

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JAG1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ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	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	アレルギー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	アレルギー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・再生療法の確立	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－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－（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

免疫グロブリン大量静注療法の作用機序解明と新しい治療標的分子の探索

所属 国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部
研究者 阿部 淳

研究要旨 免疫グロブリン大量静注療法の作用機序を明らかにすることを目的として、川崎病患者末梢血における遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。また急性期患者血清による血管内皮細胞機能の障害作用について解析した。同療法によるモノサイトの多彩な機能抑制、および血管内皮細胞機能の回復が証明された。

分担研究者

(1) 千葉大学大学院医学研究院小児病態学

寺井 勝

(2) 株式会社ベネシス研究開発本部 平尾 豊

A. 研究目的

免疫グロブリンは感染症のみならず種々の疾患、病態の治療薬として用いられている。免疫グロブリンの病原微生物感染における防御作用の機序として考えられる経路には、(1)細菌、ウイルスの増殖に対する特異抗体を通じた中和作用、

(2)細菌、ウイルスが産生する毒素に対する特異抗体を通じた中和作用、(3)抗原抗体複合体を形成することによる貪食殺菌能の増強(オプソニン効果)、(4)同じく抗原抗体複合体を形成することによる抗体依存性細胞障害活性の増強、などがあげられる。一方、静注用免疫グロブリン製剤が普及して比較的大量の免疫グロブリンを経静脈的に投与することが可能になった結果、このような感染症以外の分野でも、とくに自己免疫性疾患を中心として、免疫グロブリンのもつ種々の免疫修飾作用を期待した治療法が試みられるようになった。これらの治療の理論的根拠としては、

(1)免疫グロブリンのFc部分がマクロファージのFc受容体をブロックする、(2)マクロファージやリンパ球の抑制型Fc受容体に結合して細胞の活性化をおさえる、(3)活性化された血清中の補体が非特異的に細胞傷害を起こすをおさえる、(4)自己抗体に対する抗イディオタイプ抗体としてはたらく、などがあげられる。現在、特発性血小板減少性紫斑病、川崎病、ギラン・バレー症候群の3疾患に対して、免疫グロブリン大量静注療法(IVIG療法)の臨床効果が確認され保険適用が承認されているが、各々の疾患における免疫グロブリンの作用機序は必ずしも明らかではない。

本研究では、乳幼児に好発する全身性血管炎である川崎病に的を絞って、IVIG療法の作用機序を分子レベルで明らかにすることを目的とする。川崎病における免疫グロブリン大量静注療法の目的は、“急性期の強い炎症反応を可能な限り早期に終息させ、結果として合併症である冠動脈瘤の発症頻度を最小限にすること”(川崎病急性期治療のガイドライン、日本小児循環器学会学術委員会、2003)である。実際に、川崎病急性期治療におけるIVIG療法の有効性は確立しており、冠動脈瘤の発生率の低下が報告されている。しかしIVIG療法の作用機序には未だ不明の部分が多く、治療抵抗例も少なからず存在する。これらの治療抵抗例から冠動脈瘤の発生する頻度が高いこと、抵抗例に対する代替療法も未だ確立していないことから、IVIG療法の作用機序の解明が早急に求められている。

昨年度の本研究では、IVIG療法前後での川崎病患者の末梢血単核球の遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイで解析することにより、IVIG療法後に発現が低下する131個の遺伝子と発現が増強する67個の遺伝子を見出した。このうちの18個をIVIG療法で抑制的に制御される遺伝子として集中的に解析し、IVIG療法の治療効果の早期判定に有用と思われる分子(S100カルシウム結合蛋白および活性型Fcガンマ受容体など)を同定した。また、急性期の川崎病患者血清によって、培養HUVECの管腔形成能と透過性機能が強く障害されることを見出した。IVIG療法不応症例では治療後血清による内皮細胞障害活性が残存することから、IVIG療法の作用機序を探索する上で有用な実験系になると考えられる。本年度は以上の成果を背景として、(1)IVIG療法前後での免疫細胞の遺伝子発現の変化を好中球も含めて解析するために、静脈血全血を材料としたDNAマイクロアレイ解析を行うこと、(2)IVIG不応症例の血清によって惹起される血管

内皮細胞の機能障害についてさらに検討し、IVIG 添加の影響について解析すること、(3) IVIG 療法で使用される濃度の IgG が種々の血管内皮細胞の機能に及ぼす影響について解析すること、以上の3点を柱として研究をすすめた。

B. 研究方法

(1) マイクロアレイ解析

急性期の川崎病患者 5 名から IVIG 療法の開始前と終了後間もない時期に静脈血を採取した。また対照として発熱が 3 日以上持続した同年齢の患者 4 名から静脈血を採取した。PAXgene™ Blood RNA Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、Affymetrix 社の Globin Reduction プロトコールに従って網状赤血球由来のグロビン mRNA を除去した。精製された RNA から cRNA を合成し、Affymetrix 社の GeneChip™ (HG-U133 Plus) および Agilent Technologies 社の遺伝子発現解析ソフト GeneSpring™ を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。(研究協力者：斎藤博久、国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部長)。

(2) マイクロアレイ解析の確認

急性期の川崎病患者 20 名から IVIG 療法の前後に静脈血を採取した。PAXgene™ Blood RNA Kit および Globin Reduction プロトコールによって RNA を精製し、リアルタイム RT-PCR を用いて mRNA 発現量の変動を確認した。

(3) 川崎病患者血清

千葉大学付属病院にて入院加療を行った 22 例の川崎病患者 (計 40 検体) の凍結保存血清を使用した。22 例中、10 例が IVIG 反応例、12 例が IVIG 不応例である。

(4) 培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた機能試験

インビトロ管腔形成能およびインビトロ透過性試験は、前年度の報告書に記載した方法を用いて行った。今年度用いた条件は以下の通りである。

a) 精製 IgG、ペプシン処理化 IgG ならびに牛血清アルブミン (BSA) を健常血清とともに HUVEC に添加し透過性ならびに管腔形成能を測定した。

b) vascular endothelial growth factor (VEGF) の可溶性レセプター (soluble-VEGFR1) と、VEGF2 レセプターに対する特異的阻害薬 (VEGFR2-I) によって前処置を行い、IVIG 不応例患者血清によって惹起される透過性の変化を検討した。

c) p38MAPK の選択的阻害剤 (SB203580) および Erk の選択的阻害剤 (PD98059) によって前処置

を行い、IVIG 不応例血清によって惹起される HUVEC 機能障害の変化を検討した。

(5) 各種 IgG 標品の精製

市販の静注用 intact IgG 溶液を透析処理して蒸留水に置換した後、50,000MW 膜 (Sartorius 社、VIVASPINE CONCENTRATOR) を用いて遠心分離濃縮を行い、IgG20%濃度とした。F(ab')₂ 分画の精製は、市販の静注用 intact IgG 溶液を 100mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) で透析処理後、ペプシンで 37℃ 24 時間酵素処理を行い、PBS (pH7.4) で再度透析処理後、プロテイン A 処理を行い、非吸着画分を分取し 10 万カットの濃縮膜にて濃縮した。また、市販の静注用 intact IgG 溶液を 5mM リン酸緩衝液 (pH8.0) にて透析後、システイン、EDTA およびパパイン (100 μg/mL) で 37℃ 24 時間酵素処理を行った後、10mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) で透析し、50%飽和硫酸沈殿物を蒸留水に溶解した。蒸留水にて透析処理 (5℃) を行うと Fc は結晶化する。結晶化 Fc を集め溶解・結晶化を繰り返して精製 Fc 画分とした。抗 LPS-IgG 除去標品は LPS カップリング担体カラムを用いたアフィニティー吸着により精製を行った。

(6) 各種血管内皮細胞の刺激培養

ヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC) およびヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) は Cambrex 社から購入した。コンフルエントになった細胞培養液中に LPS を 10~1000ng/ml の濃度で添加した。精製 IgG、F(ab')₂ 分画および Fc 分画は、LPS 添加の 1 時間前に最終濃度が 10mg/ml IgG 相当になるように液体培地中に加えた。

(7) mRNA の定量

LPS 添加の 1、4、20 時間後に、RNeasy® Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、GAPDH、IL-6、IL-8 の各遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR により測定した。

(8) 培養上清中の IL-6 蛋白の検出 (ELISA)

IgG、F(ab')₂ 分画、Fc 分画で前処理した HCAEC を LPS (0、10、100ng/ml) 存在下で 24 時間刺激培養し、上清を回収した。ELISA kit (R&D 社) を用いて上清中の IL-6 を定量した。

(倫理面への配慮)

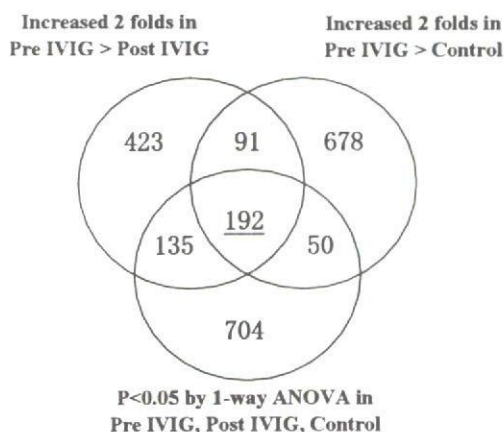
臨床検体を用いる遺伝子発現プロファイル解析の研究計画については国立成育医療センターの倫理審査を受け承認された。また臨床検体の採取および臨床情報の提供に当たっては、研究協力者の所属する各機関における倫理委員会の承認を得た。川崎病患者および健常者の血清の採取ならびに研究計画については千葉大学大学院医学研究院の倫理審査委員会の承認を得た。本研究の目的及び医

学的貢献について代諾者に十分に説明した上で、各所属機関における倫理規定に合わせて検体採取の同意を得た。また検体情報を記号化することにより、患者名などの個人情報が出ないように配慮した。

C. 研究結果

(1) PAXgene™ システムを用いた末梢血全血での遺伝子発現解析

IVIg 療法後の川崎病患者 4 名において、治療前と比べて発現が 2 分の 1 以下に有意に低下した遺伝子プロンプが 841 個、逆に 2 倍以上に上昇した遺伝子プロンプが 512 個見出された ($p < 0.05$)。さらに発熱対照群の 4 名における遺伝子発現プロファイルを加えて 1-way ANOVA 解析を行ったところ、治療前の川崎病患者群において遺伝子発現が 2 倍以上に上昇していた遺伝子プロンプが 242 個、発熱対照群において遺伝子発現が 2 倍以上に上昇していた遺伝子プロンプが 608 個見出された (下図)。



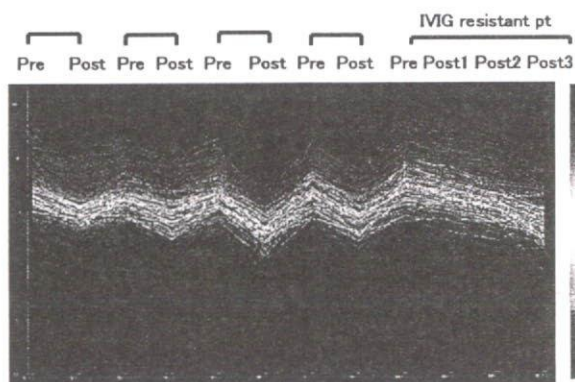
1-way ANOVA解析の結果から、治療前の川崎病患者群における遺伝子発現が治療後の川崎病患者群および発熱対照群と比べて2倍以上に上昇していた192個の遺伝子プロンプを、IVIg療法により抑制的に制御されたマーカー遺伝子群として抽出した。

(2) IVIg療法が無効だった川崎病患者の遺伝子発現プロファイル

IVIg療法に抵抗性を示した川崎病患者1名を選択して、IVIg療法前、1回目のIVIg療法後、2回目のIVIg療法後、ステロイド療法による寛解後の4時点で静脈血を採取し、(1)で抽出した192個のマーカー遺伝子群の発現量の変化を調べた。

IVIg療法抵抗症例では、192個のマーカー遺伝子群の発現量は1回目および2回目のIVIg療法後も治療前と比べて低下せず、ステロイド静注療法によ

って解熱した後、初めて発現量が低下した (下図)。



(3) DNAマイクロアレイ結果の確認

急性期の川崎病患者20名の末梢血全血から抽出したRNAを用いて、リアルタイムRT-PCRによりmRNA量の変動について解析した。その結果、解析した21種類の遺伝子のうち、マイクロアレイ解析でIVIg療法前と比べて治療後の発現量が2分の1以下に低下していた遺伝子19種類で、IVIg療法後の発現量が有意に低下することが確認された。この中には、昨年度の精製モノサイトをを用いた遺伝子発現解析で注目された、S100A9、S100A12などのS100カルシウム結合蛋白ファミリー、高親和性ガンマグロブリン受容体 (FCGR1A)、さらにIL-1b、IL-8、IL-10などの炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子が含まれていた。同時に測定したIL-6のmRNA発現量は、IVIg療法後も有意な低下はみられなかった。

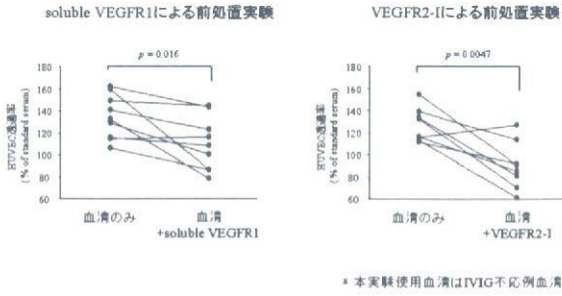
(4) IgGのヒト血管内皮細胞機能への影響

精製 IgG、ペプシン処理化 IgG、BSA を種々の濃度 (0.1~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で添加し HUVEC への影響を調べた。単層培養へ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高濃度で添加すると、どの成分でも細胞間透過性がわずかに抑制されたが、各成分間に有意差は認めなかった。またインビトロ管腔形成能への影響は認められなかった。

(5) VEGF の機能抑制と内皮細胞の透過性抑制との関連

昨年度の実験では IVIg 不応症例の血清には HUVEC の細胞間透過性亢進作用 (平均 134.8%) が認められた。今回、血清を soluble-VEGFR1 あるいは VEGFR2-I とともにインキュベートすることにより、血清の透過性亢進作用は各々 110.2%、90.4%まで有意に ($p=0.016$, $p=0.0047$) 抑制された。(下図)。

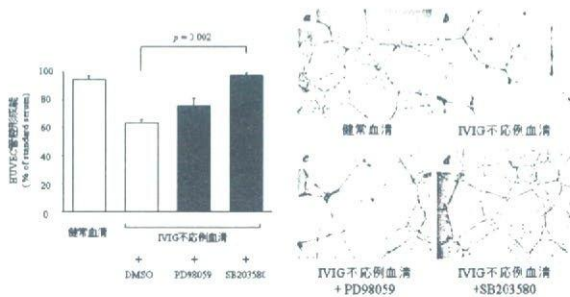
VEGFを標的としたHUVEC透過性抑制実験



(6) シグナル伝達阻害剤による管腔形成能と細胞間透過性への影響

IVIG 不応症例の血清刺激によって亢進していた HUVEC 透過率 (平均 127.2%) は、PD98059 による前処置では有意の変化はみられなかった (119.0%, $p=0.28$)。しかし、SB203580 による前処置では、HUVEC 透過率は有意に抑制された (96.6%, $p=0.027$)。また、IVIG 不応症例の血清刺激によって低下した HUVEC 管腔形成能 (平均 63.5%) は、PD98059 による前処置では有意の変化はみられなかった (76.0%, $p=0.17$)。しかし、SB203580 による前処置では、低下していた管腔形成能が有意に改善され健常血清レベルにまで亢進した (97.5%, $p=0.002$) (下図)。

シグナル伝達物質阻害剤を用いたHUVEC管腔形成能実験

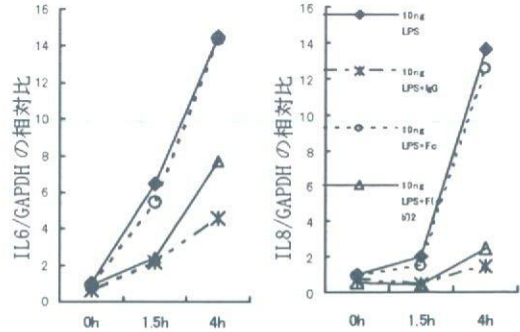


(7) LPS 刺激による血管内皮細胞からの IL-6、IL-8 産生亢進と IgG 添加による抑制

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) および冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC) を LPS で刺激培養すると、4 時間後をピークとして IL-6、IL-8 の mRNA 産生の亢進が認められた。HCAEC における増加率の方が HUVEC における増加率よりも約 2 倍高かった。また IL-6、IL-8 の産生亢進には、培養液中に 5%FCS が存在することが不可欠だった。さらに、高濃度 (10mg/ml) の IgG を培養液に添加すると、少量 (10ng/ml) の LPS 刺激では IL-6、IL-8 とともに mRNA の産生亢進は約 50%抑制された。しかし、LPS 濃度を高く (50ng/ml) すると IgG による抑制はみられなくなった。

(8) IgG 分画標品によるサイトカイン産生抑制作用の違い

HCAEC の培養液中に intact IgG (10mg/ml)、または等モル濃度の精製 F(ab')₂ 分画、Fc 分画を加えて 1 時間培養し、さらに LPS (10 ng/ml) を加えて 1.5 および 4 時間後に細胞を回収して IL-6、IL-8 の mRNA 量を測定した。intact IgG による IL-6 mRNA の産生抑制は約 70%、IL-8 mRNA の産生抑制は約 90%で、他の分画と比べて最も強い抑制活性を示した。これに対して F(ab')₂ 分画は intact IgG に近い抑制活性を示したが、Fc 分画はほとんど抑制活性を示さなかった (下図)。



さらに、培養上清中の IL-6 蛋白を ELISA で定量した。intact IgG および F(ab')₂ 分画の添加により培養上清中の IL-6 の産生量は各々 60% および 40%抑制された。これに対して Fc 分画では抑制効果は認められなかった。mRNA とは違って IL-6 蛋白では、intact IgG による抑制作用が高濃度 (100ng/ml) の LPS 刺激においても弱く (34%) 認められた。

(9) LPS 抗体を除去した精製 IgG による IL-6、IL-8 mRNA 産生の抑制

intact IgG によるサイトカイン mRNA 産生の抑制作用は F(ab')₂ 部分を通じて LPS を特異的に中和することによる可能性が高いと考えられた。そこで、抗 LPS-IgG を吸着除去した intact IgG 標品を精製して (8) と同じ条件で IL-6、IL-8 mRNA 産生の抑制活性を調べた。その結果、mock 処理をした IgG では 4 時間後の IL-6、IL-8 mRNA 産生の抑制が各々 43%、46%みられたのに対して、LPS 抗体を除去した IgG では IL-6、IL-8 mRNA 産生の抑制活性は全くみられなかった。

D. 考察

IVIG 療法の作用機序として様々な仮説が提唱されてきたが、その内容は適応となる疾患ごとに異なっている。このように多様な生理活性をもつ生物製剤の治療ターゲットを同定するためには、遺伝子発現プロファイル解析のような網羅的アプローチが適していると考えられる。本研究では、川崎病患者末梢血の遺伝子発現を DNA マイクロア

レイで解析することにより、IVIG 療法前後で発現の変動する遺伝子を網羅的に捕捉すること、抽出された遺伝子の機能解析を通じて IVIG 療法の作用機序を明らかにし、治療効果の早期判定や治療抵抗症例に対する代替治療の根拠となる指標を提出することを目標のひとつとした。

昨年度は川崎病患者の末梢血単核球 (PBMC) および精製したモノサイトをを用いて遺伝子発現プロファイル解析した。IVIG 療法の前後で有意に発現変動する遺伝子群が多数見出され、網羅的アプローチの有効性が確認された。と同時に、IVIG 療法が実際に患者の免疫細胞において多彩な生理活性を修飾することが実証された。注目すべき点は、IVIG 療法によって発現変動した遺伝子の大半が抑制的に制御されていたことである。外界からのシグナル受容体、糖・脂質代謝に働く酵素、細胞外に分泌される生理活性蛋白、転写調節因子など多彩な機能の遺伝子発現が抑制されていた。また、多くの遺伝子が主としてモノサイトで発現されるものであったことが特徴のひとつだった。

本年度は、採血後の遺伝子発現への影響を最小限に抑えること、また好中球を含む免疫細胞全体の遺伝子発現プロファイルを把握することを目標として、新しい解析システム (PAXgene™ および U133A Plus DNA-chip) を導入した。IVIG 療法前後の川崎病患者および発熱対照患者の静脈血全血における遺伝子発現プロファイル解析した結果、昨年度の精製モノサイトにおける解析結果を上回る数の遺伝子プローブが、IVIG 療法の前後で有意な発現変動を示すことが明らかになった。さらに発熱対照患者群を同時に解析したことにより、川崎病群でより特異的に変動する遺伝子プローブを抽出することができた。このことは、IVIG 療法前、療法後、発熱対照の 3 群の ANNOVA 解析から抽出された遺伝子群を用いて主成分解析 (PCA) を行い、これら 3 群が明瞭に区分できたことから明らかである。さらに、抽出された遺伝子群には好中球で特異的に発現されるものが多く含まれていた。現在、これらの遺伝子群の機能別の分類を進める一方で、川崎病に特異的かつ IVIG 療法の反応性予測に有効な臨床検査マーカーとなる遺伝子プローブを探索している。

本年度の研究の二番目の成果は、IVIG 療法抵抗症例の遺伝子発現プロファイルの解析を開始したことである。最初の症例は、通常の IVIG 療法 (2g/kg) で解熱しなかったため IVIG の追加投与 (2g/kg) を受けたが反応せず、プレドニンの経静脈投与によって初めて解熱と臨床症状の改善がみられた。マイクロアレイ解析は IVIG 初回投与前と各治療後の計 4 回行い、前項で抽出した 192

個のマーカー遺伝子群の発現プロファイルと比較した。その結果、1 回目および 2 回目の IVIG 療法後のプロファイルは治療前のプロファイルと非常に類似しており、二度の IVIG 療法にもかかわらず、治療前急性期のマーカー遺伝子群の発現亢進は抑制されなかった。さらにステロイド療法後にこれらのマーカー遺伝子群の発現は抑制され、臨床症状の改善とマーカー遺伝子群の発現量の低下がよく相関することが示された。今後 IVIG 療法に対する抵抗症例の解析をさらに進めて、冠動脈瘤の発症に関与する遺伝子発現プロファイルも明らかにする予定である。

IVIG 療法で用いられる濃度の IgG が、血管内皮細胞の機能に及ぼす影響について検討する目的で、HUVEC の細胞間透過性および管腔形成能と、HCAEC の炎症性サイトカイン産生能について検討した。その結果、IVIG 療法が HUVEC に直接作用して、その透過性を亢進させる可能性は少ないと考えられた。また高濃度の IgG は LPS 刺激による HCAEC の炎症性サイトカイン産生亢進を抑制するが、その作用機序は F(ab')₂ による LPS 特異的な中和活性による可能性が高いことを明らかにした。LPS はヒトの重症感染症において種々の病態形成に関与する重要な病原因子である。また菌種によってその抗原エпитープが異なるので、起因菌によっては IgG 製剤中に含まれる特異的中和抗体の量が大きく変動する可能性も考えられる。重症感染症に対して、その中和作用を期待して IVIG 療法を行う際には、有効性に差が出る可能性があることを考慮して慎重に投与する必要があると考えられた。高濃度の IgG がヒト血管内皮細胞のみならず、他の標的細胞に対してどのような直接作用を有するかについては、今後さらに検討をすすめて IVIG 療法の作用機序をさらに解明する端緒としたいと考えている。

昨年度の研究では、IVIG 療法の不応症例から得られた治療後血清では、HUVEC 機能の障害活性が強く認められた。IgG 自体には HUVEC に対する透過性亢進作用は認められなかったことから、この HUVEC 機能障害は、IVIG 療法後による炎症性サイトカインなどの産生抑制作用が十分に得られなかった結果ではないかと推測した。今回、VEGF の特異的阻害剤である s-VEGFR1 および VEGFR2-I で前処理することにより、IVIG 療法不応血清によって惹起される HUVEC の透過性亢進は抑制された。VEGF は、IVIG 療法不応症例にみられる強い血管透過性亢進を来す病態に重要な役割を担っていると考えられた。さらに、IVIG 療法不応症例の血清を添加すると、HUVEC 内の p38MAPK のリン酸化が持続・増強することが前年度の研究で判

明した。p38 MAPK は、血管内皮細胞においては血管新生の抑制や、血管透過性亢進に関与すると言われている。実際に、p38 MAPK の活性化を特異的に阻害する SB203580 の添加によって、IVIG 療法不応症例の血清によって惹起される HUVEC の細胞間透過性の亢進および管腔形成能の低下は、著明に軽減した。p38 MAPK の活性化が IVIG 不応血清による HUVEC の機能障害に深く関与することを示唆するものと考えられる。p38 MAPK の活性化を誘導する因子として、VEGF をはじめとする多くの炎症性サイトカイン、また熱、紫外線、病原体などが今までに報告されている。今年度の研究結果から、IVIG 療法不応症例の血清に含まれる多くの炎症性サイトカイン、特に VEGF によって血管内皮細胞内の p38 MAPK がリン酸化される経路が、重篤な血管内皮障害を惹起する主要経路である可能性が示唆された。HUVEC の p38 MAPK を活性化させる血清中の主要因子が VEGF 単独なのか、あるいは他の因子も関与するのか、検討することが来期の課題である。

E. 結論

急性期の川崎病患者の静脈血全血での遺伝子発現プロファイルを解析して、IVIG 療法後に発現が低下し、かつコントロールの発熱対照群では発現亢進のみられない遺伝子を抽出した。IVIG 療法抵抗症例ではこれらのマーカー遺伝子群の発現抑制がみられなかったが、ステロイド療法による臨床症状の改善とともに発現レベルは低下した。また IVIG 療法不応症例の血清によって惹起される HUVEC の細胞間透過性の亢進および管腔形成能の低下は、p38 MAPK 阻害剤の添加により著明に軽減した。これらのマーカー遺伝子群の中に、それ自体、あるいは VEGF その他の炎症性サイトカインの産生亢進を通じて p38 MAPK の活性化に関与するものがないか、今後検索する予定である。また IVIG 療法不応症例の解析をすすめて、これらのマーカー遺伝子群の中から治療効果の早期判定や冠動脈瘤発症の予知に有効な蛋白を決定することが来期の目標である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Abe J, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H, Terai M. Gene-expression profiling of the effect of high-dose intravenous immunoglobulin in patients of Kawasaki Disease. *J Immunol*, 2005, 174: 5837-5845.
2. Nomura I, Abe J, Noma S, Saito H, Gao B, Wheeler G, Leung D. Adrenomedullin is highly

expressed in blood monocytes associated with acute Kawasaki disease: a microarray gene expression study. *Pediatr Res*. 2005, 57: 49-55.

2. 学会発表

1. Abe J, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H, Terai M. Gene-expression profiling of the effect of high-dose intravenous immunoglobulin in patients of Kawasaki Disease. 1st Congress of Asian Society for Pediatric Research. Tokyo, Japan. Nov 24-26, 2005.
2. 東 浩二、寺井 勝 川崎病と p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) 第 53 回日本心臓病学会、大阪、日本、Sep.19-21, 2005
3. Higashi K, Ebata R, Honda T, Yasukawa K, Hamada H, Terai M. In vitro endothelial cell dysfunction induced by serum from patients with Kawasaki disease is modulated by p38 mitogen activated protein kinase. American Heart Association Scientific Sessions 2005, Dallas, TX, USA, Nov.12-16, 2005

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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