

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究課題
「アポトーシス医療技術の開発に
関する研究」

研究期間：平成 13 年 3 月 1 日～平成 17 年 3 月 31 日

研究代表者
池田 穰衛
東海大学 医学部 教授

1 . 研究実施の概要

本研究は、神経疾患に見られる脳・神経細胞の「変性・死」の本態がアポトーシスであるとの観点にたつて、脳・神経特異的アポトーシス抑制分子の動態とその制御技術を用いたゲノム・分子医療技術の開発を目的とする。脳・神経変性疾患治療の現状は対症療法に限定されている。しかし、これらの疾患は神経細胞のアポトーシスに起因することが明らかになってきた。本研究では、ゲノム情報に書き込まれている神経細胞維持情報(アポトーシス抑制機能)および調節機能を担う因子の生体内での振る舞い(分子動態・機能)を解明し、アポトーシス医療(神経難病本態医療)技術を開発する。神経細胞生存の命運を司る因子(神経変性疾患遺伝子産物)の機能とその動態を明らかにせずして本態性医療技術の開発は望めない。また、ゲノム創薬を目的とする新基盤産業の開拓・進展も不可能である。さらに、神経変性疾患遺伝子の本態機能の解明については、神経難病を忠実に再現できるモデル解析系を用いることが本態医療技術開発に必須である。

以上のような観点に立ち、本研究では、これまでに同定した抗アポトーシス因子 NAIP、ALS2 原因遺伝子 *ALS2*、およびハンチントン病(HD)原因遺伝子転写調節因子 HDBP1/HDBP2の分子動態解析を通して、神経変性疾患の発症メカニズムの本態に迫るとともに、そのメカニズムを機軸にしたモデル動物の作出、分子治療技術開発ならびに評価系の開発、さらには薬剤スクリーニング系の開発を行う。具体的には、「神経細胞の機能障害および細胞死の分子メカニズムに関する研究」として、以下3項目; 1) *NAIP* 遺伝子産物の分子機能解析、2) *ALS2* タンパク質の分子機能解析、3) *HD* 遺伝子発現調節の分子機構の解析を遂行する。同時に、「神経変性疾患モデル動物の開発と神経難病治療薬スクリーニング系ならびに評価系の開発」として以下5項目; 1) *NAIP* トランスジェニックマウスを用いた神経変性疾患生体治療モデル実験、2) *Als2* ノックアウトマウス(*ALS2* モデルマウス)の作出と分子病態解析、3) *NAIP* 発現を指標にした低分子化合物薬剤スクリーニング系および評価系の開発、4) 上記スクリーニング系を用いた神経変性防御化合物の同定、5) *HD* モデルミニブタの系統化ならびに分子病態解析、についての研究を実施した。

本研究により得られた研究成果は、以下のように要約される。

(1) 神経細胞の機能障害および細胞死の分子メカニズムに関する研究

*NAIP*の分子機能解析により、*NAIP*がその他のIAPファミリー分子(XIAPなど)とは異なり、SMACに結合しないこと、caspase 3活性を抑制しないこと、さらには*NAIP* アミノ酸配列中のNBD (Nucleotide Binding Domain)およびC末端のLRR (Leucine

Rich Repeat)領域がNAIPの有する抗アポトーシス活性に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、*NAIP*遺伝子の5'上流領域の解析により、*NAIP*遺伝子転写調節領域(プロモーター配列)を同定し、*NAIP*遺伝子転写制御候補因子の同定に成功した。さらに、一連の薬理的・細胞生物学的解析により、*NAIP*遺伝子発現が高カリウム刺激により誘導されること、ならびにその誘導がミトコンドリアを介した細胞内カルシウム・シグナル伝達系賦活化により誘起されることを特定した。

ALS2タンパク質の有する分子機能を生化学的、細胞生物学的手法を用いて解析した結果、ALS2タンパク質が低分子量G蛋白質Rab5の特異的活性化酵素であること、ALS2のC末端領域のMORN-VPS9ドメイン領域がその触媒機能を担っていること、さらには細胞内において当該タンパク質がエンドゾームにおける膜移送・融合に関わっていることを明らかにした。また、そのALS2タンパク質は多量体を形成して存在し、その多量体形成自体が上記のような分子・細胞機能にとって必須であることも明らかにした。さらに、ALS2タンパク質に高い相同性を示す新規の遺伝子*ALS2CL*を同定し、その分子機能がALS2と共通したRab5を介したエンドゾーム動態調節に関与している可能性を示した。以上の結果、および*ALS2*遺伝子変異により引き起こされる運動ニューロン疾患がいずれもALS2タンパク質のloss-of-functionにより引き起こされるという遺伝学的事実を基に、我々は、これら運動ニューロン疾患が神経系における特定のエンドゾーム動態・膜移送系の破綻により引き起こされているという仮説を提唱した。

ハンチントン病原因遺伝子(*HD*)の遺伝子発現調節の分子機構を明らかにする目的で、本研究では*HD*遺伝子5'上流領域のプロモーター領域の解析を行った。その結果、新規のヒト*HD*遺伝子転写調節候補因子(HDBP1/HDBP2)ならびに遺伝子発現調節配列の同定に成功した。そして、当該因子が新規のDNA結合ドメインを有する転写因子であること、ならびにその結合(シス)DNA配列構造を明らかにした。さらに、それら転写候補因子が細胞質と核との間を細胞内・外環境の変化に応じて移動すること、特に酸化ストレス環境下において細胞内局在を変化させることを明らかにした。これらの因子は、神経変性の主要因となっている酸化ストレスに応答して細胞核内に移動するタンパク質であることから、これら因子の酸化ストレス応答と分子動態を明らかにする事によって、当該因子の機能障害を指標とした低分子化合物のスクリーニングなどのハンチントン病治療薬の開発が可能となる可能性がある。

(2)神経変性疾患モデル動物の開発と神経難病治療薬スクリーニング系ならびに評価系の開発

神経変性疾患発症における NAIP および ALS2 タンパク質の個体における役割を解明することを目的として、NAIP トランスジェニックマウスの作出および系統化、ならびにマウス *A1s2* 遺伝子ノックアウトマウス作出を行った。これらの成果は、NAIP ならびに ALS2 タンパク質が担う神経情報伝達系と情報伝達物質の特定、神経変性の分子基盤の解明に向けて新たな道を拓くものである。そして、これらの知見は、さらに神経機能保全を対象とした新たな神経変性防御・治療技術の開発へと繋がる。特に、*A1s2* 遺伝子ノックアウトマウスは運動神経変性治療・防御技術あるいは薬剤の評価系として新たなヒト神経疾患モデル動物として発展する可能性は極めて高いと考えられる。一方、本態性神経変性疾患動物（ハンチントン病モデルミニプタ）を用いた神経難病治療薬ならびに医療技術の評価系の開発について、複数の病変型ハンチントン病遺伝子導入ミニプタの系統維持を試みたが僅か 1 個体のみ病的旋回運動を呈し衰弱死に至った。その他の個体では異常は認められず、脳神経組織の病理解析に供する事を決定した。ハンチントン病は壮・老年発症型疾患であることから、これら個体においても長期飼育と経過観察が必要と思われる。高度の脳機能を有する中型動物ミニプタは、脳定位固定や MRI 画像解析の手技が開発できた事から、無侵襲で神経変性疾患モデル個体の病態や薬理効果等を経時的に解析、評価できる有用系として可能性が得られた。

NAIP 関連の特筆すべき成果は、NAIP-ELISA 系を用いた NAIP 発現誘導低分子化合物のスクリーニング系の開発と、この系を用いて既に 30 種のヒット化合物が得られた事である。さらにその中の 1 種の化合物について、脳虚血（低酸素）による脳神経変性の顕著な防御効果ならびに変異型 SOD1 発現 ALS モデルマウスの延命効果が認められている。そして、これらアポトーシス抑制低分子化合物のスクリーニングと神経変性防御リード化合物の成果を基に、神経変性防御薬の開発を目的とするゲノム創薬ベンチャー企業、株式会社ニュージェン・ファーマを 2005 年 2 月に設立した。

以上のような研究成果を基盤として、今後さらに NAIP の生体内における抗アポトーシス活性の制御機構およびその人為的コントロール、*A1s2* 遺伝子ノックアウトマウスの分子病態解析と ALS2 タンパク質の分子機能の解明、および HD 遺伝子転写制御の分子機構の解明に関する研究を重点的に遂行することにより、神経細胞生存機構の実体、そしてその破綻が原因となって引き起こされる神経細胞機能障害、神経細胞死、さらには神経変性といった神経疾患における一連の発症分子機構のより明確な理解が可能となると考えられる。その結果、分子発症機構を基盤にした治療薬および治療法、いわゆる”pathogenesis/mechanism-based medicine” の開発が

より促進されることが期待される。そのような意味において、我々が既に開発している NAIP 発現を指標にした低分子化合物スクリーニング法は、この”pathogenesis/ mechanism-based medicine”の先鞭をつけるものである。従って、本方法により今後同定されうる新たな神経細胞保護・防御薬の解析ならびに臨床応用試験は、アポトーシス医療を基盤とする今後の神経難病本態医療技術の開発に向けての成功を占う重要な研究であると考えられる。

2. 研究構想

(1) 背景

本研究は、神経疾患に見られる脳・神経細胞の「変性・死」の本態がアポトーシスであるとの観点にたつて、脳・神経特異的アポトーシス抑制分子の動態とその制御技術を用いたゲノム・分子医療技術の開発を目的とする。脳・神経変性疾患治療の現状は対症療法に限定されている。しかし、これらの疾患の多くは神経細胞のアポトーシスに起因することが明らかとなってきた。国際共同研究「神経遺伝子」プロジェクトによって同定した新たなアポトーシス抑制因子 NAIP と XIAP さらに若年発症型筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 2 型原因遺伝子 *ALS2* を機軸にした分子機能解析ならびに薬剤スクリーニングは、アポトーシスを基調とする疾患の防御あるいは根本的治療法の開発に新たな可能性を拓くものである。

(2) 研究のねらい

本研究では、ゲノム情報に書き込まれている神経細胞維持情報 (アポトーシス抑制機能) および調節機能を担う因子の生体内での振る舞い (分子動態・機能) を解明し、アポトーシス医療 (神経難病本態医療) 技術を開発する。神経細胞生存の命運を司る因子 (神経変性疾患遺伝子産物) の機能とその動態を明らかにせずして本態性医療技術の開発は望めない。また、ゲノム創薬を目的とする新基盤産業の開拓・進展も不可能である。さらに、神経変性疾患遺伝子の本態機能の解明については、神経難病を忠実に再現できるモデル解析系を用いることが本態医療技術開発に必須である。そのような観点に立ち、本研究ではこれまでに同定した抗アポトーシス因子 NAIP、ALS2 原因遺伝子 *ALS2*、およびハンチントン病 (HD) 原因遺伝子転写調節因子 HDBP1/HDBP2 の分子動態解析を通して、神経変性疾患の発症メカニズムの本態に迫るとともに、そのメカニズムを機軸にしたモデル動物の作出、分子治療技術開発ならびに評価系の開発、さらには薬剤スクリーニング系の開発を行う。これらにより、神経細胞生存機構の実体、そしてその破綻が原因となって引き起こされる神経細胞機能障害、神経細胞死、さらには神経変性といった神経疾患における一連

の発症分子機構のより明確な理解が可能となる。その結果、分子発症機構を基盤にした治療薬および治療法、いわゆる”pathogenesis/mechanism-based medicine”の開発がより促進される。さらに、神経疾患治療薬開発を主眼とするベンチャー企業の創出も期待される。加えて、オタワ大学との共同研究体制を堅持することにより、開発されたゲノム・分子医療技術や治療薬候補化合物の評価と Phase I ~ III 試験への展開を目指すことが可能となると考えられる。

(3) 社会還元と科学技術上のインパクト

本研究は神経難病（大脳基底核の変性による運動失調症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、老人性痴呆症、アルツハイマー病）の本態治療を目的とする分子医療技術や予防・治療薬などのゲノム創薬の実現を可能にするものである。神経難病の本態療法は、日本のみならず高齢化傾向にある先進諸国における神経難病の増加を抑え、患者とその家族ならびに高齢者の精神的、経済的負担を取り除き、生活の質的向上と医療保険費の軽減に貢献することが期待される。さらに、神経難病をはじめ、成人難病（代謝・循環器疾患）の本態解明と治療・予防薬開発を可能にする各種のモデル実験動物の作出・供給、ならびに薬剤スクリーニング・評価を専門とするベンチャー企業の創出が期待される。

3 . 研究内容

3 . 1 神経細胞の機能障害および細胞死の分子メカニズムの解析

(1)実施の内容

本研究は、ゲノム情報に書き込まれている神経細胞維持情報（アポトーシス抑制機能）および調節機能を担う因子の生体内での振る舞い（分子動態・機能）を解明し、アポトーシス医療（神経難病本態医療）技術を開発することを目指すものである。神経細胞生存の命運を司る因子（神経変性疾患遺伝子産物）の機能とその動態を明らかにせずして本態性医療技術の開発を望むことはできない。本研究では、これまでの研究により同定されたアポトーシス抑制因子である NAIP、神経変性疾患の原因遺伝子産物の1つである ALS2 ならびにハンチントン病（HD）遺伝子発現調節因子である HDBP1/HDBP2 の分子機能を明らかにし、神経細胞の生存およびその破綻により引き起こされる神経機能障害・神経細胞死の分子メカニズムの解明を目指す。そして、アポトーシスを基調とする変性疾患の本態性治療のためのゲノム医療法あるいは治療薬開発への新たな手段を提供する。本研究第1の課題に関して遂行する3項目の研究について、その概略を以下に述べる。

1) NAIP 遺伝子産物の分子機能解析

Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) は、オタワ大学 (Robert Korneluk 教授、Alex MacKenzie 教授) との共同研究で脊髄性筋萎縮症 (SMA) 原因候補遺伝子の一つとして単離・同定された。その後、この研究は科学技術事業団・カナダ国際共同研究事業「神経遺伝子プロジェクト」(1996年~2000年12月迄) に継承され NAIP の機能解析が行われた。その研究過程において、ラット脳内 (海馬 CA1 領域) へのヒト NAIP 遺伝子発現ベクターの物理的導入による NAIP の強制発現あるいは薬剤によるラット内因性 NAIP 遺伝子の強制発現によって、虚血刺激による海馬 CA1 神経細胞のアポトーシス (細胞死) が大幅に抑制されたことから、NAIP は神経細胞死を抑制する新規のアポトーシス抑制因子であることが明らかにされた。さらに、NAIP が脳神経系以外の組織においても発現・機能している可能性が示された。マウスの卵巣における卵胞形成の過程において、アポトーシスを基調とする卵胞閉鎖から逃れ成熟過程にある卵胞の顆粒細胞では NAIP が特異的に発現しており、NAIP は卵胞の成熟あるいは卵胞閉鎖 (アポトーシス) の運命付けにも関わっていることが判明した。また、ヒト成人組織では免疫系・造血系組織に特に強い発現が認められている。なかでも強い発現が認められたのは脾臓と末梢血由来白血球画分で、ついで肝臓、肺、胎盤に発現がみられた。脳や脊髄を含む他の組織では NAIP mRNA の検出量は非常に低く、生理的条件下における NAIP 遺伝子の発現は極めて低いレベルに調節されていることが覗える。一方、胎児組織では肝臓、腸管、肺、心臓、脳のいずれにおいても強い発現が見られている。これらの胎児組織では正常な発生・分化の初期過程にアポトーシスが必須であることから、NAIP はアポトーシスの調節機能を背景に発生・分化の過程に関与していると思われる。

これまでに明らかになった NAIP のアポトーシス抑制活性は、活性酸素発生試薬の一種である menadione など酸化ストレス誘導剤によって誘導される細胞死に特異的である。他の抗アポトーシス因子 (Bcl-2 family, XIAP など他の IAP) が主に caspase 依存性の細胞死を抑制するのに対して、NAIP は caspase 非依存性の細胞死の抑制を特徴としており、老化や脳梗塞、炎症反応に特異的な細胞死を抑制すると考えられる。また、NAIP は虚血など神経細胞死を誘起する刺激により特異的に誘導される因子としての特性をもっていることが明らかになってきた。すなわち、細胞生命の危機に際して速やかに発現誘導が起こり (神経) 細胞を傷害から防御するシステムの一つとして NAIP は機能するものと考えられる。本研究では、我々が同定した新たなアポトーシス抑制因子 NAIP の細胞及び生体内での分子動態を解明し、NAIP の機能発現に関わる因子を含めて遺伝子レベルあるいはタンパク質レベ

ルでの機能制御法を確立する。特に、NAIP の有する酸化ストレスを起因としたアポトーシスへの抑制作用を担う分子作用シグナル伝達系の解析により、NAIP が有する細胞死抑制作用の本態を明らかにする。

一方、*NAIP* 遺伝子は脳・神経組織のみならず種々の組織・細胞、さらに個体の初期発生期などにおいて厳密な発現制御下にあることが判明している。その全容を捉える目的から、我々は *NAIP* 遺伝子プロモーター領域の構造ならびにその調節因子の同定を試みる。またさらに、*NAIP* 遺伝子発現を調節している細胞外刺激あるいは細胞内シグナル伝達系の実態を明らかにする。

2) ALS2 タンパク質の分子機能解析

高頻度神経・筋変性疾患の一つとして筋萎縮性側索硬化症 (ALS) が知られている。近年優性遺伝性の ALS 1 型の原因遺伝子として活性酸素の代謝酵素である Cu/Zn Superoxide Dismutase (*SOD1*) が同定された。ALS の多くは孤発性で遺伝性のものは 20% にも満たない。ALS 1 が全 ALS に占める割合は数%であることから、ALS 発症の分子病態解明と治療法の開発には *SOD1* 遺伝子以外の原因遺伝子の同定が待たれていた。2001 年我々は、カナダとの共同研究を背景にして劣性遺伝形式をとる ALS 2 型原因遺伝子 (*ALS2* 遺伝子) の単離・同定に成功した。*ALS2* 遺伝子のサイズはおよそ 80 Kb で 34 個のエクソンから構成され、1657 残基のアミノ酸からなるタンパクをコード (推定 184kDa) することが判明した。アミノ酸配列の解析により、*ALS2* 遺伝子産物 (*ALS2* タンパク質) は 3 種類の独立した guanine nucleotide exchange factor (GEF) のドメインを有することが明らかとなった。ALS2 の患者においては、*ALS2* 遺伝子の 第 3 エクソンに一塩基欠損変異が起き、その結果 3 アミノ酸残基の後にストップコドンが生じ、*ALS2* タンパク質本来の構造・機能が損なわれる (loss of function) と推定された。この *ALS2* 遺伝子産物の loss-of-function こそが ALS2 の発症原因の本態だと思われる。また、ALS2 は SMA と同様に劣性遺伝子疾患であることから、その遺伝子変異は loss-of-function である。従って、*ALS2* 遺伝子産物も SMA 疾患調節遺伝子産物 NAIP とおなじく神経生存に直接関わっていると考えることができる。本研究課題では、*ALS2* タンパク質に特異的な抗体を用いて当該タンパク質の生体内および細胞内の挙動と精製 *ALS2* タンパク質の生化学的機能を解析することによって *ALS2* が神経生存あるいは神経細胞死にとってどのような作用を有する因子であるかを解明する。

3) HD 遺伝子発現調節の分子機構の解析

ハンチントン病 (HD) の根本治療には、内因性 HD 遺伝子の発現コントロールが有効であることが、さまざまな HD モデルマウスの実験から明らかにされている。本研究課題では、ヒト HD 遺伝子の発現調節機構の分子メカニズムを解明するため、HD 遺伝子転写領域に結合する転写結合因子の単離・同定を行う。さらに、同定された HD 遺伝子転写調節領域の結合因子における DNA 結合様式および生体内での細胞内分布・挙動を分子生物学的・生化学的・細胞生物学的的手法により解析する。

(2) 得られた研究成果の状況

1) NAIP 遺伝子産物の分子機能解析

NAIP が有する抗アポトーシス活性の分子的基盤を明らかにすることを目的として、NAIP アミノ酸配列中の様々なドメイン構造の分子機能を生化学的手法により解析した。その結果、NAIP は、その他の IAP ファミリー分子 (XIAP など) とは異なり、SMAC に結合しないこと、caspase 3 活性を抑制しないこと、さらには NAIP アミノ酸配列中の NBD (Nucleotide Binding Domain) および C 末端の LRR (Leucine Rich Repeat) 領域が NAIP の自己結合の調節領域であるとともに、これら NBD/LRR ドメインが NAIP 抗アポトーシス活性に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

次に、NAIP 遺伝子プロモーター配列および NAIP 遺伝子転写制御候補因子の同定を行った。その結果、推定転写開始点から上流の 350 bp 領域が NAIP 遺伝子のプロモーター領域であり、プロモーター配列中のおよそ 50 bp の配列が NAIP 遺伝子発現に必須なコアプロモーター領域であることが判明した。さらに、EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) 法により、同領域に結合するタンパク質因子が複数個存在することを明らかにした。結合配列および特異的抗体を用いた解析の結果、そのうちの 하나가転写因子 Brn-2 である可能性が示された (Biochim. Biophys. Acta. 1547, 2002)。次に、NAIP 遺伝子発現の誘導の分子メカニズムを解明するため、培養細胞を用いた細胞薬理学的実験により、内因性 NAIP 遺伝子発現の上昇をもたらす刺激の同定を試みた。その結果、細胞を高濃度の KCl に暴露することにより、内因性 NAIP 遺伝子発現が一過性に上昇を示すことが明らかとなった。NAIP 以外の抗アポトーシス因子である XIAP および survivin の上昇は観察されなかったことから、KCl による NAIP 遺伝子発現上昇は特異的なものであると考えられた。そして、この NAIP 遺伝子発現の誘導は、KCl 刺激により引き起こされる細胞内カルシウム濃度の上昇に依存することが判明した。さらに、細胞内におけるカルシウムシグナル系の同定を試みた結果、NAIP 遺伝子発現誘導は、細胞質 cAMP/PKA/CREB あるはカルモジュリン、あるいは ER/SR のカルシウムストレスシグ

ナルには依存せず、むしろミトコンドリアストレスを介したカルシウムシグナル系に依存していることが明らかとなった(図1)。酸化ストレスによりミトコンドリア障害がおこること、また NAIP は酸化ストレスに対して特異的細胞死抑制活性を示すというこれまでの知見を総合すると、*NAIP* 遺伝子発現上昇がミトコンドリアに対するストレス(酸化ストレス等)から細胞を防御するための重要な生体反応である可能性が示された。また、従来から KCl 刺激は細胞の虚血時に起こる現象を実験的に再現していると考えられていることから、この *NAIP* 遺伝子発現上昇は、ラットあるいはマウスでの虚血時に観察される *NAIP* 遺伝子発現上昇結果を *in vitro* で再現しているものと推察される。

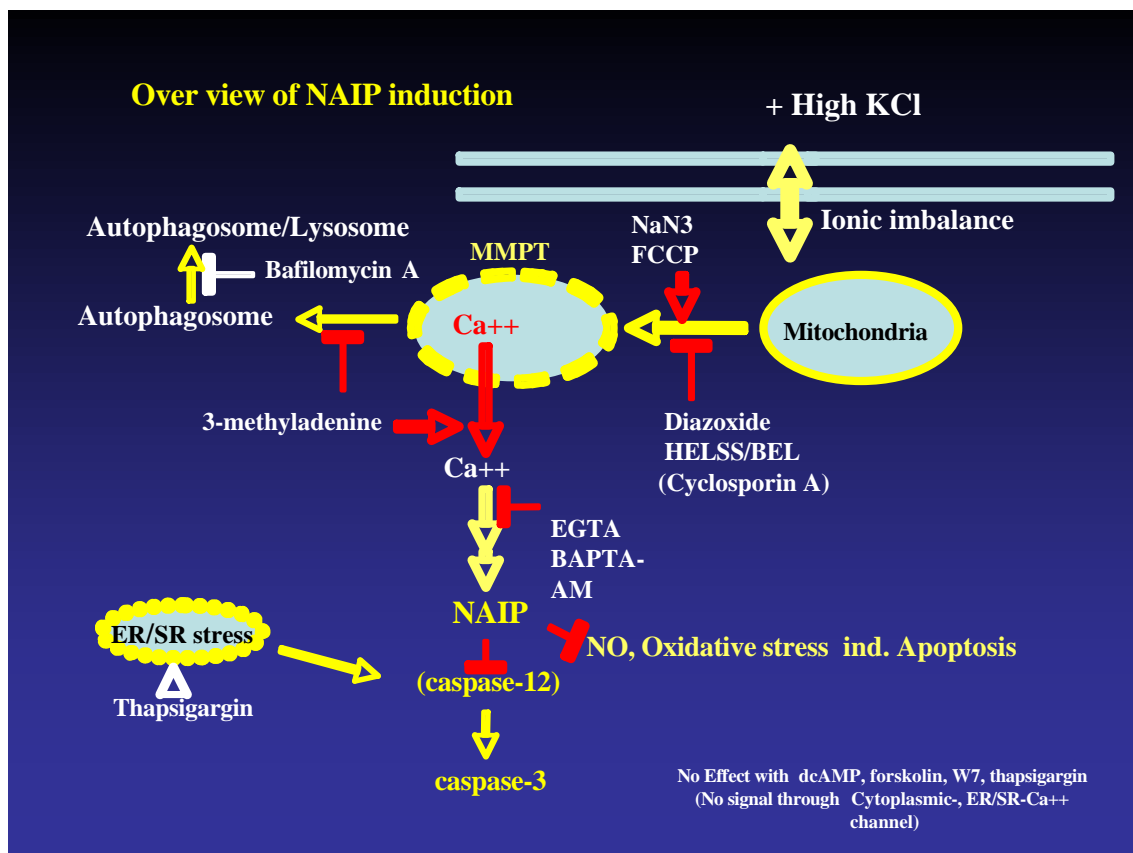


図1. 高濃度カリウム刺激による *NAIP* 遺伝子発現誘導メカニズム

2) ALS2 タンパク質の分子機能解析

ヒトおよびマウス ALS2 タンパク質に対するポリクローナル抗体の作製を行った。これまで、10 種類の合成ペプチドおよび 3 種類の組換え ALS2 タンパク質に対する合計 13 種類のポリクローナル抗体の作製を試みた。その結果、マウスおよびヒト ALS2 タンパク質のそれぞれに特異的な抗体およびヒトおよびマウス両者の ALS2 タンパク質を認識する抗体の作製に成功した。モノクローナル抗体の作製については、

現在進行中である。次に、マウスおよびヒト組織での ALS2 タンパク質の発現を、得られた抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、ALS2 タンパク質は予想されたサイズ（約 180kDa）のタンパク質として発現し、しかもその発現は脳内、特に小脳で最も顕著であり、mRNA 発現パターンと一致する結果が得られた。また、免疫組織化学的解析の結果、ALS2 タンパク質は、神経細胞特異的に発現していることが明らかとなった。さらに、細胞内での ALS2 タンパク質局在を詳細に解析するため、培養細胞に ALS2 タンパク質を強制発現させ、その分布を解析したところ、ALS2 タンパク質は細胞質に加えて、形質膜あるいは細胞内小胞上などの膜様構造体の上に高密度に局在することが明らかとなった。様々なマーカータンパク質との共染色を行った結果、ALS2 タンパク質は、初期エンドゾームに局在することが判明した。

ALS2 タンパク質の分子機能を解明するため、タンパク質機能の生化学的、細胞生物学的解析を行った。本研究では、特に ALS2 アミノ酸配列から予想されているグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)に特徴的なドメインに着目し、ALS2 の標的分子量 G タンパク質の検索と ALS2 細胞内挙動解析を行った。その結果、ALS2 はその C 末領域を介して低分子量 G タンパク質 Rab5 を特異的に活性化し、さらに初代神経培養細胞においては初期エンドソーム上で Rab5 と共存するとともに、エンドゾーム融合を促進することが明らかとなった。よって、ALS2 タンパク質は新規の Rab5GEF であり、Rab5 活性化制御やエンドソーム融合・輸送調節に関わる因子であると推定された (Hum. Mol. Genet. 12, 2003)。最近、ALS2 の有する Rab5GEF 活性が ALS2 タンパク質単量体ではなく、多数 ALS2 タンパク質同士が複合体を形成(多量体形成)することに依存していることが明らかにされている (J. Biol. Chem. 279, 2004)。さらに、本研究では ALS2 の C 末端側の配列構造的に酷似したタンパク質をコードする新規の遺伝子 *ALS2CL* を同定することにも成功した。ALS2CL タンパク質は、ALS2 同様エンドゾーム動態の調節に関わっており、ALS2 の作用を修飾している可能性が示唆された (FEBS Lett. 575, 2004) (図 2)。

3) *HD* 遺伝子発現調節分子機構の解明

酵母 one-hybrid スクリーニング法を用いて、*HD* 遺伝子転写調節領域に結合活性を有するタンパク質、ならびにそれらをコードする 2 種類の新規遺伝子 HDBP1/HDBP2 を単離した。これら 2 種類の結合因子の DNA 結合様式および生体内

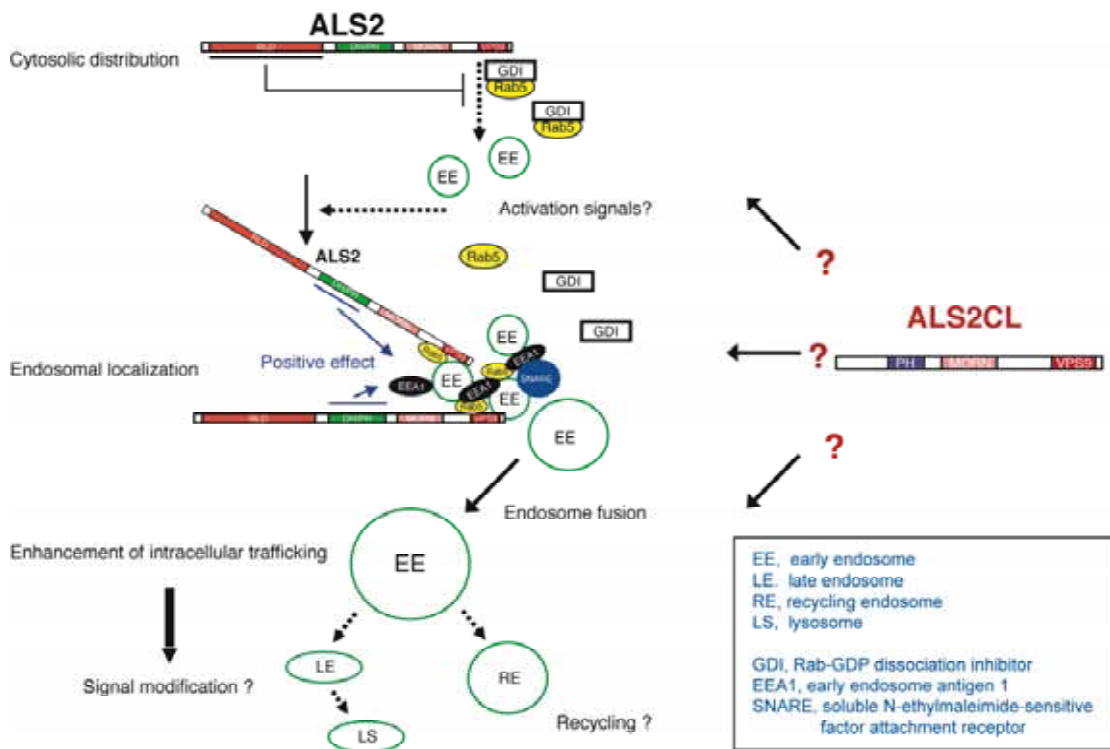


図 2 . ALS2/ALS2CL タンパク質の分子機能とエンドゾーム動態調節

での細胞内分布・挙動を分子生物学的・生化学的・細胞生物学的手法により解析した結果、2種類の因子はいずれも新規 DNA 結合ドメインを介して *HD* 遺伝子転写調節領域に存在する 3ヶ所の 7塩基配列に特異的に結合することが明らかとなった。さらに、同結合領域 7塩基配列は、神経細胞において特異的に機能している配列であることが明らかとなった(図3)。両因子は、ともに類似したドメイン構造を有する新規ファミリータンパク質に属し、アミノ酸配列内に存在する核内移行シグナルおよび核外移行シグナルの機能に依存して細胞質と核の間を移動する「核シャトル」因子であることが判明した。また、細胞で強制発現した当該因子は核内ではなく細胞質に存在することも明らかとなった(J. Biol. Chem., 279, 2004)。最近、これらの因子が、多くの神経細胞死の要因とされている「酸化ストレス」により、核内に移行することが明らかにされ、細胞死刺激に呼応した *HD* 遺伝子発現調節を行っている可能性が示唆されている。

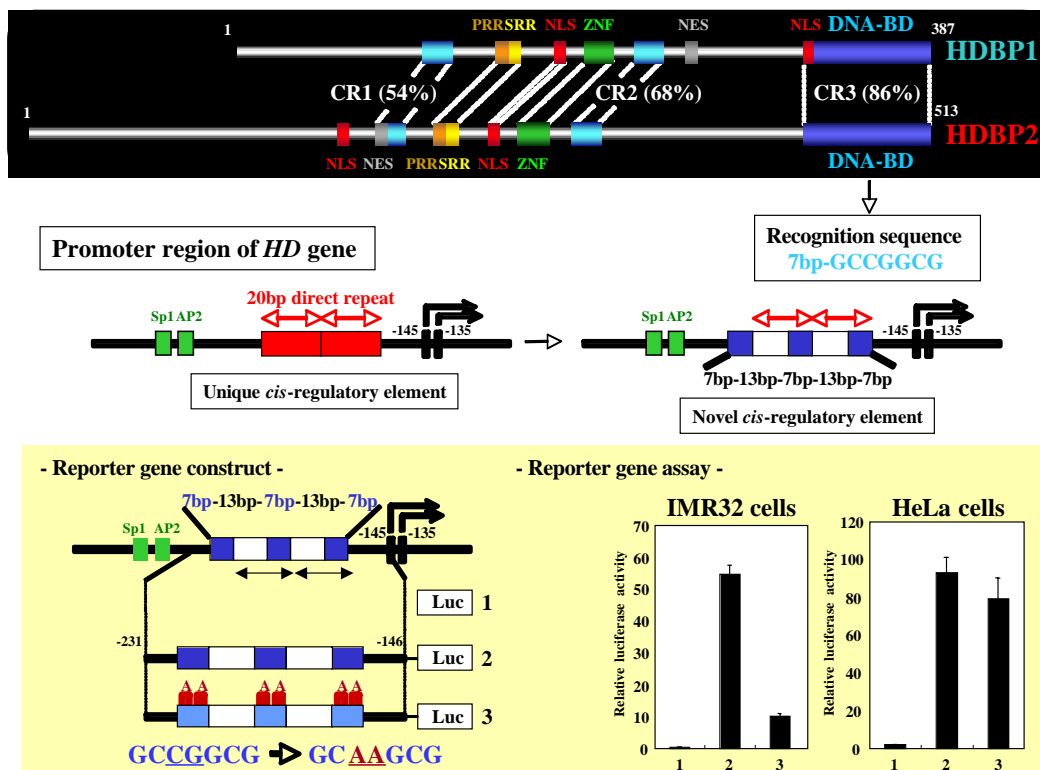


図3. HDBP1とHDBP2の機能ドメインとHD遺伝子プロモーター領域内の神経細胞特異的に機能する新規7bpシス配列

3.2 神経変性疾患モデル動物の開発と神経難病治療薬スクリーニング系ならびに評価系の開発

(1) 実施の内容

神経難病の治療法を確立してゆくためには、神経変性疾患発症のメカニズム(分子病態)を解明すると同時に、疾患を再現するモデル動物を作製することが重要な方向性の1つであると考えられる。神経難病の多くは、運動障害や知能・精神・人格障害を伴うことから、病気の本質的理解、さらには防御・治療法や治療薬等の開発とそれらの評価研究といった長期的展望に立った場合、よりヒトに近似した脳・神経系を有する動物あるいは内因性病因遺伝子の変異によって同一の病態を示すモデル動物 (Authentic Disease Animal Model) を開発することが重要である。

我々は、このような視点より、マウスによる疾患モデル動物の作出、および中型実験動物として注目されているミニプタを用いたHD遺伝子導入ミニプタの作出を平行して行ってきた。マウスは、実験動物としての歴史も古く、さまざまな遺伝子改変マウスの作出に関する方法もすでに確立されている。したがって、疾患モデルマウスを作製することは、疾患発症のメカニズムの解明に役立つのみならず、疾患

の治療法・治療薬の開発にとっても必須のものであると考えられる。一方、ミニブタは生理・解剖学的にヒトに類似する点が多く、特に前脳の発達は齧歯類に比べて著しく、解剖学的にヒトの神経系に類似している。さらに、感情、記憶・認知に至る高等精神活動や機能を有することから、ミニブタは脳・神経変性疾患のモデル実験動物として極めて有用であると考えられる。

また、本研究課題においては、神経細胞死抑制作用あるいは細胞生存促進作用を有する薬剤・低分子化合物のスクリーニング系を確立し、効率的な治療薬発見・同定の方法論の確立も目指す。そして、上記のモデル動物との組み合わせによる薬剤評価系を確立し、薬剤の生体内における作用および疾患治療効果に関する実験科学的根拠を獲得し、それらに基づいた具体的疾患治療方法の確立を目指す。以下に、本研究課題における主要研究項目の概略を述べる。

1) NAIP トランスジェニックマウスを用いた神経変性疾患生体治療モデル実験

NAIP タンパク質が生体内、特に脳神経系においてどのような生理活性を有するかについて検討するため、ヒト *NAIP* 遺伝子を発現する遺伝子導入マウス(トランスジェニックマウス)を作出する。まず、本実験で導入する2種類の *NAIP* 遺伝子コンストラクトを構築する。1つは、NAIP 全長を含むもの(CNF)であり、もう1種類は抗アポトーシス活性を有する BIR domain を含む NAIP の N 端側を含む遺伝子コンストラクト(CNN)である。プロモーターとしては、脳神経系を含めたさまざまな組織・細胞で高発現することが知られている CAG プロモーターを用いる。そして、作出された2系統のトランスジェニックマウスを用いて、bilateral common carotid artery occlusion による一過性脳虚血障害モデルを作製し、神経細胞(海馬 CA1 細胞)の傷害あるいは生存に対する NAIP タンパク質発現の影響について検討する。

2) *Als2* ノックアウトマウス(ALS2 モデルマウス)の作出と分子病態解析

ALS2 は *ALS2* 遺伝子機能喪失により発症する劣性遺伝性疾患である。従って、*ALS2* 遺伝子の分子機能の解明ならびに ALS2 病態モデル動物の作製のためには、遺伝子破壊法による *Als2* 遺伝子ノックアウトマウスを作出することが必須である。本研究項目では、まずマウス *Als2* 遺伝子構造を解明し、それを基にノックアウトマウス作出のためのターゲティングベクターを作製する。次に、作製したターゲティングベクターをマウス ES 細胞に導入し、相同組換え体 ES クローンのスクリーニングを行う。そして、得られた相同組換え体 ES クローンをさらに胚に移植することにより、キメラマウスの作出を行う。なお、ES 細胞およびキメラマウス作出実

験については東京大学医科学研究所岩倉洋一郎教授との共同研究により遂行する。その後、キメラマウスと正常マウスの交配により、生殖系列キメラの同定およびヘテロ欠損マウスの作出を行い、さらにヘテロ欠損マウス交配により、最終的に *A1s2* 遺伝子ノックアウトマウスを得る。得られたノックアウトマウスは、運動ニューロン疾患の格好の動物モデルとなることが期待され、該当マウスを用いることにより、疾患の分子病態解析および治療法への応用に利用する。

3) NAIP 発現を指標にした低分子化合物薬剤スクリーニング系および評価系の開発

NAIP 遺伝子発現上昇は、「酸化ストレス」に対する生体防御のための鍵となると考えられる。*NAIP* 遺伝子の発現を人為的にしかも至適なレベルに上昇させることができる薬剤が開発されれば、様々なストレスにより引き起こされる神経細胞死を阻止できると考えられる。そのような発想に基づいて、細胞における *NAIP* 遺伝子・タンパク質発現を特異的に上昇させる低分子化合物のスクリーニング系の開発を行う。開発の第1段階として、生体サンプル中の *NAIP* レベルを高感度に検出できる sandwich-ELISA 法を開発する。次に、低分子化合物処理後の培養細胞における内因性の *NAIP* タンパク質発現を新たに開発した sandwich-ELISA 法により検出し、*NAIP* タンパク質発現を上昇させる化合物の同定を試みる。そして、*NAIP* を特異的に上昇させる化合物に関して、酸化ストレスに伴う細胞死を抑制する活性が存在するか否かを培養細胞実験により検証する。

4) 上記スクリーニング系を用いた抗神経細胞死化合物の同定

上記の実験により同定された低分子化合物の生体内投与が個体レベルにおいても神経細胞死を抑制するか否かについての検証を行うため、急性脳虚血モデル動物(マウス・スナネズミ)を作製し、それら個体における神経細胞死に対する化合物投与の効果を解析する。また、脳内における薬物効果の分子的基盤を明らかにするため、化合物投与による脳内 *NAIP* およびその他の抗アポトーシス因子の発現動態についての解析も行う。さらに、慢性的神経疾患に関しては、すでに多数利用されている変異型 *SOD1* 発現 ALS モデルマウスに投与することにより、生体におけるその薬剤の効果に関して検討する。

5) HD モデルミニプタの系統化ならびに分子病態解析

ハンチントン病(HD)は大脳基底核線条体の尾状核および被核の神経細胞が特異的に侵される神経変疾患である。その原因遺伝子はヒト染色体 4p16.3 にマップ

され、HD 遺伝子 (HD) として単離・同定されている。ハンチントン病患者では HD 遺伝子がコードしている huntingtin (htt) タンパク質のアミノ末端に存在するポリグルタミン残基の異常伸長が常に認められている。ポリグルタミンの異常伸長と発症の相関について、トランスジェニックあるいはノックインマウスを用いて一連の解析がなされた。一方、我々は SLA 研究所 (農林省所管法人・農業特定生物研究機構出資研究開発株式会社: 1993 年 4 月 ~ 2000 年 3 月) との共同研究により、遺伝子導入ミニブタの作出技術を確立し、さらに病変型ミニブタ内因性 HD 遺伝子導入ミニブタの作出に成功した。これまでに 5 系統のファウンダー HD ミニブタと 12 個体の F1 HD トランスジェニックミニブタを得ている。うちファウンダー雄 1 頭が 6 ヶ月齢以降から錐体外路系の異常によると考えられる進行性の旋回運動を呈しており、格好の HD モデルであると考えられる。

ミニブタは、内因性の HD 遺伝子変異によって疾患を発症したことから、ヒト神経疾患の authentic disease model として適格であるといえる。これらの HD トランスジェニックミニブタはハンチントン病の分子病態解析と治療技術開発と評価系の確立にとどまらない。本研究課題ではハンチントン病の分子病態の解析を目標とする。

(2) 得られた研究成果の状況

1) NAIP トランスジェニックマウスを用いた神経変性疾患生体治癒モデル実験

マイクロインジェクション法により NAIP 全長トランスジェニック個体 (CNF マウス) および NAIP N 末トランスジェニック個体 (CNN マウス) を作出し、系統化した。そして、導入遺伝子の発現様式についてウエスタンブロットおよび免疫組織学的手法により解析を行った。発現については、ほぼいずれの臓器においても認められたが、発現レベルは低いものであった。また、同一導入遺伝子をもつトランスジェニック個体においても、系統の違いにより各臓器における発現量には差異が認められた。脳では、嗅球、海馬、大脳皮質、小脳プルキンエ細胞、脳神経核などに発現することが確認された。また、2 年間にわたる継続的観察では、CNF および CNN 系統とも明らかな病態・行動異常は認められなかった。

いずれのトランスジェニックマウスの系統とも海馬での発現が確認されたことから、bilateral common carotid artery occlusion による障害モデルを作製し、海馬 CA1 細胞の生存に対する NAIP タンパク質発現の影響について検討した。その結果、CNF ならびに CNF マウスのいずれにおいても虚血後細胞死は、コントロールマウスと同程度か、あるいはむしろ悪化するという予想に反する結果が得られた。しかしながら、一方では全長 NAIP トランスジェニックマウスから樹立した NAIP 高発現初代培養細胞では酸化ストレスに対する抵抗性を示したことから、ある種の

生体刺激に関して細胞レベルでは NAIP は細胞死抑制に働くことが再確認された。これまでの解析から、内因性 NAIP 遺伝子発現は通常の状態では低く抑えられているが、虚血性細胞障害時に NAIP 遺伝子の発現が一時的に高まるという知見を rat focal ischemia モデルから得ている。

次に、NAIP の生体内での分子作用をさらに探るため、運動神経変性マウス（変異型 SOD1 遺伝子トランスジェニックマウス：筋萎縮性側索硬化症 1 型マウス）と NAIP トランスジェニックマウスとの交配を行い、遅発性・進行性の神経変性疾患における細胞死あるいは病状進行に対する NAIP 発現の防御効果についての実験を行った。その結果、上記の虚血実験と同様に、過剰発現した NAIP には変異型 SOD1 発現 ALS マウスの発症ならびに進行を遅延させる作用はないことが判明した。従って、恒常的にしかも個体内で過剰発現している全長 NAIP/NAIP-BIR は、本来の NAIP の作用と考えられている抗アポトーシス活性が何らかの生体メカニズムによりマスクされている可能性が示唆される。個体における NAIP の分子作用機序に関しては、さらに慎重な解析を要すると考えられる。

2) *Als2* 遺伝子ノックアウトマウスの作出 (図 4)

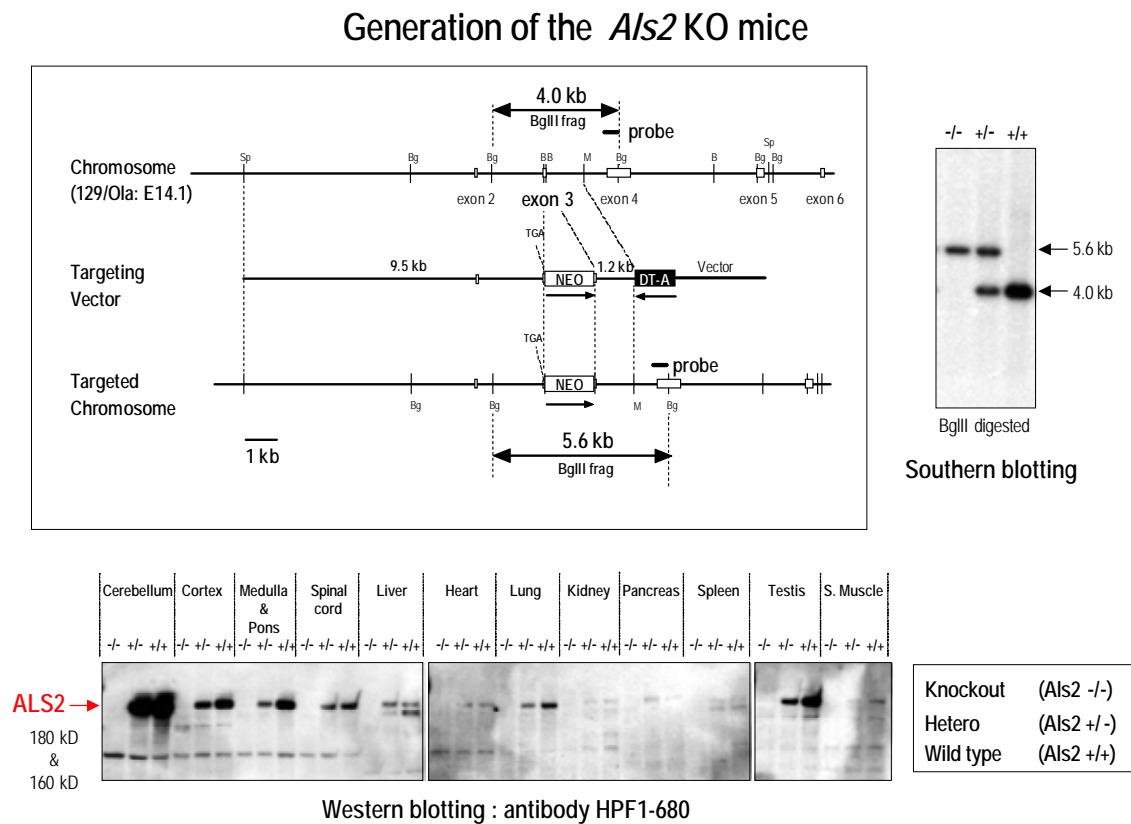


図 4. *Als2* 遺伝子ノックアウトマウスの作出

まず始めに、ノックアウトマウスを作製するために必要な遺伝子構築(ターゲット

ティングベクター)の作製を目標として実験を行った。マウス相同遺伝子(*Als2*)をコードする cDNA 断片をプローブとして、マウスゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングし、マウス *Als2* 遺伝子の第 2 エクソンから第 9 エクソンを含むおよそ 30 Kb のゲノム領域をカバーする複数のゲノミッククローンを単離した。マウス第 3 エクソンを破壊するため、得られたクローンの *Als2* 第 3 エクソンのタンパク質コード領域にネオマイシン耐性遺伝子を挿入した *Als2* 遺伝子ノックアウト用のターゲティングベクターを完成させた(図 4)。東京大学医科学研究所岩倉洋一郎教授との共同研究により、作製したターゲティングベクターを ES 細胞 E14.1 に導入し、G418 存在下で生育する ES クローンを合計 509 クローン選抜した。単離したクローンについて PCR 法およびサザンブロット法によりスクリーニングを行い、最終的に 14 個の相同組換え体を得ることに成功した。さらに、6 クローンからキメラマウス作製を行い、4 クローンに由来するキメラ個体が合計 47 匹得られた。続いて、キメラマウスと正常マウスとの交配により生殖系列キメラの同定、ならびに F1 マウスの作出を行い、最終的に F1 マウス兄妹交配により F2 マウスにおいて *Als2* 遺伝子ノックアウトマウスの産出に成功した(2003 年 6 月)。遺伝子破壊については PCR およびサザンブロット法により、ALS2 タンパク質の発現喪失についてはウエスタンブロット法によりそれぞれ確認した(図 4)。現在、計画的交配により F2 マウスを 200 匹以上作出し、行動学的解析を含めた継続観察を行っている。また、遺伝的背景の影響を排除することを意図して、当該ノックアウトマウスの C57BL/6J ならびに FVB/N 系統への純系化も併せて行っている。

3) 内因性 NAIP 遺伝子誘導低分子化合物のスクリーニング法の開発

本研究では、新たな抗ヒト NAIP モノクローナル抗体を作製し、その抗体をマイクロタイタープレートに固相化した NAIP-ELISA プレートを開発した。そして、THP-1 培養細胞を用いた薬剤スクリーニングと sandwich-ELISA による NAIP 測定法を組み合わせることにより、high-throughput の低分子化合物スクリーニング系を確立した(神経細胞死抑制作用を有する化合物を用いた医薬：特開 2004-123562)(図 5)。同方法を用いて 953 種類の低分子化合物をスクリーニングした結果、NAIP 発現を誘起させる 30 種類の化合物を見いだした。いずれの化合物に関しても、酸化ストレスに伴う細胞死を抑制する活性が存在することを培養細胞レベルで確認している。そして、その中で最も細胞死抑制効果の高い化合物についてさらに解析した結果、その抑制作用が *NAIP* 遺伝子発現の特異的上昇に依存していることが確認された。さらに、当該化合物がドパミン受容体に対するアンタゴニストであることが判明した。しかし、NAIP 上昇に起因した神経細胞死抑制作用はドパミン受容

体作用に依存せず、むしろ別の分子機構（未同定）により制御されていることが判明した（J. Cereb. Blood Flow Metab., 2005）。

4) 低分子化合物の個体における神経細胞死抑制効果の検証

急性脳虚血モデル動物（スナネズミ）を作製し、個体における神経細胞死に対する上記化合物投与の効果解析した。

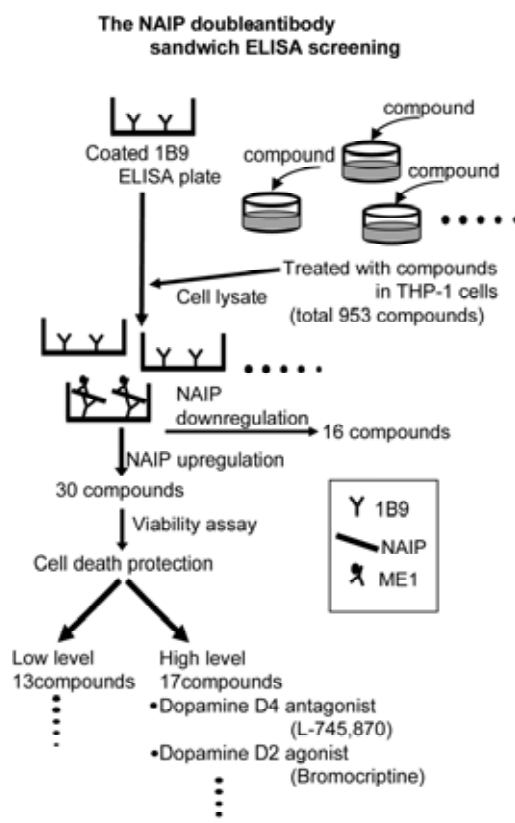


図5. NAIP-ELISA 法による NAIP 発現誘導低分子量化合物のスクリーニング

その結果、虚血前 1 回の経口投与により投与量に依存して（最高 200 mg/kg まで）海馬 CA1 神経細胞の遅発性神経細胞死が顕著に抑制された。また、同時にモデル動物の脳内における NAIP を含めた抗アポトーシス因子の発現を、免疫組織学的ならびにウエスタンブロット法により確認した結果、化合物投与により細胞死を免れた神経細胞において NAIP 発現が特異的にしかも顕著に上昇していることが明らかとなった（J. Cereb. Blood Flow Metab., 2005）。

さらに、同化合物を神経変性疾患モデル（変異型 SOD1 遺伝子トランスジェニックマウス：筋萎縮性側索硬化症 1 型マウス）に継続的に投与するにより、慢性的神経細胞死に対する当該化合物の防御作用についての評価を行った。その結果、顕著

な発症遅延効果が存在することが判明した。現在、既に細胞死抑制活性が培養細胞レベルで認められている残りの 29 種類の化合物についても解析を進めている。

5) HD モデルミニブタの系統化ならびに分子病態解析

2 頭のトランスジェニックミニブタ雌 (F0) 個体について、各個体 3 度の自然交配を行い、合計 38 頭の F1 個体が産出された。導入遺伝子を特異的に増幅・検出する PCR 法により、そのうちの 12 頭が遺伝子導入 F1 個体 (3 頭は死産) であることが確認された。サザンブロット解析により、1 頭の F0 個体から多コピー数

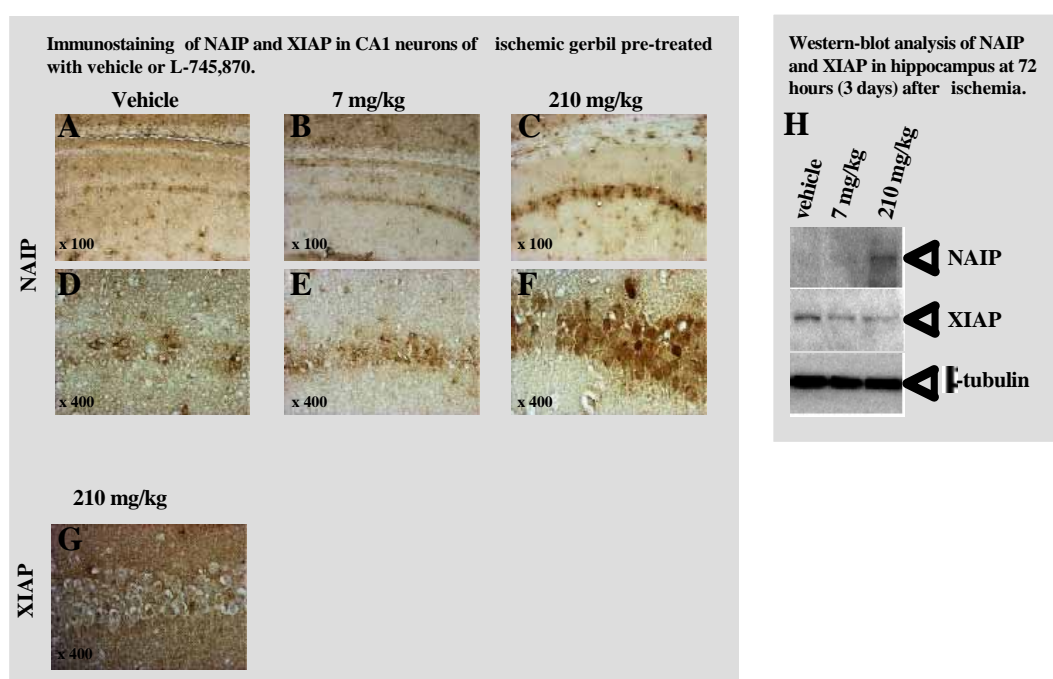


図 6 . NAIP 発現誘導低分子化合物投与による神経細胞死抑制効果

導入個体及び単一コピー導入個体の 2 系統の F1 個体の取得が確認された。もう一方の F0 個体から得られた F1 個体は死産個体であったため、この個体由来の系統樹立は成功していない。得られたすべての F1 個体の遺伝子型を、尾から抽出した各ゲノミック DNA サンプルを用いてサザンブロット法にて解析した。その結果、異なった遺伝子型を有する 3 種類の F1 ミニブタが同定された。性成熟した雄 F1 個体 (1 頭) と正常雌個体との自然交配を行い、F2 個体の作出を 2 回試みたが不成功に終わった。その原因を解析した結果、この F1 個体は無精子症であることが判明した。次に、各遺伝子型を有するミニブタ各 1 個体を屠殺し、各組織内における導入変異

型 HD 遺伝子の発現を、mRNA およびタンパク質レベルで解析した。その結果、導入遺伝子の発現はいずれも極めて低いレベルであった。従って、以前旋回運動および精子形成異常が観察された遺伝子導入ミニブタ雄 (F0) 1 個体も含めて、現時点ではこれらが導入変異型 HD 遺伝子によるものかどうかについては不明である。交配不可能な個体については、将来的な人工授精あるいは体細胞クローン作製の可能性を考え、精子および細胞の凍結保存を行った。

次に、F0 雄個体の精子 DNA 中の CAG リピート配列の不安定性の有無を検証するために、導入遺伝子内 (75 CAG リピート) の CAG リピート領域を特異的に増幅・検出する PCR 法を用いて、この個体の精子 DNA 中の CAG リピート数の変動を解析した。結果は、この個体の精子 DNA 中の導入遺伝子のもつ CAG リピート数には大きな変動は認められず、安定性を示すものであった。また、F0 から F1 個体への CAG リピートの世代間伝搬に関して検討した結果、世代間にリピート数の変動は観察されず、安定して継代されることが示された (図 7)。従って、ミニブタにおいてはマウスと同様に CAG リピート配列の複製および配偶子への分配は安定に行われ、不安定性を示すヒトの場合とは異なることが示唆された。

PCR amplification of the CAG repeat region of transgene

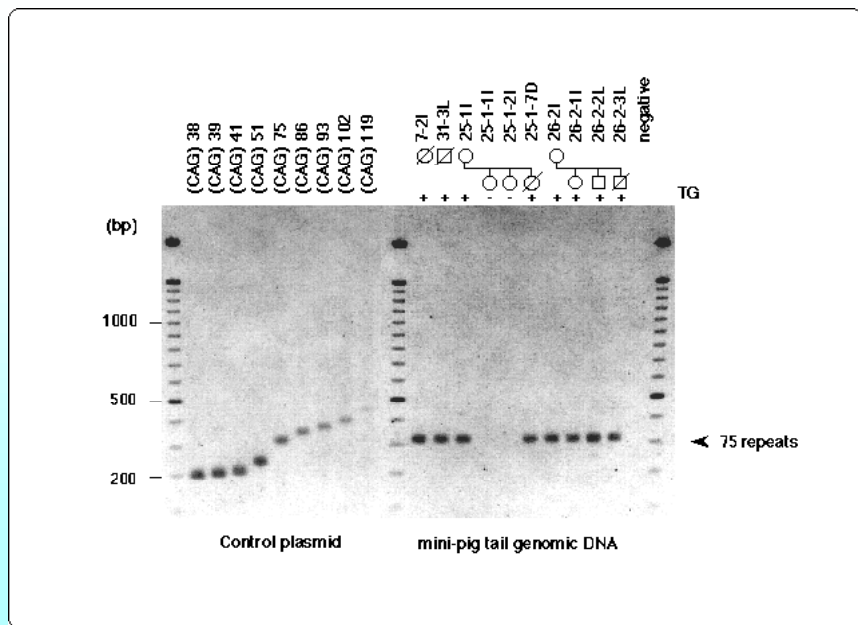


図 7. トランスジェニックミニブタにおける CAG リピート数の PCR による解析

3.3 今後の研究の展開および社会への波及効果について

本研究プロジェクトにおいては、これまでに述べてきたように、「アポトーシス医療技術の開発」に向けての基盤作りを行うために、複数の研究項目に関してそれ

ぞれ個別の目標を掲げて研究を推進してきた。その結果、これまでにそれぞれ研究計画に沿って、予想以上のペースでの成果が得られている。今後に関しては、これまでに得られた神経細胞の生存・細胞死に関する分子メカニズムをより詳細に解析するとともに、神経変性疾患の治療法・治療薬開発に直結する研究を重点的に推進し、治療法・技術の具体化を試みる計画である。そのために、これまで別個に行っていた研究項目の研究で得られた知見、研究手法、および研究材料の融合的・効率的利用を促進することにより、脳・神経特異的アポトーシス抑制分子の動態とその制御技術を用いたゲノム・分子医療技術の開発への実現化に向けて研究を加速させることを目指す。特に、今後の研究の大きな進展が期待される「NAIP 発現を指標にした化合物スクリーニング」に関しては、スクリーニングならびに pharmacological designing の強化による新たな神経細胞死保護・防御化合物の同定を行う。また、化合物の薬剤効果を検証するために、これまで用いてきた急性脳虚血モデルに加えて、遺伝子改変マウス（NAIP トランスジェニックマウス、変異 SOD1 トランスジェニックマウス、ならびに *A1s2* ノックアウトマウスなど）を積極的に利用する計画である。一方、このような発展・応用研究に平行して、薬剤効果の作用分子機序の解明を含めた神経細胞生存・細胞死ならびに神経変性疾患の分子病態機構の研究に関しては、「酸化ストレス」および「細胞内物質移送異常」というこれまでに明らかにされてきた脳神経系での異常を指標に、NAIP、ALS2、HD 遺伝子発現調節因子、ならびにその関連因子の細胞内における個々の分子機能、さらには神経細胞の生存維持において機能するこれらの因子の分子的接点の探索を行う。それにより、神経細胞生存機構の実体、そしてその破綻が原因となって引き起こされる神経細胞機能障害、神経細胞死、さらには神経変性といった神経疾患における一連の発症分子機構のより明確な理解が可能となる。その結果、分子発症機構を基盤にした治療薬および治療法、いわゆる“pathogenesis/mechanism-based medicine”の開発がより促進されることが期待される。そのような意味において、我々が既に開発している NAIP 発現を指標にした低分子化合物スクリーニング法は、この“pathogenesis/mechanism-based medicine”の先鞭をつけるものである。従って、本方法により同定されるであろう新たな神経細胞保護・防御薬の解析ならびに臨床応用は、アポトーシス医療を基盤とする今後の神経難病本態医療技術の開発に向けての成功を占う重要な研究であると考えられる。

4 . 研究実施体制

(1)体制

研究チームの構成

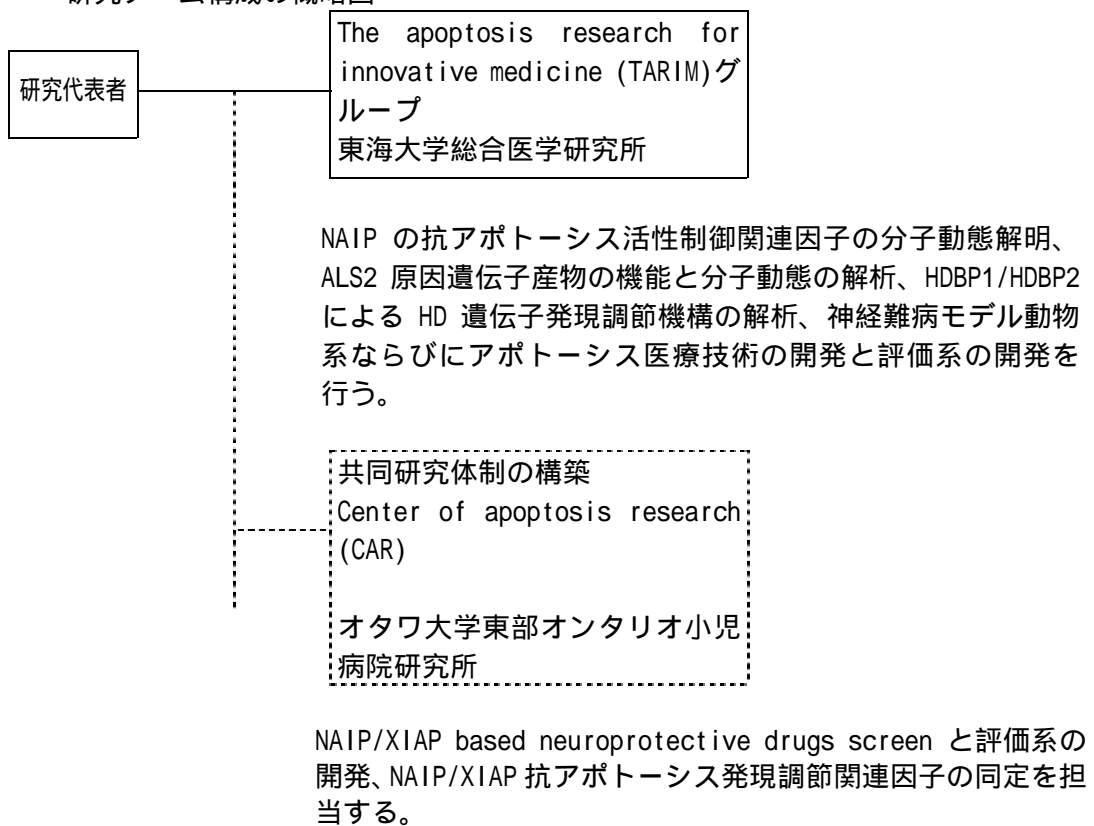
The Apoptosis Research for Innovative Medicine (TARIM) 研究チーム：

東海大学総合医学研究所に開設していた国際共同研究施設をそのまま使用した。東海大学からの参加する3名のスタッフに加えて、研究員2名、技術員4名、研究補助者1名、大学院生1名、さらに非常勤勤務者3名(延べ人数)の実施体制を構築した。

共同研究グループ：オタワ大学 Apoptosis Research Center (ARC)：

カナダ側国際共同研究代表者 (Alex MacKenzie 教授・研究所長、R. Korneluk 教授)らと共同して新規に獲得したグラントによって開設される ARC の研究施設を用い、共同研究を実施した。

研究チーム構成の概略図



(2)メンバー表

東海大学グループ (TARIM)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
秦野伸二	東海大学・ 総合医学研究所	助教授	ALS2 蛋白質分子機能および疾患モデル動物解析	平成 13 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
大須賀等	東海大学・ 総合医学研究所	助教授	NAIP の分子機能および疾患モデル動物解析	平成 13 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
田中一則	東海大学・ 総合医学研究所	研究員	HD 遺伝子発現調節分子機構の解析	平成 13 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
國田竜太	派遣先	CREST 研究員	ALS2 蛋白質分子機能および疾患モデル動物解析	平成 14 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
水村 光	派遣先	CREST 研究員	ALS2 蛋白質分子機能および疾患モデル動物解析	平成 14 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
柳澤佳子	派遣先	CREST 技術員	ALS2 蛋白質分子機能および疾患モデル動物解析	平成 14 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
宮本なつき	派遣先	CREST 技術員	HD 遺伝子発現調節分子機構の解析	平成 14 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
古曳英理	派遣先	CREST 技術員	NAIP の分子機能および疾患モデル動物解析	平成 13 年 9 月～ 平成 16 年 6 月
須賀恵津子	派遣先	CREST 技術員	NAIP の分子機能および疾患モデル動物解析	平成 14 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
小俣真紀	派遣先	研究補助 員	研究補助業務および事務 業務	平成 14 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
大友麻子	東海大学・ 大学院生	非常勤研 究補助員	ALS2 蛋白質分子機能および疾患モデル動物解析	平成 13 年 6 月～ 平成 16 年 3 月
宗像真智子	派遣先	非常勤研 究補助員	研究補助業務および事務 業務	平成 13 年 9 月～ 平成 14 年 8 月
唐下和子	派遣先	非常勤研 究補助員	研究補助業務	平成 14 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
小清水比呂子	派遣先	非常勤研 究補助員	研究補助業務	平成 14 年 4 月～ 平成 17 年 3 月

5 . 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等：該当なし

(2)招聘した研究者等：該当なし

6 . 主な研究成果

(1)論文発表 (国内 0件、海外 14件)

- 1) Hadano, S., Hand, C. K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R. S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y., Singaraja, R., Figlewicz, D. A., Kwiatkowski, T., Hosler, B. A., Sagie, T., Skaug, J., Nasir, J., Brown, R. H., Jr., Scherer, S. W., Rouleau, G. A., Hayden, M. R., and Ikeda, J. -E.: A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nature Genet.* **29** (2), 166-173, 2001.
- 2) Uchida, M., Shimatsu, Y., Onoe, K., Matsuyama, N., Niki, R., Ikeda, J. -E., and Imai, H.: Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Res.* **10** (6), 577-82, 2001.
- 3) Wang, F., Corbett, D., Osuga, H., Osuga, S., Ikeda, J.-E., Slack, R. S., Hogan, M. J., Hakim, M., and Park, D. S.: Inhibition of cyclin-dependent kinase improves CA1 neuronal survival and behavioral performance after global ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22** (2), 171-182, 2002.
- 4) Xu, M., Okada, T., Sakai, H., Miyamoto, N., Yanagisawa, Y., MacKenzie, A. E., Hadano, S., and Ikeda, J. -E.: Functional human NAIP promoter and transcriptional elements of the human *NAIP* and *ΨNAIP* genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1574** (1), 35-50, 2002.
- 5) Okada, T., Gondo, Y., Goto, J., Kanazawa, I., Hadano, S., and Ikeda, J. -E.: Unstable transmission of the RS447 human megasatellite tandem repetitive sequence that contains the *USP17* gene encoding a functional deubiquitinating enzyme. *Hum. Genet.* **110** (4), 302-313, 2002.
- 6) Singaraja, R. R., Hadano, S., Metzler, M., Givan, S., Wellington, C. L., Warby, S., Yanai, A., Gutekunst, C. -A., Leavitt, B. R., Yi, H., Fichter, K., Gan, L., McCutcheon, K., Chopra, V., Michel, J., Hersch, S. M., Ikeda, J. -E., and Hayden, M. R.: HIP14, a novel ankyrin domain-containing protein, links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. *Hum. Mol. Genet.* **11** (23), 2815-2828, 2002.
- 7) Kunita, R., Otomo, A., and Ikeda, J.-E.: Identification and characterization of novel members of the CREG family, putative secreted glycoproteins expressed specifically in brain. *Genomics* **80** (5), 456-460, 2002.
- 8) Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E., Yasuda, M., Osuga,

- H., Nishimoto, T., Naurumiya, S., and Ikeda, J. -E.: ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum. Mol. Genet.* **12** (14), 1671-1687, 2003.
- 9) Nagano, I., Murakami, T., Shiote, M., Manabe, Y., Hadano, S., Yanagisawa, Y., Ikeda, J. -E., and Abe, K.: Single-nucleotide polymorphisms in uncoding regions of *ALS2* gene of Japanese patients with autosomal-recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Res.* **25** (5), 505-509, 2003.
- 10) Tanaka, K., Shouguchi-Miyata, J., Miyamoto, N., and Ikeda, J. -E.: Novel nuclear shuttle proteins, HDBP1 and HDBP2, bind to neuronal cell specific *cis*-regulatory element in the promoter for the human Huntington's disease gene. *J. Biol. Chem.* **279** (8), 7275-7286, 2004.
- 11) Storbeck, C. J., Drmanic, S., Daniel, K., Waring, J. D., Jirik, F. R., Parry, D. J., Ahmed, N., Sabourin, L. A., Ikeda, J. -E., and Korneluk, R. G.: Inhibition of myogenesis in transgenic mice expressing the human DMPK 3'-UTR. *Hum. Mol. Genet.* **13** (6), 589-600, 2004.
- 12) Kunita, R., Otomo, A., Mizumura, H., Suzuki, K., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Hadano, S., and Ikeda, J. -E. : Homo-oligomerization of ALS2 through its unique carboxy-terminal region is essential for the ALS2-associated Rab5 guanine nucleotide exchange activity and its regulatory function on endosome trafficking. *J. Biol. Chem.* **279** (37), 38626-38635, 2004.
- 13) Hadano, S., Otomo, A., Suzuki-Utsunomiya, K., Kunita, R., Yanagisawa, Y., Showguchi-Miyata, J., Mizumura, H., and Ikeda, J. -E. : ALS2CL, the novel protein highly homologous to the carboxy-terminal half of ALS2, binds to Rab5 and modulates endosome dynamics. *FEBS Lett.* **575** (1-3), 64-70, 2004.
- 14) Okada, Y., Sakai, H., Kohiki, E., Suga, E., Yanagisawa, Y., Tanaka, K., Hadano, S., Osuga, H., and Ikeda, J. -E. : A Dopamine D4 receptor antagonist attenuates ischemia-induced neuronal cell damage via upregulation of neuronal apoptosis inhibitory protein. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2005 (in press).

(2)学会発表

招待、口頭講演 (国内12件、海外5件)

- 1) Tanaka, K., Shouguchi-Miyata, J., and Ikeda, J. -E.: Identification of the candidate transcriptional factors for the human Huntington's disease gene and DNA binding protein bound to the proximal of the CAG repeat. WFN2001 19th International Meeting of the World Federation of Neurology Research Group on Huntington's Disease,

Copenhagen, Denmark, August 25-28, 2001.

2) Hadano, S. : A causative gene underlying familial amyotrophic lateral sclerosis 2 (ALS2). The Third International Symposium on the Study of Brain Function. Program, P112 (019-1), Fukuoka, Japan, May 9-10, 2002.

3) 秦野伸二、Hand, C. K.、大須賀等、柳沢佳子、大友麻子、Devon, R. S.、宮本なつき、将口宮田淳子、岡田義則、Singaraja, R.、Figlewicz, D. A.、Kwiatkowski, K.、Hosler, B. A.、Sagie, T.、Skaug, J.、Nasir, J.、Brown, R. H., Jr.、Scherer, S. W.、Rouleau, G. A.、Hayden, M. R.、池田穰衛：家族性筋萎縮性側索硬化症 2 型 (ALS2) の原因遺伝子産物は 3 つの GEF ドメインをもつ新規 GTPase 調節因子か？第 19 回染色体ワークショップ抄録集、p28 (39)、神戸、February 1, 2002.

4) Ikeda, J. -E., Otomo, A., Kunita, R., Yoshida, E., Hadano, S., and Osuga, H.: ALS2 gene accounting for amyotrophic lateral sclerosis 2 encodes multi guanine exchange factor (GEF) domains acting for small GTPases. 神経化学 41 (3)、第 45 回日本神経化学学会大会抄録号、p354 (P01-F-18/MS4-6)、札幌、July 17-19, 2002.

5) 田中一則、将口 (宮田) 淳子、池田穰衛: Functional analysis of the putative transcription factors for human Huntington's disease gene. 神経化学 41 (3)、第 45 回日本神経化学学会 (札幌) 大会抄録集号 41(3)、p355(P01-F-19)、札幌、July 17-19, 2002.

6) 田中一則、宮本なつき、将口 (宮田) 淳子、池田穰衛: Nuclear Shuttle 活性を有する転写調節因子の解析: ハンチントン病遺伝子転写の分子機序、第 20 回染色体ワークショップ、p31 (38)、京都、January 30-February 1, 2003.

7) 池田穰衛: NAIP の抗アポトーシス機序と神経変性防御薬の開発. 生化学 74 (8)、第 75 回日本生化学会大会発表抄録集、p645 (2S28-6)、京都、October 14-17, 2002.

8) Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E., Yasuda, M., Osuga, H., Nishimoto, T., Naurumiya, S., and Ikeda, J. -E.: ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. 神経化学 42 (2-3)、264 (N057/MS1-4)、第 46 回日本神経化学学会大会抄録号、新潟、September 24-26, 2003.

9) 岡田義則、酒井治美、古曳英理、須賀恵津子、大須賀等、池田穰衛: NAIP 発現誘導化合物の in vitro および in vivo における抗アポトーシス効果. 第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p441 (01L-5)、神戸、December 10-13, 2003.

10) Kunita, R. and Ikeda, J. -E.: ALS2 is a novel guanine nucleotide exchange factor for Rab5 and is implicated in endosomal dynamics. Keystone Symposia, Traffic control: Rab GTPases in Vesicular Transport (J3), Breckenridge/Colorado, U.S.A., January 20-25,

2004.

11) Tanaka, K., Shouguchi-Miyata, J., Miyamoto, N., and Ikeda, J. -E. : The analysis of molecular function of nuclear-cytoplasm shuttling proteins, SLC2A4 and ZNF395, which bind to the novel cis-regulatory element in the human HD gene promoter. Human Genome Meeting 2004, Programme and Abstract book, p31 (workshop abstract no: 65)/ p114 (poster no: 269), Berlin, Germany, 2004.

12) Hadano, S., Kakuta, S., Sudo, K., Otomo, A., Kunita, R., Mizumura, H., Suzuki, K., Iwakura, Y., and Ikeda, J. -E. : Towards delineation of the pathogenesis for juvenile recessive motor neuron diseases: Generation and characterization of the Als2 knockout mice. Human Genome Meeting 2004, Programme and Abstract book, p30-31 (workshop abstract no: 64)/ p112 (poster no: 262), Berlin, Germany, 2004.

13) 池田穰衛：劣性遺伝の運動ニューロン疾患：ALS2 遺伝子変異と神経細胞死の機序．第 45 回日本神経学会総会、シンポジウム 3-4 脊髄小脳変性症と運動ニューロン疾患、東京、2004.

14) 秦野伸二：神経疾患の Mechanism-based Remedy．東海大学総合医学研究所第 7 回公開研究報告会、プログラム・要旨パンフレット、東京、2004.

15) 秦野伸二：ALS2 の分子病態解析-ALS2 タンパク質の分子機能およびモデルマウス作製の試み-．第 8 回新潟神経内科シンポジウム「ALS の病態と治療」、新潟、2004.

16) Okada, Y., Sakai, H., Kohiki, E., Suga, E., Tanaka, K., Hadano, S., Osuga, H., and Ikeda, J. -E. : Antiapoptotic effect of the NAIP up-regulating dopamine receptor ligands. 神経化学 43 (2-3) 361 (OB2-07)、第 47 回日本神経化学会 (大阪) 大会抄録号 (Neuro2004) 大阪、2004.

17) 池田穰衛：神経変性の mechanism-based 治療技術の開発：筋萎縮性側索硬化症．神経化学 43(2-3) 114、第 47 回日本神経化学会 (大阪) 大会抄録号 (Neuro2004) 大阪、2004.

ポスター発表 (国内 18 件、海外 10 件)

1) Hadano, S., Yanagisawa, Y., Miyamoto, N., Shouguchi-Miyata, J., Singaraja, R., Scherer, S. W., Rouleau, G. A., Hayden, M. R., and Ikeda, J. -E.: Identification and characterization of candidate genes for the juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS2) at human chromosome 2q33-q34. Eur.J.Hum.Genet. 9, 10th International Congress of Human Genetics, pp397(P1511), Vienna, Austria, May 15-19, 2001.

2) 秦野伸二、Hand, C., 大須賀等、柳沢佳子、大友麻子、Devon, R., 宮本なつき、将口淳子、岡田義則、Singaraja, R., Figlewicz, D., Kwiathowski, K., Hosler, B., Sagie, T., Skaug, J., Nasir, J., Brown, R., Jr, Scherer, S., Rouleau, G., Hayden, M., 池田穰衛：家族性筋萎縮性側索硬化症 2 型 (ALS2) の原因遺伝子および変異の同定．第 24 回

- 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p475 (1P-710)、横浜、December 9-12、2001.
- 3) 大友麻子、秦野伸二、大須賀等、岡田義則、柳沢佳子、池田穰衛：家族性筋萎縮性側索硬化症 2 型 (ALS2) 原因遺伝子 (*ALS2CR6*) のマウス相同遺伝子の単離および発現解析. 第 24 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p475 (1P-711)、横浜、December 9-12、2001.
- 4) 田中一則、将口 (宮田) 淳子、池田穰衛：ハンチントン病遺伝子転写調節候補因子及び CAG リピート近傍配列に結合する新規蛋白質の解析. 第 24 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p518 (2P-228)、横浜、December 9-12、2001.
- 5) Tanaka, K., Shouguchi-Miyata, J., Miyamoto, N., and Ikeda, J. -E.: Functional analysis of the putative transcription factors for the human Huntington's disease gene. Human Genome Meeting 2002, Programme and Abstract book, p115 (poster no:148), Shanghai, China, April 14-17, 2002.
- 6) Hadano, S., Hand, C. K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R. S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y., Singaraja, R., Figlewicz, D. A., Kwiatkowski, T., Hosler, B. A., Sagie, T., Skaug, J., Nasir, J., Brown, R. H., Jr., Scherer, S. W., Rouleau, G. A., Hayden, M. R., and Ikeda, J. -E.: Identification and characterization of the ALS2 causative gene that encodes a protein containing multiple GEF domains. Human Genome Meeting 2002, Programme and Abstract book, p191 (poster no:420), Shanghai, China, April 14-17, 2002.
- 7) Tanaka, K., Shouguchi-Miyata, J., Miyamoto, N., and Ikeda, J. -E.: Molecular behavior of the putative transcriptional factors for the human Huntington's disease. THE 15TH NAITO CONFERENCE ON MOLECULAR BIOLOGICAL APPROACHES FOR INTRACTABLE DISEASE [III]. PROGRAM, ABSTRACTS, LIST OF PARTICIPANTS、p82(PS[11]-27)、葉山 (湘南国際村センター、神奈川) October 2-5、2002.
- 8) 田中一則、宮本なつき、将口 (宮田) 淳子、池田穰衛：ハンチントン病遺伝子転写調節候補因子の細胞内分子動態、第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、P766 (2P-0406)、横浜、December 11-14、2002.
- 9) 國田竜太、大友麻子、池田穰衛：脳特異的に発現する新規推定分泌糖タンパク質、ヒト *CREG2* 並びにマウス *Creg2* の cDNA 単離と発現解析. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p583 (1P-0962)、横浜、December 11-14、2002.
- 10) Hadano, S., Yanagisawa, Y., Showguchi-Miyata, J., Otomo, A., Kunita, R., Mizumura, H., and Ikeda, J. -E.: Identification and characterization of a novel gene ALS2 C-terminal like (*ALS2CL*) which encodes a protein highly homologous to the carboxy-terminal half of the ALS2 protein. XIX International Congress of Genetics,

- Abstracts & Posters, p70 (3.A.0286), Melbourne, Australia, July 6-11, 2003.
- 11) Kunita, R., Otomo, A., and Ikeda, J. -E.: Identification and characterization of novel members of the CREG family putative secreted glycoproteins expressed specifically in brain. XIX International Congress of Genetics, Abstracts & Posters, p120 (1.C.0060), Melbourne, Australia, July 6-11, 2003.
- 12) Tanaka, K., Miyamoto, N., Shouguchi-Miyata, J., and Ikeda, J. -E.: Molecular behavior of novel nuclear shuttle proteins, HDBP1 and HDBP2, which are candidate transcriptional regulators for the human Huntington's disease gene. XIX International Congress of Genetics, Abstracts & Posters, p184 (3.E.0362), Melbourne, Australia, July 6-11, 2003.
- 13) Hadano, S., Otomo, A., Yanagisawa, Y., Showguchi-Miyata, J., Suzuki, K., Kunita, R., Mizumura, H., and Ikeda, J. -E.: ALS2 C-terminal like (*ALS2CL*): identification and characterization of the novel conserved gene that encodes a protein highly homologous to the carboxy-terminal half of the ALS2 protein. 神経化学 42 (2-3)、265 (N059)、第 46 回日本神経化学会大会抄録号、新潟、September 24-26、2003.
- 14) 田中一則、宮本なつき、池田穰衛：酸化ストレス応答による HD 遺伝子転写調節領域結合因子の細胞内局在変化. 第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p595 (1PA-337)、神戸、December 10-13、2003.
- 15) 大友麻子、秦野伸二、岡田武也、水村光、國田竜太、西嶋仁、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、古曳英理、須賀恵津子、安田政実、大須賀等、西本毅治、成宮周、池田穰衛：筋萎縮性側索硬化症 2 型遺伝子産物 ALS2 の Rab5GEF 活性とエンドソーム動態調節機能. 第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p1030 (4PC-086)、神戸、December 10-13、2003.
- 16) 國田竜太、秦野伸二、大友麻子、水村光、鈴木恭子、成宮周、池田穰衛：ヒト ALS2 タンパク質の初期エンドソーム融合は ALS2_DH/PH ドメインによって特異的に増強される. 第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p1030 (4PC-087)、神戸、December 10-13、2003.
- 17) 秦野伸二、大友麻子、柳澤佳子、将口(宮田)淳子、鈴木恭子、國田竜太、水村光、池田穰衛：*ALS2CL*：新規 ALS2 相同遺伝子の同定とその構造解析. 第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p1031 (4PC-088)、神戸、December 10-13、2003.
- 18) Kunita, R., Hadano, S., Otomo, A., Mizumura, H., Okada, T., Suzuki, K., Narumiya, S., and Ikeda, J. -E.: The DH/PH domain of ALS2 strongly enhances the C-terminal MORN/VPS9 domain-mediated endosome fusions. Keystone Symposia, Traffic control: Rab GTPases in Vesicular Transport (J3), Abstract p55(207), Breckenridge/Colorado,

- U.S.A., January 20-25, 2004.
- 19) Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E., Yasuda, M., Osuga, H., Nishimoto, T., Naurumiya, S., and Ikeda, J. -E.: Amyotrophic lateral sclerosis type 2 gene encodes protein, ALS2, is a novel guanine nucleotide exchange factor for Rab5 and implicates in endosomal dynamics. Keystone Symposia, Traffic control: Rab GTPases in Vesicular Transport (J3), Abstract p57(215), Breckenridge/Colorado, U.S.A., January 20-25, 2004.
 - 20) Hadano, S., Shiina, T., Showguchi-Miyata, J., Hashimoto, N., Aoki, M., Inoko, H., Sobue, G., and Ikeda, J. -E. : Single nucleotide polymorphism analysis of the ALS2 gene and it's regulatory region in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord. 5 (suppl. 2), 73-74 (P22) (15th International Symposium on ALS/MND, Philadelphia, USA, 2004.
 - 21) Hadano, S., Kakuta, S., Sudo, K., Otomo, A., Kunita, R., Mizumura, H., Suzuki, K., Iwakura, Y., and Ikeda, J. -E. : Generation and characterization of the Als2 knockout mice. 神経化学 43 (2-3) 490 (P2-187)、第 47 回日本神経化学会 (大阪) 大会抄録号 (Neuro2004) 大阪、2004.
 - 22) 岡田義則、酒井治美、古曳英理、須賀恵津子、田中一則、秦野伸二、池田穰衛 : NAIP 発現誘導 Dopamine D4 antagonist の抗アポトーシス効果. 戦略的創造科学研究推進事業 (CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM "脳神経科学の最先端 2004"、プログラム講演要旨集 p20 (P24) 東京、2004.
 - 23) 大友麻子、秦野伸二、岡田武也、水村光、國田竜太、西嶋仁、将口 (宮田) 淳子、柳澤佳子、古曳英理、須賀恵津子、安田政実、大須賀等、西本毅治、成宮周、池田穰衛 : 筋萎縮性側索硬化症 2 型遺伝子産物 ALS2 の Rab5GEF 活性とエンドゾーム動態調節機能. 戦略的創造科学研究推進事業 (CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM "脳神経科学の最先端 2004"、プログラム講演要旨集 p21 (P25) 東京、2004.
 - 24) 國田竜太、大友麻子、水村光、鈴木 (宇都宮) 恭子、将口 (宮田) 淳子、柳澤佳子、秦野伸二、池田穰衛 : ALS2 タンパク質多量体形成の生理的意義. 戦略的創造科学研究推進事業 (CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM "脳神経科学の最先端 2004"、プログラム講演要旨集 p21 (P26) 東京、2004.
 - 25) 秦野伸二、角田茂、須藤カツ子、大友麻子、國田竜太、水村光、鈴木 (宇都宮) 恭子、将口 (宮田) 淳子、柳澤佳子、古曳英理、須賀恵津子、宮本なつき、岩倉洋一郎、池田穰衛 : Als2 ノックアウトマウスの作出と解析. 戦略的創造科学研究推進事業 (CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM "脳神経科学の最先端 2004"、プログラム講演要旨集 p22(P27)

東京、2004.

- 26) 國田竜太、大友麻子、水村光、鈴木(宇都宮)恭子、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、秦野伸二、池田穰衛: ALS2 タンパク質の多量体形成は、ALS2 による低分子量 G タンパク質 Rab5 活性化および細胞内でのエンドゾーム融合活性に必須である. 第 27 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p998 (3PB-422)、神戸、2004.
- 27) 鈴木恭子、秦野伸二、大友麻子、國田竜太、水村光、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、須賀恵津子、池田穰衛: ALS2 相同遺伝子産物 ALS2CL は新規 ALS2 結合タンパク質である. 第 27 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p998 (3PB-423)、神戸、2004.
- 28) 秦野伸二、角田茂、須藤カツ子、大友麻子、國田竜太、鈴木(宇都宮)恭子、水村光、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、宮本なつき、古曳英理、須賀恵津子、岩倉洋一郎、池田穰衛: 若年発症型劣性家族性 ALS 疾患モデル Als2 遺伝子欠損マウスの作出と解析. 第 27 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p998 (3PB-424)、神戸、2004.

(3)特許出願(国内 2件、海外 1件)

国内

1) ハンチントン病遺伝子転写因子

特願 2001-356080 平成 13 年 11 月 21 日出願

出願人 科学技術振興事業団

発明者 池田穰衛 田中一則

2) 神経細胞死抑制作用を有する化合物を用いた医薬

特開 2004-123562 平成 16 年 4 月 22 日公開

出願人: 科学技術振興事業団、東洋紡績(株)、池田穰衛

発明者: 池田穰衛 岡田義則 酒井治美 大須賀等

海外

1) ハンチントン病遺伝子転写因子

国再公開番号 W02003/044197 平成 15 年 5 月 30 日公開

出願人: 科学技術振興事業団

発明者: 池田穰衛 田中一則

(4)新聞報道等

プレス発表・新聞報道

- 1) プレス発表「若年発症型筋萎縮性側索硬化症 2 型 (recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis: ALS2) の原因遺伝子の単離・同定に成功」(2001 年 10 月)
- 2) 遺伝性 ALS2 原因遺伝子を発見、日本工業新聞(2001 年 10 月 4 日)
- 3) 筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子を特定、毎日新聞(2001 年 10 月 4 日)

- 4) 神経性の難病 ALS の遺伝子解明、日経産業新聞 (2001 年 10 月 4 日)
- 5) 日米加研究グループ ALS2 原因遺伝子を発見、日刊工業新聞 (2001 年 10 月 4 日)
- 6) 神経難病 ALS 原因遺伝子同定、科学新聞
- 7) 東海大などが遺伝性 ALS2 の原因遺伝子を発見、自治通信
- 8) ALS 原因遺伝子を特定、秋田さきがけ (2001 年 10 月 4 日)
- 9) 神経疾患、加齢による大脳機能障害、虚血性脳神経疾患、虚血性心疾患、これらの予防・治療薬を開発・支援する大学初ベンチャー企業設立、科学技術振興機構報第 150 号 (2005 年 2 月 8 日)
- 10) 株式会社ニュージェン・ファーマ設立、日刊工業新聞 (2005 年 2 月 9 日)

依頼総説および著書

- 1) 大須賀等、池田穰衛：脊髄性筋萎縮症。最新医学 56 (7)、1638-1643、2001.
- 2) 秦野伸二：筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 分子病態研究の最前線。実験医学 19 (17)、2283-2288、2001.
- 3) 秦野伸二：家族性 ALS の新たな遺伝子。BRAIN MEDICAL 14 (1)、47-54、2002.
- 4) 田中一則、池田穰衛：Huntington 病の分子病態と神経細胞死の分子機構。最新医学 57 (7)、52-57、2002.
- 5) 秦野伸二：ALS の原因遺伝子。生化学 74 (6)、483-489、2002.
- 6) 秦野伸二：筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子の同定とゲノム研究。ゲノム医学 2 (3)、231-240、2002.
- 7) 大須賀等、大友麻子、秦野伸二、池田穰衛：ALS2 とその原因遺伝子。最新医学 57 (9) (増刊号：臨床遺伝子学 2002)、2237-2249、2002.
- 8) 秦野伸二、池田穰衛：家族性筋萎縮性側索硬化症 2 型 (ALS2) の原因遺伝子。脳機能の解明-生命科学の主潮流-、第 8 章神経変性疾患の遺伝子異常と病態解明、赤池紀扶、東英穂、阿部康二、久保千春編、ガイア出版会、福岡、p299-305、2002.
- 9) 秦野伸二：新しい家族性筋萎縮性側索硬化症遺伝子：ALS2 -運動ニューロン疾患における分子接点。医学のあゆみ 205 (2)、119-123、2003.
- 10) 池田穰衛：劣性遺伝の運動ニューロン疾患：ALS2 遺伝子変異と神経細胞死の機序。臨床神経学 44 (11)、792-794、2004.
- 11) 秦野伸二：110. 筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子。予防医学事典、松島綱治、酒井敏行、石川昌、稲寺秀邦 編、朝倉書店、東京、2005 (印刷中)
- 12) Hadano, S. and Ikeda, J. -E.: Purification and functional analyses of ALS2 and its homologue. Methods Enzymol., Regulations and effectors of small GTPases, Part F: Vesicular Trafficking GTPases (Edited by William E. Balch), Elsevier Inc., 2005 (in press)

(5) その他特記事項

平成 11 年度より開始した研究開発課題「脳・神経変性抑制因子を利用した神経変性疾患の予防・治療技術」の研究、ならびに本研究事業(SORST)で得られた成果をもとに、平成 17 年 2 月 8 日にベンチャー企業 株式会社ニュージェン・ファーマ(代表取締役:池田穰衛)を設立した。

日本をはじめ、北米、ヨーロッパ諸国では生活環境の変化と社会の高齢化によって脳・神経疾患ならびに循環器障害の多発が顕在化してきている。なかでも壮年期に発症する神経疾患や虚血性心疾患の増加は大きな社会的問題である。筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、加齢による大脳機能障害(アルツハイマー、老年性認知障害等)における神経細胞死、脳梗塞などの虚血性脳機能障害の予後に起きる脳神経細胞死、さらには心筋梗塞や狭心症の治療予後に派生する心筋細胞死には、「酸化ストレス」による細胞死(アポトーシス)が大きく関わっていることが明らかになってきた。したがって、酸化ストレスによるアポトーシスを抑制する方法の開発は、これら疾患の予防・治療薬の開発に繋がる。

我々は、NAIP 発現を誘導する化合物の高効率スクリーニングシステム(Naip-ELISA)を開発し、さらにそれを用いて約 30 種類の低分子量化合物を同定し、ALS モデルマウスの延命、虚血性心筋壊死の抑制などに有意な効果があることを見いだした。株式会社ニュージェン・ファーマでは、スクリーニングにより得られる低分子量化合物を臨床試験に持ち込み、そしてこれまで繰り返し述べてきているような“pathogenesis/mechanism-based medicine”を機軸にした新たなゲノム医療・アポトーシス医療を確立してゆくことを目指す。

7 . 結び

7 . 1 研究の進捗状況と成果に対する自己評価

本研究は、神経疾患に見られる神経細胞死(変性)の本態はアポトーシスであるとの観点から、国際共同研究事業研究事業(1995 年~2000 年、日加国際共同研究事業・神経遺伝子)の成果を基に、アポトーシスの制御を主眼とした新たな神経疾患治療法;「アポトーシス医療技術の開発」を目的としている。前半期においては、「アポトーシス医療技術の開発」の基盤となる応用基礎研究を遂行してきた。具体的には、

NAIP の抗アポトーシス活性制御関連因子の分子動態解明、若年発症型筋萎縮性側索硬化症 2 型(ALS2)原因遺伝子産物 ALS2 の機能と分子動態の解析、本態性神経変性疾患動物(Authentic Diseases Animal Model: ADAM)を用いた神経難病治療薬ならびにアポトーシス医療技術の開発と評価系の開発、と 3 研究課題を

設けて一連の研究を遂行してきた。我々が本研究で用いた遺伝子は我々が世界に先駆けて単離・同定した遺伝性神経変性疾患の責任遺伝子である。これらの神経変性疾患(脊髄性筋萎縮症、ALS2)は劣性遺伝性疾患であることから、当該遺伝子機能の消失が神経細胞死に直接関わっている。従って、当該遺伝子(産物)ならびに当該遺伝子(産物)の機能制御に共役している因子の機能とその分子機序の解明は「アポトーシス医療」の基盤と考えられる。

本研究全体の進捗状況は当初研究計画にそって順調な進捗であった。特に、NAIP関連の研究は当初の研究計画の範疇を越える進捗が見られた。ALS2関連では *Als2* 遺伝子ノックアウトマウスの作出に多少時間が掛かった。これは実験系の律速段階として、人為的操作の及ばないES細胞、マウス個体での生理反応過程が含まれているからである。各々の研究項目に関する自己評価は以下のように要約される。

NAIPの抗アポトーシス活性制御関連因子の分子動態解明:NAIPが酸化的ストレスによって誘起する細胞死(アポトーシス)特異的に抑制する事が実験的に明らかになり、このものが生体内神経細胞変性防御機構の枢要を担っていることが判明した。NAIPの活性化の分子ネットワーク解析系も確立できた事から共役因子同定への道が拓けたと言える。生体内脳神経変性防御を指標としたNAIP機能解析系(前脳虚血モデル)と生体内NAIP分子誘導低分子化合物スクリーニング系(Naip-ELISAと培養細胞アポトーシス抑制定量)が開発された事により、低分子化合物の大規模スクリーニングと生物機能評価が可能となったと言える。さらに、神経疾患(ALS)モデルマウスを用いたNAIP誘導低分子化合物の神経変性防御評価系もほぼ確立されつつある。この系を利用する事によって神経変性防御薬の開発が具体化される。

若年発症型筋萎縮性側索硬化症2型(ALS2)原因遺伝子産物ALS2の機能と分子動態の解析:ALS2の機能解析も順調に進んでおり、ALS2が新規の低分子量G蛋白GEF酵素活性を有する事が判明し、神経細胞の情報伝達の制御系に関与している事が推測され、特に上位運動神経情報伝達の機序を明らかにする分子が得られたと言える。次いで、当該疾患における運動神経変性の分子基盤解明に必須であるモデル疾患マウス、*Als2* 遺伝子ノックアウトマウスの作出に成功した(2003年6月)。当該疾患の分子病態解析ならびに神経変性(アポトーシス)の分子基盤解明への新たな道が拓けたと言える。

本態性神経変性疾患動物(Authentic Diseases Animal Model: ADAM)を用いた神経難病治療薬ならびにアポトーシス医療技術の開発と評価系の開発:神経疾患治療技術の評価系として、齧歯類実験動物よりも更にヒトの脳神経系に類似した機能を持った中型動物(ミニブタ)の利用を試みてきた。ミニブタ脳の定位固定や画像解析の手技が開発できた事から、無侵襲で神経変性疾患モデル個体の病態や薬理効果等

を経時的に解析、評価できると考えられる。しかし、ミニブタは成体重が 40kg、平均余命 10 年であることから、維持管理にかなりの経済的負担が掛かる事が難点である。また、取り扱いにおいても専門技術者の養成が必要である。本研究項目ではハンチントン病ミニブタの分子病態解析と平行して、ハンチントン病責任遺伝子の発現調節機序の解明を行ってきた。当該遺伝子の発現調節に関わる因子のスクリーニング系を確立し、複数の因子を単離・同定した。当該因子の細胞内分子動態解析も順調に進んでおり、機能の全貌を明らかにする基盤は整ったと言える。さらに、当該因子が神経細胞特異的な転写調節機能を有する事が認められており、この機能をターゲットにした神経変性治療薬の開発への道が拓けたと考えられる。

当初の研究計画に記載したオタワ大学との共同研究については大幅な変更を余儀なくされた。カナダ側国際共同研究代表者 (Alex MacKenzie 教授・研究所長、R. Korneluk 教授) らと共同して新規に獲得したグラントによって開設される Apoptosis Research Center (ARC) の建設が当初計画から大幅に遅れ、本年 2003 年 1 月 18 日に建設工事着工、同年 12 月完成の運びとなった。従って、本研究の実施期間中(平成 17 年 3 月末)に当初共同研究を完了させることが不可能となった。しかし、我々が現在開発しているゲノム・分子医療技術や治療薬候補化合物の評価と臨床試験(日本国内では極めて困難)について、オタワ大学を窓口として北米創薬ネットワークを開拓するため、オタワ大学との共同研究体制を継続する計画である。

7.2 今後の研究の展開

今後の研究により、(1) NAIP 発現誘導を指標にしたスクリーニングに基づく、新たな神経細胞死保護薬剤・化合物の同定と分子標的の解明、(2) NAIP の酸化ストレス誘発性アポトーシス抑制の分子機構の解明、(3) ALS2 タンパク質の担うシグナル伝達系ならびに物質輸送系関連因子の同定、(4) *A1s2* 遺伝子ノックアウトマウス病態解析による疾患分子発症機序の分子的理解、および(5) *HD* 遺伝子発現調節因子の酸化ストレスへの応答ならびに神経細胞特異的遺伝子誘導の分子機構の解明、といった研究成果が得られることが期待される。これらにより、神経細胞生存機構の実体、そしてその破綻が原因となって引き起こされる神経細胞機能障害、神経細胞死、さらには神経変性といった神経疾患における一連の発症分子機構のより明確な理解が可能となる。その結果、分子発症機構を基盤にした治療薬および治療法、いわゆる”pathogenesis/mechanism-based medicine”の開発がより促進されることが期待される。

一方、カナダオタワ大学との共同研究期間は、合計 9 年間を計画しており、第 1 期(5 年間)および第 2 期(4 年間)に分けている。カナダ側(オタワ大学: A R

C 研究構想、代表研究者 Alex MacKenzie 教授、Robert Korneluk 教授)は XIAP のアポトーシス抑制機能を用いた神経難病や循環器疾患治療技術開発を計画している。日本側 (TARIM) と共同して XIAP/NAIP based neuroprotective drugs screen とその評価系の開発を計画している。さらに、北米における孤発性 ALS を対象として、ALS2 遺伝子変異・多型と孤発性 ALS の症候及び予後との相関を解析する計画である。Ontario Research & Development Challenge Fund (ORDCF) から第 1 期分予算として総額 300 万カナダドルの研究ランニング費用 (Post.Doc、テクニシャン等の人件費込み) の交付が認可された。そして、昨年度末までに、オタワ大学医学部敷地内に新規にアポトーシス研究センターの建設が完了した。現在、研究活動開始を目指して、企業、財団法人からの寄付を募ると共にカナダ政府機関 (NRC, MRC, CGDN) などからのグラントの一部を共同研究として投入することによって実質的研究費の強化をはかる計画を立案している。現在、我々が開発しているゲノム・分子医療技術や治療薬候補化合物の評価と Phase I~III 試験 (日本国内では極めて困難) を効率良く行うためには、オタワ大学を窓口とした研究ネットワークを開拓しておくことが肝要である。また、日本国内では極めて入手困難な、本態治療技術開発のために必要な患者由来試料、疾患患者病態データ、正常者ゲノム DNA・試料の供給を受けることも可能となる。これらの状況を踏まえて、平成 17 年度においてもオタワ大学との共同研究体制を引き続き堅持してゆきたい。

7.3 プロジェクトの運営に関して

次に、プロジェクトを推進してゆく過程で生じた問題点を 2 つ指摘しておきたい。まず、予算枠についてであるが、予算の執行についてはプロジェクト半ばでの事業団における独立法人化などの大きな変革、また行政改革に伴う予算配分の変更が行われたためと推察するが、例年予算計画が立てられるまで該当年度の予算額が不明であったこと、ならびに毎年行われた予算枠の変更 (減額: 当世の財政上の諸事情からやむを得ないと思うが) が研究の計画・遂行において影響を受けたことが挙げられる。SORST のような研究プロジェクトにおいては、研究をより計画的・戦略的に行う上では、研究期間における全体 (少なくとも前期 3 年間) の予算配分が研究スタート時に明らかにされていることが望まれる。また、機器備品の管理方法が複雑であったという点も指摘しておきたい。我々の研究室では、これまで ERATO、ICORP、プレベンチャー、そして SORST と継続的に JST 予算の交付を受け、事業団所有の機器・備品を継続的に使用している。しかし、その機器備品に対する物品番号が、プロジェクトが変わるごとに管理移行がスムーズでないような印象を受けた。特に耐用年数の設定、およびその後の管理方法については、さらに改善の余地があると思われる。

最後に本研究事業を終えるに当たり、これまで継続的な協力をしていただいた JST の関係諸氏に感謝の意を表します。