

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

目 次

第3分野

課題番号

20030917A KH31028	非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価	吉岡澄江 …… 1
918A KH31029	ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発	能美健彦 …… 10
919A KH31030	バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発	川崎ナナ …… 18
920A KH31031	医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究	棚元憲一 …… 27
921A KH31032	動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究	大野泰雄 …… 33
922A KH31033	医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発	藤本純一郎 …… 43
923A KH31034	創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立	井上 達 …… 48
924A KH31035	新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究	合田幸広 …… 58
925A KH31036	医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・予測支援システムの構築とハイスループット試験系についての研究	頭金正博 …… 67
926A KH31037	多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発	山崎利雄 …… 74
927A KH31038	食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立	山本茂貴 …… 83
928A KH32081	DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究	阿曾幸男 …… 90

第4分野

929A KH41039	ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立	小熊恵二 …… 97
930A KH41040	小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究	奥山虎之 …… 101
931A KH42074	熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究	名和行文 …… 105
932A KH42075	新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究	山崎俊夫 …… 115

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発

所 属 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部
研究者 藤本 純一郎

研究要旨 造血幹細胞あるいは前駆細胞からの血球成熟制御法の開発、ヒト骨ならびにヒト造血の制御に関わる分子群の探索に関する研究を行った。血球成熟法の開発については、ヒト CD34 陽性骨髄幹細胞からの前駆 B リンパ球誘導法を開発したが、この誘導に IGF が重要であることを明らかにした。巨核球特異的な外来遺伝子発現系を確立したが、巨核球の成熟促進を示す新規分子発見には至らなかった。強い免疫不全形質を示す NOD/SCID マウスへのヒト骨移植モデル、すなわち、Hu-Bone-SCID マウスを開発し、ヒト腫瘍血管新生モデルならびに血管新生制御による腫瘍増殖制御モデルを完成させた。骨形成に関与する分子探索については、数個の新規遺伝子を単離した。これらの成果は、細胞の成熟制御による再生医学のより安全で有効な治療法開発に応用可能と考えられる。

分担研究者

- | | |
|---------------------|------|
| (1) 慶應義塾大学医学部 | 山田健人 |
| (2) 東京理科大学生命科学研究所 | 穂積信道 |
| (3) エスエス製薬株式会社中央研究所 | 草野浩二 |

A. 研究目的

ヒト造血組織を構成する細胞、特に、巨核球、血管、間質細胞および骨に着目し、その成熟制御法開発を通じて医薬品等の開発および再生医学への応用を図ることを目的とする。

B. 研究方法

1) マウス・ヒト造血細胞培養法

ヒト骨髄 CD34 陽性細胞からの B リンパ球誘導培養実験は、マウス骨髄由来間質細胞株 MS5 上で培養することによって行った。B リンパ球の同定は CD19 染色反応によって行った。一部の実験ではこの培養系にマウス IL-7 を添加した。巨核球の誘導はトロンボポイエチン (TPO) 添加培養を基本とした。CD34 陽性ヒト骨髄細胞は、市販品を使用し、マウス骨髄細胞と同様の実験法を採用した。培養後の細胞は、ギムザ染色ならびにフローサイトメーターによる細胞マーカー解析を行った。巨核球成熟促進作用を持つ低分子化合物の探索は、この骨髄細胞培養法を用いて行った。なお、低分子化合物はエスエス製薬株式会社から分与を受けた。

2) 巨核球特異的発現ベクター作成と発現実験

ヒト gpIIb 遺伝子の 5' 上流域プロモーターとし、これに Green Fluorescence Protein (GFP) 遺伝子を結合させたベクターを用いてトランスジェニッ

クマウスを作成した。

3) Hu-Bone SCID マウス作成とヒト腫瘍移植、ヒト血管新生モデル作成

NOD/SCID マウス皮下へヒト骨組織(海綿骨部分)を移植し Hu-Bone SCID マウスを作成した。生着したヒト骨内に各種のヒト癌組織あるいは癌細胞株を移植し、生着した腫瘍塊における血管の由来を各種抗体により同定した。

血管新生に関与する分子機構を明らかにするため、以下の実験を行った。すなわち、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 受容体 Flt-1 については細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子 (Flt-1-Fc)、Angiopoietin 受容体 Tek については細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子 (Tek-Fc) の発現ベクター (熊本大学須田年生博士より供与) をヒト癌培養細胞株に導入し、Hu-Bone SCID マウス移植骨内へ移植したのち増殖様式を検討した。Raji 細胞の移植には 8Gy 放射線照射した Hu-Bone SCID マウスを用いた。ヒト間質細胞への遺伝子導入は以下の方法に従った。遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子 (neor) を保有するレトロウイルスベクター (MBAE-EGFP) および neor を欠く MSGFP レトロウイルスベクターを作成し常法に従いウイルスを作成した。これをヒト間質細胞に感染させ Hu-Bone SCID マウスに移植した。細胞の生着と分布は、蛍光顕微鏡観察、抗 GFP 抗体反応で行った。

4) 骨形成に関与する分子探索と解析システム

マウス胎児性腫瘍由来軟骨様細胞株 (ATDC5) は複雑な軟骨細胞分化の過程を忠実に再現することで軟骨分化の研究にとって貴重な細胞である。

この細胞が Confluent 期に達した後、インスリンを添加すると細胞は増殖し細胞凝集をおこし増殖、肥大軟骨細胞分化にいたる。軟骨細胞は骨芽細胞、筋芽細胞、脂肪細胞など同様に未分化間葉性幹細胞から分化する。骨形成においては、まず将来の骨形成部位に間葉系細胞の凝集がおこる。これらの細胞が増殖、肥大し軟骨基質を産生し石灰化が誘導される。さらに血管新生がおこり骨芽細胞が分化し骨芽細胞分化による骨形成が軟骨に置き換わり長管骨が形成される。このように軟骨細胞分化は細胞凝集が最初のステップである。我々は ATDC5 細胞の凝集期に発現する遺伝子を Signal sequence trap by retrovirus-mediated expression method (SST-REX)によりクローニングした。

これらのクローンされた全遺伝子を DNA シーケンシングすることにより既知及び新規タンパクをコードする遺伝子を同定した。またこれらの遺伝子と細胞分化とのかかわりを解析するために間葉系培養細胞の分化過程における発現とマウス組織における発現も検討した。

(倫理的配慮)

本研究では、複数の種類のヒト検体を使用している。NOD/SCID マウスに移植するヒト骨組織ならびにヒト腫瘍組織の使用については施設の倫理委員会で承認を得ており、説明と同意に基づいて検体の提供を受けた。ヒト CD34 陽性骨髄細胞は市販のものを使用しており、倫理的に問題ないと考えている。各種の動物実験についてはすべて施設の動物委員会等の承認を得ており、動物愛護ならびに福祉を十分に考慮し、かつ、各種法律を遵守して行われた。

C. 研究成果

1) 血球の誘導培養法および成熟制御法の開発

1-1) B リンパ球および巨核球の誘導培養法

すでに確立したヒト CD34 陽性骨髄幹細胞からの B リンパ球誘導培養法での培養液の効果を検討したところ、RPMI1640 培養液が、 α -MEM 培養液よりも産生される B リンパ球の数が数倍多いことが判明した。

この培養系における必須分子の探索を行った。マウス MS5 は insulin-like growth factor (IGF) の mRNA を発現していること、抗 IGF 特異抗体を培養中に添加すると成熟する B リンパ球数が著しく減少することが判明し、IGF が B リンパ球成熟に関与することが判明した。

1-2) 巨核球成熟制御法の開発

昨年度までにマウス gpV プロモーターによる巨核球・血小板特異的 GFP 発現マウスを作成し

たが、本年度、ヒト gpIIb プロモーターを用いて同様にマウスを作成した。総数で 15 匹のマウスが得られたが、GFP 蛋白発現は低い結果となった。

1-3) 巨核球成熟作用を持つ新規分子探索

巨核球成熟作用を持つ低分子化合物の探索を、上記トランスジェニックマウスならびに正常マウスの骨髄細胞培養で行った。現在までに候補分子は見つかっていない。

2) Hu-Bone SCID マウス作成と血管新生モデル作成

2-1) 血管新生制御によるヒト腫瘍増殖制御モデル

昨年度までに、Hu-Bone SCID マウスがヒト血管の再構築モデルとなることを示し、また、ヒト腫瘍を移植した場合、腫瘍の栄養血管がヒト由来であることを明らかにした。本年度、血管新生に関連するふたつのシグナル回路を制御することにより、腫瘍増殖が制御できるか否かを検討した。

ヒト癌培養細胞株 (乳癌由来 MB231、神経芽腫由来 SK-N-DZ) へ、血管内皮細胞増殖因子 VEGF 受容体 Flt-1 細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子 (Flt-1-Fc) および angiopoietin-1 受容体 Tek の細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子 (Tek-Fc) の発現ベクターを導入し、安定発現細胞株を得た。これらのクローンと対照クローン (ネオマイシン耐性遺伝子のみ導入) を Hu-Bone SCID マウス移植骨内へ移植したところ、腫瘍移植後 21 日目における腫瘍の重量は、対照群に比して、Flt-1-Fc および Tek-Fc 導入群では、1/4 から 1/20 に減少した。これらの腫瘍血管の密度の減少は、Flt-1-Fc 導入群でより顕著であったが、Tek-Fc 導入群では、Flt-1-Fc 導入群では認められない腫瘍血管の形態異常 (不整、血管腔の大型化) が見られた。これらの結果は、VEGF/Flt-1 と Angiopoietin/Tek のシグナル伝達系がいずれも腫瘍血管新生に重要であるとともに、その役割は異なることを示唆する。

2-2) ヒト白血病浸潤・血管新生モデル

放射線照射した Hu-Bone SCID マウスへ、小児バーキット型白血病細胞株 Raji を静注した。その結果、2~3 週後に移植骨骨髄内に Raji 細胞の浸潤が認められ、その後、約 5~7 日間でマウスは下半身麻痺が出現し、さらに 3~5 日後に死亡した。そこで Raji 細胞移植 3 週目に移植骨、マウス造血組織 (骨髄、脾臓、末梢血) を採取し、組織学的ならびにフローサイトメーターで Raji 細胞の浸潤について解析したところ、Raji 細胞は移植骨骨髄およびマウス大腿骨骨髄での細胞の 85~95% を占め、脾臓、末梢血にも浸潤を示した。この時、Raji 細胞非静注群を陰性対照として、移植

骨髓における血管密度を算出したところ、移植骨ドナーに関らず、Raji細胞静注群での移植骨では、CD34陽性のヒト血管密度の有意な増加が全例に認められた。またこのRaji細胞では、VEGF165,181、Angiopoietin-1、Angiopoietin like factorの恒常的なmRNA発現が検出された。骨髓腫細胞株IMR32、HS-Sultanの場合は、放射線照射なしで骨髓浸潤がみられ、浸潤とともに著明な血管新生が観察された。これらの骨髓腫細胞では、VEGF165,181,FGF-2,Angiopoietin-1のmRNA発現が検出された。

2-6) ヒト・ストローマ細胞の分化能

MBAE-EGFP由来ウイルスを初代ヒトストローマ細胞へ感染させ、Hu-Bone SCIDマウスへ静注、移植骨内直接移植したところ、4-8週後に移植骨内外にGFP陽性細胞が観察され、一部は内皮細胞へ分化した。この細胞をヒト腫瘍移植マウスに接種したところ、腫瘍間質のみならず腫瘍血管内皮をも再構成した。

3) 骨形成に関与する分子探索と解析システム

Confluentに達したATDC5培養細胞にインスリンを添加し、7日目の細胞からRNAを調整し、cDNAを作製しSST-REXライブラリー(サイズ:5.7 x 10⁹)を得た。このライブラリーから486個のファクター非依存性クローンをすくりに成功した。これらの全クローンをPCR法によりDNAシーケンシングを行い細胞由来と確認された161個のクローンを得た。このうち157個のクローンが既知のタンパクで4個が新規遺伝子であった。既知の遺伝子の50%以上はコラーゲン遺伝子であった。軟骨細胞が産生する最も多くのタンパクはコラーゲンでありこの結果は極めてReasonableなものである。既知の遺伝子のうち、特に我々はNeuropilin-1(NP-1)遺伝子に興味をもち更に解析をすすめた。骨形成にとって血管新生は必須のステップである。血管新生にはVEGFが重要な役割を演じている。NP-1はVEGFのCo-receptorであり骨形成や骨芽細胞様細胞株(MC3TC-E1)で発現が報告されている。しかしATDC5における発現は明らかではない。そこで我々は分化条件下にある筋芽細胞株(C2C12)とインスリン添加後のATDC5細胞におけるNP-1遺伝子発現をNorthern blot法により検討した。C2C12細胞では恒常的に発現が認められたのに対してATDC5ではインスリン添加直後における発現は非常に弱く24日目に発現の亢進が見られた。この時期にはATDC5細胞は増殖・肥大軟骨期をへて結節形成が見られるようになる。この結果はNP-1遺伝子が軟骨形成に重要な役割を演じていることを示唆している。

次に新規遺伝子発現をATDC5, MC3T3, C2C12をもちいて解析した。クローン255の遺伝子は2.7 kb. 3.8 kbのmRNAを発現するが、培養24日以降のMC3T3-E1細胞で発現が上昇することがわかった。この細胞は培養開始時にはFibroblast様の形態をしめすが培養がすすむにしたがい骨芽細胞様になり石灰化結節を形成するようになる。この結果はクローン255遺伝子は骨形成に重要な機能を有しているものと示唆される。

D. 考察

ヒトBリンパ球の成熟誘導培養法の効率化を達成し、また、成熟に必須の分子としてIGFが候補として考えられた。IGFは以前より未分化Bリンパ球での発現が報告されていたが、機能的に重要であることが示された例はなく、独創的な成果である。今後、これらの成果をより効率的なBリンパ球成熟培養法の開発に応用したい。

巨核球の成熟制御と新規薬剤探索については、今年度作成したトランスジェニックマウスは蛋白発現が十分ではなく課題として残った。また、巨核球の成熟を促進する新規分子についても候補を挙げることができず反省点として残った。

Hu-Bone-SCIDがヒト血管新生モデルとして有用であることは昨年度までの成果で明らかである。本年度は、血管新生を制御することにより腫瘍増殖を制御するモデルを示したが、この成果は腫瘍への新規治療法開発に結びつくのみならず、血管再生を目標とした再生医療への応用も期待できる。

骨形成については、本年度、SST-REXシステムによる新規分子探索を実施し、新たな候補をいくつか見つけることができた。現在、それらの詳細に関する研究を実施中だが、骨再生へ結び付けたいと考えている。

E. 結論

- 1) ヒトCD34陽性造血幹細胞から、Bリンパ球を成熟誘導する系ではIGFが重要な機能を持つことが示された。
- 2) ヒトgpIIb遺伝子プロモーターを用いたトランスジェニックマウスを作成した。
- 3) 血管新生の制御によりヒト腫瘍増殖を抑制するモデルを開発した。
- 4) 骨形成に関与する新規分子候補を同定した。

F. 研究発表

1) Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri-U Y, Matsuo N, Matsuo Y, Karasuyama H and

- Fujimoto J. Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. *J-Immunol*, 2003; 170(1):252-260.
- 2) Mori T, Kiyokawa N, Shimada H, Miyauchi J and Fujimoto J. Anaplastic large cell lymphoma in Japanese children: Retrospective analysis of 34 patients diagnosed at the National Research Institute for Child Health and Development.. *Br-J-Haematol*, 2003 Apr;121(1):94-6.
- 3) Honma D, Uenishi H, Hirakawa H, Watanabe S, Tang W, Kiyokawa N, Fujimoto J, Yasue H and Sakimura K. Cloning and characterization of porcine g chain gene. *J-Interf-Cytok-RES, J-Interferon-Cytokine-Res*. 2003 Feb;23(2):101-11.
- 4) Ohtomo Y, Kawamura R, Kaneko K, Yamashiro Y, Kiyokawa N, Taguchi T, Mimori K, Fujimoto J. Nephrotic syndrome associated with human parvovirus B19 infection. *Pediatr-Nephrol*, 2003 Mar;18(3):280-2.
- 5) Mimori K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri-U Y, Isoyama K, Yamada K, Matsuo Y and Fujimoto J. Co-stimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. *Leukemia*, 2003 Jun;17(6):1164-74.
- 6) Furusawa T, Hosoe M, Ohkoshi K, Takahashi S, Kiyokawa N, Fujimoto J, Amemiya H, Suzuki S, Tokunaga T. Catalytic RAG1 mutants obstruct V(D)J recombination in vitro and in vivo. *Mol Immunol* 2003 May;39(14):871-8.
- 7) Ohkoshi K, Takahashi S, Koyama S, Akagi S, Adachi N, Furusawa T, Fujimoto J, Izaiki Y, and Tokunaga T. Caprine somatic cell nuclear transfer using in vivo matured oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Animal Science J*. 2003;74:269-76.
- 8) Ohkoshi K, Takahashi S, Koyama S, Akagi S, Adachi N, Furusawa T, Fujimoto J, Takeda K, Kubo M, Izaiki Y, and Tokunaga T. In vitro oocyte culture and somatic cell nuclear transfer used to produce a live-born cloned goat. *Cloning-Stem-Cells*. 2003;5(2):109-15.
- 9) Mori T, Sugita K, Kimura K, Fuke T, Miura T, Kiyokawa N and Fujimoto J. Isolated central nervous system relapse in a case of childhood systemic anaplastic large cell lymphoma without initial involvement. *J-Pediatr-Hematol-Oncol*, 2003 Dec;25(12):975-7.
- 10) Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang W, Matsui J, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J. Diagnostic Importance of CD179a/b as Markers of Precursor B-Cell Lymphoblastic Lymphoma. *Modern-Pathol*, in press.
- 11) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Suzuki T, Nakajima H, Saito M, Ohmi K, Katagiri YU, Okita H, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J. Characterization of a Shiga-toxin-resistant Stock of Vero cells. *Microbiol-Immunol*, in press.
- 12) Du W, Hashiguchi A, Hattori Y, Ikeda Y, Kondoh K, Hozumi N, Sakamoto M, Hata J, Yamada T. Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and alteration by thalidomide treatment. *Pathology International* 54;285-294, 2004 (in press)
- 13) Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Segawa K, Ikeda Y, Kizaki M. Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: Implication of p53 at ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Research* 64: 1071-1078, 2004
- 14) Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, Fen J, Koseki T, Ikeda Y, Nishihara T, Yamato K. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Mol Therapy* 8(5); 762-768, 2003
- 15) Fukuma M, Abe H, Okita H, Yamada T, Hata J. Monoclonal antibody, 4C4-mAb, specifically recognizes keratan sulfate proteoglycan on human embryonal carcinoma cells. *J Pathol* 201(1): 90-98, 2003
- 16) Yajima K, Hirose H, Fujita H, Seto Y, Fujita H, Ukeda K, Miyashita K, Kawai T, Yamamoto Y, Ogawa T, Yamada T, Saruta T. Combination therapy with PPARgamma and PPARalpha agonists increases glucose-stimulated insulin secretion in db/db mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 284(5):E966-71, 2003
- 17) Matsushita K, Okita H, Suzuki A, Shimoda K, Fukuma M, Yamada T, Urano F, Honda T, Sano M, Iwanaga S, Hata J, Umezawa A. Islet cell hyperplasia in transgenic mice overexpressing

EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene. Molecular and Cellular Endocrinology 203: 105-116, 2003
18) Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. J Immunology 170: 2170-2178, 2003
19) Watanabe, N., Tezuka, Y., Matsuno, K., Miyatani, S., Morimura, N., Yasuda, M., Fujimaki, R., Kuroda, K., Hiraki, Y., Hozumi, N. and Tezuka, K. (2003) Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch. J. Bone Miner. Metab. 21: 344-35.

G. 知的財産権の出願・取得状況
該当なし。

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社