

戦略的創造研究推進事業
CREST プログラム

研究領域「脳を守る」

研究領域事後評価用資料

平成 17 年 3 月 16 日

1. 戦略目標

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、脳機能の理解を行うことは、正に人類の課題となってきた。

したがって、第二の戦略目標を、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・新産業の創出にも繋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. 研究領域

「脳を守る」(平成9年発足)

この研究領域は、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領域である。

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。

3. 研究総括

杉田 秀夫

(国立精神・神経センター 名誉総長)

4. 採択課題・研究費

採択年度	研究代表者	終了時 所属 役職	研究課題	研究費 百万円
平成 9年度	榎野 高明	東京大学教授	遅発性神経細胞死の分子機構	517
	須京 哲也	放医研学研究所 研究員	精神分裂病における神経伝達の異常	498
	田邊 勉	東京歯科大学教授	Caチャネル遺子の変異と神経疾患	533
	辻本 賀英	大阪大学教授	脊髄神経痛症発症メカニズムの解析	531
	中山 敬一	九州大学教授	神経細胞における管轄神経機構の解明	570
	森 望	長崎大学教授	老化脳における神経可塑性制御の分子基盤	508
平成 10年度	寺崎 哲也	東北大学教授	脳関門非比輸送に基づく神経毒	609
	遠山 正爾	大阪大学教授	脳虚血による引き起こされる神経細胞死の予防法の開発	588
	長嶋 和郎	北海道大学教授	ウイルス生体複製の発症機構の解明と治療法の開発	595
	中別府 敏作	九州大学教授	活性酸素による脳神経細胞の障害とその防護機構	742
平成 11年度	荒田 喜一	国立精神神経センター部長	DNAチップによる遺伝性神経疾患の分子病態解明	548
	垣塚 彰	京大教授	神経変性の分子機構解析に基づく新しい治療法の開発	633
	金子 清俊	国立精神神経センター部長	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	596
			総研究費	7,468

5. 研究総括のねらい

「脳を守る」の最終目標は「精神・神経疾患の克服」である。「脳を守る」は非侵襲的計測技術等を用いた診断機能解析技術や遺伝子の解析研究等の進展により遺伝子の関与する脳疾患をはじめ、各種脳疾患の病態の解明等が進んでいる事を踏まえ脳の発達、老化のメカニズムの解明とその制御法の開発、多彩な精神・神経疾患の病因の解明とその治療法、予防法の開発を目指した。近年我が国の急激な超高齢化社会の到来によりアルツハイマー病などの精神・神経疾患の克服が緊急かつ重要問題であることに鑑み、その治療法につながる研究に重点を置いた。

6. 選考方針

「脳を守る」最終目標にかなったテーマを選ぶことには変わりはないが、従来にない斬新なコンセプトのもとに、革新的な手法を駆使して、病態の本質に正面から取り組むチームを選ぶように心がけた。その結果、比較的若い研究者の意欲的なテーマが候補に選ばれることになり、リスクも高まることも予想された。一方、5年間にわたり多額の研究費を投入する事の重大さを考えると、全く実績のない研究者をそのアイデアだけで選ぶことはできなかった。その研究者の実績、研究の手堅さも見極めた上で、上記の主旨に合えば若干のリスクも背負った上での選考を行った。

7. 領域アドバイザーについて

領域アドバイザー名	所属	役職	任期
金澤 一郎	国立精神・神経センター	総長	H9年4月～H17年3月
木村 淳	京都大学	名誉教授	〃
高橋 清久	国立精神・神経センター	名誉総長	〃
竹下 研三	第一福祉大学	教授	〃
立石 潤	老人保健施設・はるかぜ	施設長	〃
永津 俊治	藤田保健衛生大学	客員教授	〃

アドバイザーを人選・依頼するにあたっては、1)精神・神経系疾患の病態に造詣が深いこと、2)基礎研究者と臨床研究者間および、各専門分野を幅広くカバーできるように配慮した。

8. 研究領域の運営について

- 1) 各研究チームの自主性を尊重しながらも、「脳を守る」研究の観点を逸脱しないよう配慮した。
- 2) 年1回サイトビジットを行い、各研究チームの研究進捗状況を詳細にレビューした。また研究の問題点についてディスカッションを行い、新たな手法の提示や、専門家の紹介等研究の推進に役立つことを積極的に行った。
- 3) 画期的な研究成果を上げそうなチームに重点的に予算を配分するよう取り計らった。

9. 研究を実施した結果と所見

研究領域全体として、ほぼ初期の目標を達成したと言えるが、臨床に結びつけるにはもう少し期間が必要である。各研究課題の主な成果を以下に列記する。

平成9年度課題

研究課題：遅発性神経細胞死の分子機構

研究代表者：桐野 高明

遅発性神経細胞死の発見は研究代表者の独創的な大きい発見であった。その細胞死の分子機構を解明するため、多面的なアプローチを行い、海馬 CA1 領域に多いカルシニューリンが、虚血後プロテアソーム機能低下に関係し、p53 の蓄積を起こし、カスパーゼ3を介するアポトーシスを起こす機序が明らかにされた。その方向とは別に他グループとの共同研究により、海馬 CA1 領域における神経前駆細胞から、神経細胞の再生が見られることを見出した。この方向による研究が治療方法の開発に結びつくもの期待され、引き続き発展推進事業で継続されることになった。一方マウスにおける遅発性神経細胞死のマウスモデルを開発した意義は大きく、今後の治療開発に貢献するものと思われる。

研究課題：精神分裂病における神経伝達の異常

研究代表者：須原 哲也

PET を用いて統合失調症における脳内ドーパミン受容体に着目した研究は日本では殆ど行われていなかったが、その困難な課題に挑戦した。研究の過程で統合失調症患者ではドーパミン D2 受容体は予想に反して前部帯状回において有意な低値が認められ、陽性症状と負の相関が認められたこと、NMDA レセプターリガンドが小脳に集積する興味ある結果を見出した。

研究課題：Caチャンネル遺伝子の変異と神経疾患

研究代表者：田邊 勉

当初の目的通りCaチャンネルとしての機能が明かなポリグルタミン病の一種であるSCA6を中心としてCaチャンネル異常と疾患、症状との関連を明らかにする方向で研究が進み、1ACaチャンネル遺伝子との関連はかなり明らかになった。特にポリQ領域を持つP型チャンネルが、SCA6において特異的に変性脱落する小脳プルキンエ細胞において、高濃度に発現していることを明らかにし、そこが細胞死の場であることを示した。Caチャンネルの種々のタイプが痛みや情動異常に働いていることの発見は、予期しなかった臨床的に重要な新知見である。

研究課題：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

アポトーシスに関する基礎研究の面で大きい成果を上げ、nature に2報掲載されたことは注目すべき事である。アポトーシスがミトコンドリア膜のVDACの開閉によりシトクロムcの放出をコントロールすることによって行われるという、全く新しい概念を発表した。このVDACの開閉はこのチームが発見したBcl-2ファミリーによってコントロールされることを示し、これらの因子の分子機能的な意義をより強力なものにした。Bcl-2のアポトーシス抑制機能がBH4ドメインにあり、そこにSMNとの結合点があることを見出しSORSTにおいて新たな展開を図ることになった。

研究課題：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

当初、神経細胞の増殖を阻害している p27 と p57 の 2 つの遺伝子を阻害すれば、増殖を開始するのではないかと期待したが、動物実験で無理なことが判明した。そこでこのチームは方針を切り替え、細胞周期という困難な課題に取り組むことになった。その中で多くの重要な発見がなされた。シグナル伝達物質の PKC- が細胞増殖の抑制に働き、この機能が不全になると自己免疫疾患を発症することや、免疫抑制剤に関連したたんぱく質 FKBP38 が抗アポトーシス分子である Bcl-2 を制御し、抗癌剤や放射線照射でも死ななかったがん細胞にアポトーシスを引き起こさせることを有力誌に発表した。その他ユビキチンリガーゼ KPC 等細胞周期をコントロールする数々の因子を発見しており、メカニズムの解明に貢献している。

研究課題：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

神経可塑性分子 nGAPs、神経シグナル分子 N-Shc、神経特異的転写因子 NRSF の相互の関連についての基礎研究に進展が見られた。特に ClipinC、Grit、神経の損傷時にみられる N-Shc の応答性などに新しい所見が得られている。

平成 10 年度採択課題

研究課題：脳関門排出輸送に基づく中枢解毒

研究代表者：寺崎 哲也

「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」という仮説を証明し、その分子機構を解明することを目的とした。そのため *in vitro* の機能を保持した培養細胞系の開発が必要とされ、温度感受性条件的不活化脳毛細血管内皮細胞株 (TM-BBB, TR-BBB) を樹立することに成功した。これら細胞株は、*in vivo* BBB の機能と良く相関していた。本研究によって、多数のトランスポーターの機能が明らかとなり、脳内の神経伝達物質、神経調節因子、薬物等を脳から血液方向へ輸送することで、脳を防御する中枢解毒機構として働いていることが初めて明らかになった。今後はこれまでに得られた成果を基にアミロイドタンパクの BBB 排出機構を明らかにし、その活性化を利用した新しい治療薬の開発研究を目標として「基礎研究発展推進事業 SORST」において展開を図ることになった。

研究課題：脳虚血により引き起こされる神経細胞死防御法の開発

研究代表者：遠山 正彌

アルツハイマー病研究においてはアミロイドベータやタウ蛋白の研究が主流となっているが、本チームはプレセニリンに着目したことに特徴がある。その結果、PS2 変種蛋白が細胞死の原因となっていることを突き止め、その異常を起こすメカニズムの解明を通して PS2 変種蛋白の生成を抑止する方法を提案するに至った。この研究が進展して薬剤の開発ができれば、アルツハイマー病の根本的治療薬になる。また、PS2 変種蛋白とアルツハイマー病の病態との間に有意な相関が得られれば、診断薬にもなりうる。現在これらの開発に取り組んでいるところであり、その成果が期待される。一方中枢神経の軸索再生の研究は短期間にも拘わらず、治療法につながる成果が得られた。

研究課題：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

JCV ウイルスが中枢神経系でのみ増殖を行う機構を解明するために、1) 細胞膜側のウイルス受容体の単離・同定、2) 細胞内侵入後のウイルスの細胞内移送経路の解明、3) ウイルスゲノムの複製の場である細胞核におけるウイルスゲノムの転写・複製調節の解明、

4) JCV 感染モデル動物の作製を行った。これらの研究の結果ウイルスの特殊なタンパク (agno および VP1) を構成する遺伝子配列の機能を抑制することにより、ウイルスの増殖を抑制できることを見出した。臨床につながる成果として期待できる。

研究課題：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

当初酸化障害に対する防御遺伝子 (MTH1 , OGG1 , MUTYH) 欠損マウスを用い、病態との関係を解析する計画であったが、マウスの2年程度の寿命では、脳における有意な病態は観察されなかった。そこで、遺伝子欠損マウスから細胞株を樹立し、ヒト防御遺伝子を導入する等で機能解析を進めた。その過程で新たな防御遺伝子として、APEX2 , NEIL3 , ITPA を同定した。また、発現制御に関わる分子として JSAP1 を同定し、軸索再生に関わる因子として Galectin-1 ファミリーを同定した。

平成 11 年度課題

研究課題：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：荒畑 喜一 (西野 一三)

ヒト骨格筋・心筋の cDNA 断片をクローン化した独自の DNA チップを作製した。再現性も良く、患者一人一人の検体で解析できる従来にない優れたものになった。遺伝子発現情報をカタログ化し、分類した。しかし、病態と関連づけるには更に一段のブレークスルーが必要で、シグナル伝達系等の解析結果を加味している。また、投与薬物による筋組織の動態を分子レベルでモニターする方法を試みており、治療法のない筋ジストロフィーに光を当てようとしている。

研究課題：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

「ポリグルタミン病」と呼ばれる 9 種類の神経変性疾患に共通する発症機序をポリグルタミンによる毒性の観点から解析した。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を 2 種類の手法で探索したところ、いずれも VPC というセンサー遺伝子に到達した。しかも VCP はリン酸化やアセチル化によって、劇的に ATPase 活性が変化することを突き止めた。VCP の活性を制御することにより、これら神経変性疾患を根本的に治療する可能性が出てきたので、SORST でさらに研究を続けることになった。

研究課題：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

我が国においても重大な課題になってきた、CJD や狂牛病の問題に正面から取り組む貴重な研究チームとなった。正常プリオンタンパク質が何故感染型プリオンに変換されるのかは、謎であるが、その解決として、変換に関与するシャペロン様分子、X 因子の探索に努め、候補分子を同定するに至った。一方、正常分子に対しときほぐし活性を発揮する分子シャペロンを探索し、アンフォルジンを発見した。また、神経細胞死には正常プリオンの存在が必須であることを示した。これらの知見によりプリオン病を治療する糸口が掴めたと言える。

今後の展望および懸案事項

1) 根本的な治療法のない精神・神経疾患に対し基礎研究を重ね、臨床に結びつけるのは極めて困難なことではあるが、アルツハイマー病等一部は臨床への研究が進んでおり、近い将来治療法が確立されることが期待できる。今後超高齢化社会を迎え、痴呆等が大きな社会負担になることを考えれば、その成果は大きなインパクトを生み出すであろう。

2) CRESTの研究支援により、従来陽の当たらなかった研究チームが、強力なメンバーの結集や、効率的な研究ツールの充実により、強力な研究チームに変身できたことは確実であり、今後の研究に期待できる。しかし、「脳を守る」研究領域が消え去った後もこの分野の研究アクティビティを維持できるのか、大きな問題である。また、将来この分野の研究を目指す研究者に活躍の場が得られるよう領域の設定が望まれる。

3) 基礎研究の国際的な競争に勝ち抜くには、有効な特許の取得が不可欠である。CRESTの研究活動において特許出願に努めた結果、今まで経験のなかった研究者も特許とはどういうものか少しは理解を深めたものと思われる。今後特許取得は大学管理下に置かれるが、その傾向が続くよう願っている。有効な特許を取得するためには、探索型研究だけでは不十分で、網羅的な研究を組み合わせる必要があり、そのためには限られた研究資源をどう分配するかが重要な問題になると予想される。

10. 総合所見

1) 現時点での研究領域としての成果

戦略目標である「脳の老化、疾病のメカニズムの理解と制御」を具体化できる意欲的なテーマを選択し、総花的・経験的なテーマは意識的に排除した。その結果疾病の根本的なメカニズムに迫る遺伝子の機能に関わるテーマが多く採択されたのは当然として、対象となる疾病に偏りが生じるのは避けられなかった。

領域運営においては、(1)「脳を守る」観点を重視し、臨床も視野に入れた基礎研究となるよう誘導した。(2) 限られた研究資金を有効活用するため、領域内で研究テーマが重複しないよう配慮した。(3) 研究成果を貴重な財産とし、社会に還元する手段として特許出願について多くの研究者に認識して貰い、38件の出願を行った。

中間評価・事後評価は全課題について実施し、アドバイザーから高い評価が得られた。

2) 本研究領域が存在したことによるメリット、基礎研究に対する功績・問題点

・先にも述べたように、超高齢化社会を迎える日本にとって最重要な課題であり、世界的に見ても競争が激しい分野で、一貫した研究ができたことは、まさに時流を得た企画であった。しかもこの分野の重要性は高まるばかりなので、今後とも継続できる企画を考えて頂きたい。

・13チームが精神・神経疾患の基礎研究に取り組めたことは、この分野の研究に計り知れない効果をもたらしたものと確信する。

・採択されたチームの中には、既に研究体制が確立されていたチームもあるが、留学から帰国したばかりとか、テーマが一変して再出発という研究者も多く、そのような若い研究者にとって、研究環境を整え、人材を結集する上で大きな役割を果たしたと言える。

・5年間という長期にわたり、安定的な資金サポートを受け、また、事務所においても日常業務をサポートする体制下において、研究者が伸び伸びと研究に専念できるというCREST本来の理想は具現できたものと考え。そこには若干の無駄や重複があるかも知れないが、それらの欠点を補ってあまりあるフレキシビリティを発揮できれば、日本の理想的な理想の基礎研究体制ができるのではないかと考える。

・CRESTの制度は従来なかった画期的な制度であるため、当初は馴染みのない機関もあり、CRESTの主旨を理解して貰うために時間がかかると言う問題があったが、CRESTの良

さは急速に浸透してゆき、徐々に解消された。

3) 研究領域単位で研究を遂行することの意義

- ・基礎研究の分野では、個人がばらばらに地道に研究を続ければよいという時代ではなくなった。また、日々革新があり、ダイナミックに変化する時代にあっては、柔軟に対応できる制度が望まれる。その意味で5年間という研究期間の設定は適正であった。
- ・一人の研究統括を置き、数人のアドバイザーがサポートする研究領域を想定した場合、「脳を守る」研究領域は程良い規模であったと考える。しかし、これ以上狭い分野に限定すると、応募できる研究者が限定され、質が低下したり、応募できる研究者と応募できない研究者の不公平感が広がって、CRESTへの信頼が低下するおそれがある。大部分の基礎研究者が何らかの領域に応募できるような制度が望まれる。

4) 感想・その他

- ・精神・神経系疾患に対して分子レベルで根本的に研究し直そうという機運の中に、それにふさわしいテーマを選び研究できたことは、日本の脳科学発展に大きく貢献し、世界の潮流に乗り遅れることなくリーダーシップを保てた大きな原動力になった。
- ・十分な研究環境を整えれば、日本の若い研究者は独創性を発揮し、世界一流の研究者に引けを取らない成果が出せることを確認できた。
- ・研究者からは、CRESTならではの夢のあるテーマに取り組んで自由に研究できる喜びと感謝の念を何度も聞いている。これはCRESTの制度が研究者から如何に歓迎されているか、また期待されているかの表れと言えよう。特に、研究者を自由に雇用できること、費目間の調整が柔軟にでき、無駄がないこと等が評価された。
- ・小規模で地味な存在に過ぎなかった研究チームが、CRESTによって優秀な人材を結集し、革新的な解析ツールで武装することによって、強力なチームに変身した実例をまざまざと見せられて、非常に心強く感じられた。機器の購入についてはチーム内で慎重に検討されており問題ないが、人材については非常に順調に進んだチームがある一方、適当な人材を見つけられないまま終わったチームもあった。人材の発掘は基本的に研究代表者の重要な責務ではあるが、JSTにはこれまでの膨大な実績を生かして、候補者のリストを持つ等サポートできる体制を取ったらどうだろうか。
- ・領域として、知的所有権の確保に努め、それなりに成果を上げ得たと思われる。しかし、日本の特許制度の欠陥により、出願後の審査が遅延しており、研究期間内には殆ど審査に貢献できなかったのは残念である。
- ・精神・神経疾患の克服という国家的な使命はますます重要になりつつある。一過性の成果に終わることのないよう、今後とも同様なサポートが得られるよう期待したい。

領域評価用資料 **添付資料** (CREST プログラム)

研究領域 「**脳を守る**」

1. 応募件数・採択件数

採択年度	応募件数	面接件数	採択件数
平成 9 年度	98	20	6
平成 10 年度	66	12	4
平成 11 年度	61	12	3
採択数 計			13

2. 主要業績

(1) 論文・特許件数

論文件数（海外のみ）

研究代表者	年							合 計
	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	
桐野 高明	9	18	17	10	11			65
須原 哲也	7	7	10	22	23			69
田邊 勉	5	2	6	13	13			39
辻本 賀英	14	11	12	2	6			45
中山 敬一	16	16	16	18	22			88
森 望	3	6	4	6	10			29
寺崎 哲也		1	8	11	20	14		54
遠山 正彌		12	12	14	13	15		66
長嶋 和郎		15	24	27	28	13		107
中別府雄作		7	11	14	13	16		61
荒畑 喜一			14	15	15	11	3	58
垣塚 彰			7	21	14	7	9	58
金子 清俊			6	3	4	12	3	28
領域合計	54	95	147	176	192	88	15	767

特許件数（海外出願件数）

研究代表者	年							合 計
	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	
桐野 高明	0	0	0	0	0	1		1
須原 哲也	0	1	0	0	0			1
田邊 勉	0	0	1	1	0			2
辻本 賀英	0	1(1)	0	0	0			1(1)
中山 敬一	1	0	2	0	0			3
森 望	0	0	0	0	0			0
寺崎 哲也	0	0	5	1(1)	1	2		9(1)
遠山 正彌		1	0	1	3(2)	0		5(2)
長嶋 和郎		1	0	1	3(1)	0		5(1)
中別府雄作		0	0	0	1	1		2
荒畑 喜一			0	0	1	0	0	1
垣塚 彰			2	1(1)	1	1(1)	1(1)	6(3)
金子 清俊			2(1)	0	0	0	0	2(1)
領域合計	1	4(1)	12(1)	5(2)	10(3)	5(1)	1(1)	38(9)

(2) 主要論文

桐野 高明

「遅発性神経細胞死の分子機構」

1. Asai A, Qiu J-h, Narita Y, Chi S, Saito N, Shinoura N, Hamada H, Kuchino Y, Kirino T.: High-level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J Biol Chem* 274:34450-34458, (1999)
2. Qiu JH, Asai A, Chi S, Saito N, Hamada H, Kirino T.: Proteasome inhibitors induce cytochrome-c/caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 20: 259-265, (2000)
3. Asai A, Tanahashi N, Qiu JH, Saito N, Chi S, Kawahara N, Tanaka K, Kirino T.: Selective proteasomal dysfunction in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:705-10, (2002)

須原 哲也

「精神分裂病における神経伝達の異常」

1. Yasuno F., Suhara T., Okubo Y., Sudo Y., Inoue M., Ichimiya T., Tanada S. Dose relationship of limbic-cortical D2-dopamine receptor occupancy with resperidone. *Psychopharmacology*, 154:112-114, 2001
2. Haradahira T., Okauchi T, Maeda J., Zhang M-R., Kida T., Kawabe K., Mishina M., Watanabe Y., Suzuki K., Suhara T. A Positron-Emitter labeled GlycineB Site Antagonist, [11C]L-703,717, Preferentially Binds to a Cerebellar NMDA Receptorsubtype consisting of GluR e3 Subunit in vivo, but not in vitro, *Synapse*, 43:131-133, 2002
3. Suhara T., Okubo Y., Yasuno F., Sudo Y., Inoue M., Ichimiya T., Nakashima Y., Nakayama K., Tanada S., Suzuki K., Halldin C., Farde L. Decreased dopamine D2 receptor binding in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psych*, 59:25-30, 2002

田邊 勉

「Ca チャネル遺伝子の変異と神経疾患」

- 1) Toru, S., Murakoshi, T., Ishikawa, K., Saegusa, H., Fujigasaki, H., Uchida, T., Nagayama, S., Osanai, M., Mizusawa H. & Tanabe, T. (2000). Spinocerebellar ataxia type 6 mutation alters P-type calcium channel function. *Journal of Biological Chemistry*, 275:10893-10898.
- 2) Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Minowa, O., Kazuno, A., Han, W., Matsuda, Y., Yamanaka, H., Osanai, M., Noda, T. & Tanabe, T. (2000). Altered pain responses in mice lacking a1E subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6132-6137.
- 3) Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Kazuno, A., Matsuda, Y., Nonaka, T., Han, W., Toriyama, H. & Tanabe, T. (2001). Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking N-type Ca²⁺ channel. *The EMBO J.* 20: 2349-2356.

辻本 賀英

「脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析」

- 1) Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. Bcl2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-487, 1999
- 2) Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401: 168-173, 1999

- 3) Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T. and Tsujimoto, Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and VDAC, which is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 275: 12321-12325, 2000
- 4) Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 152: 237-250, 2001

中山 敬一

「神経細胞における増殖制御機構の解明」

- 1) Shirane, M., Nakayama, K.-I.: Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nature Cell Biol.*, 5: 28-37 (2003).
- 2) Miyamoto, A., Nakayama, K., Imaki, H., Hirose, S., Jiang, Y., Abe, M., Tsukiyama, T., Nagahama, H., Ohno, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I.: Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase C delta. *Nature*, 416: 865-869 (2002).
- 3) Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y., Littman, D.R.: Differential Requirements for Runx Proteins in CD4 Repression and Epigenetic Silencing during T Lymphocyte Development. *Cell*, 111: 621-633 (2002).

森 望

「老化脳における神経の可塑性制御の分子基盤」

- 1) Nakamura T, Takeuchi K, Muraoka S, Takezoe H, Takahashi N, and Mori N: A neurally-enriched coronin-like protein, ClipinC, is a novel candidate for an actin cytoskeleton-cortical membrane linking protein. *J. Biol. Chem.* 274, 13322-13327 (1999)
- 2) Naruse Y, Aoki T, Kojima T, and Mori N : Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13691-13696 (1999)
- 3) Nakamura T, Komiya M, Sone K, Hirose E, Gotoh N, Morii H, Ohta Y, and Mori N. Grit, a GTPase-activating protein for RhoA and Cdc42, regulates neurite extension through its association with TrkA receptor and N-Shc, CrkL/Crk adapter molecules. *Mol. Cell. Biol.* 22 (24) 8721-8734 (2002)

寺崎 哲也

「脳関門排出輸送に基づく中枢解毒」

1. H. Takanaga, S. Ohtsuki, K. Hosoya and T. Terasaki: GAT2/BGT-1 as a system responsible for the transport of γ -aminobutylic acid at the mouse blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 21: 1232-1239 (2001)
2. S. Ohtsuki, T. Masanori, H. Takanaga, H. Shimizu, M. Watanabe, K. Hosoya, T. Terasaki: The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22:1327-1335 (2002)
3. S. Mori, H. Takanaga, S. Ohtsuki, T. Deguchi, Y. Kang, K. Hosoya, T. Terasaki: Rat organic anion transporter 3 (rOAT3) is responsible for brain-to-blood efflux of homovanillic acid at the abluminal membrane of brain capillary endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 23:432-40 (2003)

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」

1. Manabe, T., Katayama, T., Sato, N., Gomi, F., Hitomi, J., Yanagita, T., Kudo, T., Honda, A., Mori, Y., Matsuzaki, S., Imaizumi, K., Mayeda, A., and Tohyama, M., Induced HMGA1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease., *Cell Death Differ.*, 10(2003)698-708
2. Yamashita, T. and Tohyama, M., The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI., *Nat Neurosci.*, 6(2003) 461-7
3. Yamaguchi, A., Hori, O., Stern, D. M., Hartmann, E., Ogawa, S. and Tohyama, M., Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation *J Cell Biol.* 147 (1999) 1195-204.
4. Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., St George-Hyslop, P., Takeda, M. and Tohyama, M., Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 1 (1999) 479-85.

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」

1. Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Takada A, Suzuki S, Hasegawa H, Umemura T, Fujisawa J, Tanaka Y, William W. Hall, Nagashima K: Transcriptional activation of JC Virus by human T-lymphotropic virus type I tax protein in human neuronal cell lines. *J Biol Chem* 275: 17016-17023, 2000
2. Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, Matsuda M: Spatio-temporal images of growth-factor induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411: 1065-1068, 2001
3. Komagome R, Sawa H, Suzuki T, Suzuki Y, Tanaka S, Atwood WJ, Nagashima K: Oligosaccharides as Receptors for JC Virus. *J Virol* 76: 12992-13000, 2002

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」

1. Tahara, K., D. Tsuchimoto, Y. Tominaga, S. Asoh, S. Ohta, M. Kitagawa, H. Horie, T. Kadoya, and Y. Nakabeppu. 2003. FosB but not FosB Induces Delayed Apoptosis Independent of Cell Proliferation in the Rat1a Embryo Cell Line. *Cell Death Diff.* 10:496-507.
2. Yoshimura, D., K. Sakumi, M. Ohno, Y. Sakai, M. Furuichi, S. Iwai, and Y. Nakabeppu. 2003. An oxidized purine nucleoside triphosphatase, MTH1 suppresses cell death caused by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 278:37965-37973.
3. Xu, P., K. Yoshioka, D. Yoshimura, Y. Tominaga, T. Nishioka, M. Ito, and Y. Nakabeppu. 2003. In vitro development of mouse embryonic stem cells lacking JSAP1 scaffold protein revealed its requirement during early embryonic neurogenesis. *J. Biol. Chem.* 278: 48422-48433.

荒畑 喜一

「DNAチップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明」

1. Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Tachikawa M, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol*

Genet 12: 595-600, 2003

2. Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Imazawa M, Goto Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 279: 11402-11407, 2004

Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Awaya A, Suzuki Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma. *Neurology* 62: 620-623, 2004.

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」

1. Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., Nakadate, K., Ohsawa, Y., Kamei, Y., Popiel, A. H., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y., Uchiyama, Y., Hori, S., & Kakizuka, A. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 8: 977-984, 2001.

2. Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y., Fujikake, N., Matsukage, A., & Kakizuka, A. Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegenerations in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 9: 264-273, 2002.

3. Kobayashi, T., Tanaka, K., Inoue, K., & Kakizuka, A. Functional ATPase activity of p97/VCP is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 47358-47365, 2002.

4. Mizuno, Y., Hori, S., Kakizuka, A., & Okamoto, K. Vacuole-creating protein in neuro-degenerative diseases. *Neurosci. Lett.* 343: 77-80, 2003

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」

1. Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Interaction of D-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: Implication for an alternative function of Dld2p. *Biochem Biophys Res Commun.* 319: 78-82, 2004

2. Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p forms a novel grapple-like structure and has an ATP-dependent F-actin conformation modifying activity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 320: 1271-1276, 2004

3. Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p modifies the protein conformation of both properly-folded and misfolded substrates *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 323:339-344, 2004

(3) シンポジウム等

シンポジウム名	月 日	場 所	入場者数	特記事項
「脳を守る」研究連絡会議	平成 12 年 1 月 27 日	東京ガーデンパレス	80 名	
「脳を知る」「脳を守る」合同シンポジウム ー脳の機能とその異常ー	平成 13 年 4 月 27 日 ~ 28 日	京都国際会館	420 名	「脳を知る」との合同シンポジウム
「脳を守る」シンポジウム	平成 14 年 4 月 25 日 ~ 26 日	日本科学未来館	190 名	
「脳を守る」シンポジウム	平成 15 年 1 月 24 日	日本科学未来館	150 名	終了シンポジウム
「脳を守る」シンポジウム	平成 16 年 1 月 23 日	日本科学未来館	130 名	終了シンポジウム主体
「脳」三領域合同終了シンポジウム	平成 16 年 10 月 7 日 ~ 8 日	日本科学未来館	580 名	10/9 に「一般向け講演・展示会」を開催した

(4) 受賞等

- ・ 辻本 賀英 第 17 回大阪科学賞 「細胞死抑制遺伝子 bcl-2 の発見と細胞死の分子機構」
平成 11 年 10 月
- ・ 垣塚 彰 第 39 回ベルツ賞 平成 14 年 11 月

(5) その他重要事項(新聞・雑誌・テレビ等)
顕著なケース なし

(6) その他の添付資料
外国特許出願リスト

(6) 脳を守る外国特許出願リスト

No.	出願チーム	発明の名称	出願日(国内優先日)	出願国	発明者	発明の要旨
1	辻本	アポトーシス抑制又は促進物質のスクリーニング方法	1999/2/15	US	辻本 賢英 清水 重臣	Bcl-2ファミリーはチトクロムC遊離の過程を制御することでアポトーシスを制御している。このBcl-2ファミリーの機能ターゲット分子が、ミトコンドリア膜のVDACチャネルであることを発見した。このVDACをターゲットにしたスクリーニングを行うこと
2	寺崎	不死化血管周皮細胞株	1999/11/11	US,CA,GB,DE,FR,,SE	飯笠 久 研部 恵美 中島 哲也 寺崎 益夫 帯刀 益夫	SV40温度感受性突然変異株tsA58ラージ抗原遺伝子導入ラットの脳毛細血管周皮細胞より、細胞株を樹立した。この細胞株は周皮細胞の表面マーカーであるPDGF 受容体 等の発現を保持している。血管壁変性疾患の研究、血管新生研究、脳における自己免疫疾患の研究、血管周皮細胞を標的とした医薬品のスクリーニング等の研究に有用である。
3	金子	高効率抗体スクリーニング法	2000/11/24	US,EP	金子 清俊	2次元電気泳動ファージバニング法(2D-PP)と組織ファージバニング法(in situ PP)を含む高効率抗体スクリーニング法並びに抗体チップ/組織チップ作成へ応用する。この抗体チップを用いることで、病的状態における蛋白質の発現プロファイルの一括解析が可能になる。
4	垣塚	神経変性疾患の予防薬または治療薬の有効成分となる物質のスクリーニング方法	2000/8/24	US,EP	垣塚 彰 平林 美穂	異常タンパク質が、バロシン含有タンパク質(VCP) と結合することにより神経細胞の変性、脱落を生じさせ、神経変性疾患を引き起こす。任意の異常タンパク質、VCP、および候補物質を共存させ、異常タンパク質とバロシン含有タンパク質の結合が阻害されるかをスクリーニングする。
5	遠山	プレセニン2遺伝子エクソン5欠損型スプライシング異常の生成に関与する核酸	2001/6/27	US,CA,GB,DE,FR,,SE	遠山 正彌 眞部 孝幸 片山 泰一 今泉 和則 池田 陽子	孤発性アルツハイマー病患者脳において共通に見られ、神経細胞死を引き起こすプレセニン2のスプライシング変種(PS2V)の産生メカニズムを明らかにし、そのスプライシング異常の原因となるRNA結合蛋白質HMG-1を同定した。またHMG-1が結合する配列を決定した。HMG-1の本配列への結合阻害が孤発性アルツハイマー病をはじめ他のスプライシング異常により発症する疾患の治療薬開発のターゲットになる。
6	遠山	医薬組成物	2001/6/27	US,CA,GB,DE,FR,,SE,AU,KR,CH,SE	遠山 正彌 眞部 孝幸 片山 泰一 今泉 和則 森本 繁夫 池田 陽子	スプライシング変種(PS2V)が産生され、神経細胞死を引き起こしそれが孤発性アルツハイマー病の原因となる。従ってHMG-1のプレセニン2遺伝子エクソン5への結合を妨げればPS2Vによる神経細胞死を防ぐことができる。おとり遺伝子を用いることによりPS2Vの発現を抑制し、神経細胞死を防ぐことに成功した。
7	長嶋	JCウイルスagnoを対象としたPMLの治療	2001/11/22	US,CA,GB,DE,FR,,SE	長嶋 和郎 澤 洋文 岡田 由紀	進行性多巣性白質脳症(progressive multifocal leukoencephalopathy, PML)の原因ウイルスであるJCウイルスの増殖を阻止する目的としてJCウイルスが有する遺伝子のうちで最も小さな遺伝子であるagnoに変異をいれてこの遺伝子発現を停止させると、JCウイルスの増殖が阻止されることを見出した。agno遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチド(RNA干渉(RNA interference: RNAi))を感染細胞に導入することにより、本ウイルス疾患の治療法確立が可能となる。
8	垣塚	薬剤スクリーニング方法(ERRL1特許)	2002/8/8	US,CA,EP(GB,DE,FR,SE,SW)	垣塚 彰 亀井 康富 大泉 宏	核内受容体のうちこれまでリガンドが判明していない孤児受容体ERR(estrogen receptor-like protein)がERRL1と名付けた蛋白性のリガンドで活性化されることを発見した。このERRL1を発現させるトランスジェニックマウスは運動負荷をあたえた時と同様の痩せを示し、高脂肪食や遺伝的な肥満に抵抗性を示した。新規抗肥満薬及び抗糖尿病薬のスクリーニング法を提供する。
9	垣塚	修飾化バロシン含有タンパク質に対する抗体	2003/12/19	PCT	垣塚 彰 大泉 宏 堀 清次 前田 良次 野口 昌克	これまでに報告されていないVCP蛋白質内での蛋白質修飾を受けるアミノ酸を同定した。この修飾VCPに対する特異抗体を作成し、実験用の試薬として販売する権利を本発明とする。

(7) 中間評価結果、事後評価結果

研究課題別中間評価結果

1 - 1 . 研究課題名

遅発性神経細胞死の分子機構

1 - 2 . 研究代表者名

桐野 高明 (東京大学大学院医学系研究科 教授)

1 - 3 . 研究概要

一過性脳虚血後、海馬の遅発性神経細胞死はきわめて緩徐に進行し、受動的破壊による細胞死とは異なる。その上流では神経細胞特有の機構による細胞死の決定機構が働き、その間は神経細胞死は可逆性で治療可能であり、最終的にアポトーシス共通の経路に達すると不可逆的に進行すると考えられる。アポトーシスの上流での神経細胞特有の分子機構を解明し、治療可能域を探ることが本研究のねらいである。

1 - 4 . 中間評価結果

1 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

研究代表者は、一過性脳虚血後特に海馬 CA1 細胞において、遅発性の神経細胞死が見られることを発見している。そのメカニズムを解明するため、当初はカルシニューリンに着目した仮説を立て、それを立証する研究に着手した。その結果、カルシニューリンが p53 を介して関与することが立証された。それ以外にも、ユビキチン/プロテアソームの機能低下、及びカスパーゼ 3 が関与していることを明らかにした。また、遅発性神経細胞死のモデル動物をマウスで作製することに初めて成功した。これらの成果は独創的であり、世界をリードするものである。

研究体制は、分子解析グループが 2 グループ、治療実験グループが 3 グループあり、それぞれ独自の研究を展開している。しかし、後者の 3 グループは現段階では必ずしも研究の主題との関連が明らかでない部分もあり、もっとメカニズムの解明に主力をおくべきであろう。今後は、in vitro 系の解析で見いだしたカルシニューリン、p53、プロテアソーム等分子群の動きが in vivo でどのように動いているのか、チームで開発したモデル動物で実証し、治療方法の開発を目指して欲しい。

1 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

遅発性神経細胞死が防止出来れば、脳梗塞等の障害が著しく軽減出来、インパクトは大きい。その治療法を開発するための手段として、マウスにおける遅発性神経細胞死モデルを開発した意義は大きい。臨床を主体としたチームであり、治療方法の開発方針が明確になれば、大いに力を発揮できるものと期待される。そのためにも、遅発性神経細胞死の分子機構の解明が強く期待される。

1 - 4 - 3 . 総合的評価

本研究は、研究代表者が自ら発見した現象のメカニズムを解明しようとするものであり、その成果は着実に上がっている。また、モデルマウスの作製に成功したことは高く評価される。この分野では日本におけるリーダー的な立場にあるので、今後ともリーダーシップを発揮して治療方法の開発につなげることが強く期待される。

2 - 1 . 研究課題名

精神分裂病における神経伝達の異常

2 - 2 . 研究代表者名

須原 哲也 (放射線医学総合研究所 特別上席研究員)

2 - 3 . 研究概要

本研究は、精神分裂病の大脳皮質におけるドーパミン神経伝達及び関連分子の異常をポジトロンCTを用いて測定し、臨床症状、薬物反応性など複数の指標との関連を明らかにする。さらに、生体における大脳皮質ドーパミン機能及びその調節機構を研究することにより、精神分裂病の新しい治療原理の構築を目指している。

2 - 4 . 中間評価結果

2 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

本研究は1)精神分裂病の病態と治療に関する研究、2)新規リガンドの開発・評価研究、の2つに分けられる。臨床研究は、これまでに大脳皮質領域のドーパミンD2受容体を[11C]FLB 457を用いて定量評価し、精神分裂病において前部帯状回のD2受容体結合が正常対照群に比較して低く、精神分裂病の陽性症状と負の相関があることを明らかにした。一方リガンド開発研究においては、NMDA受容体の標識リガンドとしてacetyl[11C]L-703,717を開発し、in vivoにおける評価では小脳にのみ特異結合することを見出した。これらの知見は国際的にも斬新な成果である。欧米に比してかなり遅れているリガンドの開発は、九州大学との共同研究によってacetyl[11C]L-703,717を始めいくつかの候補化合物を得ており、よく貢献している。動物用PETの導入や実験動物搬入のための調整に手間取った感は拭えないが、その後は体制を立て直して成果を挙げつつある。PETを用いた研究では、合成・薬理・解析の3グループ間の密接な協力体制が必要であるが、日本では外国と比べてチームの立ち上げが困難であった。本研究はCRESTの支援があって初めて可能になったものであり、その意義は大きい。また、東京医科歯科大学を初め臨床家との連携が円滑になされており、さらに共同研究体制を広げる努力がなされている。更に効果的なリガンドを開発し、臨床応用に進むことが期待される。

2 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

精神分裂病における大脳皮質でのD2受容体の研究やNMDA受容体の研究では、評価すべき成果を挙げている。既に12編の国際誌への発表も行っており、この点も評価出来る。NMDA受容体リガンドacetyl[11C]L-703,717の小脳特異的標識が確立されれば、小脳変性疾患への応用も期待できる。

2 - 4 - 3 . 総合的評価

分裂病が抗ドーパミン薬でその陽性症状が改善される事は臨床的に解っていたが、D2受容体について線条体以外で検索した意義は大きい。分裂病において、D1受容体に次いでD2受容体が大脳皮質、特に前部帯状回で低下し、且つ陽性症状と負の相関がありそうであると言う指摘は、大きい意味を持つ。今後症例を増やして確実な結論に達してほしい。リガンドの開発に関しては、我国では薬学、特に製薬会社との協力がなかなか得にくい分野であるが、マウスでグリシンサイトのNMDA受容体リ

ガンドが小脳特異的サブユニットと結合するという研究は意義深い。今後更にデータをより確実なものとした上で、各種の小脳変性症に応用出来る事を期待したい。

3 - 1 . 研究課題名

Ca チャネル遺伝子の変異と神経疾患

3 - 2 . 研究代表者名

田邊 勉 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授)

3 - 3 . 研究概要

本研究の目的は、SCA6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にある。研究代表者等は、SCA6患者プルキンエ細胞において1Aチャネルの凝集体を見出した。また、SCA6変異を有する1Aチャネルは機能低下していることを明らかにした。さらに、神経特異的チャネルである1A、1B及び1Eチャネルの機能的特異性と協同性の一端を明らかにした。これらの研究を通じて、未解明なSCA6については神経変性疾患の治療法を開発することを目指している。

3 - 4 . 中間評価結果

3 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

SCA6の病態において、1Aチャネル遺伝子のCAG延長が何故神経細胞変性脱落を引き起こすのかを解明するため、免疫組織化学的解析、変異マウスの機能解析、*in vitro*における電気生理学的解析、ノックインマウス、ノックアウトマウスの作製と多彩な手法を駆使して丹念にアプローチした。その結果、SCA6病態に結びつく多くの成果を挙げている。

特に、1)SCA6患者の剖検脳のプルキンエ細胞質内にポリグルタミンの凝集体があり、且つコピキチン化されていないこと、2)生物学的にポリグルタミンの長さが長くなるに従ってCaチャネルが不活性化し易くなり、且つこのチャネルを通るCa流入量が減少する、3)1AチャネルのcDNAをクローニングした、等が治療法の開発にとって重要な意義を有する。また、付随した研究において、痛覚伝達機構における神経特異的Caチャネルの機能の役割を明らかにしているが、慢性疼痛の治療薬につながることも期待できる。世界的に競争の激しい分野であるが、量的にも質的にも遜色のない成果を上げている。

同一研究機関内の薬理学教室と神経内科教室との連携がうまくかみ合っており、研究体制は良好である。今後は、Caチャネル遺伝子ノックアウトマウス及びSCA6病態モデルマウスの作製、小脳機能における個々の電位依存性Caチャネルの特異性と協同性の解析を通じて、SCA6の遺伝子治療の開発を目指して欲しい。

3 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

1Aチャネルという単一Caチャネル遺伝子の変異により、SCA6やその他多彩な神経変性疾患が発症することを明らかにした成果は、大きなインパクトになるであろう。臨床応用に進むためには、更に動物実験で確認する必要がある。1B、1Eチャネルについては、すでにノックアウトマウスを作製して機能解析を行っている

段階であるが、1Aチャンネルについては、ES細胞を作製した段階でこれからの課題である。特に、P型1Aチャンネルロックアウト及びロックインマウスの作製と表現型の解析は必須である。SCA6モデルマウスの作製については既に着手しているが、早期に完成することが望まれる。

3 - 4 - 3 . 総合的評価

SCA6の病態に迫るメカニズムの研究は順調に進んでいるが、細胞質内ポリグルタミン凝集体の出現、in vitroでのCa流入の低下など、この両者の因果関係は今後の課題である。モデルマウスや変異マウスの作製には、飼育スペースやマンパワーの問題があり困難が予想されるが、方法論は出来上がっているので、研究チームの努力に期待したい。残された期間を有効に使って、神経変性疾患の治療に結びつく方法論を確立することを期待する。

4 - 1 . 研究課題名

脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析

4 - 2 . 研究代表者名

辻本 賀英 (大阪大学大学院医学系研究科 教授)

4 - 3 . 研究概要

研究代表者等は、遺伝性の運動神経変性疾患の一つである脊髄性筋萎縮症(SMA)の疾患原因遺伝子産物Smnが、神経細胞死を防ぐBcl-2たんぱくに結合し、その活性を促進する機能を有することを示してきた。本研究ではSMA発症メカニズムを解明するため、Bcl-2の持つ細胞死抑制機能の生化学的基盤の解明と、Smnによるその機能増強の分子メカニズムの解明を目指して研究を展開してきた。

その結果、Bcl-2ファミリーの機能ターゲットがミトコンドリア膜上のチャンネルVDACであることを示し、細胞の生死決定機構の分子構造を明らかにすると同時に、Smn・Bcl-2の結合に必須の領域を決定し、Smn機能解明の基礎を作った。

4 - 4 . 中間評価結果

4 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

当初の計画に沿って着実に研究は進められている。SmnがBcl-2と結合する必須部位BH4を特定しており、Smnの立体構造を解明する等、Bcl-2ファミリー蛋白の機能解明とSmnがBcl-2機能を増強する分子機構の解明に進展がみられている。本来の計画以外にも、例えばBcl-2ファミリー蛋白がミトコンドリア膜VDACを通過するシトクロムCの遊離を調節することによってアポトーシスを制御していることの発見、クロマチン凝集反応を担う新規因子Acinusの発見等、国際的に第一級の成果を挙げている。これらの成果は一流国際誌に発表され反響を呼んでいる。

国際的にアポトーシスの研究は最も多く競争の激しい分野であるが、研究代表者の成果は独創的であり、高いレベルにある。チーム編成は、研究代表者の属する単一講座内の少数精鋭による集中した研究となっている点では際だっている。密度の高い効率的な研究が出来るのも、このチームのレベルの高さによるものと見られる。今後Smnの機能解析を更に進め、SMAの発症機構に直接結びつく研究、更に治療法

の開発につなげる事が期待される。そのためには、臨床研究者との共同研究が必要になるであろう。

4 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

Bcl-2 ファミリー蛋白が直接 VDAC の機能を制御すること、BH4 ドメインが最小機能ユニットであること、Bcl-2 機能を制御する新規小胞体膜蛋白 (RTNxs) の同定、クロマチン凝集反応を担う新規因子 (Acinus) の同定等、重要な成果を挙げている。既に 21 編の論文を発表し、そのうち 3 編は Nature であることは特筆されるべきことである。アポトーシスの分子機構の解明から、SMA の原因遺伝子 Snn の機能解析、更に発症メカニズムに進んでいる。Bcl-2 ファミリーのアポトーシス制御機構の解明は、神経変性疾患の治療の手がかりとなるであろう。

4 - 4 - 3 . 総合的評価

優れた研究である。アポトーシス機構の解明を基礎として Snn の機能解析、更に SMA の分子機構の解明につながる事を期待したい。特に、Snn の遺伝子異常が何故運動ニューロンに特異的に出現するかが解明されれば、治療への手がかりが与えられるであろう。この研究は多くの神経細胞のアポトーシスに深く関係しているの、広い領域にも好影響を与えるものと期待できる。研究代表者は基礎系の研究者であるが、今後疾患の解明のために臨床系の研究者との研究協力を希望する。

5 - 1 . 研究課題名

神経細胞における増殖制御機構の解明

5 - 2 . 研究代表者名

中山 敬一 (九州大学生体防御医学研究所 教授)

5 - 3 . 研究概要

本研究の目的は、神経細胞が何故増殖しないのかを分子レベルで解明しようとするものである。当初その原因の一つは、細胞周期を止める 2 つの類似した分子 p27、p57 が神経系に強く発現しているためと考えた。そこで、p27、p57 の発現機構を解明し、またダブルノックアウトマウスを作成することによって、神経細胞の細胞周期停止メカニズムを明らかにしようと試みた。ダブルノックアウトマウスの作成は早期に達成したが、神経再生につながる展望は開けなかった。直ちに研究の軌道修正が行われ、停止メカニズムよりは進行メカニズムを中心とする、細胞周期の基本に立ち返った研究を開始した。細胞周期制御に重要な役割を果たす分子群の発現調節機構、特にユビキチン依存性蛋白分解機構に関して、その責任因子を単離同定に成功し、さらに遺伝子改変動物を作製してその生理的機能を明らかにしてきた。さらに、神経細胞で特異的に働くサイクリン様分子をクローニングし、現在その機能解析を進めている。また、ポリグルタミン病における異常蓄積蛋白のユビキチン化機構を明らかにしつつあり、その治療法を開発つつある。

5 - 4 . 中間評価結果

5 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

本研究の主テーマは、p27 と p57 のダブルノックアウトにより神経細胞の増殖性を獲得し、この細胞を用い移植、再生に応用しようとする独創的な狙いだったが、

ダブルノックアウトによっても神経細胞は増殖せず、その意味で初期の目的は達成できなかったと言わざるを得ない。初期計画は予測通りには進まなかったが、細胞周期の促進因子であるサイクリン E の発現制御機構の解析は、細胞生物学的に幾つかの発見をもたらした。また、その周期性がユビキチンリガーゼの発現による事をノックアウトマウスで証明した成果は評価出来る。さらに、脳に発現する新しいサイクリン分子 BK5 を発見同定し、細胞周期の新しい概念形成に寄与した。このチームは、細胞生物学的実験や、ノックアウトマウスを作成し発生工学的に個体レベルで解析出来る研究能力において優れており、そのレベルは国内外の研究組織と較べても非常に高いことが実証された。

神経細胞の増殖制御機構の基礎的研究は重要であり、更に研究材料を変え、例えば幹細胞からの神経細胞の発生段階やテラトーマ由来の培養細胞を使った研究も期待出来る。神経細胞の生存維持のため、ユビキチン化機構を中心とする基礎的研究を、各種の神経変性疾患について検討する事も重要であろう。

5 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

初期計画は予測通りには進まなかったが、細胞周期の促進因子であるサイクリン E の発現制御機構の解析は、細胞生物学的に幾つかの発見をもたらした。また、その周期性がユビキチンリガーゼの発現による事をノックアウトマウスで証明した成果は評価出来る。さらに、脳に発現する新しいサイクリン分子 BK5 を発見同定し、細胞周期の新しい概念形成に寄与した。MJD1 のユビキチン化の研究は、広く神経変性疾患の分子機構の解明につながる可能性がある。

神経細胞周期制御機構やユビキチン/プロテアソーム系と神経変性疾患関連の分野は競争が激しく、短期間で意義のある成果を得ることは容易ではないが、研究者は実行能力が極めて高いので、1) 細胞周期制御におけるユビキチンリガーゼの問題、2) ユビキチン依存性蛋白分解の分子機構の解明、は神経変性疾患の成因や治療法開発につながるかもしれない。

5 - 4 - 3 . 総合的評価

当初の本研究テーマである神経細胞に増殖性を持たせる為に、増殖制御遺伝子 P27、p57 のダブルノックアウトマウスの実験は残念ながら予測通りに行かなかった。しかし、細胞周期制御機構について多くの成果が得られており、今後もこの方面の研究を集中的に推進すべきものとする。ユビキチン化機構の解明は、ポリグルタミン病に限らず多くの神経変性疾患の病態、治療法の開発に役立ち、「脳を守る」研究として重要であろう。

6 - 1 . 研究課題名

老化脳における神経の可塑性制御の分子基盤

6 - 2 . 研究代表者名

森 望 (国立長寿医療研究センター 部長)

6 - 3 . 研究概要

本研究では、神経細胞の可塑性の分子機構、加齢変動の原因を探る目的で、神経細胞の可塑性因子 (SCG10 遺伝子群) とその発現を制御するシグナル伝達物質

(Sck/ShcB 及び N-Shc/ShcC)、転写制御因子 (NRSF) の神経特異性に注目して、その実体と機能の一部を明らかにしてきた。今後は、それぞれの機能についてさらに検討を加えるとともに、加齢変動を追跡し、それらの連携によって形成される神経可塑性の老化にともなう減退のメカニズムを解明し、脳における可塑性制御の観点から老化脳の保護の可能性を探る。

6 - 4 . 中間評価結果

6 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

突起伸展の制御因子 nGAPs、転写抑制因子 NRSF/REST、神経特異的なシグナル伝達分子 N-Sch に関する研究等を総合して、神経細胞に特徴的なシグナリング、遺伝子発現、そして可塑性制御の分子機構を明らかにし、老化脳における不可逆的退行変化を解明することが本研究の当初の計画であり、それにそってかなりの進展を見ている。神経細胞の可塑性因子 (SCG10 遺伝子群) の新しい神経特異的なホモログ RB3、SCLIP、その発現を制御するシグナル伝達物質 N-Shc/ShcC、及びその関連分子 Sck/ShcB、また転写制御因子 (NRSF) の実体と機能を解明してきた。SCG10 を中心とする nGAPs について、微小管を制御する機構がわかってきた。これらの研究は初期計画から一貫しており、方針の変更はない。

老化脳に関する系統的な研究は世界的にも未開拓な分野である。一方、寿命制御遺伝子研究は酵母、線虫、マウスなどで行われているが、そこで同定された因子は本研究で扱われている核内転写因子やシグナル伝達分子との関連が示唆され、本研究がこの研究分野で主要な位置を占めていると考えられる。老化による神経可塑性の減退の方向性は適切であると思われるが、その他の老化遺伝子や脳のエネルギー代謝など他の研究グループとの関連も考慮する必要はないだろうか。老化脳の形態的变化、機能低下に直接結びつく成果を今後期待したい。

6 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

サイレンサーによる転写抑制の機構、神経特異的なアダプター分子 N-Shc が脳に特異的に発現し機能していること、nGAPs の微小管崩壊制御機構等々、神経可塑性に関わる分子の一部が解明されている。各種因子の機能が神経の生存維持に必須であることは明らかになった。今後、「脳を守る」という観点から、神経可塑性の老化による減退の機構の解明により老化脳の分子機構が明らかになり、その成果が予防、治療などに結びつけばインパクトは大きい。

6 - 4 - 3 . 総合的評価

胎生期から成長する過程は比較的研究しやすいが、老化脳の退行的な変化は関連因子が多岐にわたり複雑に関連してくるので、非常に困難であることは想像に難くない。本研究では、老化に伴う神経細胞の変化として、可塑性減退の分子機構を解明しようとしている。現在迄の研究により、発達期の脳の可塑性についてはかなり解明されてきた。しかし、その延長線上に老化脳の実態が見えてくるだろうか。可塑性の減退のメカニズムの解明に、まず発達期の可塑性を解明することの重要性は理解できるが、老化脳の可塑性に関与する各因子の加齢における変化の実態を知る事も重要である。老化脳における可塑性関連各因子の実態をまず明らかにし、発達期での差異が如何なるメカニズムによるかが解ると、「脳を守る」観点から進歩がもたらされるであろう。

7 - 1 . 研究課題名

脳関門排出輸送に基づく中枢解毒

7 - 2 . 研究代表者

研究代表者 寺崎 哲也 東北大学未来科学技術共同研究センター 教授

7 - 3 . 研究概要

血液脳関門は異物の侵入から脳を守る『障壁』として働いていることが知られている。この研究では、更に血液脳関門は不要な老廃物や異物などが脳内に溜まらないような種々の汲み出しポンプが解毒機構として働いていることを明らかにする。脳防御システムとしての血液脳関門の役割を明らかにすると共に、この汲み出しポンプと脳の老化との関連性やポンプを利用した新しいクサリの開発の糸口を探る。

7 - 4 . 中間評価結果

7 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

血液脳関門の輸送機能を解析する上で、本来の *in vitro* の機能を保持した不死化細胞株の樹立に成功した。脳毛細血管内皮細胞株、星状膠細胞株、脈絡叢上皮細胞株、網膜毛細血管内皮細胞株などを樹立し、さらに共培養実験にも成功した。これらの実験系を用いて、主として神経伝達物質の排出輸送機構を明らかにした。主な成果として、神経伝達物質の排出輸送系として GAT2 / BGT-1、ASCT2、神経伝達物質の代謝物や尿毒症物質の排出輸送系として OAT3、脳内ステロイドの代謝物排出輸送系として oapt2 が重要な働きをしていることを明らかにした。当初予想されていなかったクレアチンの脳内への輸送系が存在することを見出したのは興味深い。

このように、未知なトランスポーターを次々に発見しており、脳関門で排出輸送系の全貌が明らかになりつつある。さらにクローニングを行って生理的意義を解明することが望まれる。今後ともカタログを充実させることは重要な仕事であるが、どの目的でどのような drug delivery を提唱出来るかはまだ見えていない。筋の良いコンセプトを得るにはもう少し焦点を絞った研究が必要であろう。

7 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

研究代表者が主張する血液脳関門の排出輸送系を明らかにすることに関しては、高いレベルの研究が行われており、内因性物質のカタログはかなり進展している。特に、*in vitro* 系の実験系を確立した意義は大きい。トランスポーターの遺伝子クローニングは今後の課題である。薬学系の研究者にはなじみの少ないノックアウトマウスの作成にも果敢に取り組んでいるが、残された期間を考えるとかなり急ぐ必要がある。臨床への応用に関しては臨床の専門家と共同研究を行いながらターゲットを設定し、焦点を絞る必要があると考えられる。

7 - 4 - 3 . 総合的評価

本研究は研究代表者が提唱する独創的な脳関門輸送機構を明らかにしようとするものであり、多彩な実験を行いよく健闘している。新規なトランスポーターの発見により、研究代表者が提唱する機構は疑いようのない事実になったと言える。また予想以上に複雑な系が存在することも明らかになった。研究者としてその全貌を明らかにしたいという意欲は良く理解出来るが、一方「脳を守る」の観点からはもう少し焦点を

絞って drug deliveryへの応用への道筋をつけることも要望される。そのためにクレアチントランスポーターの生理的意義を明らかにしたり、臨床研究者と共同研究したりすることが望まれる。

研究代表者の努力により、このチームには優秀な研究者が集結し、研究室の activity が飛躍的に高まっていると考えられる。このポテンシャルを活用して更に成果を挙げることを期待したい。

8 - 1 . 研究課題名

脳虚血により引き起こされる神経細胞死防御法の開発

8 - 2 . 研究代表者

研究代表者 遠山 正彌 大阪大学大学院医学系研究科 教授

8 - 3 . 研究概要

神経細胞は低酸素負荷により容易に死に至り、虚血性脳障害を引き起こす。一方、アストロサイトは強い耐性を示す。本研究では、低酸素に耐性を示すことを可能とするタンパク発現の機序が神経細胞には欠如しているが、アストロサイトには備わっているという視点に立ち、これまで新規に単離した三種のストレスタンパクの機能解析を行い、アストロサイトに備わる虚血耐性機序を神経細胞に発現させることで神経細胞を守ることを目指す。また、孤発性アルツハイマー病患者では、プレセニリン - 2 のスプライシング異常産物が蓄積している。本研究では、この産物によってもたらされる細胞ストレスの機能と、スプライシング制御機構の解明を試み、アルツハイマー病の新たな治療法の開発を目指す。

8 - 4 . 中間評価結果

8 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

研究代表者は低酸素負荷がかかった時、ニューロンは脆弱であるのに対し、アストロサイトは抵抗性を示すことに着目し、その原因を調べた結果アストロサイトではシャペロン様分子 ORP150 が発現して細胞死を防御していることを見出した。その ORP150 をニューロンに誘導すれば神経細胞死を防げるのではないかという独創的な発想のもとに研究が進められた。その結果、ORP150 以外にも低酸素負荷時に小胞体の機能を守る因子として SERP1 を、また新規ストレス蛋白として Lon を同定した。また、マウスに ORP150 を強制発現させると虚血ストレスだけでなく興奮性アミノ酸による神経細胞死も防御することが解ってきた。一方、プレセニリン - 2 (PS2) に着目した孤発性アルツハイマー病の研究では、大きな進展があった。孤発性アルツハイマー病患者脳では PS2 遺伝子のエクソン 5 が欠損したスプライシング変種 (PS2V) が発現している。この異常なスプライシングを引き起こす因子を探索したところ、既知の蛋白質 HMG-1 であることを突き止めた。HMG-1 蛋白質は pre-mRNA に結合してスプライシング異常を引き起こしているため、HMG-1 と結合しプレセニリン - 2 遺伝子エクソン 5 への結合を阻害する類似因子を探索すれば、アルツハイマー病治療薬になりうると考えられる。また、血液中での PS2V を測定すれば、アルツハイマー病の早期診断法になりうると考えられる。このコンセプトをベースにして、医薬品メーカーとの共同研究を行っている。

8 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

低酸素ストレスによる神経細胞死を防御するメカニズムは着実に解明されていると言える。当初の目的である虚血性疾患への適用に関してはアデノウイルスを用いた遺伝子導入を試みた段階で今後の課題である。一方孤発性アルツハイマー病を発症させる PS2 のスプライシング変種が起こるメカニズムについては、その原因蛋白質を突き止めるというブレークスルーがあり、治療法の開発に前進したことは高く評価出来る。既に医薬品候補物質を特許化しており、薬品メーカーとの共同研究を行っており、今後の実用化が期待出来る。

8 - 4 - 3 . 総合的評価

非常に活発なグループで精力的な研究がなされて、成果も着実に上がっていることは十分認められる。特に根本的な治療法がなく、社会的な問題になっているアルツハイマー病に対し、明確な機序に基づく治療法を提案出来るところまで来たことは希有な成果と言える。しかし、研究があまりに順調に進展していることに懸念がないわけではない。in vitro study の結果の解釈は慎重を要し、実際の病態での検証も十分に行うことが要望される。基礎固めを十分に行いながら、開発へと進展すれば大きな成果が期待出来る。

9 - 1 . 研究課題名

ウイルス性脳障害の発症機構の解明と治療法の開発

9 - 2 . 研究代表者

研究代表者 長嶋 和郎 北海道大学医学部 教授

9 - 3 . 研究概要

ウイルスによる脳炎・脳症は多くの場合致死的であるが、治療法は確立されていない。本研究は脳炎・脳症を発症させるウイルスの神経親和性のメカニズムを明らかにする。更に神経細胞に特異的に発現するウイルスベクターを用いて、各々のウイルスに特異的な抑制因子を用いた遺伝子治療法を開発し、脳炎・脳症の根本的な治療法の確立を目的とする。

9 - 4 . 中間評価結果

9 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

研究は当初の計画どおり順調に進行しているが、予想外の結果を得ることが多かった。しかし巧みに研究方針を転換して成果に結びつけていることが伺われる。ヒト脳に進行性多巣性白質脳症(PML)を惹起する JC ウイルス (JCV) の受容体が種々の細胞で発現しているが、合成糖鎖結合蛋白質および脂質を用いて検討した結果、シアル酸が受容体本体であること、JCV の神経特異性を規定しているのは核内因子である事が判明した。現在その候補蛋白を単離している。当初は JCV の特異的受容体を明らかにしようとしたものであるが、むしろ核内における転写因子が特異的であることが解りつつある。また意外なことに JCV の agnogene がウイルス合成に必須であることを発見した。これらの事実に基づき現在治療法の無い PML に対して治療法を開発している。

JCV のウイルスベクターの開発では大腸菌で JCV 外郭蛋白 VP1 を発現させることに

成功した。その擬ウイルスは種々の細胞に侵入することも判明した。しかし、JCVの大きさが5.1kbであることから、どこまで有用であるかは不明である。

当初の目的であるウイルス脳炎・脳症全般の治療を目指す方向からは後退した感があるが、JCVの治療に関しては成果が上がり、実用化が期待される。

9 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

当初の予想からは外れたが、予想外のところで重要な発見をしている。JC ウイルスの複製、増殖を押さえるアプローチについては着実に進展しており、臨床への応用が期待できる。特に agnoprotein の抑制による JCV の抑制の試みはユニークであり、この点に焦点を絞ると大きな成果が期待出来よう。

遺伝子治療としてのベクターの開発はユニークであり推進すべきものと思われるが、組み込むことの出来る DNA の大きさに限界があるので応用範囲は限られるであろう。

9 - 4 - 3 . 総合的評価

正攻法で研究した割には、予想が外れることが多く、研究の方向付けに苦慮したと思われる。しかしたゆまぬ努力によって、予想外のところで重要な発見があった。特に agnogene がウイルス合成に必須であることを発見したことにより、臨床への方向付けが得られたことは大きな成果である。チームワークも良く、予算を有効に成果に結びつける努力も伺われた。CREST の制度を有効に使って研究室の activity を飛躍的に高めた典型的なケースと言えるかも知れない。

10 - 1 . 研究課題名

活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構

10 - 2 . 研究代表者

研究代表者 中別府 雄作 九州大学生体防御医学研究所 教授

10 - 3 . 研究概要

脳・神経細胞の生存と機能保持には核ゲノム情報の維持が必須であり、さらに脳機能に必要なエネルギー供給にはミトコンドリア DNA の維持が重要である。本研究では、核やミトコンドリア DNA の酸化障害は神経細胞死を引き起こし、脳の老化や神経変性疾患の原因の1つとなるという仮説に基づき、その分子実態と防御機構を明らかにし、更に障害を受けた脳の機能回復を目指して、神経前駆細胞からの神経細胞供給のメカニズムを探る。

10 - 4 . 中間評価結果

10 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

研究代表者は当初の計画に従い活性酸素によるゲノム損傷の分子実体とその防御機構及び活性酸素ストレス下における神経前駆細胞活性化のメカニズムの研究が進んでいる。活性酸素によるゲノム損傷の分子実体とその防御機構では 8-オキシグアニン(8-oxoG)と 2-ヒドロキシアデニン(2-OH-A)を始めとしてヒト細胞が複数の防御機構を核とミトコンドリアに独立に備えていることを明らかにした。神経前駆細胞活性化のメカニズムでは脳の虚血再還流障害時に発現誘導される AP-1 (Jun / Fos) 複合体のサブユニットである FosB が、神経軸索伸長・再生促進因子 (Galactin-1)

の発現と細胞運命（増殖・分化・死）を制御することを明らかにし、虚血再還流障害を受けたラット海馬歯状回において、Galectin-1 の発現を伴った DNA 複製（BrdU の取り込み）の誘導を見出した。現在、これら活性酸素に対する防御遺伝子の発現異常及びそれに伴う核酸の酸化損傷と変性疾患病態との因果関係の解明に取り組んでいる。そのため、それぞれの遺伝子欠損マウスおよび変性疾患のマウスモデルを確立し、防御遺伝子の欠損およびトランスジーンによる「神経変性の促進と抑制」に注目した解析を準備している。

1 0 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

fosB 遺伝子の機能解析、活性酸素による DNA 損傷機構の研究は着実に進展しており、DNA 中の 8-oxoG の除去修復酵素、OGG1 に関する研究、神経軸索・再生因子 Galectin-1 の同定等独創的な成果が多い。また、DNA 中に存在する複数の酸化塩基の定量的検出法を確立することによって酸化傷害の定量的検出法を可能にした。一方動物モデルによる仮説の実証には多くの困難が伴っている。目的とする神経疾患の動物モデルには確立したものがないため、研究代表者は共同研究を通じて種々トライしていることは評価出来るが、ヒト疾患との相同性には疑問が残る。その中では MPTP 投与によるパーキンソン病モデルは有望であろう。また酸化傷害防御遺伝子の機能異常は神経疾患の直接原因になるとは限らないため、実験動物の遺伝子的バックグラウンドを揃える等実験の精密さが要求される。もっと焦点を絞った方が良い結果が期待できよう。

現在のところ、活性酸素は障害するニューロン特異的と言うよりはむしろ変性を促進する増悪因子としての役割と考えられるので、神経変性疾患に関する研究ではこれらを明らかにし、治療成果に結びつけることが求められる。難しい課題であるが、臨床研究者と共同して着実に成果を挙げることを期待したい。

1 0 - 4 - 3 . 総合的評価

活性酸素によるゲノム損傷の分子実体とその防御機構及び活性酸素ストレス下における神経前駆細胞活性化のメカニズムについては、ほぼ当初の計画どおり成果を挙げている。中でも MTH1、APE2 については世界をリードしている。神経前駆細胞活性化についても他にないユニークな研究を行っている。遺伝子改変マウスによる研究は今後の課題であるが、神経変性疾患患者剖検脳についても成果を挙げている。このチームの独創性、研究推進能力は定評があり、基礎研究のレベルは比較的高いと評価出来るので、今後とも期待出来よう。

1 1 - 1 . 研究課題名

DNA チップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明

1 1 - 2 . 研究代表者

研究代表者 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

研究代表者代理 西野 一三

1 1 - 3 . 研究概要

急展開する先端的 DNA チップ技術の開発構想は、膨大な量の遺伝子発現・変異情報へのアクセスを可能にする革新的技術戦略である。そこで本技術を、疾病研究の新时代方法論と位置づけ、その独自開発を行う。さらに遺伝性筋疾患をモデルとして、応用化研究を推進する。筋の障害機構に關与する多数の未知遺伝子並びに修飾因子の発見と、それらの発現情報のデータベース化によって、筋障害過程に最も重要な細胞のシグナル伝達経路を一挙に解明することが期待される。これは、根拠の基づく医療 (EBM) の実現に不可欠の課題である。

1 1 - 4 . 中間評価結果

1 1 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

遺伝性筋疾患の分子病態を解明するために独自のマイクロアレイ型ヒト筋特異的 DNA チップを開発に着手し、筋疾患の遺伝子解析に必要と考えた 5000 以上のクローンを載せるという当初の目標は達成した。更に試用した結果、信頼性が高く、かつ少量のサンプルで済むため一例ごとの解析も可能になったため、今後疾患との関連を調査するにあたっての前準備は整ったと言えよう。

このツールを用いて、筋疾患における遺伝子発現解析を行うのが今後の課題であり当初ターゲットとして挙げた筋ジストロフィー 3 疾患、すなわち福山型先天性筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー 2A 型 (calpainopathy)、エメリードレフュス型筋ジストロフィーの解析を行う体制が整った。しかし、検体数からも全てを順調に実施していくのは困難が予想され、焦点を絞ることが求められる。

1 1 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

筋疾患の遺伝子解析に必要と考えた 5000 以上のクローンを載せるという当初の目標は達成した。これまでに、5760 クローンを載せたチップを完成させた。チップの作製にあたっては、ハイブリの効率を均一化すること、逆転写の効率の問題による影響を出来る限り排除することに留意した。更に完成した DNA チップを用いた遺伝子発現のモデル実験により、高い再現性 (相関係数 0.984)、広いダイナミックレンジ (10 の 3 乗オーダー)、高い定量性を有することを確認した。さらに、極少量の生検筋検体からの解析が可能であり、世界で初めて、一例ごとの筋生検材料を用いて遺伝子発現解析が可能となった。更に試用した結果、信頼性が高く、かつ少量のサンプルで済むため一例ごとの解析も可能になったため、今後疾患との関連を調査するにあたっての前準備は整ったことは評価できる。

今後何に着眼しどのように解析していくかが、課題である。DNA チップを使えば、膨大なデータが得られることは確実であるが、意味のある情報を得るためには総合的な技術と学術に裏打ちされたセンスが必要である。そういう点からも、期間内にまとまった成果を出すためには余程焦点を見定めた研究が望まれる。

1 1 - 4 - 3 . 今後の研究に向けて

5000 以上のクローンを載せた DNA チップを作製するという目標は達成したので、今後はそれを用いて如何に筋疾患における遺伝子発現解析を行うのが今後の課題である。幸い疾患に精通した研究者を共同研究者に選んであるので、共同研究者との緊密な連携が可能である。当初ターゲットとして挙げた筋ジストロフィー 3 疾患、すなわち福山型先天性筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー 2A 型 (calpainopathy)、エメリードレフュス型筋ジストロフィーの解析にあたっては、

その疾患に造詣の深い共同研究者との協力関係を密にして研究を進めて欲しい。

1 1 - 4 - 4 . 戦略目標に向けての展望

DNA チップは学術的遺伝子解析だけではなく、テーラーメイド治療を行うための診断手段等将来汎用される技術になると考えられる。その DNA チップ作製に正面から取り組み、成功したことは将来に向けた大きな財産になると考えられる。また、過去トライされたことのない、強力なツールを用いた解析によって、現在治療法の全くない筋ジストロフィーに対して、治療法を開発する手がかりをつかむことを期待したい。

1 1 - 4 - 5 . 総合的評価

ヒト骨格筋に特異的な cDNA 5760 クローンを載せたマイクロアレー型 DNA チップを作製した。信頼性も高く、少量の検体での解析が可能のため一例ごとの解析が可能になった。このことは高く評価され、目標の半ばを達成したと言えよう。DNA チップを用いて筋疾患における遺伝子発現解析を行うという次のステップはこれからである。今後の方向性として疾患特異的な遺伝子あるいはその発現パターンを同定することが重要であるが、そこまで到達するのは決して容易ではない。何よりも DNA チップによる発現解析が、筋疾患の病態機序解明のどのような点で有用であるかという点について、深い洞察が求められる。それがないと、単に descriptive な解析に終わるし、筋線維の消失を反映するような二次的な結果を見ってしまう可能性が懸念される。発現プロファイリングによって何を明らかにすると考えているか見通しをきちんと設定する必要がある。

1 2 - 1 . 研究課題名

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

1 2 - 2 . 研究代表者

垣塚 彰 京都大学 生命科学研究科高次生体統御学 教授

1 2 - 3 . 研究概要

マシャド・ジョセフ病やハンチントン舞踏病の原因遺伝子から作り出されるポリグルタミンが神経変性を引き起こすことが判明した。本研究では、ポリグルタミンによる神経変性の分子機構を解明することによって「神経変性とは何か」という問いに答える統一概念をつくること、さらには、神経変性に共通する分子機構に基づいた治療法を開発して神経変性疾患を一網打尽にする新しい方法論を構築することをめざす。

1 2 - 4 . 中間評価結果

1 2 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

ポリグルタミン病をモデルにした実験系を樹立し、これらの疾患モデルを徹底的に解析することにより、一見異なる複数の神経変性疾患に共通する神経細胞変性の基本原理を分子レベルで解明してきた。細胞内には、変性蛋白を感知するセンサー蛋白質が存在するとの仮定のもと、そのような仮想センサー蛋白質の同定を進めたところ VCP 蛋白質が見出された。一方、ポリグルタミンが引き起こす細胞死のシグナル伝達に関わる遺伝子を同定する目的でショウジョウバエの複眼変性を引き起こ

す原因遺伝子として同様に VCP 蛋白質を見出した。この VCP 蛋白質は既知の物質であるが、このような機能を持っていることは解っていなかった。どうやらこの VCP はポリグルタミン病のみならず、パーキンソン病や ALS などの神経変性疾患の発症にも深く関わっているらしいことが解ってきた。今後はこの VCP 蛋白質の機能を深く追求することによって神経変性疾患の概念が大きく変わる可能性があり、治療方法の手がかりが得られることを期待したい。

一條グループでは、神経細胞死に着目して ASK1-MAP キナーゼ経路の研究を行った。また、後藤グループは生存促進機構に着目して、PI3 キナーゼ / Akt 経路、Notch による神経系前駆細胞の生存促進の研究をおこなっており、それぞれに成果を挙げている。

1 2 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

Machado-Joseph 病 (MJD) の原因遺伝子の発見、単離より出発してポリグルタミン病をモデルにした実験系を確立して、MJD 原因遺伝子産物のプロセッシング、異常タンパク蓄積の感知、小胞体ストレス誘導、ポリグルタミン発現による細胞死など多岐にわたり進捗した。特に神経変性疾患の発症に、VCP と呼ばれる ATPase がキー分子である証拠を提出しつつあることが高く評価された。

今後はこの VCP 蛋白質の機能を解析することに主眼がおかれる見通しであり、質量分析が可能になる体制を整えつつある。このチームの解析手法は正攻派でありながら、斬新なアイデアにより新規な知見を得るのに優れているので、今後とも画期的な発見がなされることを期待したい。ただし、モデル動物による検証は慎重に進めていく必要がある。特にマウスを用いた *in vivo* の研究に留意して欲しい。

1 2 - 4 - 3 . 今後の研究に向けて

神経変性疾患の原因を解明するためには、VCP 蛋白質を初めたんぱくの機能を解明することが重要であることが解ってきた。そのため、質量分析計等新たな投資が予定されている。また、重要な役割を担ってきた一條グループが発展して独立したチームになる予定であり、予算、研究体制には見直しが必要である。神経変性疾患の分子病態の研究は、日本が世界をリードしつつある分野であり、このチームが推進する VCP 蛋白質の機能解析によってブレークスルーが期待できるので、重点テーマとして推進していく必要があると考えられる。

1 2 - 4 - 4 . 戦略目標に向けての展望

研究チームが目指してきた「「ポリグルタミンによる神経変性の分子機構を解明することによって「神経変性とは何か」という問いに答える統一概念をつくること」に対しては VCP 蛋白の機能発見によって回答が得られつつある。もうひとつの「神経変性に共通する分子機構に基づいた治療法を開発する。」」ことにも手がかりが得られたと言っても良く、今後の発展が期待される。

1 2 - 4 - 5 . 総合的評価

ポリグルタミンと共存する蛋白が VCP (AAA family の ATPase) であることを見出し、さらにそれがポリグルタミン病以外の神経変性疾患にもみられること、その ATPase 活性の低下が細胞死を引き起こすことを見出した。これらの研究は極めて独創性に富み、神経変性疾患の病態解明と治療法の開発につながる重要な研究である。研究グループの構成も適切で、研究は極めて順調に進んでいると考えられる。その

他 ER ストレスとの関連、ミトコンドリア異常による酸化ストレスとの関連、動物モデルによる検証等残された課題も多いが、若い研究グループの頑張りに期待したい。

1 3 - 1 . 研究課題名

プリオン複製に關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

1 3 - 2 . 研究代表者

金子 清俊 国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第七部 部長

1 3 - 3 . 研究概要

正常型から異常感染型プリオンへの構造変換に重要な役割を果たしている新しい因子を同定し、現在深刻な社会問題化している乾燥硬膜移植後や狂牛病に代表されるプリオン病の治療法開発は、他の様々なコンフォメーション病の治療の先駆的モデルとしても重要である。さらに、新方法論の開発により、生化学並びに病理組織学分野における蛋白研究の飛躍的な発展が期待される。

1 3 - 4 . 中間評価結果

1 3 - 4 - 1 . 研究の進捗状況と今後の見込み

プリオン病は日本でも極めて注目されている新しい核酸を介さないプリオン蛋白に起因する感染性の神経疾患であるが、プリオン蛋白の生理機能には未知の点が多く、プリオン病治療法は未だにない。本研究ではプリオン蛋白の生理機能の解明、プリオン病治療法の開発、の 2 課題に対して研究を進めている。当初具体的目的としたプロテイン X の分離同定、プリオン分解酵素の分離同定、防御型プリオンによる治療法の開発に精力的に取り組んでいる。当初想定された方向で順調に伸展しているので、確実な成果が期待出来る。

1 3 - 4 - 2 . 研究成果の現状と今後の見込み

当初の目標に向けた研究が着実に行われており、その過程で重要な発見がなされている。正常型プリオンを異常感染型プリオンに高次構造変化をおこすシャペロン様分子を同定するアッセイ系 (prion unfolding assay) を確立してプロテイン X の探索に役立てていること、プリオン蛋白に蛍光分子を融合してプリオン蛋白質の細胞内輸送過程や分解過程の可視化に成功したこと、防御型プリオン蛋白の大腸菌での発現精製に成功していることなどは独創的かつ画期的なことと言える。しかし、これらの成果はややトピックス的な成果のようでもあり、目標に向けての確実な成果とまでは言えない。投稿論文がほとんど見あたらないことも気になるところである。もともとこのチームは日本では数少ないプリオン蛋白の研究チームであり、独創性にも優れているので、研究体制がしっかりしていれば、確実な成果が期待出来るよう。

1 3 - 4 - 3 . 今後の研究に向けて

明らかにせねばならない研究目標がすっきりとしており、この目標に添った前段階の成果も、PrPc の unfolding の研究や防御型プリオン分子の研究などで着実に出ていと評価される。協同研究グループの西島グループはラフト上での PrPc の PrPsc への変換、木村グループはヒトプリオン蛋白 219 番アミノ酸多型の検討と、金

子グループと密接に関連したテーマを追究しており連携関係は良い。今後の研究に向けた課題としては感染の研究設備をどう整えるのかという問題がある。また、金子グループでは研究員の出入りが頻繁なために、継続した研究という点では問題があった。現在多くの研究課題を抱えていることを考えると、研究員の絶対数が不足しているように見える。これらの問題を克服することが必要であろう。

13-4-4. 戦略目標に向けての展望

日本にも硬膜移植による医原性のプリオン病の存在が確認され、この研究の重要性が脚光を浴びることになった。その治療や予防は極めて重要、かつ緊急性の高いものでプリオン複製に関与する新しい因子の同定とその臨床応用には大きな期待がもたれている。性急な対応に流されることなく、当初目標とした研究を着実に発展させ、最終目的となる治療法開発に直接つながる成果が期待される。

13-4-5.

総合的評価本研究は neuroscience として重要であるのみでなく社会的、経済的にも重要課題である。研究者らは 1)Prion の分解酵素、2)Protein X の解明、3)予防、治療法の開発を目標として並行して研究が進行中である様に思われる。正常型プリオンと異常感染型プリオン蛋白の機能に注目し、その細胞内輸送過程や分解過程の可視化に成功するなど、ある程度注目すべき成果が得られた。しかし、このテーマの複雑さを考えるとまだブレイクスルーまでは達していないという見方と、この仕事は大きく発展する見込みがあるので、大いに期待したいという見方に分かれた。期待の大きさに応えられるかどうかはこれからのチームの頑張りにかかっていると言える。

研究課題別事後評価結果

1 - 1 . 研究課題名

遅発性神経細胞死の分子機構

1 - 2 . 研究代表者名及び主たる研究参加者名

(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者	桐野 高明	東京大学大学院医学系研究科	教授
主たる研究参加者	浅井 昭夫	東京大学大学院医学系研究科	講師
	口野 嘉幸	昭和大学薬学部	客員研究員
	濱田 洋文	札幌医科大学分子医学研究部門	教授
	森川 栄治	埼玉医科大学総合医療センター	脳神経外科 教授
	渡邊 卓	杏林大学臨床病理学教室	教授

1 - 3 . 研究内容及び成果

遅発性神経細胞死 (delayed neuronal death) とは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り、その過程にはきわめて興味深い特徴がある。短時間の虚血 (齧歯類を用いた実験モデルでは 3-10 分) の後、神経細胞はほぼ完全に元の状態に回復する。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する。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 時間後までは認めない。神経細胞は正常の膜電位を保持して電気的な活動も示す。ストレス蛋白 (hsp70, ubiquitin) などの mRNA の発現も認める。しかし mRNA から蛋白への翻訳は強く抑制される。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。海馬 CA1 領域の神経細胞がきわめて緩やかに、かつ再現性高く細胞死に陥るので、虚血性神経細胞死の代表的なモデル系の一つとして、世界的にこの現象を対象とする研究がなされてきている。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る。その上流では神経細胞特有の機構による細胞死の決定機構が働き、その間は神経細胞は可逆性で治療可能であり、最終的にアポトーシス共通の経路に達すると不可逆的に進行すると考えられる。アポトーシスの上流での神経細胞特有の分子機構、特に calcineurin および proteasome による細胞死制御の分子機構を解明し、治療可能域を同定することが研究のねらいである。

I . 桐野チーム

- 1 . 神経細胞において calcineurin を高レベル発現させると種々の刺激に対して vulnerability が増大し、通常アポトーシスをおこさないような刺激によっても容易にアポトーシスをおこすようになることを見出した。また、calcineurin 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ることが明らかになった。また、これらは FK506 および cyclosporin A などの calcineurin 阻害剤で抑制されることも明らかになった。また、in vivo においても海馬遅発性神経細胞死が FK506 によって抑制されることを明らかにし

た。

2. 神経細胞において proteasome 阻害剤を用いて proteasome 機能を阻害するとミトコンドリア・カスパーゼ依存性のアポトーシスが誘導されることを明らかにした。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 free ubiquitin が減少し conjugated ubiquitin が蓄積することを見出した。さらに、一過性前脳虚血後、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を明らかにした。また、これが分子レベルで 20S から 26S への再会合の障害によるものであることを明らかにした。
3. 神経細胞において calcineurin を高発現させて誘導される神経細胞死に p53 のリン酸化が必須であることを明らかにした。
4. マウス総頸動脈および脳底動脈を 14 分間遮断することにより遅発性神経細胞死を効率よく再現することに成功した。
5. 神経細胞における proteasome 機能阻害によるアポトーシスにおいて p53 が必須であることを明らかにした。また、p53 ノックアウトマウスでは p53 野生型マウスに比して一過性全脳虚血後の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。

II . 口野グループ

c-Myc により小胞体ストレスによるアポトーシスが 5~10 倍増強され、そのためには c-Myc の N 末および C 末領域に存在する機能ドメインが必須であることを見出した。また、その機序が c-Myc による Bax の活性化増強であることを明らかにした。また、神経芽腫で認められる腫瘍の自然消退現象が、H-ras / PI3K を介した non-apoptotic なプログラム細胞死によるものであることを明らかにした。

. 森川グループ

グルタミン酸レセプタータイプシロン 1 のノックアウトマウスでは野生型あるいはグルタミン酸レセプタータイプシロン 2 のノックアウトに比して有意に局所脳虚血による梗塞巣が縮小することを示し、虚血による神経細胞死にグルタミン酸レセプタータイプシロン 1 が関与していることを明らかにした。また、永久局所脳虚血による梗塞巣は虚血後 7 日目まで徐々に拡大するが、この拡大に S-100 タンパク質が関与しており、S-100 の阻害剤によって梗塞巣が有意に縮小することを明らかにした。

. 渡邊グループ

胎児網膜神経細胞の発生過程に糖担体輸送分子 isoform である GLUT1~3 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

・濱田グループ

アデノウイルスベクターを用いて種々の細胞への遺伝子導入を試みたところ、in vitroでは神経細胞も含めて、様々な細胞で高い遺伝子導入効率が観察できた。しかし、in vivoでは脳への遺伝子導入効率はあまり高くなかった。また、Protein transduction domains (PTD) 融合タンパク質として TAT、VP22 を使用した融合タンパク質とタンパク質導入試薬 BioPorter™、Chariot™ を用いて、培養細胞へのタンパク質導入効果を検討した。TAT 融合タンパク質の導入効率は悪く、VP22 融合タンパク質は導入効率がよかった。BioPorter™、Chariot™ は導入効率良好であった。

1 - 4 . 事後評価結果

1 - 4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

遅発性神経細胞死の発見は研究代表者の独創的な大きい発見であった。その細胞死の分子機構を解明するため、多面的なアプローチを行い、海馬 CA1 領域に多いカルシニューリンが、虚血後プロテアソーム機能低下に関係し、p53 の蓄積を起こし、ミトコンドリアのカパーゼ 3 を介するアポトーシスを起こす機序が明らかにされた。しかし、治療に結びつくような成果にまでは至らなかった。その方向とは別に別のグループとの共同研究により、海馬 CA1 領域における神経前駆細胞から、神経細胞の再生が見られることを見出し、その成果は Cell に掲載された。この方向による研究の方が治療法の開発に結びつくものと期待され、引き続き発展推進事業で継続されることになった。一方マウスにおける遅発性神経細胞死のマウスモデルを開発した意義は大きく、今後の治療開発に貢献するものと思われる。論文発表は海外誌に 65 報掲載された。そのうち、前述の Cell の論文はインパクトが大きかった。その他遅発性細胞死の分子機序に関する論文が数件ある。特許についてはマウスモデルの出願等が期待されたが、期間中に出願までには至らなかったのは残念である。口頭発表は国内 59 件、海外 7 件発表された。

1 - 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

当初は遅発性神経細胞死の分子機序を早期に発見し、治療法の開発に進展することが期待された。しかしアポトーシスに至る経路は複雑であり、全体を統一的に解明するまでには至らなかった。遅発性神経細胞死のマウスモデルを開発した意義は大きく、今後の治療開発に貢献するものと思われる。また、研究の後期に至り、思いがけぬ所から神経前駆細胞による神経細胞の再生を見出したことは実用的に重要であり、この研究テーマに曙光を見出した感がある。

1 - 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

研究課題が採択された後に、研究代表者が医学部長に就任した。また、研究推進の中心になって活躍された浅井講師は埼玉医科大学の教授に就任した。

2 - 1 . 研究課題名

精神分裂病における神経伝達の異常

2 - 2 . 研究代表者名及び主たる研究参加者名

(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者	須原 哲也	放射線医学総合研究所 特別上席研究員
主たる研究参加者	大久保 善朗	東京医科歯科大学大学院教授
	原田 平輝志	放射線医学総合研究所 主任研究員
	前田 稔	九州大学大学院薬学研究科 教授

2 - 3 . 研究内容及び成果

統合失調症(精神分裂病)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古くは次第に慢性化、荒廃化すると考えられてきた。しかし抗精神病薬、特に近年の非定型抗精神病薬の開発によって多くの統合失調症患者の社会への復帰が可能になってきているが、その一方で疾患の病態生理は未だに不明な点が多く、薬物の開発や臨床利用も経験的な方法によるところが多いのが現状である。本プロジェクトでは非侵襲的画像解析を用いて、統合失調症の神経伝達機能の異常に関し、主にポジトロン CT(PET)を用いて検討し、さらに抗精神病薬による脳内受容体の占有率測定や、新しいポジトロン標識リガンドの開発・評価を行った。特に統合失調症では脳内のドーパミン神経伝達の異常が予想されていることから、脳内のドーパミン神経伝達に関わる受容体や、ドーパミン神経伝達を修飾する神経系の測定に向けた取り組みを行った。

脳内ドーパミン D2 受容体は線条体に高密度に分布しており、これまでのドーパミン D2 受容体研究は線条体を中心に行われてきた。高親和性リガンド FLB 457 を ^{11}C で高比放射能標識を行うことによって線条体外ドーパミン D2 受容体の定量評価を行ったところ線条体に比し著しく低値であった。これらの値が正常の加齢でどのように変化するかを検討したところ、大脳皮質領域で 10 年で約 10% 低下することが分かった。一方人格の形成にドーパミン神経伝達関わっている可能性が示唆されていることから、線条体外ドーパミン D2 受容体と人格指標の一つである新奇性追求の関連について検討を行い、右島部においてドーパミン D2 受容体結合能と新奇性尺度の間で強い相関を見出している。

統合失調症では抗精神病薬未服用の患者と正常被検者の比較を行うことができた。ドーパミン D2 受容体は予想に反して前部帯状回において統合失調症群で有意な低値が認められ、陽性症状と負の相関が認められた。ドーパミン D2 受容体結合の低下は介在神経のドーパミン神経系に対する抑制的調節機能の障害を反映するものと解釈される。視床を分割して評価したところ主に背内側核と視床枕を含む領域で統合失調症において有意な低値が認められた。他の神経伝達物質受容体に関しては、セロトニン 2A(5-HT_{2A}) 受容体とセロトニン 1A(5-HT_{1A}) 受容体の測定を行った。5-HT_{1A} 受容体は扁桃体で有意に低く不安 / 抑うつ症状とに相関が認められた。一方統合失調症の脳に形態変化が伴うとの報告は多いが、小脳虫部が有意に小さいこと、さらに側脳室の大きさで測定した経時変化で、統合失調症においては正常対照群に比較して経時的な拡大率が有意に大きいことを明らかにした。このことは今後経時的な機能変化を追っていくことの重要性を示唆している。

統合失調症の治療に関連して、大脳皮質領域における抗精神病薬によるドーパミン D2 受容体の用量と占有率との関係を明らかにした。サルを用いて高用量のクロザピンによるドーパミン D2 受容体の占有率とその時間変化を測定したところ、占有率は時間と共に急速に低下することを明らかにした。このように占有率の時間変化は抗精神病薬治療において重要な指標であり、薬物の特性を考慮した治療計画を立てる上で、先に述べたシミュレーションの関係式は臨床的に極めて有用な指標を提供できるものと予想される。

PETを用いた研究においては *in vivo* で有効なリガンドの有無が、測定範囲を決定する。また *in vivo* の条件下では、内在性伝達物質の影響を受けるか受けまいかなど、リガンドによって *in vitro* の条件とは異なる特性を検証する必要がある。^[11C]FLB 457、^[11C]WAY 100635 等開発したリガンドの評価を行った。しかし *in vitro* 結合と *in vivo* 結合での乖離が見られ、有意義なデータは得られなかった。例外として、グリシン結合部位に選択的な^[11C]L-703,717 が小脳の NR2C / NR1 サブユニットに *in vivo* 条件下でのみ選択的に結合することを発見し、その脳移行性を改善したプロドラッグ体である Acetyl-^[11C]L-703,717 を臨床利用可能な PET トレーサとして開発した。NMDA 受容体のリガンドに見られた *in vitro* 結合と *in vivo* 結合の乖離は、生体中での NMDA 受容体の複雑な活性調節機構を反映した結果であると推察された。従ってこの乖離の原因を明らかにすることが NMDA 受容体の機能解明につながるると同時に、今まで困難であったグルタミン酸受容体の PET リガンドの効率的な開発を可能にするものと考えられる。

2 - 4 . 事後評価結果

2 - 4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

PETを用いて統合失調症における脳内ドーパミン受容体に着目した研究は日本では殆ど行われていない。その困難な課題に挑戦した意義は高く評価された。研究論文は海外 70 件、国内 28 件掲載された。口頭発表は国内 98 件、海外 49 件であった。これらは着実な成果と言えよう。研究の過程で統合失調症患者ではドーパミン D2 受容体は予想に反して前部帯状回において有意な低値が認められ、陽性症状と負の相関が認められたこと、NMDA レセプターリガンドが小脳に集積する興味ある結果を見出した。しかし臨床応用には至らなかった。研究の推進はリガンド開発にかかっていたが、やはりリガンド開発は困難が多く特許出願も 1 件にとどまった。スエーデンやアメリカの強大なグループに対抗するにはもっと広いグループの結集が求められる。

2 - 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

脳内ドーパミン受容体結合能の研究、薬物の占有率の検討、新たなリガンド開発など重要な課題で比較的質の高い成果を上げている。しかし、対象疾患患者数の低さ、実用的なリガンドの開発といった点でまだまだ問題が残った。これらの問題は研究対象の困難性から来るものと思われる。本グループとしては高い成果を上げたと評して良いと思われる。日本にとっては数少ない貴重な研究グループなので、幅広いグループを結集して薬剤の開発に進んで欲しい。

2 - 4 - 3 . その他の特記事項 (受賞歴など)

この研究課題を遂行可能になったのは、高価な PET 機器の使用が可能になったこと、有機合成チームの結集が出来たこと、放射性物質の取り扱いが可能だったことが挙げられよう。その意味で CREST による支援、放射性医学総合研究所の貢献は大きかったと言えよう。

3 - 1 . 研究課題名

Ca チャネル遺伝子の変異と神経疾患

3 - 2 . 研究代表者名及び主たる研究参加者名

(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者	田邊 勉	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科	教授
主たる研究参加者	村越 隆之	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科	助教授
	水澤 英洋	東京医科歯科大学医学部脳神経機能病態学	教授

3 - 3 . 研究内容及び成果

脳組織においては多種多様な神経細胞がそれぞれ連絡し複雑で絶妙なネットワークを形成しているが、個々の神経細胞の種類によって、発現している Ca チャネルのタイプ、発現量は著しく異なる。神経組織に特異的に発現する Ca チャネル 1 サブユニットとしてこれまでに 1A, 1B, 1E の 3 種類の遺伝子が明らかにされている。これらのサブユニットはそれぞれ P/Q 型、N 型、R 型 Ca チャネルをコードしている。Ca チャネルは神経細胞間の情報伝達そして、神経細胞と標的器官 (筋肉、感覚器等) との情報伝達に必須の要素として機能している。一方、電位依存性 Ca チャネルを通して流入する Ca は個体発生に伴って構築される神経ネットワークの形成にも関与しているが、ある特定の Ca チャネルが特異的にこの機能を担っているのかどうかは不明である。本研究は

(I) 個々の Ca チャネルの生理機能とその特性を明らかにし、複数種のチャンネルが一つの神経細胞に共存していることの生理的意義を明らかにする

(II) 遺伝子変異と疾患との関係を、変異 1A チャネルの発現制御、電流特性、活性制御などの側面から明らかにする

(III) 以上の解析結果から得られた情報を基盤にして疾患モデルマウスを製作する

の項目からなり、これらを有機的に繋げることにより 1A チャネル遺伝子疾患の治療法を模索しようとするものである。本研究成果は ' イオンチャンネル疾患 ' 全般の原因究明と治療法開発に格好のモデルを提供することになると期待される。

実施・研究成果

・ 遺伝子ノックアウトマウスを用いた Ca チャネルの生理機能とその特性の解明 (1 . 遺伝子変異マウス解析グループ、2 . 変異導入チャンネル解析グループ) 。

これまで、クローン化した脳 Ca チャネルの構造機能連関の研究は、変異導入遺伝

子をそれが本来発現している環境において発現させ構造機能連関の解析を行うことが必須である。種々の脳 Ca チャネル遺伝子をノックアウトしたマウスはこれまで不明瞭であった種々の神経機能に及ぼす個々のチャネルの関与の特異性及び貢献度の解明さらにはチャネル変異に基づく病態の解明と治療法の開発に役立つことが期待される。種々の神経特異的 Ca チャネル遺伝子変異マウスの解析から、外部からの侵害性刺激や体内の病変に対する生体防御機構として働き、生命維持に重要な警告反応である急性の生理的な侵害受容性疼痛には P/Q 型チャネルが、そして病的な疼痛であり、治療を必要とする慢性の侵害受容性疼痛には N 型および R 型チャネルが、さらに神経因性疼痛には N 型チャネルが重要な働きをしていることが明らかになり種々難治性疼痛に対する特異的治療薬の開発に繋がる成果が得られた。このように痛覚伝達一つをとっても個々の Ca チャネルは、ある種の痛み伝達においては特異的に、別の種類の痛み伝達においては共同的に働いていることが明らかになり、これらチャネルの機能的差をうまく利用することにより神経細胞の Ca ホメオスタシスを正常状態に維持できる可能性が示唆された。一方 N 型チャネルと R 型チャネルノックアウトマウスは情動に関与する行動学的解析においてまったく反対の性質（恐怖心欠落傾向 VS 怖がり傾向）を示した。両チャネルの脳内における分布は非常にオーバーラップしており、今後これらチャネル欠損による情動異常の分子的基盤の解明に興味を持たれる。

II. P/Q 型チャネル遺伝子変異と脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)の病態との関係の解析(1. 遺伝子変異マウス解析グループ、2. 変異導入チャネル解析グループ、3. 疾患遺伝子解析グループ)。

1. 我が国における常染色体性優性遺伝性の純粋小脳失調症の家系を対象として連鎖解析を行い、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。
2. SCA6 の原因遺伝子産物である P/Q 型チャネルにはスプライシングの差によってポリグルタミン(ポリ Q)領域を持つものと持たないものの 2 グループが存在するが、ポリ Q 領域を持つ P 型チャネルが、SCA6 において特異的に変性脱落する小脳プルキンエ細胞において、高濃度に発現していることを明らかにした。
3. SCA6 の患者プルキンエ細胞の細胞質内に P 型チャネルの aggregate を見出した。これらの封入体はユビキチン化されておらず、他の多くの CAG リピート病において見出されている封入体とは性質を異にするものであることが明らかとなった。一方、長い異常ポリ Q 鎖のみを認識する抗体 1C2 を用いて解析すると、多くのプルキンエ細胞の細胞質内に顆粒状の小封入体の多発が見いだされた。核内にも存在する可能性があり、原因遺伝子産物からなる封入体が細胞質のみに認められるのと異なった分布を示した。これにより組織切片のみでも SCA6 の確定診断が可能になった。
4. 患者由来 P 型および Q 型スプライスバリエントチャネルを作製しその電気生

理学的特性を解析したところ、ポリ Q 伸長に伴い P 型チャ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。臨床的に SCA6 は純粋小脳失調を特徴とし、病理学的には P 型チャネルが主に発現しているブルキンエ細胞が大きく消失するのに対し、P 型、Q 型チャネルが共に発現している小脳顆粒細胞が比較的保たれている特徴がある。したがってこれらチャ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。

5. SCA6 変異を導入した P 型チャネルを stable に発現させた培養細胞系を作製した。正常な培養環境では導入細胞は異常を示さないものの、ストレス下においては正常な遺伝子を入れた対照に比べアポトーシスによる細胞死 (カスパーゼ依存性) をきたしやすくなることを見出した。
6. SCA6 患者の臨床症候の分析にて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を明らかにした。さらに、遺伝子解析と神経病理学的解析により SCA6 の CAG リピートはきわめて安定で somatic mosaicism はないこと、CAG 数 20 は明瞭に疾患レンジであることを明らかにした。

III . モデルマウスの作製 (1 . 遺伝子変異マウス解析グループ、 4 . 遺伝子変異マウス作製グループ)

SCA6 においては、原因遺伝子が Ca チャネルであるということから、P/Q 型チャネル遺伝子座の native プロモーターの下流にヒト疾患 Ca チャネル遺伝子をシングルコピー導入できるターゲットベクターを構築した。そしてこれを ES 細胞に導入し相同遺伝子組換えがおきた変異 ES 細胞クローンの単離に成功した。続いて疾患 P 型チャネル遺伝子を含む組み換え用ベクターを構築し、これを上記 ES 細胞に導入し SCA6 変異を有するヒト型 P 型チャネルを有する変異 ES 細胞クローンの単離に成功した。そしてこの ES 細胞からジャームライントランスミッションしたマウス (ノックインマウス) の取得に成功した。一方、本チャネル遺伝子の他の変異が、SCA6 同様難治性疾患である EA2 および FHM の原因遺伝子としても同定されている。単一イオンチャネル遺伝子内部の種々の変異がこのように多彩な神経疾患とそれぞれ独立にリンクしているということは驚きであるとともに大きなチャンスでもある。すなわちこれら疾患を包括的に考えることにより、個々の疾患症状の原因究明、治療法開発が加速度的に早まることが期待される。同様の手法で EA2 モデルマウス、FHM モデルマウスの作製を試み両方ともに完成した。ヒトにおいて EA2 は比較的若年から、FHM はそれに遅れてそして、SCA6 はかなり高齢になってから発症するというような時間経過を経るが個々の患者によって非常にばらつきが大きく、何かほかに発症を誘引するような因子の存在を強く示唆させる。モデル動物においては発症前段階から老齢に至るまで詳しく解析が可能であり、モデル動物にさまざまな “ 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であり、疾患遺伝子変異を有するヒトにおいてはこれら避けるような予防法の開発につながるも知れな

い。

3 - 4 . 事後評価結果

3 - 4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表は海外に 44 件、国内 50 件掲載された。口頭発表は国内 78 件、海外 25 件であった。当初の目的通り Ca チャネルとしての機能が明かなポリグルタミン病の一種である SCA6 を中心として Ca チャネル異常と疾患、症状との関連を明らかにする方向で研究が進んでおり、1ACa チャネル遺伝子との関連はかなり明らかになった。特にポリ Q 領域を持つ P 型チャネルが、SCA6 において特異的に変性脱落する小脳プルキンエ細胞において、高濃度に発現していることを明らかにし、そこが細胞死の場であることを示したことは大きな成果である。Ca チャネルの種々のタイプが痛みや情動異常に働いていることの発見は、予期しなかった臨床的に重要な新知見であるが、メカニズムの解明は今後の問題である。鎮痛薬の開発手法を提供する特許を 2 件出願した。当初の目的に沿ってノックアウトマウス、モデルマウスの作製に取り組み予定通り完成したが、解析の時間が十分に取れなかったのが残念である。従って、Ca チャネルの変異で、何故 SCA6, EA2, FHM の多彩な表現型を示すのか？ SCA6 で何故プルキンエ細胞が特異的に細胞死をおこすのか？等多くの疑問が解明されずに残ることになった。今後の研究に期待したい。

3 - 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本来の目標に沿って Ca チャネルの生理的機構の多くを解析し、遺伝子変異と疾患との関連を示唆する幾つかの知見が得られたが、全体像が解明され治療法に結びつくまでには至らなかった。ノックアウトマウスやモデルマウスも予定通り作製することが出来、大きな成果と言えるが、研究期間内には十分解析するまで至らなかった。一方 Ca チャネルが疼痛に係わっていることを発見し、鎮痛薬の開発に大きな示唆が得られたのは予期しなかった成果であり、実用化の面では期待出来るであろう。

3 - 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

なし

4 - 1 . 研究課題名

脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析

4 - 2 . 研究代表者名及び主たる研究参加者名

(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者	辻本 賀英	大阪大学大学院医学系研究科	教授
主たる研究参加者	恵口 豊	大阪大学大学院医学系研究科	助教授
	清水 重臣	大阪大学大学院医学系研究科	助教授

4 - 3 . 研究内容及び成果

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、その原因遺伝子として smn (survival motor neuron) が同定されている。研究課題発足以前に Smn たんぱくが

Bcl-2(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)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る。このCREST研究はこの成果を基礎としており、これら遺伝子産物の解析を通しSMAの発症メカニズムを解明するとともに、神経変性疾患の治療応用への可能性をさぐることを目的とした。

本研究では、上記の目的達成のため、特に以下の2つのspecific aimsを設定し、研究を遂行した。

(1) SmnによるBcl-2機能増強の生化学的基盤の解明

(2) Bcl-2およびそのファミリー因子によるアポトーシス制御の生化学的基盤の解明

である。

SmnによるBcl-2機能増強の分子機構を明らかにするために、種々の欠失変異遺伝子を作成し、それらを用いてBcl-2/Smnの結合に必要な領域の割り出しを行った。その結果、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(多くの疾患変異が見出されている)が相互作用に必須であることを明らかにした。BH4ドメインは以下に述べるようにBcl-2機能の重要なパーツであり、疾患治療薬の開発の観点からも興味深い機能ドメインである。また、免疫染色によりBcl-2遺伝子発現が生後、運動神経において特異的に低下することを見出し、それがSMAにおける運動神経細胞の特異的脱落のメカニズムであることを示唆した。

Bcl-2およびそのファミリーメンバー(細胞死抑制機能を有するものと促進機能を有するメンバーからなる)は、ミトコンドリア膜上で機能し、ミトコンドリア外膜の透過性を調節することで細胞死を制御していることを示した。アポトーシスシグナルが発生するとシグナルは最終的にミトコンドリアに集約され、ミトコンドリア外膜の透過性が増大し、外膜/内膜間隙に存在するたんぱくが細胞質に漏出する。この中に複数のアポトーシスシグナル伝達物質(たとえばシトクロムc)が含まれており、これらが細胞質で下流の破壊的なプログラム、たとえばカスパー(アポトーシス特異的なたんぱく分解酵素)の活性化を誘起する。細胞死抑制メンバーであるBcl-2やBcl-xLと促進メンバーであるBaxやBakの機能ターゲットの一つとしてミトコンドリア外膜のチャネルであるVDAC(voltage-dependent anion channel)を同定し、生化学的手法および電気生理学的手法により、Bcl-2/Bcl-xLはチャネルを閉孔し、一方、Bax/Bakはチャネルの構造変化を誘導し、たんぱく通過孔を形成させることを示した。さらに、酵母を用いた遺伝学的な解析、および特異的な抗体を用いた細胞生物学的手法により、VDAC活性が哺乳動物細胞のアポトーシスに必須であることの実証を得た。

VDAC抑制を指標にして、Bcl-2機能の最小ドメインがBH4領域にあることを示し、このドメインのみで細胞死を抑制しうることを示した。またtetraocarcin A(微生物代謝物)はVDACをターゲットとしてBcl-2機能を抑制することを明らかにした。こ

これらの結果は、「Bcl-2 ファミリーたんぱくはVDAC制御を介して細胞死調節を行う」という研究者らのモデルを強くサポートするものである。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発揮することを示し、疾患治療のための薬剤の開発に対する重要な方向性を示した。

Bcl-2 および Bcl-xL の結合パートナーとして、多くの細胞で発現する小胞体たんぱくの一つである Reticulon-xS (Reticulon-x の一つのスプライシングバリエーション) を同定した。このたんぱくは、結合依存的に Bcl-2 および Bcl-xL の機能を抑制することを見出した。さらに、RTN-xS は数種類のカスパー (caspase-8, -9 と -12) に結合すること、さらに興味深いことに小胞体ストレス特異的にダイマー形成を行うこと、RTN-xS のダイマー形成の誘導によりアポトーシスを誘導することなどを明らかにした。これらの結果は、RTN-xS が、種々の神経変性疾患に関わることが示唆されている小胞体ストレス誘導性細胞死のシグナル伝達因子 (caspase 活性化のためのアダプター分子) の候補であることを示唆している。

当 CREST 研究の主目的のサポートとして、幾つかの異なった観点から細胞死 (アポトーシスならびにネクローシス) の分子機構の解析を行ってきたが、以下のような成果を得た。

アポトーシスの実行過程の解析のために、独自の *in vitro* アッセイ系を確立し、アポトーシスに特徴的でありその定義の一つになっている核クロマチン凝縮に関わる新規の因子 (Acinus と命名) を単離同定した。この分子のアポトーシスにおける関与を解析するため、Acinus 結合たんぱくを探索し、幾つかの分子を同定した。これらの中に RNA プロセッシングに関わる因子が含まれている。また Acinus の正常機能を明らかにする目的で Acinus 欠損マウスの作成を行い、Acinus 欠損マウスは胚発生遅延を呈し (E7.5)、致死となることを見出した。より詳細な解析のためコンディショナルノックアウトマウスの系統も作成した。

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明らかにする目的で、低酸素・低グルコース誘導性の細胞死の解析を行った。この細胞死はアポトーシスをドライブするカスパーに依存しない系であることを示し、その解析の糸口として顕著にまた再現性良く現れる核の収縮を取り上げ、核収縮に必須の因子の探索を行った。permeabilized 細胞を用いた *in vitro* アッセイ系を確立し、核収縮誘導因子の精製を行い phospholipase A2 (PLA2) 活性を持つ新規分子を同定した。siRNA を用いた機能的ノックアウト法を利用することにより、特に 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。

アポトーシスの特徴の一つであるアクティブブレブリングの生理的意義とその分子メカニズムの解明を目指し、ブレブリングに関わる因子の単離同定を試みた。この目的のために、まず、アクティブブレブリングという動的なイベントを再現できる *in vitro* アッセイ系を確立する必要があると考え、種々の permeabilized 細胞法を検

討し、細胞抽出液によりアクティブレピングを誘導できる invitro 系の確立に成功した。

ここで得られた成果は、細胞死プロセスの幾つかの重要なステップの解明につながるものであり、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理解に有用であると同時に、疾患治療という観点からも重要な情報を提供している。

4 - 4 . 事後評価結果

4 - 4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表は海外で 62 件掲載された。特に nature に 2 報掲載されたことは注目すべき事である。1 報はアポトーシスがミトコンドリア膜の VDAC の開閉によりシトクロム c の放出をコントロールすることによって行われるという、全く新しい概念を発表したものである。この VDAC の開閉はこのチームが発見した Bcl-2 ファミリーによってコントロールされることを示し、これらの因子の分子機能的な意義をより強力なものにした。もう 1 報はアポトーシスの特徴(定義)の一つである核クロマチン凝集が起こるメカニズムを解明する中で Acinus という新規因子を発見したものである。いずれも画期的な発見としてインパクトの高い発表であった。このチームの特徴として得られた成果に満足せず、次々とステップアップする姿勢が強いことであろう。Bcl-2 のアポトーシス抑制機能が BH4 ドメインにあり、そこに SMN との結合点があることを見出した。アポトーシスに関連して 3 件の重要な出願を行い、うち 1 件は外国出願された。

4 - 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

極めて信頼性の高い研究を次々に発表した。Bcl-2 及びそのファミリー因子によるアポトーシス制御の機構をかなりの程度明らかにした成果は大きい。また、Snn との相互作用も明らかにした。本研究では Acinus の同定や新規の核収縮誘導因子の同定など、今後の研究発展に寄与すると思われる副産物も得られており、高い評価が与えられた。また、アポトーシスのメカニズムを解明していく中で、Bcl-2 の作用点が明らかになり、それに特殊な蛋白を付与することによって薬剤となりうることを動物モデルで示した。更に研究を進めることによって現在治療法のない SMA の治療薬だけでなく、アポトーシス関連の治療薬(例えばがんの治療薬)の開発が期待される。

4 - 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

研究代表者は 1999 年 CREST の成果を含めた「細胞死抑制遺伝子 bcl-2 の発見と細胞死の分子機構の解析」によって第 17 回大阪科学賞を受賞した。

5 - 1 . 研究課題名

神経細胞における増殖制御機構の解明

5 - 2 . 研究代表者名及び主たる研究参加者名

(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者 中山 敬一 九州大学生体防御医学研究所 教授
主たる研究参加者 北川 雅敏 浜松医科大学医学部 教授

5 - 3 . 研究内容及び成果

日本人の3大死因は、癌・心虚血性疾患・脳血管障害であるが、これらは全て細胞増殖の問題として捉えることができる。癌は細胞増殖が無制限に起こることがその原因であり、一方、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の道を閉ざしている。本研究プロジェクトのテーマは、「なぜ神経細胞は分裂しないか」という点にあるが、これは裏を返せば、「なぜ細胞は分裂するのか」というメカニズムを知ることであり、その本質的なメカニズムを理解することが本研究の目的である。特に細胞周期におけるG0期(静止期)からの脱出機構は、神経細胞等の非分裂性細胞で喪失している能力であるが、その分子メカニズムに関しては全く不明であり、本研究の最終目標はそのG0期からの脱出に関する分子メカニズムを明らかにすることである。

細胞周期は非常に多くの制御分子によって調節が行われている複雑な系であるが、大きく分ければ細胞周期を回転させるためのアクセル分子と停止させるためのブレーキ分子が存在する。まずブレーキ分子の代表格であるp27Kip1とp57Kip2の時空間軸における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は全く発現していないが、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。p27Kip1とp57Kip2のロ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すると共に、トランスジェニックマウスも作製して、ブレーキの過剰発現が増殖だけでなく、分化にも影響することを明らかにした。p27Kip1とp57Kip2の両者を欠損させたマウスは、残念ながら胎盤形成が障害されて胎子の成長が止まってしまい、詳細な神経細胞における解析が不可能であったため、現在コンディショナルロックアウト法によって成体マウスにおいて両ブレーキを不活化する実験を進めている。

次に、p27Kip1の発現の調節の問題に取り組んだ。上述したように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。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。このブレーキ分子の分解による解除機構は、細胞がG0期からG1期に入るための必要条件であり、その機構を明らかにすべく、まずp27Kip1の分解機構の生化学的解析を行った。p27Kip1はユビキチン・プロテアソーム系によって破壊させることが知られていたため、まずユビキチン化によって破壊される分子でユビキチン化の一般原理を追求することを目指した。そのときに用いた分子はWnt系のシグナル伝達分子であるカテニンとNF- κ B系のシグナル伝達分子であるI κ Bである。これらをユビキチン化するメカニズムは、p27Kip1のユビキチン化するメカニズムと非常によく似ている。これら一連の研究からユビキチン化に必要な酵素であるユビキチンリガーゼ(E3)の性質が明らかとなってきた。これらはユビキチンリガーゼの中でもSCF複

合体と呼ばれる分子複合体であり、それは Skp1、Cul1、Rbx1、F-box タンパク質の 4 者から構成されていた。驚くべきことに F-box タンパク質は多数存在し、種々の基質に対するアダプター的な役割を果たすことが明らかとなった。

p27Kip1 のユビキチン化に必要な F-box タンパク質である Skp2 の生理的作用を調べるために Skp2 ノックアウトマウスを作製して、その異常を検討したところ、Skp2 ノックアウトマウスでは p27Kip1 の分解異常とそれによる蓄積の他に、サイクリン E の蓄積、染色体や中心体の過剰複製等の異常が認められた。これらの異常が本当に p27Kip1 の分解障害によるものかどうかを調べるために、Skp2・p27 ダブルノックアウトマウスを作製したところ、染色体や中心体の過剰複製は消失し、これらは p27Kip1 の分解が正常に行われないうちに起こったことが遺伝学的に証明された。

しかしながら、Skp2 ノックアウトマウスの解析は全く予想しなかった問題を提起した。Skp2 ノックアウトマウスにおいても G0 期から G1 期に移行する際には p27Kip1 はユビキチン化によって分解されてしまうのである。つまり、G0-G1 移行期には別のユビキチンリガーゼが作用して p27Kip1 を分解してしまうことが想定された。その未知のユビキチンリガーゼを、カテニンや I κ B の解析を通じて培ってきた *in vitro* ユビキチン化技術を用いて、生化学的に精製することに成功し、その遺伝子を単離した。この新規分子を KPC (Kip1-ubiquitylation Promoting Complex) と名付けた。KPC は KPC1 と KPC2 からなるヘテロ二量体であった。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、最終的に 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。

北川グループは、p27Kip1 の分解に従来から重要だと考えられてきたユビキチン依存性の機構の他にタンパク質の切断によるものがあるということを見出し、それを詳細に生化学的解析を行った。このタンパク質切断によって p27Kip1 は N 末端から 30 番目付近で切り離され、この分子はブレーキ分子としての活性を喪失することが明らかとなった。これは従来のユビキチン・プロテアソーム系の機構とは全く異なる機構で行われていることが明らかとなった。

5 - 4 . 事後評価結果

5 - 4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

活発な論文発表を行い、海外で 90 報掲載された。また口頭発表は国内 47 件、海外で 15 件であった。

当初目的とした、神経細胞の増殖を阻害している p27 と p57 の 2 つの遺伝子を阻害すれば、増殖を開始するのではないかと期待は生存そのものが出来ないことが判明したため頓挫した。しかしこのチームは方針をむしろアクセルを刺激することに切り替え、細胞周期という困難な課題に取り組むことになった。その中で多くの重要な発見がなされた。注目される発表の一つは信号伝達物質の PKC- δ が細胞増殖

の抑制に働き、この機能が不全になると自己免疫疾患を発症することを2002年にnatureに掲載されたことである。また、免疫抑制剤に関連したたんぱく質FKBP38が抗アポトーシス分子であるBcl-2を制御し、抗癌剤や放射線照射でも死ななかつたがん細胞にアポトーシスを引き起こさせることをNature cell biologyに掲載された。その他細胞周期をコントロールする数々の因子を発見しており、さらにポリグルタミン病病因遺伝子産物MJD1の分解機構の解明からVCPを介して結合するE4/UFD2aを発見したことも興味深い。これらの新規発見に対応して4件の国内出願を行った。これだけの成果を出せたのも多くの若手研究者のエネルギーを結集し、ノックアウトマウス作製等のスキルが優れていたためと考えられる。

5 - 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

アルツハイマー病を始め、多くの精神・神経疾患は神経細胞が異常に死滅するために起こる疾患であり、神経細胞を増殖させることが出来れば、根本的な治療になりうる。従来成人での神経細胞は増殖しないとされていたが、神経細胞の増殖を抑えているブレーキを外せば神経細胞を増殖させることが出来るのではないかとの構想のもとに研究を開始した。しかし、ブレーキを外しても神経細胞を増殖させることは出来ず、研究チームはむしろ細胞周期を動かすアクセルを刺激するという困難な方向に研究を転換した。この方針転換の善し悪しは議論の分かれるところではあるが、結果としてはより多くの成果を残すことになったのは間違いないであろう。特にG0期からの始動に関係する新しいユビキチンリガーゼKPC発見のインパクトは大きい。細胞周期のメカニズムの解明を進めても直ちに細胞増殖への応用は考えにくい。研究を進める過程で自己免疫への応用、アポトーシスの促進によるがん治療への応用、Machado-Joseph病におけるMJD1ユビキチン化酵素E4(UFD2a)を単離同定して遺伝子治療への手がかりを得たこと等、派生的な成果を十分に拾い上げていることはこのチームの有能さを示していると思われる。

5 - 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

CRESTの成果等により北川雅敏助教授が浜松医科大学の教授に就任した。

6 - 1 . 研究課題名

老化脳における神経の可塑性制御の分子基盤

6 - 2 . 研究代表者名及び主たる研究参加者名

(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者	森 望	国立長寿医療研究センター	部長
主たる研究参加者	上園 保仁	長崎大学大学院医歯薬総合研究科	講師
	中村 岳史	科学技術振興事業団	研究員
	渡辺 恭良	大阪市立大学医学部	教授
	木山 博資	大阪市立大学医学研究科	教授

6 - 3 . 研究内容及び成果

本研究では神経の突起進展の制御因子である神経特異的な nGAPs と、その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 と、さらに NGF / neurotrophin 等の神経栄養因子による nGAPs 誘導にかかわる神経特異的なシグナル伝達分子 N-Shc 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、そして可塑性制御の分子機構を明らかにすることを狙いとした。

老化制御グループ:

1. 神経突起進展関連分子 nGAPs 成熟脳における神経突起伸展制御分子は神経可塑性にからみ、非常に有望な老化脳制御分子となりうると考えられ、SCG10 を中心に、その構造と機能解析を進めた。SCG10 の発現は、成熟大脳皮質の部分切除により誘導がかかるが、その遺伝子発現誘導レベルは老化により著しく阻害される。研究を進める過程で、新たな神経特異的なホモログ、SCLIP (SCG10-like protein) と RB3 の存在が明らかとなった。ドメイン構造は基本的に同じだが、特にリン酸化をうける分子の中央部の制御ドメインでの多様性が見られた。SCLIP、RB3 を含めて、SCG10 関連遺伝子群のすべてについて in vitro でも in vivo でも神経突起の主骨格となる微小管 / マイクロチューブの崩壊活性をもち、リン酸化によって活性が制御されることを明らかにした。微小管制御分子以外に、神経系での発現の強い新規のアクチン結合蛋白 ClipinC を発見した。ClipinC は神経細胞内での微小管からアクチン繊維へ繋がる成長円錐のような場所で神経骨格の有機的な連係制御に係わっている可能性が考えられる。
2. 神経選択的サイレンサー制御因子 NRSF は神経機能に直結した多くの遺伝子を統括的に制御する重要な転写因子である。NRSF によって制御される神経遺伝子の多様性について、NRSF 配列をプローブにヒトゲノムプロジェクトのデータベースを調べ、従来知られていなかったターゲット遺伝子の候補となるものを数十種明らかにした。NRSF による神経選択的転写抑制に関して、mSin3-HDAC 複合体のリクルートによるクロマチン構造変換を介した転写抑制機構があることを提唱した。

ノックアウトマウス作製 / 解析グループ:

当初、N-Shc ノックアウトマウスの作製を目的とし、N-Shc 遺伝子の単離、ターゲットイングコンストラクトの作製、ES 細胞への遺伝子導入等進めた。しかし、生殖細胞系列への伝播が起らなかった。一方、カナダの研究グループが N-Shc KO マウスの樹立解析を報告したため、独自の KO マウスの開発は研究途中で断念した。平成 13 年からカナダで樹立されたマウスを用いた。

シグナルグループ:

リン酸化チロシンアダプター分子 Shc の神経系特異的なホモログである N-Shc を単

離したので、N-ShcとShcを対比して、その遺伝子基盤、生化学的特質、生物学的な応答特性を理解することを目指した。N-Shcに特有のシグナル伝達経路を調べるためにCH1ドメインでチロシンリン酸化残基を決定した。ついで、それに特異的に結合する分子を特定したところ、Grb2だけでなくCrkが新たなサイトに結合することを見いだした。アクチン細胞骨格の再編成に関わると考えられる因子を探索し、新規調節蛋白質Grit (G-protein regulator interacting with TrkA) を同定した。Gritの発現は神経系に強く、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た。N-Shcに神経細胞保護作用があるかどうか明らかにする目的で、神経活性化や神経細胞死のシグナル伝達に係わるプロテインキナーゼC (PKC) との相互作用の可能性について探究した。その結果、N-ShcとPKC deltaの発現が成熟脳で非常によく一致すること、また、N-ShcとPKCdeltaが酸化ストレス下に特異的に結合することを見つけた。

チャネルグループ：

G protein-coupled receptors (GPCRs) によるシグナルにN-Shc, Sck, ならびにShcアダプター蛋白が介するかどうかをクローン化GPCR、ならびにクローン化N-Shc, Sckを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用い、受容体によるイオンチャネル活性の修飾を指標として検討した結果、Shc系アダプター蛋白はGq共役型受容体シグナルを調節することで脳内での働きを制御していると考えられた。中枢では数多くのGq共役型受容体が発現しており、神経伝達、記憶、学習などに密接に関与していることから、Shcはそのモジュレーターとして働く可能性がみえた。特に、N-Shc, Sckがあると神経の脱感作が強まる。これは、神経の過敏状態を抑制することにより、N-Shc等が神経保護に働く可能性を示唆するものである。

可塑性グループ：

ネコの視覚野可塑性におけるnGAPs蛋白の役割について研究を進め、神経活動及び神経栄養因子に依存してSCG-10が誘導されることによって、LGNニューロンの軸策終末のチューブリンネットワークの崩壊が起こり、可塑的变化が生じることが推察された。また、老化によってBDNF受容体からSCG-10発現に至る情報伝達系のスイッチの切り替えが生じ、これによって神経可塑性の低下が生じることが示唆された。

神経再生グループ：

舌下神経切断後の神経再生の研究を進める過程でShcやnGAPs関連分子の遺伝子応答について研究を進めた。神経特異的に機能すると考えられるアダプタータンパク質、N-Shcの発現は、BMP2とRAによって直接あるいは間接的に誘導されていることが明らかになった。さらに中枢神経系においては、NT3やBDNFなどのニューロトロフィンファミリーの神経栄養因子がN-shcの発現を直接的に誘導・維持している

ことが明らかになった。Shc ファミリーの上流で作用するニューロトロフィンの作用は、N-Shc を介するシグナル伝達経強度に対する正のフィードバック制御と捉えることができる。また本研究に関連して BMP2 と RA あるいは神経栄養因子によって発現制御を受ける神経特異的新規タンパク質 (BRINP ファミリー) を発見した。その発現様式からいずれの BRINP タンパク質も、発達段階特異的、あるいは領域特異的な神経細胞の機能分化・個性獲得に作用していることが示唆される。

6 - 4 . 事後評価結果

6 - 4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

原著論文は海外 31 件、国内 16 件掲載された。口頭発表は国内 24 件であった。研究の特質にもよるが、特許出願は行われなかった。神経可塑性分子 nGAPs、神経シグナル分子 N-Shc、神経特異的転写因子 NRSF の相互の関連についての基礎研究に進展が見られた。特に ClipinC、Grit、神経の損傷時にみられる N-Shc の応答性などに新しい所見が得られた。研究が広範にわたるため、多くのサブグループで研究が進められた。それぞれの研究施設に異動があったため、連携が十分とは言えず成果のばらつきが大きい。特に N-Shc のノックアウトマウスの作製において海外に遅れをとったことが痛手であった。もともと困難が予想されたことであるが、上記の成果は発達期の脳を中心とした成果であり、神経突起の可塑性の低下から脳の老化機序を解明するとの当初目標は残念ながら未達成である。5 年間では時間が足りなかった印象がある。

6 - 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

日本では脳の老化の解明を目指す研究者は少なく、このグループは貴重な存在である。基礎的、理論面での成果は大きかったが、脳老化制御と脳保護へ至るような成果には繋がらなかった。一方脳老化制御に中心的役割を果たす分子群を解明したので、脳老化、アルツハイマー症やパーキンソン病の研究へと発展することが期待出来る。また、N-Shc が寿命に関連した因子であることが解ったので、この分野の研究を進めることでブレークスルーが得られるかも知れない。

6 - 4 - 3 . その他の特記事項

なし

7 - 1 . 研究課題名 「脳関門排出輸送に基づく中枢解毒」

7 - 2 . 研究代表者名及び主たる研究参加者名

(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者 寺崎 哲也 (東北大学未来科学技術共同研究センター教授)

主たる研究参加者

大槻 純男 (東北大学大学院薬学研究科助教授)

細谷 健一 (富山医科薬科大学薬学部教授)

玉井 郁己 (東京理科大学薬学部教授)

7 - 3 . 研究内容及び成果 :

血液脳関門(Blood-Brain Barrier; BBB)研究には、in vitro の機能を保持した培養細胞系の開発が必要不可欠であり、温度感受性 tsA58 SV40 large T 抗原遺伝子導入動物から条件的不死化脳毛細血管内皮細胞株(TM-BBB、 TR-BBB)を樹立した。これら細胞株は、in vivo BBB の機能を十分に反映しており、化合物の輸送速度はほとんど in vivo の輸送速度と一致した。さらに、周皮細胞や星状膠細胞についても条件的不死化細胞株を樹立し、共培養系を確立することで、より高度に in vivo 機能を保持した BBB の再構築に成功することができた。

脳内の神経伝達物質と神経調節因子に対する BBB の生理的役割を解明する為に、GABA、アスパラギン酸(Asp)、L-プロリン、ノルエピネフリン、ドパミン、セロトニンに着目した。本研究によって、BBB には GABA トランスポーター2 (GAT2/BGT-1)、ASC トランスポーター2 (ASCT2) 等それぞれのトランスポーターが発現していることを示した。ドパミンの最終代謝物であるホモパニリン酸(HVA)は BBB の脳側細胞膜に発現する有機アニオントランスポーター 3 (OAT3) によって脳から排出されることを明らかにした。OAT3 は、神経伝達物質の代謝物やインドキシル硫酸などの尿毒症物質や薬物を脳から除去する役割を果たしている。

これらの輸送担体はいずれも、脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜に局在し、排出輸送過程の第一段階を担っているものである。一方、内皮細胞内の物質が血液中に排出されるには、血液側細胞膜にも輸送担体が必要である。これらについては、ABCG2、ABCC4、ABCC5 などを含む ABC トランスポーターを中心に検討中であり、近い将来解明されるであろう。

これらの成果に加えて、CRT と OCTN2 が BBB に発現し、各々、血液中のクレアチンとカルニチンを脳内へ供給していることを明らかにした。本研究によって、BBB の生理的役割として、脳内の神経伝達物質、神経調節因子、及びそれらの代謝物、尿毒症物質、薬物を脳から血液方向へ輸送することで、脳を防御する中枢解毒機構として働いていることが初めて明らかになった。さらに、脳内エネルギー蓄積性物質と脂質代謝関連物質を脳内へ供給することで脳の支援機構として働いていることを初めて明らかにした。

7 - 4 . 事後評価結果

7 - 4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表は海外で 54 件掲載された。Transporter に関するものが大部分であるが、年度を経るに従って増加しており、研究成果が着実に反映されている。特に研究の基礎となる脳関門排出の in vitro 実験系を確立出来たことが特筆される。この実験系は in vivo 血液脳関門の機能を十分に反映していることが立証され、世界的に脳関門排出系を評価する最適な評価系として認められている。この評価系に関連して 6 件の国内特許、2 件の海外特許を出願しており、国内外の有力企業からライセンスの申し込みがなされている。また国内外の多数の大学との共同研究が始まっている。本来の目的である脳内の不要な親水性物質を BBB から排出しているトランスポーターについてはかなり解明されたと言えるが、血液から脳内への栄養物質等の輸送等についての解明は部分的なものに止まった。BBB トランスポーターの全貌を解明することは今後の大きな課題である。

7 - 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究の目的は「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」という仮説を証明し、その分子機構を解明することを目的とした。そのため *in vitro* の機能を保持した培養細胞系の開発が必要とされ、温度感受性条件的不活化脳毛細血管内皮細胞株(TM-BBB、TR-BBB)を樹立することに成功した。これら細胞株は、*in vivo* BBBの機能と良く相関していた。さらに、周皮細胞や星状膠細胞についても条件的不活化細胞株を樹立し、共培養系を確立することで、より高度に *in vivo* 機能を保持した BBB の再構築に成功することができた。本研究によって、多数のトランスポーターの機能が明かとなり、脳内の神経伝達物質、神経調節因子、薬物等を脳から血液方向へ輸送することで、脳を防御する中枢解毒機構として働いていることが初めて明らかになった。今後はこれまでに得られた成果を基にアミロイドタンパクの BBB 排出機構を明らかにし、その活性化を利用した新しい治療薬の開発研究を目標として「基礎研究発展推進事業 SORST」において展開を図ることになっており、その成果が期待される。

7 - 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

共同研究者の大槻純男(東北大学助教授)が「脳関門輸送の分子生物薬剤学的研究」で平成16年度日本薬学会奨励賞を受賞した。

8 - 1 . 研究課題名 「脳虚血により引き起こされる神経細胞死防御法の開発」

8 - 2 . 研究代表者名及び主たる研究参加者名

(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者 遠山 正彌 (大阪大学大学院医学系研究科教授)

主たる研究参加者

小川 智 (金沢大学医学部教授)

山下 俊英 (大阪大学大学院医学系研究科助教授)

片山 泰一 (大阪大学大学院医学系研究科助手)

8 - 3 . 研究内容及び成果:

(1) ストレス蛋白グループ

アストロサイトは低酸素刺激下でも細胞死に抵抗性が見られる。その原因となる因子の探索を行い、ORP150を同定した。神経細胞にORP150を強制発現させると神経細胞は低酸素刺激下でも細胞死に抵抗性となる。これらの現象はトランスジェニック(TG)マウスを用いた実験で確かめられた。新規ストレス蛋白としてSERP1とLonを同定し、機能解析を行った。いずれも小胞体ストレスに関与していることが示唆された。

(2) アルツハイマー病グループ

アルツハイマー病は高齢化を迎える現代社会が克服しなければいけない最大課題の一つである。プレセニリンに着目した研究の結果、家族性アルツハイマー病ではプレセニリ

ン 1 遺伝子の変異、孤発性アルツハイマー病(SAD)ではエクソン 5 を欠失するプレセニリン 2 (PS2) mRNA から産生される PS2 スプライシング変種蛋白が発現していることを見出した。また、PS2 変種細胞は小胞体に局在するカススペース 4 を活性化し細胞死に至る事を見出した。

PS2 変種蛋白の発現を抑制する手段について研究を行った結果、PS2 変種蛋白は HMGA1a がエクソン 5 の特異構造に結合し、PS2 変種蛋白を発現することが明らかとなった。そこで、HMGA1a に結合しやすい物質をおとりとして投与すると PS2 変種蛋白の発現は抑制されることを確かめた。現在このおとりとなる蛋白性分子候補を開発中であり、SAD の根本的治療薬の開発が期待される。また、孤発性アルツハイマー病患者の脳脊髄液中には正常の高齢者と比べて高い PS2 変種蛋白の濃度が観察されることから、PS2 変種蛋白をマーカーとする SAD 早期診断薬の開発を進めている。

(3) 中枢神経機能修復・再生グループ

神経細胞を救済し得たとしても、失われた神経回路の再建が出来なければ機能再建は望めない。これまで不可能とされてきた中枢神経の軸索再生にあえてチャレンジし、重要な知見を得た。MAG、Nogo、Omgp の 3 種が中枢神経の軸索再生抑制因子として知られているが、これら 3 種の因子は全て p75 受容体を活性化し、一連の機序を経て中枢神経の軸索再生を抑制していることを解明した。この機序を解除出来る因子を探索したところ、2 種の因子 (pep5、p21) の同定に成功した。マウス実験等により pep5、p21 は脊髄損傷、脳挫傷などの治療に有効である事が示唆された。

8 - 4 . 事後評価結果

8 - 4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表は海外で 66 件掲載された。件数多いことに加え、Nat Neuroscience.、Nat Med.、Nat Cell Biol.、J Cell Biol. 等有力誌への掲載が多いことからこのチームの充実ぶりが伺える。特許ではストレス関連小胞体タンパク質 SERP1 に関連して 2 件、アルツハイマー病関係 2 件、中枢神経の軸索再生関係 1 件、合計 5 件の特許出願を行い、そのうちアルツハイマー病関係の 2 件は外国にも出願している。アルツハイマー病治療薬の開発については、共同開発する企業も決まり現在鋭意研究中である。中枢神経の軸索再生の研究は平成 12 年下期から着手したばかりであるが、短時間で成果を挙げたことは評価出来よう。一方当初の目的である ORP150 等を用いた神経細胞死の防御法については、実用化の目途が立たず不満足な結果に終わった。しかし、総合すれば高い成果と言えよう。このチームは優秀なスタッフと学生が揃っており、かつ臨床を意識した研究に特徴が見られる。サクセスストーリーが多い中で、臨床に適用するにはもっと地道な検証を経ることが必要と考えられる。

8 - 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究の目的は「脳虚血により引き起こされる神経細胞死防御法の開発」であり、当初 ORP150 等のストレス蛋白を神経細胞に導入出来れば、神経細胞死を防止出来るのではないかと考え、そのメカニズムの解明に取り組んだ。しかし、アルツハイマー病においても、その原因が低酸素刺激による小胞体の機能異常という共通の因子が働いていることが分か

り、社会的要請の高さを考え研究の重点をアルツハイマー病にシフトさせた。アルツハイマー病研究においてはアミロイドベータやタウ蛋白の研究が主流となっているが、本チームはプレセニリンに着目したことに特徴がある。その結果、PS2 変種蛋白が細胞死の原因となっていることを突き止め、その異常を起こすメカニズムの解明を通して PS2 変種蛋白の生成を抑制する方法を提案するに至った。この研究が進展して薬剤の開発が出来れば、アルツハイマー病の根本的治療薬になる。また、PS2 変種蛋白とアルツハイマー病の病態との間に有意な相関が得られれば、診断薬にもなりうる。現在これらの開発に取り組んでいるところであり、その成果が期待される。一方中枢神経の軸索再生の研究は短期間にも拘わらず、治療法につながる成果が得られた。今後の進展が期待される。

8 - 4 - 3 . その他の特記事項 (受賞歴など)

平成 12 年 Highly Cited Researchers 受賞 (since 2000 ~)

平成 13 年 バイオビジネスコンペ JAPAN 最優秀賞受賞

9 - 1 . 研究課題名 「ウイルス性脳障害の発症機構の解明と治療法の開発」

9 - 2 . 研究代表者名及び主たる研究参加者名

(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者 長嶋 和郎 (北海道大学大学院医学研究科教授)

主たる研究参加者

澤 洋文 (北海道大学大学院医学研究科助教授)

高橋 秀宗 (国立感染症研究所室長)

望月 直樹 (国立循環器病センター部長)

大場 雄介 (大阪大学微生物研究所助手)

9 - 3 . 研究内容及び成果:

JC ウイルス (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る。成人の 70-80% は抗体保有者であるが、免疫不全を契機に活性化して、中枢神経系に特異的に PML を発症すると考えられている。脳をウイルス疾患から守るため JCV をモデルとして中枢神経系で増殖するメカニズムの解明を行った。その結果 JCV の細胞接着から細胞膜を介しての細胞内侵入、細胞内移送、核でのウイルス増殖の機構、ウイルス粒子の細胞核から細胞質への移送、細胞質から細胞膜への移送経路のほぼ全容が明らかになった。さらにこれらの研究により得られた基礎的事実に基づいて JCV を利用し、脳組織に種々の分子を発現させ得るウイルスベクターの作成を行った。JCV の外殻蛋白を試験管内で発現させ作製したウイルス偽粒子 (感染の危険性は無い) が外来遺伝子、蛍光物質等を細胞内に取り込み、細胞内に外来遺伝子を発現させることを確認し、遺伝子ベクターとしての作用を有する事を確認した。また糖脂質、さらに JCV の siRNA、中和抗体を作製して、JCV 感染を抑制する事に成功し、PML 治療への基礎的事実を確立した。

共同開発により、HIV 脳症の原因となる HIV の増殖の機構の解明、それに基づく治療法の開発、インフルエンザウイルスに対する予防法の開発を行った。さらにウイルス感染によ

る細胞応答を解析する基礎として、神経系細胞の分化誘導時に重要な因子を単離し、ウイルス感染により生じる DNA 傷害時の機構を解析し、シグナル伝達物質の分子間相互作用の可視化を行った。また北海道大学実験生物センターとの共同研究により、当初ウイルス感染症の可能性も考えられていた外的刺激により異常行動を示すラットを単離し解析した。

9 - 4 . 事後評価結果

9 - 4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表は海外で 107 件掲載された。中には研究主題から外れた文献も散見されるが、それにしても膨大な成果の積み重ねである。このチームは CREST 課題の発足と共に、新たな研究員の雇用、新鋭機器の導入に伴って研究室のレベルが向上し旺盛な発表意欲につながったものと考えられる。JC ウイルスの細胞膜への接着、細胞質内ついで核内への侵入、ウイルスゲノムの複製、ピリオンの形成と細胞外への輸送の全貌について多くの新知見が得られた。しかしウイルス増殖にキーとなるファクターがもう少しで解明されるところで終了となったのは惜まれる。臨床への応用として JCV を利用したベクターの開発、agnoprotein を標的とした siRNA や JCV 中和抗体を用いた JCV 感染抑制、HIV 増殖抑制法は有望であるが、今後に期待したい。これらにつき 5 件の国内出願、1 件の海外出願を行い、更に関連特許として 4 件出願する予定である。

9 - 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究では、ウイルスによる脳の障害から“脳を守る”ことを目的として、ウイルス性脳障害の発症機構を解明するために、PML の原因ウイルスである JCV を対象として研究を行った。まず、JCV が中枢神経系でのみ増殖を行う機構を解明するために、1) 細胞膜側のウイルス受容体の単離・同定、2) 細胞内侵入後のウイルスの細胞内移送経路の解明、3) ウイルスゲノムの複製の場である細胞核におけるウイルスゲノムの転写・複製調節の解明、4) JCV 感染モデル動物の作製を行った。さらにこれらの研究により得られた基礎的事実に基づいて JCV を利用し、脳組織に種々の分子を発現させ得るウイルスベクターを作成することにより、ウイルス性脳障害の治療法を開発することを試みた。得られた成果は国際学会で多数発表され、この分野では高い評価を受けた。また、共同研究を行う機会も増えており今後の成果が期待できる。

9 - 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

特になし。

10 - 1 . 研究課題名「活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構」

10 - 2 . 研究代表者名及び主たる研究参加者名

(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者 中別府雄作(九州大学生体防御医学研究所教授)

主たる研究参加者

岩城 徹（九州大学大学院医学研究院教授）

高島 明彦（理化学研究所脳科学総合研究センターチームリーダー）

光本 泰秀（大塚製薬医薬第二研究所チームリーダー）

10-3. 研究内容及び成果：

神経細胞の機能を保持するために必要なエネルギーのほとんどは、ミトコンドリアでの酸素呼吸により供給されているが、活性酸素が常時発生するため、神経細胞はその活動を維持する上で活性酸素による酸化障害の危機に常に曝されている。このチームでは「DNAの酸化障害とその防御機構」について研究を進め、大腸菌から哺乳動物まで生物は酸化されたDNAを修復する機構とその前駆体ヌクレオチドの酸化体を分解、排除する機構を備え、活性酸素による酸化障害の危機に対抗していることを明らかにしてきた。核およびミトコンドリアゲノムDNA中の酸化損傷の修復機構として、グアニンの酸化体（[8-oxoG]）とアデニンの酸化体（[2-OH-A]）、異常ヌクレオチドの浄化機構としてプリンヌクレオシド三リン酸の酸化体と脱アミノ化体を同定した。これら防御機構の破綻と疾患との関係を解析するため修復機構を持つ因子のノックアウトマウスを作成解析した。その結果例えば、アルツハイマー病やパーキンソン病の病態と「8-オキソグアニン」の異常との関連が示唆された。

一方、活性酸素による遺伝子発現制御に関わるシグナル伝達系と転写因子に関する研究ではMAPキナーゼカスケードを空間的に制御する新規タンパク質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。また、*in vitro* 実験でFosBタンパク質が細胞増殖・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FosBの下流で発現が誘導されるタンパク質として、神経軸索伸長（再生）因子として機能するGalectin-1とGalectin-1を同定した。これらは脊髄後根神経節の切断端からの軸索再生を促進するので、神経再生を促進する治療薬として有望である。

10-4. 事後評価結果

10-4-1. 外部発表（論文、口頭発表等）、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表は海外で63件掲載された。地味な成果の積み重ねであり、インパクトのある雑誌掲載は少なかったようである。しかし、殆どの論文に研究代表者が名を連ねており、統制のとれた論文発表になったようである。活性酸素防御機構と疾患の関係を解析するため、このチームはマウスのバックグラウンドを揃えることから始めたため、実験動物の作成が遅れ詳細な解析までは出来なかったのが惜まれる。活性酸素障害は誰もが徐々に侵襲を受けるものであり、際だった疾患特異性が見られないため、ともすれば地味な研究と見なされがちであるが、人間の寿命を左右するものであるから、是非必要な基礎研究であると考えられる。その意味でこのチームが地道に成果を積み上げたことはこの分野に光をあてたものとして評価される。さらに、神経軸索伸長（再生）因子としてGalectin-1ファミリーを同定した。神経再生につながる事が期待される。

10-4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究では新たな視点から、活性酸素による障害から「脳を守る」方法の基礎理論を構築し、遺伝子改変マウスやその脳・神経細胞を用いてその実効性を検証することを目指した。当初酸化障害に対する防御遺伝子（MTH1、OGG1、MUTYH）欠損マウスを用い、病態との関係を解析する計画であったが、マウスの2年程度の寿命では、脳における有意な病態は観察されなかった。そこで、遺伝子欠損マウスから細胞株を樹立し、ヒト防御遺伝子を導入する等で機能解析を進めた。その過程で新たな防御遺伝子として、APEX2、NEIL3、ITPAを同定した。また、発現制御に関わる分子として JSAP1 を同定し、軸索再生に関わる因子として Galectin-1 ファミリーを同定した。神経再生への応用が期待される。

10-4-3. その他の特記事項（受賞歴など）
特になし。