

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（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

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

所属 国立感染症研究所 細胞化学部
研究者 西島 正弘

研究要旨

(1) サルモネラ菌のリピド A は感染宿主への適応によって様々な修飾を受ける。このうち一部の修飾は、感染細菌にとって、宿主 Toll-like receptor 4 による認識から逃れやすくなる点で細菌にとって有利に働くことが分かっている。抗菌ペプチドに対する耐性を付与することが知られているホスホエタノールアミン修飾が Toll-like receptor 4 認識に与える影響を検討したところ大きな影響を与えないことが分かった。リピド A 修飾の多様性は宿主自然免疫応答に対する機能的役割分担の結果であると考えられた。

(2) ケルセチン、ルテオリンの LPS 刺激抑制作用機序を検討した。両フラボノイドは LPS 刺激による I κ B の消化、Akt のリン酸化、p38 のリン酸化を抑制したが PMA 刺激による NF κ B 活性化は抑制しなかった。また LPS 刺激によるラフト集積を抑制した。

(3) アポトーシス細胞の貪食に伴って産生される IL-6 は樹状細胞を未熟な状態にとどめるのに部分的に関わることにより、自己抗原に対する応答を未然に防いでいる

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 川崎清史
- (2) 北里大学理学部 熊沢義雄
- (3) 東邦大学理学部 小林芳郎
- (4) 生化学工業株式会社 明田川純

A. 研究目的

注射用医薬品、生物学的製剤、及び医療用具中の発熱物質による汚染は医療安全性上重要な問題である。従来、汚染の検出にはウサギを利用した発熱試験及びその代替法としてのカプトガニ血液凝固系のエンドトキシン応答性を応用したリムルステストが利用されてきた。発熱試験は簡便性に欠け、一方リムルステストは簡便かつ高感度であるが、エンドトキシンに対する特異性、非エンドトキシン発熱物質の存在、天然資源であるカプトガニを利用することから環境保護上の問題点が長らく指摘されてきた。従って、これらの問題点を解決する新しい試験法の開発は重要な課題である。

近年、エンドトキシンによる発熱応答の原因となるリポ多糖の免疫担当細胞による認識機構は、受容体を構成する因子 (Toll-like receptor 4 (TLR4) と MD-2) の発見に伴い急速に解明されつつある。宿主免疫細胞によるエンドトキシン認識はエンドトキシンによる発熱応答の分子基盤である。従って、この系をエンドトキシン検出に応用できればヒトの応答性に近いエンドトキシン試験法が開発されることが期待できる。

本研究では従来のリムルステスト法の問題点を補完する、新しいエンドトキシン検出法を作出するため免疫担当細胞 (マクロファージ等) によるエン

ドトキシン認識・刺激伝達機構の解明とそのエンドトキシン検出法への応用に関する研究を行う。本研究により、ヒトのエンドトキシン応答性に非常に近い測定法が確立されることが期待できる。また、培養細胞を利用した測定法を目指しており、この方法はウサギ発熱試験より簡便かつ迅速であることが期待できる。これらの研究目標を達成するため、国立感染症研究所及び生化学工業の研究グループはエンドトキシン受容体を利用したエンドトキシン検出法に関する研究を行う。北里大学ではリポ多糖シグナル伝達の情報伝達機構、東邦大学ではアポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義に関する研究を行なう。

B. 研究方法

B-1-1) ホスホエタノールアミン修飾型リピド A の精製

大腸菌で誘導剤アラビノースの培地添加により PmrC (サルモネラ菌のリピド A ホスホエタノールアミン修飾酵素) を過剰発現するように設計したプラスミドを作成した。本プラスミドを大腸菌株に導入後、アラビノースを培地に添加して培養した菌株からリピド A を抽出精製した。質量分析系による分析の結果、ホスホエタノールアミン修飾を受けたリピド A の生成が認められた。そこで、プラスミドを導入された大腸菌をアラビノース存在下で大量培養して、定法に従いリピド A を精製した。精製されたリピド A は様々な構造の混合物なので、薄層クロマトグラフィーにより分離し、

修飾を受けたリポド A と修飾を受けていないリポド A を分離精製した。修飾の確認は質量分析計で精製リポド A の質量を測定することにより行った。

B-1-2) ホスホエタノールアミン修飾型リポド A の活性測定

ヒト TLR4 とヒト MD-2 を強制発現している Ba/F3 細胞株を精製したリポド A で刺激し、転写因子 NF- κ B の活性化をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) の活性化で測定する (レポーターアッセイ)。

B-2-1) マクロファージ

C57BL/10ScSn マウスの骨髄由来マクロファージを用いた。骨髄由来マクロファージは、骨髄細胞を M-CSF 存在下で 10 日間培養して得た。

B-2-2) ウェスタンブロット

常法に従い、I κ B, Akt, p38, リン酸化 Akt およびリン酸化 p38 に対する抗体を用いて、ウェスタンブロットを行った。

B-2-3) ルシフェラーゼアッセイ

NF κ B の活性化を HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより測定した。

B-2-4) ラフトの観察

細胞膜に存在する GM1 を FITC 標識コレラトキシン B サブユニットで結合させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

B-3-1) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

IL-6KO マウスは東京大学医科学研究所岩倉教授より供与された。これを SPF 条件で繁殖させて用いた。他のマウスは三協ラボより購入した。マウス未熟樹状細胞は、マウス (C57BL/6、雄 6 週令) 骨髄細胞を GM-CSF 存在下 7 日培養して得た。すなわち 3 日目に培地を半分交換し、5 日目に非付着性細胞を集め、まきなおして、得た。この方法で得られた細胞の 60-80% は細胞表面マーカーと形態から見て未熟樹状細胞であった。アポトーシス細胞は IL-6KO マウスと同系統の C57BL/6 マウスの胸腺細胞を X 線照射して得た。得られたアポトーシス胸腺細胞を腹腔内、静脈内、および皮下組織内の 3 経路により単回あるいは複数回投与し、一週間後の血清中の自己抗体 (抗 ssDNA 抗体) の産生量を ELISA 法を用いて測定した。

C. 研究結果

C-1) ホスホエタノールアミン修飾型リポド A の生物活性

TLR4-MD-2 複合体はリポド A の微細構造を認識し細胞内に活性化シグナルを伝達する。腸内細菌である大腸菌とサルモネラ菌はリポド A の基本構造は同一である。一方、サルモネラ菌は低マグネシウムな

どの宿主環境を模倣した培養条件下でリポド A の修飾酵素 (脱アシル化酵素 PagL、パルミトイル化酵素 PagP、水酸化酵素 Lpx0 など) の遺伝子発現が活性化される。前年度の研究によりリポド A は脱アシル化とパルミトイル化を受けることにより TLR4-MD-2 複合体による検出感度が 30 から 100 倍程度低下する、すなわち TLR4-MD-2 複合体に認識されにくくなることがわかった。今年度はホスホエタノールアミン修飾を受けることにより TLR4-MD-2 複合体による検出感度が変化するか解析した。ホスホエタノールアミン修飾型リポド A を精製して、ヒト TLR4 とヒト MD-2 を強制発現している Ba/F3 細胞株を刺激し、転写因子 NF- κ B の活性化をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) の活性化で測定した。その結果、修飾型と非修飾型とは大きな差は認められなかった。

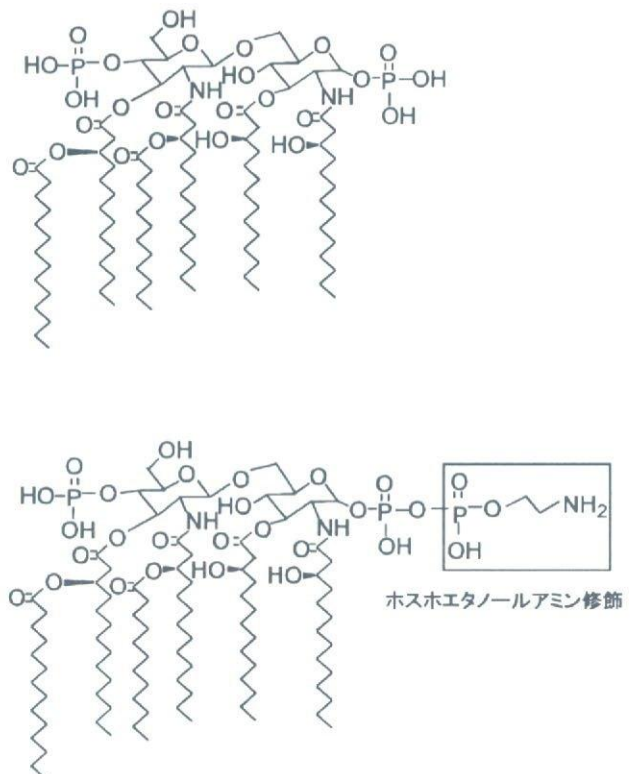


図 1 非修飾型及びホスホエタノールアミン修飾型リポド A の構造

C-2) リポ多糖シグナル伝達の情報伝達機構

マクロファージを LPS で刺激する前にケルセチンおよびリテオリンで処理すると、I κ B の消化、Akt のリン酸化、p38 のリン酸化が抑制された。そこで、受容体を介さずに、直接 PKC を活性化する PMA で刺激したときの NF κ B の活性化を測定したところ、両フラボノイドは NF κ B の活性化を抑制しなかった。

LPS による刺激を伝達するためには、ラフトの集積が重要である。そこで、ケルセチンおよびリテオリンが LPS 刺激によるラフトの集積を抑制するか検

討したところ、両フラボノイド共にラフトの集積を抑制した。また、抗 CD3 抗体あるいは抗 IgM 抗体で受容体を架橋することによるラフトの集積も、両フラボノイド前処理により抑制された。

C-3) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

正常マウスより調製した未熟樹状細胞とアポトーシス胸腺細胞を共培養すると、未熟樹状細胞の成熟分化が観察されないのに対して、IL-6KO マウスより調製した未熟樹状細胞を用いた場合には、未熟樹状細胞の成熟化が観察された。この結果は、我々が以前に抗体を用いて IL-6 を中和したときの結果と一致するものであり、やはり IL-6 は未熟樹状細胞が成熟分化を抑制していることが確認された。

さらに IL-6KO マウスにアポトーシス胸腺細胞を腹腔内、静脈内、および皮下組織内投与したあとの抗 ssDNA 抗体 (IgM および IgG) 産生を調べた。いずれの投与経路、また投与回数においても抗 ssDNA 抗体 (IgG) の産生量は野生型マウスおよび IL-6KO マウスともに極微量であった。一方、抗 ssDNA 抗体 (IgM) の産生は、いずれの投与経路においても IL-6KO マウスのほうが高い傾向があった。しかしながら、両系統マウスで有意差のある結果は得られなかった。

D. 考察

D-1) ホスホエタノールアミン修飾型リポド A の生物活性

サルモネラ菌のリポド A は感染宿主への適応によって様々な修飾を受ける。それぞれの修飾と修飾多様性には感染という現象における生理的意義があると考えられる。パルミチル化と脱アシル化修飾は、前年度の成果で示したように、感染細菌にとって、宿主 Toll-like receptor 4 による認識から逃れやすくなる点で細菌にとって有利に働く。ホスホエタノールアミン修飾は抗菌ペプチドに対する耐性を付与することが知られている。今年度の結果からホスホエタノールアミン修飾は Toll-like receptor 4 認識には大きな影響を与えないことが分かった。リポド A 修飾の多様性は宿主自然免疫応答に対する機能的役割分担の結果であると考えられた。

D-2) リポ多糖シグナル伝達の情報伝達機構

ケルセチンおよびルテオリンは LPS によって誘導される TNF- α および IL-6 産生を抑制するが、その作用機序は、ラフトの集積を抑制することで、下流へのシグナル伝達を抑え、LPS 刺激を抑制することが明らかとなった。両フラボノイドは、抗 CD3 抗体、抗 IgM 抗体を用いたラフト集積も抑制したことから、両フラボノイドは、シグナル伝達にラフトの集積が

重要な刺激に対して、抑制的に働くことが示唆された。

D-3) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

今回の結果から、*in vitro* においてアポトーシス細胞を貪食した未熟樹状細胞が IL-6 を産生し、それが樹状細胞への分化をオートクリン的に抑制していることが示唆された。これは、アポトーシス細胞に対して免疫寛容を起し、自己抗体を産生させないようにする上で重要な機構の一つであろうと推察された。しかしながら、*in vivo* において IL-6KO マウスにアポトーシス胸腺細胞を投与すれば、自己抗体が産生されることが予測されたが、実際には正常マウスと比較して有意な自己抗体産生は認められなかった。この結果は、IL-6 が未熟樹状細胞の成熟分化だけでなく、抗体産生に至るまでの免疫応答にも重要な役割を果たしていることを示している。

E. 結論

- (1) リポド A ホスホエタノールアミン修飾は Toll-like receptor 4 認識には大きな影響を与えない
- (2) ケルセチンおよびルテオリンの LPS 刺激抑制作用の機序について検討した結果、両フラボノイドは LPS の刺激は抑制したが、直接 PKC を活性化する PMA の刺激は抑制しなかった。また LPS 刺激によるラフト集積を抑制しただけでなく、抗 CD3 抗体や抗 IgM 抗体で受容体を架橋したラフト集積も抑制した。これらのことから、ケルセチンおよびルテオリンは、ラフトの集積を抑制することで、下流へのシグナル伝達を抑え、LPS の刺激を抑制することが明らかとなった。
- (3) IL-6KO マウス由来未熟樹状細胞を用いて、未熟樹状細胞の分化成熟には、やはり IL-6 が重要な役割を担っていることが確認された。しかし *in vivo* では、抗体産生にも IL-6 は重要であるため、予想された IL-6KO マウスにおける自己抗体産生は認められなかった。

F. 研究発表

F-1) 論文発表

- 1) K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *J. Bacteriol.* (2005) vol.187, 2448-2457
- 2) K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Purification and characterization of deacylated and/or palmitoylated lipid A species unique to *Salmonella typhimurium*.

J. Endotoxin Res. (2005) vol.11, 57-61

3) R. K. Ernst, K. N. Adams, S. M. Moskowitz, G. M. Kraig, K. Kawasaki, C. M. Stead, M. S. Trent, and S. I. Miller : The *Pseudomonas aeruginosa* Lipid A Deacylase: Selection for Expression and Loss Within the Cystic Fibrosis Airway

J. Bacteriol. (2006) vol.188, 191-201

4) K. Okemoto, K. Kawasaki, K. Hanada, M. Miura, and M. Nishijima.: A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1beta or activation of caspase-1.

J. Immunol. (2006) vol. 176, 1203-1208

5) Gotoh M., Takamoto Y., Kurosaka K., Masuda J., Ida M., Satoh A., Takayama E., Kojima-Aikawa K., Kobayashi Y. and Matsumoto I. : Annexins I and IV inhibit *Staphylococcus aureus* attachment to human macrophages. *Immunology Letters* 98, 297-302 (2005)

6) Hatada, S., Ohta, T. Shiratsuchi, Y., Hatano,

M. and Kobayashi, Y. : A novel accessory role of neutrophils in Concanavalin A-induced hepatitis. *Cell. Immunol.* 233, 23-29 (2005)

7) Iyoda, T., Nagata, K., Akashi, M. and Kobayashi, Y. : Neutrophils accelerate macrophage-mediated digestion of apoptotic cells in vivo as well as in vitro. *J. Immunol.* 175, 3475-83 (2005)

8) Saijo, S., Nagata, K., Nakano, Y., Tobe, T. and Kobayashi, Y. : Inhibition by adiponectin of IL-8 production by human macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. . *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1180-1183 (2005)

9) Suppressive effects of flavonoids quercetin and luteolin on lipid raft accumulation following pathways. Kaneko M, Takimoto H, Seki Y, Kawaguchi K, Kumazawa Y. FEBS Letter 投稿予定 (承認済)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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