

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の確立に関する研究	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

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

所属 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
研究者 最上知子

動脈硬化抑制の新技术として、末梢細胞での HDL 形成促進・コレステロール蓄積抑制、肝臓からのコレステロール・胆汁酸排泄促進の方法を探った。ABCA1 の遺伝子転写制御機序や ABCA1/A7 による HDL 形成の機序、細胞内脂肪滴退縮、脂質メディエーターの構造と活性に関する新知見を得た。また胆汁酸吸着樹脂に強いインスリン抵抗性改善作用を見いだした。

分担研究者

- (1) 名古屋市立大学大学院医学研究科 横山信治
- (2) 帝京大学薬学部 藤本康之
- (3) 三菱ウエルファーマ(株)創薬第二研究所
坂井 薫、杉本佳奈美
- (4) あすか製薬(株)西東京研究所 松倉竹雄

A. 研究目的

末梢組織はコレステロールを分解できないことから、血管壁の細胞では過剰のコレステロールは蓄積し、動脈硬化の原因となる。これを防ぐには、コレステロールを HDL の形で運び出し、肝臓で胆汁酸に転換し排泄する必要がある。この研究では、[1]末梢細胞での HDL 産生、[2]肝臓でのコレステロール・胆汁酸排出の促進により動脈硬化性疾患を防ぐ新たな方法を探るとともに、[3]コレステロールの胆汁酸への転換促進がもたらす抗肥満・抗糖尿病作用についても明らかにする。

[1] HDL 産生を促進するには、膜トランスポーター ATP-binding cassette transporter A 1 (ABCA1) の発現増加が有用である。(1)臨床的に HDL 上昇作用が認められているカルシウムアンタゴニストおよびフィブラートについて ABCA1 遺伝子発現促進とそのメカニズムを解明し、ABCA1 発現量の増加を図る。また細胞内のコレステロールが HDL に形成されるまでの過程を、(2)細胞内のコレステロール輸送とその制御、(3)細胞内脂肪滴の形成と退縮、の観点からそれぞれ解明する。

[2] 肝臓でのコレステロール・胆汁酸排泄の促進と抗肥満・抗糖尿病作用については、(1)胆汁酸輸送を担うトランスポーター BSEP 発現を制御する脂質メディエーターを同定し、その産生促進

手法を探るとともに、(2)胆汁酸吸着樹脂投与によるコレステロールの胆汁酸への転換促進が抗肥満・抗糖尿病作用をもたらすことを、病態モデルマウスを用いて明らかにする。

B. 研究方法

B-1 HDL 産生による末梢細胞からのコレステロール搬出の促進

(1) ABCA1 と ABCA7 の発現をエクダイソンにより制御できる発現系を構築し、定量的な比較を行った。また自らアポ A-I などを形成する肝細胞においての HDL 形成の機構について、細胞外の脂質非結合アポ A-I を特異的な単クローン抗体を用いてトラップし、その役割を解析した。(2)各種カルシウムアンタゴニストやフィブラート系薬物の ABCA1 発現増加・HDL 産生促進作用に関しては、培養マクロファージ系細胞や繊維芽細胞を用い、マウス ABCA1 遺伝子プロモーター解析により機序の解明を行った。(3)細胞内脂肪滴のプロテオーム解析結果を活用し、構成タンパクの機能阻害薬物を中心に、培養細胞での脂肪滴形成を抑制する薬物を探索した。

B-2 肝臓でのコレステロール・胆汁酸排出促進に機能する脂質メディエーター

コレステロールから胆汁酸への転換を促進する手段として胆汁酸吸着樹脂(三菱ウエルファーマ(株)で合成したコレステチミド(2-methyl imidazole-epichlorohydrin copolymer))を用い、2型糖尿病モデルとして汎用されている KKAY マウスにおいてグルコース負荷後の血糖値 AUC (0-120min)、空腹時血糖、空腹時インスリン、また肝臓の胆汁酸合成酵素 mRNA 発現量を測定した。

胆汁酸輸送を担うトランスポーターBSEP の遺伝子転写は核内受容体 FXR により直接促進されることから、FXR の活性化を指標に BSEP 発現制御物質を探索した。各種胆汁酸・胆汁アルコールは、広島国際大学宇根瑞穂助教授により提供された。

(倫理面への配慮) 当該研究においては、ヒト組織を研究材料とする実験、ヒト遺伝子の解析は行っていない。動物の取り扱いは「動物実験に関する指針」(昭和 63 年 1 月三菱化学動物実験委員会策定)を遵守し動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を行った。

C. 研究成果

C-1 HDL 産生による末梢細胞からのコレステロール搬出の促進

1) ABCA1 および ABCA7 による HDL 形成機構

ABCA1 と ABCA7 による HDL 新生の詳細を比較検討するため、GFPfusion タンパクを ecdyson 依存の発現ベクターに組み込んで HEK293 細胞に導入した系を構築した。この系がアポ A-I 依存的に生産する HDL を HPLC により分析したところ、ABCA1 はコレステロールに富んだ大粒子 HDL の産生を相対的に増加させるのに対し、ABCA7 は小粒子のみを増加させる現象を見いだした(J. Lipid Res. 46: 1703-1711, 2005)。内因性に apoA-I を産生する肝細胞で HDL 粒子が新生する機構を、マウス初代培養肝細胞とヒト肝癌細胞 HepG2 を用いて検討した。分泌される apoA-I を遊離 apoA-I に対する特異的単クローン抗体を用いてトラップすると、内因性 apoA-I による HDL 産生は殆ど抑制され、肝細胞では、apoA-I が一旦分泌された後に細胞膜の ABCA1 と作用するオートクリン機構により HDL が新生することが示された(Tsujita et al., JLR 46: 154-162, 2005)。

2) カルシウム拮抗剤および PPAR α 活性化剤による ABCA1 遺伝子発現の増加

カルシウム拮抗剤は降圧剤・抗不整脈薬として臨床上用いられるが、抗動脈硬化作用および HDL 上昇効果が認められている。そのひとつ verapamil はマクロファージ系細胞 RAW264 において HDL 産生を促進する。昨年度の研究で、この上昇は遺伝子転写の促進によることを ABCA1 遺伝子プロモーターを用いて明らかにした。本年度はプロモーター解析を進め、verapamil による ABCA1 遺伝子転写促進の機序の解明を試みた。ABCA1 遺伝子転写は核内受容体 LXR の活性化により促進されることが知られているが、ABCA1 遺伝子プロモーター領域(-1238/+57)中の

LXR 応答配列(LXRE)に変異を導入し、verapamil の効果は LXR と独立であることを明らかにした。さらに、ABCA1 遺伝子プロモーターを 5' 側から短縮し、また転写因子結合が想定される配列に変異を導入し、verapamil の作用領域と応答配列を同定した。平行して、プロテイン/DNA アレイにより verapamil により活性が変動する核内転写因子を検出した。

ヒトで HDL を上昇させることが確認されているフェノフィブラートの活性代謝物フェノフィブリン酸(FA)が、マクロファージにおいて LXR 依存的に ABCA1 の遺伝子転写および蛋白発現量を上昇させ apoA-I 依存性の HDL 新生反応を亢進させることを報告した(Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol. 25: 1193-1197, 2005)。さらに、HDL の主要な産生組織である肝由来の HepG2 細胞において、フェノフィブリン酸は細胞内のコレステロールの合成能に影響を及ぼさずに細胞内のコレステロール含量を低下させることを見いだした。

3) 細胞内脂肪滴の形成抑制・消失促進方法の探索

HuH7 細胞をオレイン酸存在下に 2 日間培養することで、細胞内に脂肪滴が形成された。このとき、細胞内の中性脂質量も顕著に増加していた。培地からオレイン酸を除去して培養を続けても、脂肪滴の大部分はその後の 3 日間の培養期間中細胞内に残存し続けていた。しかし、オレイン酸除去時に Triacsin C を添加した場合、3 日間の培養期間中に脂肪滴量は顕著に減少した。細胞内の中性脂質量を測定した結果もこれを裏付けており、Triacsin C を添加した場合には細胞内の中性脂質量の顕著な低下が見られたが、オレイン酸除去のみをおこない Triacsin C を添加しなかった細胞では中性脂質量は高く保たれていた。したがって、Triacsin C には、一旦細胞内に形成されてしまった脂肪滴を消失させる能力があることが明らかとなった。

トリアシルグリセロールの合成に必要なグリセロール系基質が、脂肪滴形成にどの程度寄与するかを調べた。長鎖脂肪酸によって誘導される脂肪滴形成の場合、グルコース濃度を 0.1mg/ml 程度まで低下させても脂肪滴形成は停止しないことから、グリセロール系基質は細胞内代謝系によって容易に供給されうると考えられた。しかし、低栄養の培養条件においては、グリセロールは低下した脂肪滴形成を顕著に回復させることができ、脂肪酸依存の脂肪滴形成系ではグリセロールは依然重要な因子であることがうかがわれた。

C-2 肝臓でのコレステロール・胆汁酸排出促進に機能する脂質メディエーター

1) 胆汁酸代謝調節を介した脂質・糖代謝制御

本研究では胆汁酸吸着剤が血清 TG 低下作用、抗肥満作用を示す新たな知見について検討を行う。

本年度は血糖低下作用について検討を行った。2型糖尿病病態モデル KKAy マウスに高脂肪食を与え、胆汁酸吸着樹脂コレステチミドを投与すると、体重増加が抑制された。コレステチミド群の体重はコントロール群の体重と比較して投与期間を通して低値を示した(図 1)。投与最終日の累積摂餌量はコントロール群とコレステチミド群でほぼ同等であった。コレステチミド群の空腹時血糖値、空腹時インスリン値、および血糖値 AUC (0-120min)はいずれもコントロール群よりも有意に低下した(図 2-4)。コレステチミド樹脂は強いインスリン抵抗性改善作用を持つことが示された。肝臓における *cyp7 α* と SHP の遺伝子発現はコレステチミド群ではコントロール群と比較して *cyp7 α* の遺伝子発現量が約 5 倍以上と顕著に増加し、SHP の遺伝子発現量は 50%以上減少した。

2) 胆汁酸排泄を制御する脂質メディエーターの構造と活性

胆汁酸/胆汁アルコールのステロイド骨格は、他のコレステロールやステロイド代謝産物と異なり、A/B 環がシス配位(5 β)の特異な構造を持つ。昨年度の研究において、胆汁酸排出ポンプ BSEP の発現を促進する脂質メディエーター胆汁アルコールを見いだした。本年度は、胆汁アルコールの構造と活性の相関を明らかにすることを目的に、ステロイド A/B 環の立体配位に着目して検討を進めた。

胆汁酸や(哺乳動物の)胆汁アルコールは A/B 環が cis 配位(5 β)の極めて特異な立体構造を有している。本研究では、魚類や両生類の一部にごく希に認められる 5 α 配位の胆汁アルコール 5 α Cyp と 5 α Buf、およびその 5 β 異性体である 5 β Cyp と 5 β Buf を用いて(図 5)、FXR 活性化における、胆汁酸・アルコールの A/B 環の立体配位の役割を探った。

ヒト FXR の転写活性化において、5 β 胆汁アルコールである 5 β Cyp と 5 β Buf は、予想通り胆汁酸 CDCA を上回る活性を示した。一方、5 α 胆汁アルコールは全く効果を示さなかったが、FXR アゴニストであるケノデオキシコール酸 CDCA や GW4064 の作用は濃度依存的に阻害した(図 6)。さらに In vitro では FXR へのコアクチベーター会合を誘導できず、FXR アゴニスト GW4064 の活性を競合的に阻害した。した

がって、5 α 胆汁アルコールは、FXR には結合できるものの、コアクチベーター会合を誘導せず、転写を活性化しないこと、すなわち、A/B 環がトランス配位(5 α)の異性体は、アンタゴニストとして機能することを明らかにした。この結果から、FXR 活性化における A 環の立体配位の重要性が示された。

さらに、5 α 胆汁アルコールは、HepG2 細胞において胆汁酸の排出ポンプ BSEP mRNA の CDCA による発現誘導を競合的に阻害した。同様に、SHP 遺伝子発現も阻害した。CYP71A の発現は予想に反して、抑制した(Nishimaki-Mogami *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339: 386, 2006)。

D. 考察

D-1 HDL 産生による末梢細胞からのコレステロール搬出の促進

HDL 産生には膜トランスポーター ABCA1 が必須の役割を担う。その遺伝子異常は HDL 欠損症の原因となり、マウスへの過剰発現は血清 HDL の上昇を引き起こす。さらに、過剰発現マウスでは動脈硬化の進展が抑制されることから、ABCA1 発現を増加できれば動脈硬化性疾患予防・治療の新たな手段となることが期待されている。本年度は、ABCA1 遺伝子発現促進について、verapamil およびフェノフィブリン酸の作用機序の解明を進めた。一方、HDL 形成機構に関して、HDL の主生成源である肝細胞では分泌されるアポ A-I によるオートクリン機構を明らかにした。また、ABCA7 による HDL 形成について、ABCA1 よりコレステロールの乏しい粒子を形成する現象を認めた。さらに、細胞内でのコレステロールプールとなる脂肪滴の形成・退縮制御に関する新たな知見を得ている。これらの知見は、HDL 形成促進およびコレステロール蓄積防止による動脈硬化抑制のためのさらなる手段、ならびに創薬の新たなターゲットを提供する極めて重要なものと考えている。

D-2. 肝臓でのコレステロール・胆汁酸排出促進に機能する脂質メディエーター

HDL として末梢組織から運び出されたコレステロールは、肝臓で胆汁酸に転換され胆汁中に排出される。この過程を促進する胆汁酸吸着樹脂は、強力な血清コレステロール低下剤として用いられている。本研究では樹脂投与が抗肥満・抗糖尿病作用・インスリン抵抗性改善を示す新たな知見を得ている。これは、コレステロール/胆汁酸代謝と糖質代謝のリンクを示

す極めて重大な発見と考えている。本研究ではまた、胆汁酸への転換過程の中間体が胆汁酸排出促進の脂質メディエーターとして機能することを新たに見いだしている。これらはコレステロール低下・胆汁うっ滞治療薬の直接の候補となるとともに、抗肥満・抗糖尿病作用発現での役割を明らかにすることにより、新たな抗肥満・抗糖尿病の創製につながると考えている。

E. 結論

- HDL の形成機構に関して以下の知見を得た。
1) ABCA7も HDL を形成するが、コレステロール含有の乏しい小粒子のみを産生する。2) 自らアポA-Iを分泌する肝細胞ではオートクリン機構で HDL が形成される。
- カルシウムアンタゴニストのひとつ verapamil が ABCA1 発現を促進する機序について、ABCA1 遺伝子プロモーターの解析により、転写活性化に関わる領域と応答配列を明らかにした。
- 肝細胞においてフェノフィブラートの活性代謝物フェノフィブリン酸が合成の低下なしにコレステロール含量を低下させる現象を見だし、細胞への取り込みあるいは汲み出し機構の関与を推定した。
- ヒト肝由来培養細胞では、長鎖脂肪酸が強い脂肪滴形成作用を有するが、これに比してグルコースやグリセロールの寄与の程度は一見低く見積もられた。また、アシル CoA 合成酵素阻害剤 Triacsin C が脂肪滴の退縮を強く促進することを見いだした。
- 胆汁酸吸着樹脂は 2 型糖尿病 KKAY マウスにおいて、体重増加を抑制し、空腹時血糖、空腹時インスリン、および糖負荷後の血糖値 AUC を低下させたことから、強いインスリン抵抗性改善作用が示唆された。また、肝臓における核内受容体 FXR の活性抑制作用も示された。
- 胆汁酸トランスポーターBSEP 発現促進作用を示す脂質性メディエーター・胆汁アルコールの構造と活性の関係を解析し、ステロイド A/B 環の立体配位が FXR へのコアクチベーター会合を変化させることにより、BSEP 遺伝子転写制御に重要な役割を担うことを明らかにした。

F. 研究発表

1. Nishimaki-Mogami, T., Kawahara, Y., Tamehiro, N., Yoshida, T., Inoue, K., Ohno, Y., Nagao, T., Une, M. 5 α -Bile alcohols function as farnesoid X

receptor antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339: 386-91 (2006)

2. Tamehiro, N, Sato, Y., Suzuki, T., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Yokoyama, S., Kawanishi, T., Ohno, Y., Inoue, K., Nagao, T., Nishimaki-Mogami, T. Riccardin C: A natural product that functions as a liver X receptor (LXR) α agonist and an LXR β antagonist. *FEBS Lett.*, 579: 5299-5304 (2005)
3. Arakawa, R., Tamehiro, N., Nishimaki-Mogami, T., Ueda, K., Yokoyama, S. Fenofibric acid, an active form of fenofibrate, increases apoA-I-mediated HDL biogenesis by enhancing transcription of ABCA1 gene in an LXR-dependent manner. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 1193-1197 (2005)
4. Kanayasu-Toyoda, T., Fujino, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Nishimaki-Mogami, T., Sato, Y., Sawada, J., Inoue, K., Shudo, K., and Yamaguchi, T. HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 using surface plasmon resonance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 94: 303-309 (2005)
5. Maki Tsujita, Cheng-Ai Wu, Sumiko Abe-Dohmae, Shinichi Usui, Mitsuyo Okazaki†, and Shinji Yokoyama. On the Hepatic Mechanism of HDL Assembly by the ABCA1/ApoA-I Pathway. *J. Lipid Res.* (2005) 46: 154-162.
6. Jin-ichi Ito, Yuko Nagayasu, Rui Lu, Alireza Kheirollah Michi Hayashi and Shinji Yokoyama Astrocytes produce and secrete fibroblast growth factor-1 that promotes production of apoE-high density lipoprotein in a manner of autocrine action. *J. Lipid Res.* (2005) 46: 679-686 *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* (2006) 26: 20-27.
7. Shinji Yokoyama. Assembly of high density lipoprotein by the ABCA1/apolipoprotein pathway. *Curr. Opin. Lipidol.* (2005) 16: 269-279.
8. Michi Hayashi, Sumiko Abe-Dohmae, Mitsuyo Okazaki, Kazumitsu Ueda and Shinji Yokoyama. Heterogeneity of high density lipoprotein generated by ABCA1 and ABCA7. *J. Lipid Res.* (2005) 46: 1703-1711
9. Shinji Yokoyama. Assembly of high density

lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2006) 26: 20-27.

10. Sumiko Dohmae, Kazumitsu Ueda and Shinji Yokoyama. ABCA7, a molecule with unknown function. *FEBS Letters* in press.
11. Jin-ichi Ito, Alireza Kheirollah, Yuko Nagayasu, Rui Lu, Koichi Kato and Shinji Yokoyama. Apolipoprotein A-I increases association of cytosolic cholesterol and caveolin-1 with

microtubule-cytoskeletons in rat astrocytes. *J. Neurochem.* (2006) in press

12. Masuda Y., Itabe H., Odaki M., Hama K., Fujimoto Y., Mori M., Sasabe N., Aoki J., Arai H. and Takano T. ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. (2006) *J. Lipid Res.* 47, 87-98.

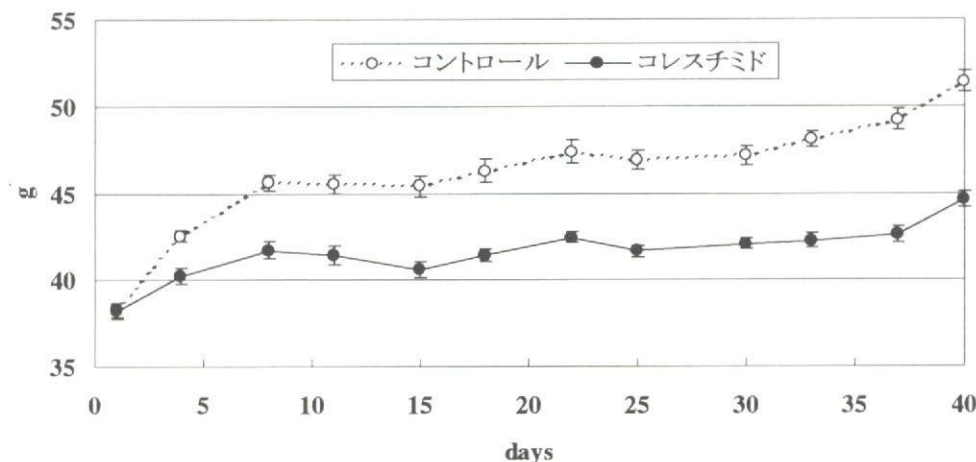


図1 胆汁酸吸着樹脂コレステリドによる KKAY マウスにおける体重増加の抑制

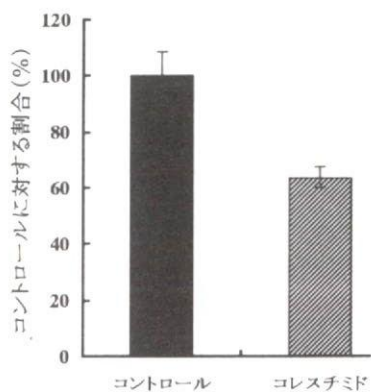


図2 空腹時血糖値に対するコレステリドの作用

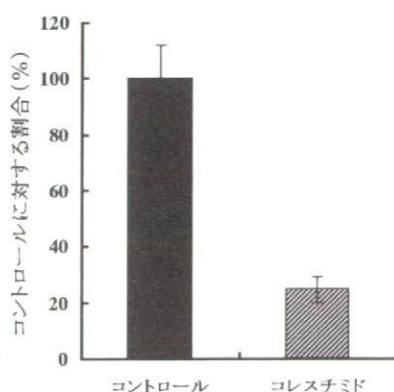


図3 空腹時インスリン値に対するコレステリドの作用

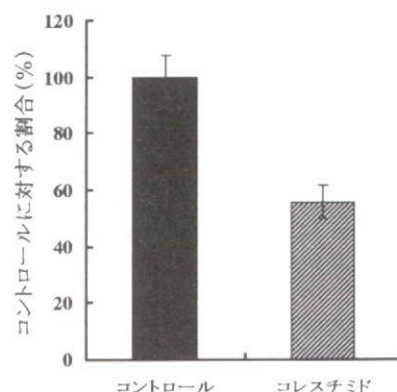


図4 血糖値AUC(0-120min)に対するコレステリドの作用

(Mean ± SEM, **: p < 0.01 vs コントロール by Dunnett's test)

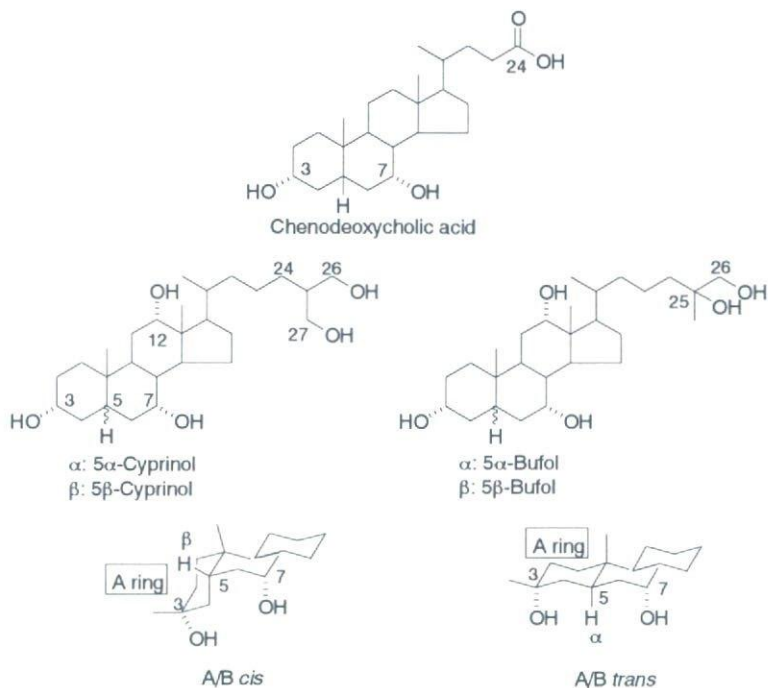


図5 胆汁アルコールおよびケノデオキシコール酸 (CDCA) の構造 5 α - and 5 β -cyprinol, 5 α - and 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α ,26,27-pentols; 5 α - and 5 β -bufool, 5 α - and 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α ,25,26-pentols; chenodeoxycholic acid, 3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholanoic acid.

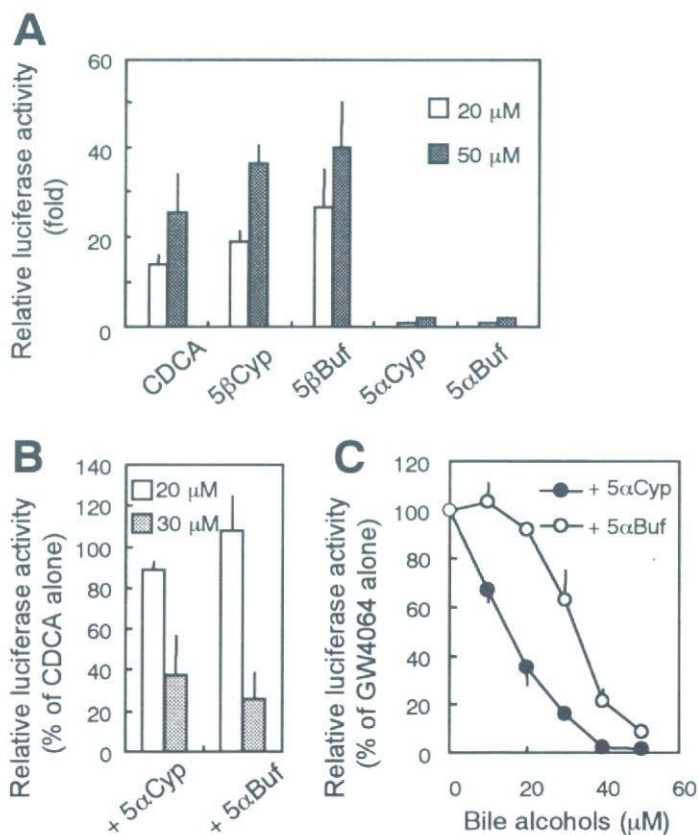


図6 5 β 胆汁アルコールはFXRを活性化するが、5 α 胆汁アルコールはアンタゴニストとして機能する:CV-1細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ

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