脂質代謝が密接につながっている可能性を見出した。

また、VCP の酸化修飾の意義の詳細が明らかになった。すなわち、VCP は PEX19（ポリオキシゾームを作る蛋白質）と相互作用をし、VCP-PEX19 複合体はカタラーゼのペルオキシゾームへの移行を促す。VCP が酸化を受けると失活し、カタラーゼのペルオキシゾームへの移行機能がなくなり、カタラーゼがサイトゾルに増加し、酸化を消去する働きをする。これらの知見により、VCP は、自身の機能修飾を介して、異常蛋白質の蓄積時や酸化ストレスが生じた時にそれらを解消するためのフィードバック系を形成している主要な蛋白質であることが明らかとなった。

垣塚らが神経変性と VCP の関係を見いだしたことに少し遅れて、VCP の変異によってヒトの遺伝病が引き起こされることが明らかになった⁷⁶。この病気は、**I**nclusion **B**ody **M**yopathy with **P**aget disease of bone and **F**ront-temporal **D**ementia) と呼ばれる優性遺伝病で、中年以降に封入体を持つ筋症と Paget 型の骨粗鬆症と前側頭葉型の痴呆を示す疾患である。垣塚らは、この疾患を引き起こす変異 VCP では、VCP の凝集体を形成する機構が亢進していることを明らかにした。さらに、この病気を引き起こす変異 VCP は、ATPase 活性が異常に亢進していることを見出し、ショウジョウバエ等を用いた実験から、この ATPase 活性の亢進が細胞変性を引き起こすことに密接に関係していることを突きとめた。

また、ストレス時の ATP 量の制御という点において、別の重要な発見があった。例えば小胞体ストレスの時には、PERK(PKR-like endoplasmic reticulum kinase)が活性化されて翻訳開始因子 2 (eIF2 α) のリン酸化が生じ、その結果、蛋白質の翻訳が止まり、小胞体へのさらなる蛋白質の供給が抑制される。垣塚らは、この時、リボゾーム RNA(rRNA)の合成が抑制され ATP が節約されることを明らかにした。すなわち、rRNA は、ATP、GTP、CTP、UTP を用いて合成されることから、rRNA の合成阻害によって、ATP に代表されるこれら

⁷⁶ Watts GD, et al., Nat. Genet., 36, 377–381, 2004

の物質の節約がなされることになる。同様に eIF2 α のリン酸化は、ウイルス感染、酸化ストレス、アミノ酸飢餓、紫外線照射時にも引き起こされ、翻訳抑制が誘導される。これらのストレス時においても、半減期の短い蛋白質が rRNA の転写機構から乖離することで、rRNA の合成抑制がおこり、ATP などが節約され、ストレス解消に必要な細胞機能に配分するシステムを生体が有していることを明らかにした。

以上のように、本研究から受け継がれたその後の研究によって、VCP が担う神経変性疾患での役割のみならず、酸化ストレスを解消するフィードバック機構の発見や新たな ATP 節約機構の発見など、幾つかの新たな細胞の恒常性維持機構の解明に発展した。

3-6-3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果

(1) 科学技術の進歩に貢献する成果

垣塚のポリグルタミン病の概念は、各種標準的な教科書にも記述され一つの疾患としての地位を得るに至っている。さらに、垣塚らの仕事とは違うアプローチによるポリグルタミン病の研究が行われ研究は発展している。国内では理化学研究所の貫名信行がマウスモデルを用いて蛋白質凝集と細胞死の関連研究、名古屋大学の祖父江元が球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) においてテストステロン依存性のポリグルタミン病の蛋白質凝集を薬物で抑制する研究を行っている。他にも東京医科歯科大学の水澤英洋が脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) 患者脳における変異 α 1A カルシウムチャネル蛋白質凝集物の研究、東京薬科大学の柳茂はポリグルタミン変性蛋白質と結合する CRAG が、ポリグルタミンの核内移行を制御する機序およびユビキチン化を誘導してポリグルタミンの凝集を消去する機序の研究を行っている。エストロゲン関連核内受容体 (ERR) と肥満・糖尿病の関連については垣塚らの研究が先行しているが、まだ大きな広がりにはなっていない。

MJD についてはカナダの Michael Hyden と米国の Christopher Ross が研究を継続している。両者の研究室には垣塚研究室から cDNA を提供しているが、まだ研究者の輪は小さい。一方、現在、世界中で使用されている VCP cDNA の多くは垣塚研究室が供給したものであり、VCP 研究は、疾患関連のみならず生理作用における役割の解明へと研究者の輪は着実にひろがっている。

(2) 応用に向けた発展と社会への波及効果

垣塚らは、上記のような基礎研究と平行して、実験で観察したいろいろな病態を修飾する薬物のスクリーニングを行い、神経変性疾患の表現型を緩和する幾つかの物質を見出している。これらの物質から、ポリグルタミン病のみならず、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に共通して予防・治療効果を示す新しい治療薬の開発がなされることが期待される。また、このような物質は、これまで治療法が全く見つからない別の幾つかの難治性疾患の革新的な治療法の開発に発展する可能性がある。

読売新聞(01.10.27)に VCP 蛋白質と異常蛋白質蓄積による疾患の解説記事が掲載された。また、朝日新聞(02.10.1 夕刊)および読売新聞(02.10.1 夕刊)に PCG-1/ERR1 蛋白質の肥満治療薬としての可能性の紹介記事が掲載された⁷⁷。

(3) 人材育成状況

永井義隆(博士研究員)は独立し、精神・神経センターにおいて、ポリグルタミン鎖結合ペプチド QBP1 が異常伸長ポリグルタミン蛋白質の構造変移・凝集体形成を阻害し、さらにポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性を抑制することを明らかにして、ポリグルタミン凝集阻害化合物の探索のために大規模な低分子化合物ライブラリーからハイスループットスクリーニングを行なっている。その他、ハンチントン病に対して RNAi 治療がその発症と進行を遅らせることをモデルマウスで見出している。一條秀憲は東京大学・薬学部に異動し、ストレス応答のシグナル伝達制御に関わる分子 ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase1) がストレスによる細胞死の重要なメディエーターであることを見出し、ASK ファミリー分子群を巡る生と死と分化のシグナル伝達の解析研究およびストレスの受容認識とシグナル変換の分子機構の解析と創薬的応用を目指した研究をしている。後藤由季子は東京大学分子細胞生物学研究所において、MAP カスケード内のがん遺伝子でセリン/スレオニンキナーゼである Akt の生存促進機構の研究およびストレス刺激で共通に活性化するセリン/スレオニンキナーゼである JNK(c-Jun N-terminal kinase)のストレス刺激による活性化と JNK 依存的細胞死との関係の研究を行っている。

⁷⁷ 読売新聞 夕刊 (2002年10月1日号1面)