

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第 1 分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭 金正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭 金正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 ……	271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 ……	281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 ……	288
第4分野			
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 ……	307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 ……	315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 ……	319
第5分野			
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 ……	327
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 ……	336
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 ……	342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 ……	349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 ……	387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 ……	395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 ……	401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 ……	406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明

国立成育医療センター 消化器科医長 香坂隆夫

胆道閉鎖症患者の JAG1 遺伝子および蛋白と末梢血 HCMV 特異性 T 細胞を調べ、その低下を認めた。線維細胞産生因子は THP-1 に対し、増殖および分化、IL-8 の産生促進、細胞膜上の CD14 の発現などの作用を示す。serum amyloid A について macrophage 活性化作用を有することを THP-1 やヒト単核球を用いて確認した。

分担研究者

株式会社 ユーエムエー

多々納 俊雄

A. 研究目的

AGSや胆道閉鎖症の疾患はJAG1遺伝子などの異常が発生段階に関与しているが、胆道閉鎖症の原因としてHCMV感染の重要性は、広く認められその報告は多い。我々は、HCMVの病態として、胆道残遺物を中心に immediate early antigen が染色されることを示した。これらことは、HCMVとT細胞系の相互関係により病態が決定され、発症の因をなしている可能性がある。今回、胆道閉鎖症のHCMV特異的T細胞について検討し、HCMV感染が胆道閉鎖に及ぼす影響について検討した。これらの特異的T細胞の動きと分布を知ることにより、胆道閉鎖症におけるHCMV感染の意義とその発症機序を解明し、あわせてJAG1の炎症における役割を免疫機序との関連で明らかにすることを目的とした。

肝の炎症機序の検討として肝細胞樹立株を用いてJAG1について検討を行った。Huh7株を用いてTNF α の刺激によるIL-8産生が亢

進することを見出し、in vitro の系を確立し、JAG遺伝子を導入やJAG蛋白を添加実験などでサイトカインの産生に対する効果を調べた。これらの実験結果により、JAG1遺伝子の肝障害に対する役割を明らかにし、肝の炎症の持続の機序を解明する。

胆道閉鎖や慢性肝炎から肝繊維症への進展の機序として、繊維細胞自身が炎症を促す物質を産生し、新たな免疫反応を引き起こす機序を想定した。

AGSや胆道閉鎖症の疾患そのものは発生段階の異常に関与しているが、生後よりの持続的な肝障害、肝の繊維化も重要な所見であり、長期予後を決する因子である。JAG1遺伝子異常が、臓器の発症に重要でありAGSの責任遺伝子とされている。今回は胎生期の肝の発症のみならず、生後の肝障害の持続に対する役割について検討する目的ため、ヒト繊維細胞株KMST、マウス繊維細胞株3T3などの各種繊維芽細胞の培養上清を用いてTHP-1に対する刺激作用を調べた結果、THP-1に種々の免疫学的変化を示すことが明らかとなった。この因子の同定とその調節機序、とくにこの系におけるJAG 遺伝子の役割を明らかにし、胆

道閉鎖やAGSの生後の肝繊維化の機序を解明する。

このことは同時に他の成因によって生ずる臓器繊維化の機構の解明につながり、肝硬変症や腎硬化症の進展機序解明に役立つと考えられる。臓器不全とくに、肝不全や腎不全のような終末期の不全状態の進行を改善し、透析や移植への移行を防ぐことにより患者の治療に役立つ結果を得るとともに、結果として社会医療費の軽減に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1). 対象

国立小児病院ならびに成育医療センターに通院中の患者で遺伝子検索ならびに遺伝子によるHLA型判定、さらにHCMV抗体陽性で、本研究の趣旨につき了解の得られたAGS患者28例、胆道閉鎖症42例、その他の乳児、新生児期発症の肝疾患患者38例である。これらの患者については成育医療センターならびに国立小児病院の倫理委員会の指定書面による了解を得た。これの患者につきHLAの遺伝子解析を行い、0201または0206のHLA型を有する患者25名を対象としてHCMV特異的T細胞の検討を行った。測定は九州大学 滝口雅文研究室で、HLAのtypingは成育センター阿部淳免疫室室長のもとで行った。

2). 研究方法

JAGの肝細胞に対する効果

Hucct1、Huh7、3T3細胞、KMST細胞にJAG1遺伝子、JAG2遺伝子を導入したが、その方法はすでに発表した方法に準じて行った。Notch蛋白の発現、JAG1蛋白の効果はC末

端にFlagを固定し、anti-FlagIgGで検出した。3T3細胞に遺伝子導入し、その上清を添加し、ELISA法やwestern blotting法で検討した。

各種、樹立細胞株ACHN、Hucct1、Huh7、KMST細胞、3T3細胞は東北大学加齢研究所、細胞工学センターより譲渡されたものを用いた。肝細胞株であるHucct1、Huh7をTNF α で各種細胞を刺激したときの細胞増殖能とサイトカインの測定はそれぞれMTT法、ELISA法で行なった。

ルシフェラーゼアッセイ、NF- κ B gel shift assayについてはすでに発表した方法に準じて行った。

繊維細胞のTHP1への効果

Wild typeとmutant JAGの作成は、繊維細胞3T3にDulbecco's modified Eagle's mediumに10% FBSを添加して使用した。JAG1の遺伝子導入はSuperFect Transfection Reagentを用いて、その指示書に従って行った。JAG1蛋白の精製はQuagen社のプロトコールに従ってNi-NTAアガロースビーズを用いて行った。Western blotting法は5% BSAとTBST blocking bufferを用いてblockingを行い、1:1000程度の濃度で抗体を用いた。

3T3細胞と、THP-1細胞との関連はモノサイト系細胞への刺激系に準じて行い、増殖および分化、IL-8の産生促進、細胞膜上のCD14の発現などを、MTT法、ELISA法、Fax analysisで検討した。

倫理面への配慮

患者の検体を研究目的に使用するに当たり、成育医療センターならびに国立小児病院の倫理委員会の指定の書面で了解を得た。

AGS および胆道閉鎖症の検体は成育医療センターでは、HCMV 特異的 T 細胞に対する研究に引き継がれ、検体の採取を続けた。新たに新生児期、乳児期の肝疾患の患者と研究課題の拡張を行ったので、成育医療センターの倫理委員会の許可を得た。

C. 結果

1. 肺動脈狭窄と新生児期発症の肝炎における JAG 1 遺伝子異常の分布の比較

心疾患と肝疾患において、JAG 1 遺伝子異常を調べた。その結果では、肺動脈狭窄例 25 例では異常例なく、胆道閉鎖症に JAG 1 遺伝子の異常が 10% 存在することを見出した。JAG 1 遺伝子異常は肝疾患に多く認められることを確認したので、肝疾患に対する調査を 3 年間にわたり遂行し、JAG1 遺伝子異常を胆道閉鎖症で 10%、新生児肝炎でも 10%、劇症肝炎では 10% に見出した。とくに胆道閉鎖症においては重症例に偏位していること、その変異は肝炎、胆道閉鎖症では mis-sense mutation であることを見出した。この結果は、肝障害に JAG 1 遺伝子が関与していること、その異常の型は AGS に多く認められる異常の型である deletion とは異なっていることを明らかにした。

2. AGS における JAG1 遺伝子の作用機序

AGS は、常染色体優性の遺伝性疾患であり、肝内胆管閉塞は本疾患の本体をなす症状の一つである。この病態における JAG1 遺伝子の役割を知るため JAG1 遺伝子と hepatocyte growth factor gene (HGF) の関連について検討した。試験管内で、wild type と AGS に認められる mutants を COS-7 に導入し、HGF の転写 RNA の量、蛋白について検討した。wild type の JAG1 遺伝子

は、HGF の転写を抑制する。JAG1 mutant 遺伝子の変異部位によって異なる抑制を示した。機序的には、JAG1 蛋白の量的変動によって、HGF の発現が規定され、Notch2-JAG1 の系が HGF の過剰産生を抑制していると考えられた。

3. TNF α の肝細胞への効果と JAG 1 蛋白、JAG 1 遺伝子導入による影響

Hucct1、Huh7 などの肝細胞株に対して TNF α 刺激と同時に JAG 蛋白 (JAG1、JAG2) を添加することで細胞増殖能、IL-8 産生能の変化を検討した。Huh7 に対して TNF α で刺激したときの細胞増殖能との比較した結果、増殖には変化を認めず、TNF α の濃度に比例して、IL-8 産生が増加した。JAG 1 蛋白は全ての細胞で 40-80% 程度まで IL-8 産生抑制した。Huh7 では JAG1 遺伝子導入により、TNF α で刺激したときの IL-8 産生増強効果は著しく抑制された。さらに JAG 1 mutant 遺伝子による効果は、コントロール、polymorphism、AGS に認められた mutant の三種類で検討した。この中で蛋白の変化のない 3071 (最もよく認められる polymorphism) は抑制効果が認められないが、DSL region の 592、CR region の 3221 は wild のものに比し、産生抑制の効果は半分程度であった。以上より、肝炎において見出された mis-sense mutation により産生された JAG1 異常蛋白は抗炎症作用が弱く、JAG1 遺伝子異常者ではこのことが炎症持続の因をなしているとも考えられた。

4. NF κ B と JAG 1 蛋白、JAG 1 遺伝子導入による細胞内情報機構

Huh7 の細胞内伝達機構の変化を NF κ B の変化、ルシフェラーゼアッセイによって検

討した。ルシフェラーゼアッセイでは時間経過とともに、JAG 1 の抑制効果が認められた。NF κ B は p 50- p 52 p 65 の complex であるが活性化によってこの複合体が解離する。Huh7 における TNF α 刺激下での、JAG1 蛋白の添加による NF κ B 活性の変化を、ゲルシフトアッセイ (Electrophoretic mobility shift assay) で検討した。その結果、TNF α 刺激による p 50、p 65 の発現、JAG1 蛋白の添加による p 50、p 65 の発現抑制が観察された。このことより、TNF α の刺激はアポトーシス系よりも NF- κ B 系に強く関連しており、JAG 1 はこの作用を抑制すると考えられた。

5. 線維細胞の産生する THP1 細胞を活性化する因子と JAG 遺伝子

これまでの検討で 3T3 細胞の上清に種を越えて、THP1 細胞を活性化する因子の存在を見出したので、この産生機序について検討する目的で 3T3 細胞に JAG 遺伝子の導入を行いその効果について検討した。

JAG 1 遺伝子の導入によって、培養上清の THP1 を活性化する因子の産生は抑制されるが、JAG2 遺伝子導入細胞では無変化であった。また精製した JAG1 蛋白の効果では THP1 の培養系に加えても影響はなく、3T3 側に添加したときのみ限定的な抑制効果が認められた。このことより、THP-1 を活性化する因子は線維細胞の産生系に存在し、線維細胞側が JAG1 遺伝子、蛋白の調節を受けていることが示された。なお同様の実験を JAG2 についても行い、効果が認められないことを確認した。さらに KMST を始めとするヒトの多種類の繊維細胞樹立株が THP-1 の増殖および分化を誘導する蛋白を放出していること、この因子が JAG1 遺伝子導入、

および JAG1 蛋白により抑制されることを確認した。細胞株でない肝、腎由来のヒト繊維細胞でも効果が認められた。

6. 線維細胞上清の THP-1 細胞に対する作用 各種線維細胞に共通に認められる培養上清の THP-1 細胞に対する効果について検討してその同定に利用できる検査について検討した。結果は下記の通りである。

THP-1 細胞の活性化増殖作用についてまず検討した。線維細胞の培養上清の添加のもとで、THP-1 細胞は増殖が増大すると考えられ、24 時間、48 時間の培養を添加群、無添加群で比較した結果、MTT 法による測定で、1.5 倍から 2 倍の吸光度の増加が認められた。

THP-1 細胞の炎症性サイトカインの産生能の変化に対する検討では、TNF α 、IL-1、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインについて検討したが線維細胞の培養上清添加による THP-1 細胞の IL-8 の産生亢進は、培養上清の量的依存性に増大が認められた。

THP-1 の細胞分化に対する効果は FACS analysis による解析を行った。線維細胞の培養上清添加により THP-1 細胞膜上に CD11b、CD14 の出現が認められた。なお THP-1 の成熟型とされる AHP-1 では、刺激無しで CD14 の発現が認められ、かつ線維細胞の培養上清の添加に対しても変化を示さなかった。

7. 線維細胞の THP1 活性化因子の同定

JAG1 遺伝子および JAG 2 遺伝子の遺伝子導入による線維細胞の変動について検討した。遺伝子導入により線維細胞の THP1 活性化因子の産生に顕著な相違が認められた。

すなわち繊維細胞の産生する THP1 活性化因子は繊維芽細胞へ JAG1 遺伝子導入することにより産生が止まるが、JAG2 遺伝子導入では影響はなかった。JAG1 遺伝子および JAG2 遺伝子の両者を 3T3 細胞に導入し、DNA チップによる解析を試み、その変化より、解析を行った。解析の結果、JAG1 遺伝子導入した場合、JAG2 遺伝子導入した場合での相違は 100 種の遺伝子の mRNA 産生に相違が認められた。その中のひとつの候補として アミロイド 蛋白を取り上げ、serum amyloid P₁ が THP-1 に対し、同様の刺激作用を有することを確認した。この因子は、肝臓、腎臓、皮膚の繊維細胞からも放出されており、JAG1 蛋白の制御を受けている点でも共通であった。

D. 考察

繊維化を主体とする病変—特に末期臓器不全—肝硬変—腎硬化症など—の病勢に関与する因子について臨床基礎の両面から調べた。JAG1 遺伝子異常は胆道閉鎖症や劇症肝炎、新生児期の肝炎に認められ、肺動脈狭窄などの心疾患よりは肝疾患に異常が認められることを見出し、JAG1 遺伝子の肝疾患における役割について炎症の抑制という面から調べた。TNF α は肝炎の一次的な炎症性サイトカインであり、アポトーシスの誘導など、劇症肝炎などで中心的な役割を果たす。TNF α で刺激したときの IL-8 産生増強効果は JAG1 によって抑制された。JAG1 mutant 遺伝子はこの作用の減弱が認められ、炎症の調節障害が存在し、肝炎の持続に関与していることが示唆された。HGF は肝幹細胞に

おける、分化増殖に重要な役割を演じていることはよく知られている。AGS に認められる JAG1 遺伝子の heterozygous な異常に伴って生じた AGS の過剰発現は、肝の分化に影響を与える可能性を示した。肝幹細胞は肝細胞と胆管細胞に分化する際、種々の影響を受けるが、その一つとして HGF の調整の不十分さが関与していることを示した。

胆道閉鎖症の成因については、種々の論争があり、先天奇形、炎症免疫異常、それを引き起こすため因子として、ウイルス説や胆管炎症惹起物質説などがある。我々はすでに、胆道閉鎖症において JAG1 遺伝子異常を見出し、この異常が miss-sense の type であり、AGS に認められる deletion や stop codon による変異とは異なることを発表した。この異常も JAG1 遺伝子としての働きは、半分程度であることから、異常をきたす原因となることを示唆してきた。今回、さらにこの点を追求し、HCMV との関連を調べる目的で HCMV 特異的 T 細胞について検討した。その結果、発病時には末梢血で調べる限り、この細胞は低値であった。この全身反応の弱さが、局所の反応を逆に強める結果となっているのか、局所の反応が進行しているために、HCMV 特異的 T 細胞が少ないのかは、今後検討する必要があるが、この結果が胆管局所の反応を反映しているとすれば、意義は高いと考える。

繊維化を主体とする末期臓器不全—肝硬変—腎硬化症など—に関与する因子について基礎の両面から調べた。とくに繊維細胞の放出する macrophage 活性化因子と JAG1 遺伝子との相互関連を検討した。線維細胞の放出する液性因子の THP-1 に対する作用を検討し、増殖分化、IL-8 の産生亢進、

THP-1 細胞自身の CD14、CD11b の発現増強の効果を確認した。

JAG 1 遺伝子の線維細胞への導入によって、培養上清の THP-1 を活性化する因子の産生は抑制されるが、JAG2 遺伝子導入細胞では無変化であった。また JAG 蛋白の効果では THP-1 の培養系に加えても影響はなく、3T3 側に添加したときのみ限定的な抑制効果が認められた。以上のことより、THP-1 を活性化する因子は線維細胞の産生系に存在し、線維細胞側が JAG1 遺伝子、蛋白の調節を受けていることが示された。さらに多種類の繊維細胞樹立株が THP-1 の増殖および分化を誘導する蛋白を放出していること、この因子が JAG1 遺伝子導入、および JAG1 蛋白により抑制されることを確認し、肝、腎由来のヒト繊維細胞でも効果が認められた。この因子は、ATHP-1 には、何ら影響を与えないことより、分化過程にある monocyte 系に対してのみ、増殖、分化などの効果があると考えられた。

この繊維細胞の放出する macrophage 活性化因子の産生は JAG1 遺伝子およびその産物の調節を受けていると考えられた。このことを利用して、DNA チップにより、候補をもとめ、そのひとつとして、アミロイド蛋白について検討し、SAP にその活性があることを見出した。しかし、SAA などについての検討は済んでおらず、今後さらに因子の種類と機序について検討が必要と考えられる。いずれにしても、炎症蛋白のひとつが macrophage を活性化するということが、肝の繊維化が炎症によって増強するというを示唆しており、臨床の結果をよく反映する機序と考える。

線維細胞の放出する THP-1 活性化因子の

臓器の線維細胞間の相違は顕著でなく、末期臓器不全の免疫反応の経過を普遍的に説明しうる機序と考えられる。今後の研究の方向性としては macrophage 活性化因子の同定と JAG1 の制御機構の解明を通して臓器繊維化への進展を防ぐ臨床に役立つ方向に進めていきたい。

E. 結論

臨床的な検討では、胆道閉鎖症をはじめとする小児期発症の肝疾患における JAG1 遺伝子異常を調べ、1 割に mis-sense mutation を見出した。

HCMV 感染の胆道閉鎖症を調べ HCMV 特異的 T 細胞の全身的な反応派、むしろ低下しており、このことが局所症状を増悪させている可能性がある。

繊維芽細胞の培養上清について検討し、THP-1 に対し、増殖分化、IL-8 の産生亢進、細胞の CD14 の発現などの作用を示す液性因子を見出し、さらに JAG1 遺伝子および蛋白がこの因子の産生を調節していることを立証した。繊維芽細胞の産生する因子は JAG 2 遺伝子の影響は受けないことをより、この両者を 3T3 細胞に導入し、DNA チップによる解析を試み、serum amyloid P が THP-1 に対し、同様の刺激作用を有することを確認した。繊維細胞が放出している因子の一つと考えられた。さらに異なる因子の同定とその作用機序が解明されれば、炎症と繊維化の機序解明と繊維化阻止への治療の開発が可能となることが期待できる。

F. 研究発表

発表論文

1. Yuan ZR, Kobayashi N, Kohsaka T.

- Human JAGged 1 mutants cause liver defect in Alagille syndrome by overexpression of hepatocyte growth factor. *J Mol Biol.* 2006 24;356(3):559-68.
2. Nakamura A, Imaizumi A, Niimi R, Yanagawa Y, Kohsaka T, Johns EJ. Adenoviral delivery of the beta2-adrenoceptor gene in sepsis: a subcutaneous approach in rat for kidney protection. *Clin Sci (Lond).* 2005 109(6):503-11.
3. Kano H, Ito Y, Matsuoka K, Nakajima T, Iwata T, Kohsaka T, Saito H, Abe J. Critical role of T cell migration in bacterial superantigen-mediated shock in mice. *Clin Immunol.* 2004 Feb;110(2):159-71.
- 4: Nakamura A, Imaizumi A, Yanagawa Y, Kohsaka T, Johns EJ., beta(2)-Adrenoceptor activation attenuates endotoxin-induced acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Feb;15(2):316-25.
5. Kano H, Ito Y, Matsuoka K, Nakajima T, Iwata T, Kohsaka T, Saito H, Abe J. Critical role of T cell migration in bacterial superantigen-mediated shock in mice. *Clin Immunol.* 2004 Feb;110(2):159-71.
- 6: Nakamura A, Imaizumi A, Yanagawa Y, Kohsaka T, Johns EJ., beta(2)-Adrenoceptor activation attenuates endotoxin-induced acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Feb;15(2):316-25.
- 7: Donadini R, Wahlberg M, Kohsaka T, Ito Y, Fields BA. Related Articles, Links Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2003 Jul;59(Pt 7):1330-2. Epub 2003 Jun 27.
- 8Nakamura A, Imaizumi A, Yanagawa Y, Niimi R, Kohsaka T, Johns EJ. Beta2-adrenoceptor activation inhibits Shiga toxin2-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2003 Jul 15;66(2):343-53.
- 9: Abe J, Kano H, Nogami H, Matsumoto S, Baba K, Saito H, Kohsaka T. Pathogenic role of a superantigen in *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Adv Exp Med Biol.* 2003;529:459-61
- 10: Kano H, Ito Y, Matsuoka K, Iwata T, Saito H, Kohsaka T, Abe J. Role of T cells and gamma interferon in *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen (YPM)-induced toxicity in mice. *Adv Exp Med Biol.* 2003;529:137-9.
- 11: Nakamura A, Imaizumi A, Yanagawa Y, Niimi R, Kohsaka T. Suppression of tumor

necrosis factor-alpha by beta2-adrenoceptor activation: role of mitogen-activated protein kinases in renal mesangial cells.

Inflamm Res. 2003 Jan;52(1):26-31.

2. 学会発表

2004 年東京 (第 31 回日本小児栄養消化器肝臓病学会)、2004 年 9 月 18 日

胆道閉鎖症におけるウイルス感染の意義

田川 学、肥沼 幸、香坂隆夫

2004 年東京 (第 31 回日本小児栄養消化器肝臓病学会)、2004 年 9 月 18 日

胆道閉鎖症術後の妊娠 7 例の臨床経過とその検討

肥沼 幸、田川 学、黒田達夫、村島温子、北川道弘、香坂隆夫

図およびその説明

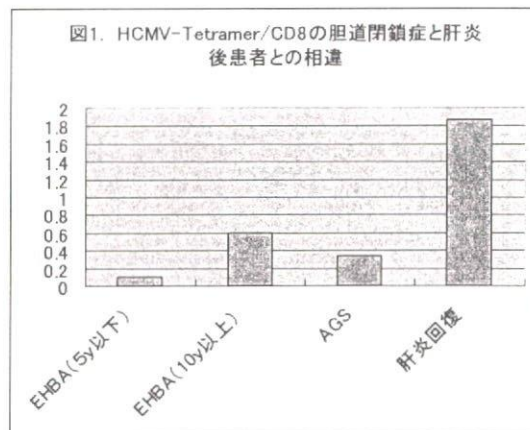


図 1.胆道閉鎖症の 5 歳以下の群は HCMV/CD8 比が他の群に比し有意に低い。肝炎後の患者はすべてこの時点は活性化しているものは含まれていない。

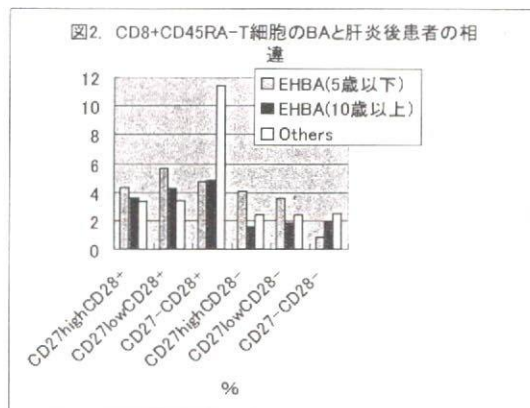


図 2.CD8+CD45RA+細胞の群は BA は CD27+CD28+群で高く、CD27-は低下傾向を示す。CD45RA+CD27+は監視機能として働いている可能性が示唆されている。

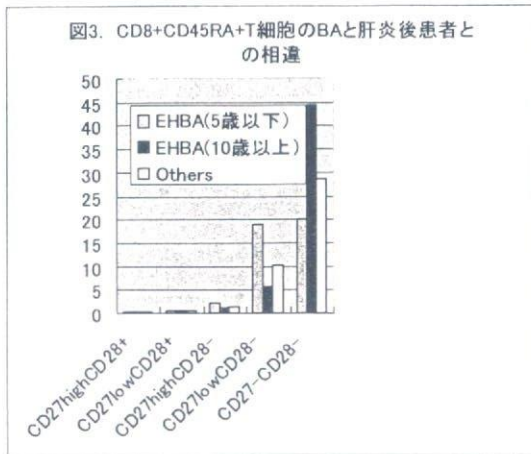


図 3. CD8+CD45RA+CD28+ 分画は effector T 細胞を含むが、BA は CD28⁻ が有意に上昇している。CD27⁻CD28⁻ は低下傾向を有する。CD27⁻CD28⁻ は低下傾向を示す。

2002/05/13
violet:control
red:IgG
sky blue:LPS
blue:SAP
green:RPMI+FCS from KMST
yellow:RPMI+toreharose from KMST

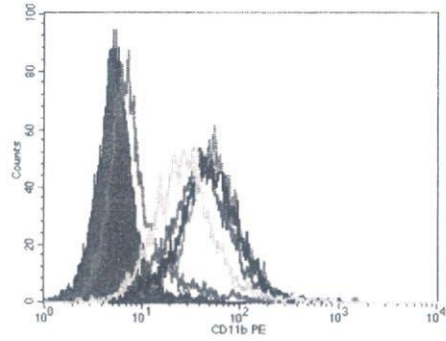
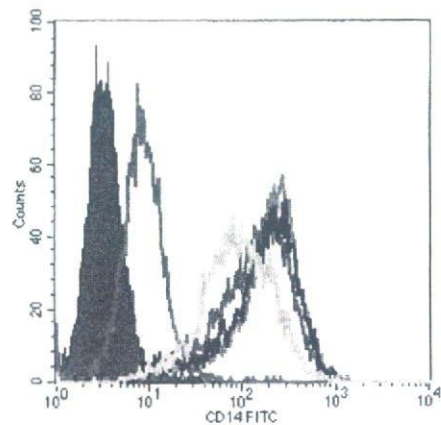


図 4. CD11b THP-1 の変化
KMST 10*5/100ml 48 h 培養の上清 FCS
toreharose 添加、IgG 1mg/ml、LPS 1 μg/ml
をそれぞれ加えて 24 h の培養を行った。

2002/05/13
violet:control
red:IgG
sky blue:LPS
blue:SAP
green:RPMI+FCS from KMST
yellow:RPMI+toreharose from KMST

図 5
CD14 THP-1 の変化
KMST 10*5/100ml 48 h 培養の上清 FCS
toreharose 添加、IgG 1mg/ml、LPS 1 μg/ml
をそれぞれ加えて 24 h の培養を行った。



平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31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