

Fig. 6. Intravenously injected QD-labeled cells remained for several days in the peripheral blood. EL-4 cells used for administration were pre-stained with PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma) before incubated with 0.1 mg/ml QD. Then the cells were collected and re-suspended in serum-free DMEM and intravenously injected into the mice. The mice were sacrificed at indicated days ($n = 2$). The fluorescence intensity of the QD-holding cells was measured and calculated by a CytoAce300 analyzer, as shown in Fig. 3. In the right graphs, the forward scattered is given on the y -axis and side scattered on the x -axis. Shown numbers in inset mean the percentage of cells in upper right region of graphs. As positive control, an equivalent number of QD-labeled cells were added into the blood separately.

accumulated in the splenic white pulp. In addition, QD-labeled cells could be detected in sections of the kidneys, liver, and lung in 7 days (Fig. 7B). The estimated value of QDs in each organ calculated in accordance with QDs contained in each section is shown in Table 1. This result suggests that approximately 20% of injected cells were present in those organs 7 days after injection.

Our results suggested that the QDs could be used as a cell-tracing marker, especially for that of the transplanted target cells. QDs could enable high luminescent labeling of target cells easily and these applications

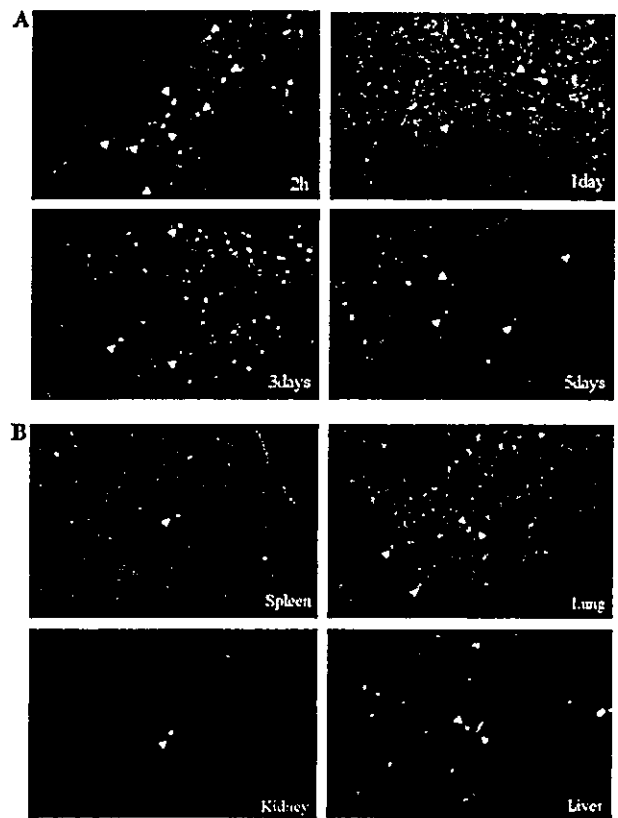


Fig. 7. QD-labeled EL4 was located into kidney, liver, lung, and spleen. (A) The fluorescence images of sliced spleen collected 2 h, 1 day, 3 days, and 5 days after administration ($n = 2$). (B) The fluorescence images of the kidneys, liver, lung, and spleen 7 days after administration. The cells were observed by fluorescence microscopy, as in Fig. 1. Arrowheads indicate the location of QD-holding cells.

could also be applied to flow cytometric analysis. In this study, we performed the labeling of QDs in EL-4 lymphocytoma cell lines by cellular endocytotic pathways. This result indicated that it is possible to tag target cells only by adding albumin-conjugated QDs into the culture media. In addition, the injected QD-labeled cells were observed up to 5 days in this experiment. However, some of the QDs were eliminated from the cells after a long-time incubation time even in vitro, and the observed number of cells was smaller than expected; the number of cells observed 2 h after injection was quarter of the anticipated value and it decreased to 1/6 by next day. It was not elucidated in this research why QD labeled cells were disappearing from the body in these experiments, but we can presume three possibilities by our study. The first possibility was the attenuation of QDs from endosomes by cell division. As shown in Fig. 3, labeled QDs have already been detached in most of the labeled cells, even though a few QD-labeled cells remained for over a week in vitro. The fluorescence intensity of QD-labeled cell population was attenuated within first 24 h, but fluorescent attenuation ratio

Table 1

The estimated number of injected cells labeled by QDs contained in each organ at indicated days after injection

Time	Organ	QD-labeled cells in each section (cells/section)	Estimated cell numbers in each organ ($\times 10^4$ cells/organ)
2 h	Spleen	605 \pm 133	41.2 \pm 13.4 (4.1%)
	Kidney	Not detected	Not detected
	Liver	1.0 \pm 1.0	0.58 \pm 0.63 (0.06%)
	Lung	46.7 \pm 18.0	18.6 \pm 71.9 (1.86%)
3 days	Spleen	97.7 \pm 27.7	6.64 \pm 2.44 (0.66%)
	Kidney	0.33 \pm 0.58	0.04 \pm 0.07 (0.004%)
	Liver	2.0 \pm 1.0	1.16 \pm 0.68 (0.12%)
	Lung	47.3 \pm 5.0	18.5 \pm 2.15 (1.85%)
7 days	Spleen	72.0 \pm 10.8	4.90 \pm 1.24 (4.9%)
	Kidney	1.3 \pm 0.6	0.15 \pm 0.09 (0.15%)
	Liver	10.6 \pm 2.1	6.17 \pm 1.75 (6.1%)
	Lung	51.6 \pm 11.0	20.1 \pm 4.52 (20.1%)

QD-labeled cells including each organ section were counted ($n = 3$). The estimated cell numbers in each organ were the presumed value calculated from the volume of the organs and the number of QD-labeled cells contained in the sections. The data are presented as means \pm standard deviation. The value in parentheses shows the percentages of the injected QD-labeled cells located in each organ.

became lower after more than 24 h culture. Moreover, QDs held in endosomes were gradually concentrated in a time-dependent manner. The distribution of QDs may incline toward the specific position in a cell, which resulted in that QD may be unevenly distributed to the two product cells at cell division. Probably QDs may be eliminated from injected cells in the same way in vivo. Furthermore, the influence by cell division in the mouse cannot be disregarded either. As shown in Fig. 6, injected EL-4 cells were grown after 5 days (*right graphs*) and detection of QD-labeled cells became difficult 5 days after injection (*left graphs*). Thus, cell labeling using QDs may tend to be influenced by cell division. The second possibility was exclusion of injected cells by the host-immune system. QDs holding cells may be vanishing more rapidly out of the blood circulation by some active pathways in the early stage after injection. As we surmised that QDs were excluded by the spleen function, QD-labeled cells were detected from the sections of the kidneys, liver, lung, and spleen. Approximately 20% of injected QD-labeled cells were accumulated in those four organs up to 7 days after injection. The last possibility was the loss of photoluminescent ability of the QDs. It was known that the fluorescence emitted from QDs was attenuated by depriving of electric charge on QDs. We assumed that the degradation of the surface of QDs in endosomes including QDs was due to a change of the pH as a consequence of activation of T cells. But as shown in Fig. 4, no significant fluorescent elimination was observed although QD-holding lymphocytes were stimulated with calcium ionophore A23187, PMA, and some lectins such as ConA and PHA.

Our approaches suggest that QDs can be traced using the injected cells for more than a week by quite easy techniques. In this approach, QDs had many more advantageous points than organic fluorophores. As shown in Fig. 5, the fluorescent intensity of QDs was approxi-

mately equal to that of the organic fluorophores in short-time exposure such as flow cytometry, but the fluorescence of QDs was superior to that of organic fluorophores in terms of the operating lifetime. QDs could be applied not only to cell labeling marker but also to real-time single-molecule bioimaging for several minutes in living cells, such as antigen-antibody reactions, the moment of viral infection, the movement of transcription in nuclei, and more. More improvements may be achieved by multicolor scanning using some QDs of different particle sizes [22].

At present, no damage or toxicity caused by injection of QD-labeled cells over individuals was observed although the adverse effects on the organisms by the QDs were anticipated, and cytotoxicity was observed at high concentration of QDs. Efforts to address this issue are being made in developing a different silicon based QD. Further miniaturization of the particle is anticipated and silicon-based QDs are expected to be much safer because neither cadmium nor selenium is used. Advanced surface treatment and improved introducing-methods of QDs were required to retain the QDs inside the cells for a longer and more stable duration. Nowadays, another introduction method that encapsulated individual nanocrystals in liposomes is being considered [23–25]. QDs could be used in both carrier or drug delivery systems and to assess the effects of treatment by combining this method and the other gene targeting therapy using the liposomes if a semi-permanent cell labeling technique was enabled in those methods [26]. Furthermore, a small tumor can be detected by specific wavelength infrared rays emitted from some QDs, as the QDs can be conjugated with biomolecules which can specifically recognize tumor cells in a similar way as antibodies and some lectins [27]. Visualization of QDs which flowed in the blood of the capillary vessels and which were accumulated in adipose tissue has already been reported using multiphoton microscopy [28].

The dynamics of QDs in this application is dependent on the albumin conjugating on the surface of the QDs. Further, it may be expected to conjugate QDs with various proteins or molecules for the carrier molecules of drug delivery system or cell specific marker. With the development of new surface treatments of QDs, it may soon become possible to make these possibilities come true using various methods to replace the conventional organic fluorophores that are currently being used.

Acknowledgments

We are grateful to Drs. Tomokazu Nagao, Ken Murayama, and Wayne Dawson (National Institute of Infectious Diseases) for valuable advice and help with data collection, animal treatment, and proof-reading. This work was supported by Grant 'H14-nano-004' of the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

- [1] S.J. Rosenthal, I. Tomlinson, E.M. Adkins, S. Schroeter, S. Adams, L. Swafford, J. McBride, Y. Wang, L.J. DeFelice, R.D. Blakely, Targeting cell surface receptors with ligand-conjugated nanocrystals, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 4586–4594.
- [2] B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou, A. Libchaber, In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles, *Science* 298 (2002) 1759–1762.
- [3] G.T. Shubeita, S.K. Sekatskii, G. Dietler, I. Potapova, A. Mews, T. Basch, Scanning near-field optical microscopy using semiconductor nanocrystals as a local fluorescence and fluorescence resonance energy transfer source, *J. Microsc.* 210 (2003) 274–278.
- [4] H. Xu, M.Y. Sha, E.Y. Wong, J. Uphoff, Y. Xu, J.A. Treadway, A. Truong, E. O'Brien, S. Asquith, M. Stubbins, N.K. Spurr, E.H. Lai, W. Mahoney, Multiplexed SNP genotyping using the Qbead system: a quantum dot-encoded microsphere-based assay, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 43.
- [5] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K.N. Haley, J.A. Treadway, J.P. Larson, N. Ge, F. Peale, M.P. Bruchez, Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, *Nat. Biotech.* 21 (2003) 41–46.
- [6] W.C. Chan, D.J. Maxwell, X. Gao, R.E. Bailey, M. Han, S. Nie, Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging, *Curr. Opin. Biotech.* 13 (2002) 40–46.
- [7] H. Mattoussi, J.M. Mauro, E.R. Goldman, G.P. Anderson, V.C. Sundar, F.V. Mikulec, M.G. Bawendi, Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 12142–12150.
- [8] S.A. Weston, C.R. Parish, New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy, *J. Immunol. Methods* 133 (1990) 87–97.
- [9] A.B. Lyons, C.R. Parish, Determination of lymphocyte division by flow cytometry, *J. Immunol. Methods* 171 (1994) 131–137.
- [10] M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos, Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, *Science* 281 (1998) 2013–2016.
- [11] W.C. Chan, S. Nie, Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection, *Science* 281 (1998) 2016–2018.
- [12] X. Gao, W.C. Chan, S. Nie, Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding, *J. Biomed. Opt.* 7 (2002) 532–537.
- [13] E.R. Goldman, E.D. Balighian, H. Mattoussi, M.K. Kuno, J.M. Mauro, P.T. Tran, G.P. Anderson, Avidin: a natural bridge for quantum dot-antibody conjugates, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 6378–6382.
- [14] D. Gerison, F. Pinaud, S.C. Williams, W.J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A.P. Alivisatos, Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated CdSe/ZnS semiconductor quantum dots, *J. Phys. Chem.* 105 (2001) 8861–8871.
- [15] I.L. Medintz, A.R. Clapp, H. Mattoussi, E.R. Goldman, B. Fisher, J.M. Mauro, Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors, *Nat. Mater.* 9 (2003) 630–638.
- [16] E.R. Goldman, G.P. Anderson, P.T. Tran, H. Mattoussi, P.T. Charles, J.M. Mauro, Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays, *Anal. Chem.* 74 (2002) 841–847.
- [17] K. Hanaki, A. Momo, T. Oku, A. Komoto, S. Maenosono, Y. Yamaguchi, K. Yamamoto, Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 (2003) 496–501.
- [18] J.K. Jaiswal, H. Mattoussi, J.M. Mauro, S.M. Simon, Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates, *Nat. Biotech.* 21 (2003) 47–51.
- [19] H. van Dekken, A. Hagenbeek, J.G. Bauman, Detection of host cells following sex-mismatched bone marrow transplantation by fluorescent in situ hybridization with a Y-chromosome specific probe, *Leukemia* 10 (1989) 724–728.
- [20] R. Rizzuto, M. Brini, P. Pizzo, M. Murgia, T. Pozzan, Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells, *Curr. Biol.* 5 (1995) 635–642.
- [21] C. Kaether, H.H. Gerdes, Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein, *FEBS Lett.* 369 (1995) 267–271.
- [22] Y.T. Lim, S. Kim, A. Nakayama, N.E. Stott, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging, *Mol. Imaging* 2 (2003) 50–64.
- [23] A. Hayashi, T. Nakanishi, J. Kunisawa, M. Kondoh, S. Imazu, Y. Tsutsumi, K. Tanaka, H. Fujiwara, T. Hamaoka, T. Mayumi, A novel vaccine delivery system using immunopotentiating fusogenic liposomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261 (1999) 824–828.
- [24] T. Nakanishi, A. Hayashi, J. Kunisawa, Y. Tsutsumi, K. Tanaka, Y. Yashiro-Ohtani, M. Nakanishi, H. Fujiwara, T. Hamaoka, T. Mayumi, Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the MHC class I processing pathway, *Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 1740–1747.
- [25] J. Kunisawa, T. Nakanishi, I. Takahashi, A. Okudaira, Y. Tsutsumi, K. Katayama, S. Nakagawa, H. Kiyono, T. Mayumi, Sendai virus fusion protein mediates simultaneous induction of MHC class I/II-dependent mucosal and systemic immune responses via the nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue immune system, *J. Immunol.* 167 (2001) 1406–1412.
- [26] M. Harada-Shiba, K. Yamauchi, A. Harada, I. Takamisawa, K. Shimokado, K. Kataoka, Polyion complex micelles as vectors in gene therapy-pharmacokinetics and in vivo gene transfer, *Gene Ther.* 9 (2002) 407–414.
- [27] M.E. Akerman, W.C. Chan, P. Laakkonen, S.N. Bhatia, E. Ruoslahti, Nanocrystal targeting in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 12617–12621.
- [28] D.R. Larson, W.R. Zipfel, R.M. Williams, S.W. Clark, M.P. Bruchez, F.W. Wise, W.W. Webb, Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo, *Science* 300 (2003) 1434–1436.

特集にあたって

A new technology developing diagnoses and evaluation of therapy by bioimaging—Introduction



鈴木和男

Kazuo Suzuki

国立感染症研究所生物活性物質部, 日本バイオイメージング学会会長

治療や医薬の安全性が重視されている今日, 安全で経済性の高い医薬の提供, 非侵襲性の診断法や治療判定, 医薬・診断の安全性の評価など, これまでにない医療分野での新しい技術の開発が要望されている。一方, 治療薬の開発には莫大な費用がかかり, ひいては薬価へそれがはねかえってくる。また, 臨床試験にも莫大な費用と時間がかかり, 審査基準も厳しい状況から, 多くの日本の製薬企業は海外で臨床試験, 審査をしているともいわれている。このような現状のなかにあつて, あらたな診断法, 治療評価法を開発し, 的確で簡便な方法を利用した日本発信のテクノロジーを使った医療分野の発展を考えなくてはならない時代にさしかかっている。

このような状況のなか, 昨年(2003)から今年(2004)はじめにかけて“バイオイメージングによる医療応用をめざした”シンポジウムを3回企画した¹⁻³⁾。このときのテーマをもとに, 医療応用に関連するバイオイメージングの研究者に, 今回の特集のメインテーマ“バイオイメージングが切り開くあらたな診断・治療評価技術”に沿って執筆してもらうことにした。

これからの新しい“診断法”や“治療評価”に, “ナノテクノロジー”で開発された微小な分子や, 微細な構造解析法も使ってバイオイメージングのテクノロジーを利用することが日常的になってきている。つまりイメージング技術とナノテクノロジーとの融合による医学・生物の現象解析が不可欠になりつつあることを物語っている。その意味で, バイオイメージング技術は医療の先端技術であり, その医用応用への研究が急速に進展しつつある。このように, バイオイメージングの技術は医療分野での応用に取り入れられる状況になっている。その背景には医学・生物学において“みる技術”を活用した“バイオイメージング”が定着していることがあげられる。

そこで今回は, 新しいテクノロジーの創出による治療法・診断の方法の基礎や新しい治療法の開発などに主眼をおいた特集を企画した。

文献

- 1) 日本バイオイメージング学会・他: シンポジウム, バイオイメージングとナノテクノロジー, 東京, 2003年2月20~21日。
- 2) 日本バイオイメージング学会・他: シンポジウム, ナノとバイオの融合学理構築, 産業基盤形成, 松島, 2003年9月10~11日。
- 3) 日本バイオイメージング学会・他: シンポジウム, バイオイメージング—最近の進歩と医療への応用, 東京, 2004年1月9日。

血管炎初期反応のイメージング

In vivo imaging of MPO-ANCA related glomerulonephritis in mouse



長尾朋和(写真) 鈴木和男

Tomokazu NAGAO and Kazuo SUZUKI

国立感染症研究所生物活性物質部

◎腎炎, SLE, リウマチをはじめとする難治性血管炎は, 自己免疫疾患などの免疫異常による好中球の活性化や好中球自己抗体と連動して進行するものと予想されている。著者らはそのなかでも ANCA 陽性の急速進行性糸球体腎炎に注目し, その炎症初期に起こるであろうと考えられる血管傷害について, 腎血流の *in vivo* イメージング手法を用いて検討した。本稿ではその手法と結果について, 概略を解説したい。

Key word : 好中球自己抗体, 糸球体腎炎, *in vivo* イメージング

MPO-ANCA 陽性糸球体腎炎

Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) 陽性の急速進行性糸球体腎炎は, わが国においては myeloperoxidase (MPO) を抗原とする MPO-ANCA の抗体価が上昇するタイプが多くみられる¹⁾。MPO-ANCA 陽性の半月体形成性腎炎は糸球体基底膜に補体や免疫グロブリンの沈着を認めない pauci-immune 型であることが特徴であるが, 現在のところ, このような特徴を示し, かつ MPO-ANCA 単独で半月体形成性腎炎を誘導できる動物モデルは Xiao らの報告²⁾を除いて存在しない。MPO が MPO-ANCA の抗原になっていることは MPO 欠損マウスで明らかにされており³⁾, ほかにもリスクファクターとなるようなサイトカインやケモカインが報告されている^{4,5)}が, これらと MPO-ANCA がどのように血管炎の発症・進展にかかわっているのか, いまだ明らかになっていないのが現状である。また, 上記のように最適な動物モデルが存在しないため, これまで MPO-ANCA に関して得られた知見の多くは *in vitro* における実験によるものであった。しかし, 今後のより詳細な発症メカニズムの検討や, グロブリン

治療⁶⁾などの治療効果を含めた解析を行ううえで, *in vivo* における解析手法の確立が重要視されてきている。

腎微小血管傷害を起こす誘導型モデルマウス

著者らも, MPO-ANCA として polyclonal rabbit anti-mouse MPO antibody (anti-mMPO) のみを C57BL/6 マウスに静脈内投与した場合, anti-mMPO のみではマウスに腎炎を発症させることが不可能であった。そこで, モデルには *Candida albicans* 由来糖ペプチド CAWS, polyclonal rabbit anti-mouse MPO antibody (anti-mMPO) および fMet-Leu-Phe (FMLP) の 3 種類の物質を組み合わせ用いた。CAWS は大野らによって作製されたもので, 比較的大きいサイズの動脈に血管炎を誘導することが知られている^{7,8)}。また, FMLP は好中球走化性因子であり, これを用いて好中球を活性化することができる。そこで, これらを静脈内投与することで, 急性的に腎微小血管傷害を起こす誘導型モデルマウスの確立をめざした。最終的なプロトコールは C57BL/6 マウス(雄, 9 週齢)に CAWS (150 μg/mouse) を静脈内投与し, その 3

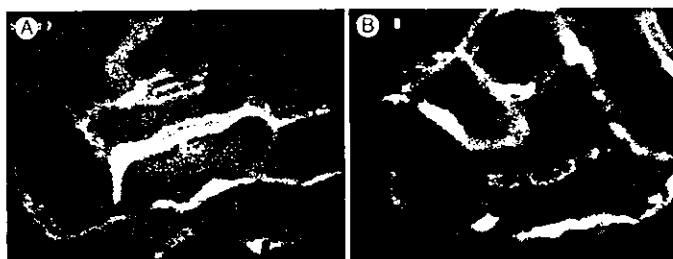


図 1 コントロールマウス(A)および CAWS+anti-mMPO+FMLPを投与したマウス(B)の腎表面血流

FITC-dextran によって蛍光を発生し、白く見える網目状の部分が毛細血管で、血管以外の暗い部分は尿細管である。コントロールマウスでは血流速度が速いため、個々の血球細胞を確認することができないが、腎炎を誘導したマウスでは血流が停止しつつあるため、赤血球などが黒いスポットとして確認できる。

時間後に anti-mMPO(1 mg/mouse)を、加えて 5 日後に fMet-Leu-Phe(FMLP, 10^{-8} mol/mouse)を静脈内投与するものである。このモデルマウスは慢性的な腎炎を引き起こすものではないが、FMLP の投与から一過性の蛋白尿などの特徴を示し、さらに糸球体には微小血栓もみられるなど、糸球体毛細血管に何らかの傷害を与えるものであった。

In vivo イメージング

著者らはこのモデルマウスの評価手段として、*in vivo* イメージングを利用した。とくに血管炎のように血管がおもな傷害の場合、血流のような生体内のダイナミックな変化をとらえることが可能な *in vivo* イメージング技術は非常に有用である。また、組織学的には変化が確認できないような、炎症における比較的初期段階を評価するためにも最適な手法といえる。これまでにも透過光による観察が容易な腸間膜微小循環系を対象とした研究が行われてきたが、実質臓器レベルにおいても臓器自体の厚みのために光透過が非常に悪いものの、蛍光物質をトレーサーとした臓器表層の血流観察が可能であり、これによって多くのあらたな知見が報告されてきている。著者らが観察対象とした腎臓は臓器全体に毛細血管がはりめぐらされており、血液による光吸収の影響が大きい。糸球体毛細血管の血流状態を観察することは非常に困難であった。しかし、リアルタイム共焦点顕微鏡⁹⁾や 2 光子励起顕微鏡¹⁰⁾などを用いて

糸球体血流を可視化することが可能になってきている。

著者らの用いた実験系は通常の蛍光顕微鏡観察と同様で非常にシンプルであり、モデルマウスの血流は蛍光物質 FITC-dextran を用いて可視化することとした。FITC-dextran の分子量は約 280,000 であり、通常の機能を有した血管であれば、血管外に漏れ出すことはない。すなわち、蛍光顕微鏡観察を行ったときに血漿のみが蛍光を発生することとなる。また、特殊な細胞以外にはほとんど取り込まれないため、赤血球などは蛍光を発生しない。実際の手順としては、麻酔下のマウスに FITC-dextran を尾静脈投与した後、背部を切開し腎のみを露出させた後、これを生存状態のまま倒立顕微鏡下において蛍光観察した。また、観察中はヒーティングプレートを用いて 37°C に保ち、さらに生理食塩水を用いて臓器の乾燥を防いだ。この方法によって腎表面を流れる尿細管周囲毛細血管の可視化が可能となり、また腎表面より 50 μ m 以内に存在する糸球体であれば、その毛細血管を可視化することも可能となった。しかし、残念ながら腎表面より 50 μ m 以内に存在する糸球体は非常に少なく、その後の解析に供する量の映像は得られなかった。そこで、観察対象となる血管は尿細管周囲毛細血管とし、その血流動態を DVD レコーダーで録画した後、画像解析を行った。

モデルマウスにおける血流の悪化

この観察手法を用いて確立した誘導型モデルマ

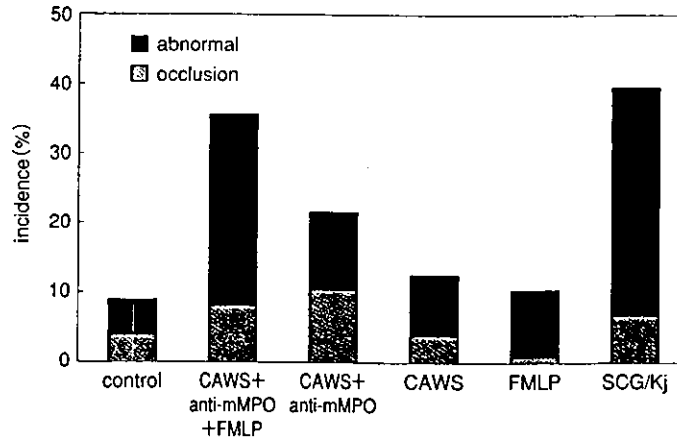


図2 各投与条件における血流が停止した血管(occlusion)と異常な血流がみられる血管(abnormal)の割合

CAWS, FMLP, anti-mMPO の3種類すべてを投与した場合において顕著な血流停止, 異常血流が観察され, 糸球体腎炎の自然発症マウスである SCG/Kj マウスにおいても同程度の血流停止や異常血流がみられた。

ウスおよび無処理のコントロールマウスにおける腎血流動態を比較したところ, モデルマウスにおいて顕著な腎微小循環の悪化が観察された(図1)。具体的には血流速度の低下・血流停止・血液の逆流などの現象が観察され, CAWS または FMLP 単独投与の場合と比較し, anti-mMPO を投与した場合に血流停止(occlusion)が誘発され(観察した血管の約10%), さらに3種類すべてを投与した場合には広範囲にわたる腎表面血流の悪化(abnormal)が観察された(観察した血管の約30%) (図2)。このような腎表面血流の悪化は, 糸球体腎炎の自然発症マウスである SCG/Kj マウスにおいても同様にみられた。さらに, この腎微小循環の悪化には血管内皮への白血球の接着を伴ったものもみられ, anti-mMPO を用いたこの腎炎誘導モデルにおいては MPO の関与が予想されることから, 観察された白血球のなかでもとくに MPO を発現している好中球が炎症における重要な役割を担っているものと考えられる。

おわりに

血管炎初期反応のイメージングとして, とくに糸球体腎炎を対象とした *in vivo* イメージングを紹介した。本手法により血管内で起こっている現象をリアルタイムにとらえることが可能となり,

その結果, MPO-ANCA が関連する血管炎の初期において, 内皮細胞への白血球の接着とそれによる血流の悪化がみられることが明らかとなった。近年のコンピュータ画像処理技術の進歩によって顕微鏡の性能も向上してきており, 上記の高速共焦点顕微鏡や2光子励起顕微鏡など, *in vivo* イメージングにより適した顕微鏡も開発されてきている。今後, これらの顕微鏡技術を用いた新しい知見が期待される。

なお, 本研究は厚生労働科研究費により行われた。

文献

- 1) 中林公正, 土岐岳士: ANCA 関連血管炎の臨床像。医学のあゆみ, 206: 130-132, 2003.
- 2) Xiao, H. et al.: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J. Clin. Invest.*, 110: 955-963, 2002.
- 3) Ishida-Okawara, A. et al.: Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation*, 25: 381-387, 2001.
- 4) Cockwell, P. et al.: Interleukin-8: A pathogenic role in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 55: 852-863, 1999.
- 5) Arimura, Y. et al.: Serum myeloperoxidase and serum cytokines in anti-myeloperoxidase antibody-associated glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.*, 40:

- 256-264, 1993.
- 6) Jayne, D. R. W. et al. : Intravenous immunoglobulin for ANCA-associated systemic vasculitis with persistent disease activity. *Q. J. Med.*, **93** : 433-439, 2000.
 - 7) 大野尚仁 : 血管炎を誘導する真菌糖蛋白質の免疫活性化. *医学のあゆみ*, **206** : 150-152, 2003.
 - 8) Ohno, N. : Chemistry and biology of angitis inducer, *Candida albicans* water-soluble mannoprotein- β -glucan complex (CAWS). *Microbiol. Immunol.*, **47** : 479-490, 2003.
 - 9) Oyanagi-Tanaka, Y. et al. : Real-time observation of hemodynamic changes in glomerular aneurysms induced by anti-Thy-1 antibody. *Kidney Int.*, **59** : 252-259, 2001.
 - 10) Dunn, K. W. et al. : Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **283** : C905-C916, 2002.

●お知らせ●

■広島がんセミナー・鳥取バイオサイエンス振興会国際シンポジウム

「Cancer and Epigenetics —Basic Research and Clinical Implication—」

日時：2004年10月30日(土)～31日(日)

場所：広島国際会議場

(広島市中区中島町1-5 広島平和記念公園内 TEL : 082-242-7777)

Symposium

1. To be announced
Jean-Pierre Issa (University of Texas M D Anderson Cancer Center, USA)
2. Studies of epigenetic regulation in imprinted domains in cancer
Mitsuo Oshimura (Tottori University, Tottori)
3. The role of histone modification in the imprinted gene
Satoshi Fujii (Hiroshima University, Hiroshima)
4. Role of histone modification in tumor suppressor gene silencing in cancers
Yutaka Kondo (University of Texas M D Anderson Cancer Center, USA)
5. The epigenetic hypothesis of cancer
Andrew P. Feinberg (Johns Hopkins University, USA)
6. Role of methylated DNA-binding proteins in transcription and genome stability
Mitsuyoshi Nakao (Kumamoto University, Kumamoto)
7. Function and regulation of the AML1 transcription factor complex

Issay Kitabayashi (National Cancer Center Research Institute, Tokyo)

8. Methylation pressure in neuroblastomas with poor prognosis
Toshikazu Ushijima (National Cancer Center Research Institute, Tokyo)
9. Epigenetic regulation of human genome universally involves CTCF/BORIS binding regions
Victor V. Lobanenko (NIH-NIAID, USA)
10. Genetic and epigenetic regulation of cell cycle genes in human aging
Hidetoshi Tahara (Hiroshima University, Hiroshima)
11. Histone deacetylases—Novel targets for cancer therapy—
Eric Verdin (University of California, San Francisco, USA)
12. Chemical genetic approach to cancer therapy
Minoru Yoshida (RIKEN Wako Institute, Saitama)

主催：財団法人広島がんセミナー

財団法人鳥取バイオサイエンス振興会

参加登録：事前登録要(参加費当日支払 5000円)

★主題に関連したポスター発表を公募します

締め切り：2004年8月10日

問い合わせ・申し込み先：

〒734-8551 広島市南区霞1-2-3

広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病理学研究室(旧病理学第一)内

国際シンポジウム事務局 安井 弥

TEL 082-257-5145 FAX 082-257-5149

Home page : <http://www.convention.co.jp/hcs/>

腎臓血管傷害のイメージング

国立感染症研究所生物活性物質部^{*}、東京理科大学理工学部^{**} 長尾 朋和^{*}、村山 研^{***}、越尾 修^{*}
東京薬科大学薬学部[†]、東邦大学医学部大橋病院[‡] 大野 尚仁[‡]、三浦 典子[‡]、高橋 啓[‡]
オタゴ大学(ニュージーランド)[§] 馬淵 綾子[§]、南谷 晴之[§]
慶應義塾大学大学院基礎理工学部^{||} 鈴木 和男^{***}

要 旨

腎炎、動脈炎、SLEなどの難治性血管炎は、好中球自己抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; ANCA)が血清中に検出される自己免疫疾患で、免疫異常や好中球活性化と連動して進行するものと予想されている。好中球活性化の関与については、病理組織切片の観察の知見によっているが、生体ではどのような状況で活性化されているかは明らかではない。おそらく、*in vivo*での血管内部は、血管炎に伴って、血圧・血流速度などの血行力学的因子が変化していると想像される。これらの血流因子の変化を*in vivo*で解析し、血管傷害の要因を検証することが必要である。この方法には、顕微鏡を用いた*in vivo*の生存状態で、臓器微小循環血流を観察して、血流のパラメーターを定量的に評価することが必要である。この方法により、腎炎において重要な働きを担っているものと思われる好中球の動態も*in vivo*での観察・解析が可能である。そこでわれわれは、腎炎の発症・進展におけるANCAおよび好中球の役割を明らかにするために、腎炎モデルマウスの構築および*in vivo*イメージング観察を行った。その結果、*Candida albicans*由来糖ペプチド(CAWS)、rabbit anti-mouse myeloperoxidase (anti-mMPO)およびfMet-Leu-Pheによって腎血管傷害を誘導したC57BL/6マウスでは、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流などが観察され、最も顕著な場合、広範囲にわたる腎表面血流の停止も観察された。さらに、これらの現象には血管内皮への白血球の接着も観察された。本腎炎誘導モデルにおいては、myeloperoxidase (MPO)が関連していることから、観察された白血球のなかでも特に好中球が炎症における重要な役割を担っているものと考えられる。

本血管炎誘導モデルにおいて開発した*in vivo*イメージングの評価法は、血管炎の進行によって誘発される多臓器不全の治療法の開発や、治療機転および発症機構を解析するうえで有用であることを示した。

I. 緒 言

難治性血管炎は、腎炎、動脈炎やSLEなどとして顕れ、その要因の1つにANCAが、血清中に増加することが明らかにされてきている¹⁾⁴⁾。このように、難治性血管炎には、自己免疫疾患などの免疫異常が関与している⁵⁾。また、ANCAの対応分子の主なものが、好中球顆粒酵素のprotease-3 (PR-3)やMPOであることから、好中球の活性化が発症や病態に関与していることが予想される⁶⁾⁷⁾。

また、生体防御機能の不全は、好中球や免疫細胞の機能破綻やそれによるサイトカインの異常なネットワークのかく乱を誘導し、種々の臓器障害をもたらす。血管内皮細胞は、サイトカインと活性化白血球の攻撃にさらされ、また、臓器内での異常反応の前線となる。特に、好中球活性化は、難治性血管炎の発症およびその要因になっていることが強く示唆されており、好中球の殺菌酵素であるMPOがMPO-ANCAの抗原になっていることをわれわれは明らかにした⁸⁾。すなわち、ANCAが好中球を活性化し、血管炎の発症に関わっている可能性を示唆した⁹⁾¹⁰⁾。

一方、血管炎の病初期には、病理組織切片の観察から好中球が浸潤していることから裏付けられている。しかし、病理所見による*in vitro*の観察は、生体の生きたままでの観察ではないことから、生体での状況をそのまま解析することはできない。血管炎に伴って、生体の血管内部では、血圧・血

流速などの血行力学的因子が変化していると推定されるが、*in vitro*では、これらの因子の変化をとらえることはかなり困難である。しかしながら、これらの因子が血管傷害に影響を及ぼすかを検証することが必要である。そこで、顕微鏡を用いた*in vivo*の観察システムより、生存状態で臓器微小循環血流を観察して、これらのパラメーターを定量的に評価することが必要である。さらに、重要な働きを担っているものと推定されている好中球の血管内部での動態も、本システムを使って*in vivo*での観察・解析をすることも重要である。一方、本システムの開発には、動物モデルが必要である。そこで、カンジダ菌成分Candida albicans derived substances (CADS)の接種による好中球抗体MPO-ANCAが血中に増加する冠状動脈炎モデルを用いた¹¹⁾。また、カンジダ菌外成分CAWSも血管炎を強く誘導することが可能である。

そこで、本研究では、CAWSによる腎傷害モデルマウスを作製し、本モデルマウスにより、*in vivo*イメージング法を開発した。それにより、腎炎の発症・進展におけるANCAおよび好中球の役割を検討した。

II. 研究方法

- ①多臓器不全関連血管炎モデルマウスの調整：C. albicans由来物質CAWSを投与して誘導した。
- ②*in vivo* イメージング：C57BL/6マウス(オス、9週齢)にCAWS(150 mg/mouse)をiv投与し、3時間後にanti-mMPO(rabbit anti-mouse myeloperoxidase, 1 mg/mouse)をiv投与した。5日後、同様にCAWSとanti-mMPOを投与した後、fMet-Leu-Phe(FMLP, 10^{-8} mol/mouse, 細菌由来トリペプチド)をiv投与し、その3日後に腎表面における血流状態を観察した。血流の可視化にはFITC-dextranを用い、各マウスの腎表面における尿管周囲毛細血管の血流を観察した。観察される血流動態は顕微鏡に接続したビデオカメラで撮影し、DVDに録画した。

III. 結果

腎血管傷害を誘導するためにCAWS, anti-mMPOおよびfMet-Leu-Pheを投与し、腎臓表面血管の*in vivo*イメージングにより、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流を観察・解析した。

- ①PBS投与のコントロールマウスでの腎臓血管の血流を観察した(図1)。



図1. コントロールマウスの腎血管の*in vivo*イメージング

②CAWS, anti-mouseMPOおよびfMet-Leu-Pheの投与による腎微小循環傷害のin vivoイメージング。

CAWS, anti-mouseMPOおよびfMet-Leu-Pheの投与によって、腎微小循環が悪化する様子がin vivoイメージングにより観察された(図2)。CAWSの投与によって、冠状動脈炎が誘導された。その頻度は、100%近い値を示した。この濃度以上の投与は、全身性の多臓器不全様ショックにて死亡した。また、in vivoイメージングの解析では、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止がみられた(図2)。

③血流遮断と血管内皮細胞への白血球接着。

腎臓表面血管の流速の変化も、CAWS+anti-mouseMPO+fMet-Leu-Pheのときに悪化した。血流速度の低下・血流停止・血液の逆流などの現象が観察され、CAWSまたはFMLP単独投与の場合と比較し、両者に加えてanti-mMPOを投与した場合に血流停止が誘発され(観察した血管の約10%)、広範囲にわたる腎表面血流の悪化が観察された(約30%)。さらに、この腎微小循環の悪化には血管内皮細胞への白血球の接着を伴ったものもみられた(図3)。

C57BL/6マウスにCAWS, anti-mMPOおよびfMet-Leu-Pheを投与して誘導される腎血管傷害をin vivoイメージングにより、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流を観察した。また、広範囲にわたる腎表面血流の停止も観察した。さらに、これらの現象には血管内皮への白血球の接着を伴ったものも観察された。

IV. 考 察

CAWSによって、冠状動脈炎が100%近く発症し、投与量の増加により、多臓器不全様ショックで死亡した。この血管炎誘導モデルにおいては、*C. albicans*由来糖ペプチドCAWSが、MPOおよびMPO-ANCA産生と発症誘導に不可欠であることから、CAWSなどの真菌由来分子がサイトカインと連動して好中球を活性化して、多臓器不全様の症状を誘発する役割を担っているものと考えられる。その結果、急速な血管炎を誘発し、ひいては、多臓器不全をきたしたと考えられる。そのCAWSに加え、anti-mouseMPOおよびfMet-Leu-Pheを投与し、in vivoイメージングすることにより、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着も



図2. CAWS誘導の腎血管傷害in vivoイメージング
CAWS+anti-mMPO+FMLP



図3. CAWS誘導の腎血管傷害in vivoイメージングにおける血管内皮への白血球の接着

みられた。この *in vivo* での現象が、腎血管傷害の誘導を説明できると思われるが、分子機構との関係を明らかにする必要があり、さらに検討する必要がある。CAWSおよびanti-mMPOによって誘導される腎微小血管傷害誘導モデルを用いた *in vivo* イメージングの解析から以下のような推論が得られた。まずCAWSによって好中球数の増加・好中球活性化が誘発される。この状態において投与された好中球自己抗体(anti-mMPO)は、活性化によって細胞膜表面へ移行したMPOと複合体を形成し、さらなる好中球の活性化・血管内皮細胞への接着・活性酸素種の産生を引き起こすと考えられる。このことから、白血球のなかでも特に好中球が炎症における重要な役割を担っているものと推察される。また、この *in vivo* イメージング解析による評価法は、CAWS誘導血管炎やSCG/Kjマウスなどの腎炎モデル^{12)・14)}での発症機構の解析に有用であり、本システムの利用が期待される。また、血管炎の治療法^{15)・17)}の新しい評価系として有用であると思われる。このように、微小血管傷害を生体内で観察するシステムは、血管炎や多臓器不全の治療法の評価や治癒機構の解析として、今後の利用が期待される。

文 献

- 1) Jennette JC, Falk RJ : Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases : a review. *Am J Kidney Dis* 15 : 517-529, 1990
- 2) Suzuki K : Neutrophil functions of patients with vasculitis related to MPO-ANCA. *Int J Hematol* 74 : 134-143, 2001
- 3) Savage COS, Winearls CG, Jones SJ, et al : Prospective study of radioimmunoassay for antibodies against neutrophil cytoplasm in diagnosis of systemic vasculitis. *Lancet* 1 : 1389-1393, 1987
- 4) Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, Elema JD, et al : Autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 37 : 799-806, 1990
- 5) Harper JM, Thiru S, Lockwood CM, et al : Myeloperoxidase autoantibodies distinguish vasculitis mediated by anti-neutrophil cytoplasm antibodies from immune complex disease in MRL/Mp-lpr/lpr mice : a spontaneous model for human microscopic angitis. *Eur J Immunol* 28 : 2217-2226, 1998
- 6) Tomizawa K, Mine E, Fujii A, et al : A panel set for epitope analysis of myeloperoxidase (MPO)-specific antineutrophil cytoplasmic antibody MPO-ANCA using recombinant hexamer histidine-tagged MPO deletion mutants. *J Clin Immunol* 18 : 142-152, 1998
- 7) Fujii A, Tomizawa K, Arimura Y, et al : Epitope analysis of myeloperoxidase (MPO) specific anti-

- neutrophil Cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in MPO-ANCA-associated glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 53 : 242-252, 2000
- 8) Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, et al : Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation* 25 : 381-387, 2001
 - 9) 鈴木和男 : 血管炎発症機構の解析研究-活性化好中球の関与. *医学のあゆみ* 206 : 133-139, 2003
 - 10) 鈴木和男 : ANCA関連血管炎の発症機序-活性化好中球の関与. *リウマチ科* 29 : 228-236, 2003
 - 11) Murata H, Iijima H, Naoe S, et al : The pathogenesis of experimental arteritis induced by *Candida* alkali-extract in mice. *Jpn J Exp Med* 57 : 305-313, 1987
 - 12) Kinjoh K, Kyogoku M, Good RA : Genetic selection for crescent formation yields mouse strain with rapidly progressive glomerulonephritis and small vessel vasculitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 3413-3417, 1993
 - 13) Cherry Engelman RW, Wang BY, Kinjoh K, et al : Calorie restriction delays the crescentic glomerulonephritis of SCG/Kj mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 218 : 218-222, 1998
 - 14) Ishida-Okawara A, Ito Ihara T, Muso E, et al : Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/kj mice. *Nephrol Dial Transplant*(in press)
 - 15) Jayne DR, Chapel H, Adu D, et al : Intravenous immunoglobulin for ANCA-associated systemic vasculitis with persistent disease activity. *QJM* 93 : 433-439, 2000
 - 16) Jayne DR : Update on the European Vasculitis Study Group trials. *Curr Opin Rheumatol* 13 : 48-55(Review), 2001
 - 17) Ito-Ihara T, Nogaki F, Ono T, et al : Intravenous immunoglobulin (IVIG) treatment of MPO-ANCA-related microscopic polyangiitis. *Cleveland Clin J Med Suppl* 69 : SII-188, 2002

Title:

Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives.

Authors:

Takuo Suzuki^{1,2}, Tomoko Nishimaki-Mogami¹, Hiroshi Kawai¹, Tetsu Kobayashi¹, Youichi Shinozaki¹, Yoji Sato¹, Toshihiro Hashimoto³, Yoshinori Asakawa³, Kazuhide Inoue¹, Yasuo Ohno¹, Takao Hayakawa¹, and Toru Kawanishi¹

¹National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

²Pharmaceuticals and Medical Device Agency, Tokyo, Japan

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, Tokushima, Japan

Running title: Natural nuclear receptor agonists

Summary

Nuclear receptors represent a very good family of protein targets for the prevention and treatment of diverse diseases. In this study, we screened natural compounds and their derivatives, and discovered ligands for the retinoic acid receptors (RARs) and the farnesoid X receptor (FXR). In the reporter assay system of nuclear receptors presented here, two fluorescent proteins, enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) and enhanced cyan fluorescent protein (ECFP), were used for detection of a ligand-based induction and as an internal control, respectively. By optimizing the conditions (e.g., of hormone response elements and promoter genes for reporter plasmids), we established a battery of assay system for ligands of RARs, retinoid X receptor (RXR) and FXR. The screening using the reporter assay system can be carried out without the addition of co-factors or substrates. As the result of screening of more than 140 compounds, several compounds were detected which activate RARs and/or FXR. Caffeic acid phenylethyl ester (CAPE), known as component of propolis from honeybee hives, and other derivatives of caffeic acid up-regulated the expression of reporter gene for RARs. Grifolin and ginkgolic acids, which are non-steroidal skeleton compounds purified from mushroom or ginkgolic leaves, up-regulated the expression of the reporter gene for FXR.

Key words

FXR, RAR, Reporter assay, Fluorescence, GFP, Caffeic acid, Ginkgolic acid, Grifolin

Introduction

Nuclear hormone receptors are ligand-activated transcription factors that are involved in a variety of physiological, developmental, and toxicological processes. The nuclear hormone receptor superfamily includes receptors for thyroid and steroid hormones, retinoids and vitamin D, as well as receptors for unknown ligands. These receptors share a highly conserved DNA-binding domain and a discrete ligand-binding domain, and bind to hormone response elements (HREs) on the DNA during the formation of homodimers, heterodimers, or monomers. This ligand-binding to nuclear receptors leads to conformational change of these receptors and the recruitment of coactivator complexes, resulting in the transcriptional activation (Khorasanizadeh and Rastinejad, 2001). Their ligand-dependent activity makes nuclear receptors good pharmacological targets.

Nuclear receptors form a superfamily of phylogenetically related proteins encoded by 48 genes in the human genome. Three isotypes of RARs (RAR α , RAR β and RAR γ) are receptors for retinoids such as all-*trans* retinoic acid (ATRA) (Petkovich et al. 1987; Brand et al. 1988; Krust et al. 1989). RAR α is associated with differentiation therapy for human acute promyelocytic leukemia (Hansen et al. 2000). RAR β plays a central role in limiting the growth of different cell types (reviewed in Hansen et al. 2000), and is thus a possible target for the treatment of breast and other cancers. RAR γ is also primarily expressed in the skin and is involved in skin photoaging and carcinogenesis, and in skin diseases such as psoriasis and acne (Fisher et al. 1996).

FXR is a receptor for bile acids such as chenodeoxycholic acid (CDCA), deoxycholic acid, cholic acid, and their conjugates. Bile acids are synthesized in the liver and secreted into the intestine, where their physical properties facilitate the absorption of fats and vitamins through micelle formation. Cholesterol disposal from the liver is also dependent on the bile acid composition of the secreted bile. Bile acids bind to FXR to

activate and regulate transcription of FXR target genes. FXR controls the expression of critical genes in bile acid and cholesterol homeostasis (Makishima et al. 1999; Parks et al. 1999; Wang et al. 1999). FXR-null mice show elevated serum cholesterol and triglyceride levels (Sinal et al. 2000), and an FXR agonist has been shown to reduce serum triglyceride levels (Maloney et al. 2000). FXR is thus an attractive pharmacological target for the treatment of hyperlipidemia. Moreover, an FXR agonist has been reported to confer hepatoprotection in a rat model of cholestasis (Liu et al. 2003).

RXR is a common heterodimeric partner for many receptors, including thyroid hormone receptor (TR), RAR, vitamin D₃ receptor (VDR), peroxisome proliferator activated receptor (PPAR), liver X receptor (LXR), and FXR, in addition to functioning as the receptor for *9-cis* retinoic acid (9CRA) during formation of a homodimer.

To determine ligands for these nuclear receptors, we developed a reporter assay system using GFP derivatives. To study the promoter and enhancer control of gene expression, firefly luciferase is widely used as a reporter protein because it has high sensitivity and a broad linear range. In the commonly used reporter assay, β -galactosidase, a well-characterized bacterial enzyme, or renilla luciferase is usually used in conjunction with firefly luciferase to normalize the transfection efficiency of the reporter gene (Sherf et al. 1996; Martin et al. 1996). In such cases, the activity of the two reporter proteins must be measured in different ways (e.g., absorptiometry and luminescence photometry) or by using two substrates. In the reporter assay presented here, we used two species derived from green fluorescent protein (GFP), one (EYFP) to measure the promotion and enhancement of gene expression, and the other (ECFP) to normalize the transfection, and were thus able to measure the fluorescent protein signals simultaneously without any co-factor or substrates. As the result of screening of more than 140 compounds, it was found that several compounds activate RARs and/or FXR.

Materials and Methods

Chemicals

Chenodeoxycholic acid was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), and all-*trans* retinoic acid and 9-*cis* retinoic acid were from Wako (Osaka, Japan). Ginkgolic acid 17:1, 15:0, and 13:0 were purchased from Nagara Science (Gifu, Japan).

Purification and synthesis of test compounds

Ginkgolic acid 15:1 was purified from *Ginkgo biloba* L. var. *diptera* according to Morimoto et al. (1968). 2-Methyl ginkgolic acid methyl ester was prepared by methylation of the ginkgolic acid with methyl iodide and K_2CO_3 (Paul and Yeddanapalli, 1956; Begum et al. 2002). Grifolin was purified from *Albatrellus confluens* and *Albatrellus ovinus* (Ishii et al. 1988; Nukada et al. 2002). We isolated bazzanenyl caffeate from the liverwort *Bazzania fauriana* (Toyota and Asakawa, 1988). We synthesized caffeic acid phenethyl ester (CAPE), farnesyl caffeate and geranyl caffeate for acquirement in quantity. The synthesis of CAPE by coupling reactions of caffeic acid and β -phenylethyl bromide was reported by Hashimoto et al. (1988), and the details for the synthesis of farnesyl and geranyl caffeates are described below. The purity of the compounds for the bioactivation test was shown to be over 95% by 1H - and ^{13}C NMR spectra.

Synthesis of Farnesyl caffeate

Twenty five % NaOH (2.5 ml) was added to a solution of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid) (2.10 g) in HMPA (hexamethylphosphoric triamide) (150 ml), and the mixture was stirred for 1 h under N_2 at room temperature. A solution of farnesyl bromide (4.98 g) in HMPA (20 ml) was added dropwise for 10 min to the reaction mixture. The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature, and poured in iced cooling

H₂O (300 ml). The organic layer, which was extracted with Et₂O (200 ml x 2), was washed with brine (300 ml), dried (MgSO₄) and evaporated under reduced pressure to an oil (6.75 g). The oil was chromatographed on silica gel (200 g) with a gradient solvent system of CHCl₃-EtOAc increasing the amount of 2% portions EtOAc stepwise to give 32 fractions. Farnesyl caffeate (1.435 g; Y. 43.2%) was obtained from 10% EtOAc-*n*-hexane eluate (Fr. 12-18) as a pure white powder. Caffeic acid (1.025 g; Y. 48.8%), the starting material, was recovered from 20% EtOAc-*n*-hexane eluate (Fr. 25-31).

Farnesyl caffeate: EI-MS: *m/z* 384 (M⁺, 5%), 315, 204, 180, 163 (100 %), 135, 93, 69; HR-MS: *m/z* 384.2307, C₂₄H₃₂O₄ requires 384.2300; Anal. Calcd for C₂₄H₃₂O₄: C, 74.97; H, 8.39. Found: C, 74.85; H, 8.30; FT-IR (KBr) cm⁻¹: 3480 (OH), 3301 (OH), 1678 (C=O), 1600, 1278, 1183; UV (EtOH)λ_{max}nm (log ε): 333 (4.15), 303 (4.00), 248 (3.90), 220 (4.03); ¹H NMR (acetone-d₆): δ1.56 (3H, *s*, CH₃), 1.62 (3H, *s*, CH₃), 1.65 (3H, *s*, CH₃), 1.76 (3H, *s*, CH₃), 4.68 (1H, *d*, J=7.0Hz, H-1'), 5.12 (2H, *m*, H-6' and H-10'), 5.41 (1H, *t*, J=7.0 Hz, H-2'), 6.26 (1H, *d*, J=15.9 Hz, H-β), 6.87 (1H, *d*, J=8.2 Hz, H-5), 7.03 (1H, *dd*, J=1.8, 8.2 Hz, H-6), 7.15 (1H, *d*, J=1.8 Hz, H-2), 7.53 (1H, *d*, J=15.9 Hz, H-α), 8.26 (1H, *br.s*, -OH), 8.49 (1H, *br.s*, -OH); ¹³C NMR ((acetone-d₆): δ16.1 (*q*, CH₃), 16.4 (*q*, CH₃), 17.7 (*q*, CH₃), 25.8 (*q*, CH₃), 26.8 (*t*, CH₂), 27.4 (*t*, CH₂), 40.1 (*t*, CH₂), 40.4 (*t*, CH₂), 61.3 (*t*, CH₂), 115.1 (*d*, CH), 115.7 (*d*, CH), 116.3 (*d*, CH), 120.1 (*d*, CH), 122.4 (*d*, CH), 124.6 (*d*, CH), 125.1 (*d*, CH), 127.6 (*s*, C), 131.6 (*s*, C), 135.9 (*s*, C), 142.1 (*s*, C), 145.6 (*d*, CH), 146.3 (*s*, C), 148.7 (*s*, C), 167.3 (*s*, -COO)).

Synthesis of Geranyl caffeate

Twenty five % NaOH (2.1 ml) was added to a solution of caffeic acid (2.00 g) in HMPA (150 ml), and the mixture was stirred for 1 h under N₂ at room temperature. A solution of geranyl bromide (3.10 g) in HMPA (20 ml) was added dropwise for 10 min to the reaction mixture. The reaction mixture was treated further as described above to afford geranyl

caffeate (1.48 g; Y. 61.4 %) as a white powder, and caffeic acid (0.56 g; Y. 28.0 %).

Geranyl caffeate: EI-MS: m/z 316 (M^+ , 10 %), 247, 180, 163 (100 %), 136, 69; HR-MS: m/z 316.1682, $C_{19}H_{24}O_4$ requires 316.1674; Anal. Calcd for $C_{19}H_{24}O_4$: C, 72.12; H, 7.65. Found: C, 72.01; H, 7.68; FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3483 (OH), 3295 (OH), 1678 (C=O), 1599, 1278, 1183; UV (EtOH) λ_{maxnm} (log ϵ): 334 (4.16), 302 (4.05), 249 (3.93), 222 (4.01); 1H NMR (acetone- d_6): δ 1.60 (3H, *s*, CH_3), 1.66 (3H, *s*, CH_3), 1.75 (3H, *s*, CH_3), 4.68 (1H, *d*, $J=7.0$ Hz, H-1'), 5.12 (1H, *t*, $J=7.0$ Hz, H-6'), 5.40 (1H, *t*, $J=7.0$ Hz, H-2'), 6.27 (1H, *d*, $J=15.9$ Hz, H- β), 6.87 (1H, *d*, $J=8.2$ Hz, H-5), 7.03 (1H, *dd*, $J=2.0, 8.2$ Hz, H-6), 7.16 (1H, *d*, $J=2.0$ Hz, H-2), 7.55 (1H, *d*, $J=15.9$ Hz, H- α), 8.28 (1H, *br.s*, -OH), 8.50 (1H, *br.s*, -OH); ^{13}C NMR ((acetone- d_6): δ 16.4 (*q*, CH_3), 17.7(*q*, CH_3), 25.8 (*q*, CH_3), 27.0 (*t*, CH_2), 40.1 (*t*, CH_2), 61.3 (*t*, CH_2), 115.1 (*d*, CH), 115.6 (*d*, CH), 116.3 (*d*, CH), 120.0 (*d*, CH), 122.4 (*d*, CH), 124.6 (*d*, CH), 127.6 (*s*, C), 132.0 (*s*, C), 142.1 (*s*, C), 145.6 (*d*, CH), 146.3 (*s*, C), 148.7 (*s*, C), 167.3 (*s*, -COO)).

Plasmid construction

Plasmids were constructed for the expression of RXR α , FXR and RARs. The ORF regions of human RXR α , human FXR, mouse RAR α 1, mouse RAR β 2, and mouse RAR γ 1 (accession numbers X52773, U68233, X57528, S56660, X15848) were amplified by PCR and inserted into pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), respectively. For reporter plasmids, the luciferase region of the pGL3-Control Vector (Promega, Madison, WI, USA) was replaced with the EYFP fragment of pEYFP-N1 or the ECFP fragment of pECFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) using *Nco*I and *Xba*I sites. Subsequently, the simian virus 40 (SV40) early promoter was cut out with *Bgl*III and *Hind*III, and replaced with the thymidin kinase (TK) promoter of the pRL-TK vector (Promega) or one of several other promoters (the 3' region of the TK promoter, the cytomegalovirus (CMV) promoter, or the