

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

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

所属 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部
研究者 新見 伸吾

研究要旨 トロンボモジュリンは HUVEC の増殖およびラット角膜における血管新生を促進し、カニクイザルの LPS 投与による TNF- α の増加を抑制した。肝細胞の増殖刺激により plasmin 活性、uPA 活性、MMP-2 活性が増加した。

分担研究者

- (1) 三重大学医学部、鈴木宏治
- (2) 日本大学生物資源科学部、関泰一郎
- (3) 旭化成ファーマ株式会社 研究センター、鶴田一壽

A. 研究目的

脳血管疾患、心疾患は日本人の主要な死因に挙げられている。これらの疾患はいずれも虚血が原因であることから、血栓形成の制御あるいは病変部位への血流確保による虚血性疾患治療法の確立は保健衛生上の重要課題である。虚血部位への血流を確保する方法として、血管新生療法が期待されているが、未だ十分な治療法は確立されていない。

我々は、トロンピンがマウス乳がん (MMT) 細胞の浸潤を促進し、浸潤促進に要するトロンピンの有効濃度をトロンボモジュリン (TM) が顕著に低下させることを最近見出した。一方、トロンピンは血管新生を促進することが明らかになっていることから、MMT 細胞の浸潤の場合と同様に血管新生促進に要するトロンピンの有効濃度を TM が低下する可能性が示唆された。トロンピンは血液凝固因子であり、その作用は TM により抑制される。したがって、血管新生促進に要するトロンピンの有効濃度を TM により低下させることが可能ならば、血液凝固を回避した条件でのトロンピンによる虚血系疾患の治療が期待される。

そこで本研究では、トロンピン・TM の作用及び他の血管新生促進因子の発現調節について検討することにより血管新生の制御法を探索し、虚血性疾患治療薬の創出にむけた基礎的知見を得ることを主な目的として①TM がヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の増殖に及ぼす作用②TM がウサギ角膜における血管新生に及ぼす作用③TM が炎症に及ぼす作用④肝細胞の増殖刺激が血管新生促進因子である plasmin、uPA、MMP の活性に及ぼす作用について検

討を行った。

B. 研究方法

1. TM が HUVEC の増殖に及ぼす作用に関する検討

HUVEC を、ウシ胎児血清 (FCS) を 2% で添加した EBM-2 培地を用いて 24 時間培養した後、TM、トロンピン、ヒルジンをそれぞれ単独もしくは同時に添加し、さらに 24 時間培養した。培養後の細胞数は、血球板を用いて計数した。結果は、コントロール (TM、トロンピン、ヒルジン無添加) を 100% とした相対値で示した。FCS 中のトロンピン濃度は合成蛍光基質 Boc- β -benzyl-Asp-Pro-Arg-4-methyl-coumaryl-7-amide を用いて測定した。

2. TM がウサギ角膜における血管新生に及ぼす作用に関する検討

ラット角膜に VEGF (10 ng/ml)、あるいは VEGF と TM (10 μ g/ml) を含むペレットを移植 1 週間後にペレットに向かって伸長した血管の数を計数した。

3. TM が炎症に及ぼす作用に関する検討

3.1 炎症モデルの作成と採血

カニクイザルをモンキーチェアに固定し、生理食塩液に溶解した LPS 溶液 (1 mg/ml) を右前腕橈側皮静脈内に投与後、TM (0.2 mg/kg) または生理食塩液を左前腕橈側皮静脈内に投与し炎症を惹起した。

予め 3.8% クエン酸ナトリウム溶液を 1/10 容充填したシリンジを用いて、LPS 投与 0.5 時間前、LPS 投与後 0.5、1、2、4、6、8 及び 24 時間後に後肢伏在静脈から 2 ml ずつ採血した。

3.2 酵素免疫測定

得られた血液を用いて血小板数を測定し、残りを 3,000 rpm、4°C で 10 分間遠心して血漿を調製し、ELISA キットを用いて TNF- α 及び IL-6 の値を測定した。

4. 肝細胞の増殖刺激が血管新生促進因子である plasmin、uPA、MMP の活性に及ぼす作用に関する検討

4.1 部分肝切除

Wistar系オスラット(体重150~200g, 日本生物材料センター)を用いエーテル麻酔下で70%部分肝切除術を施した。同時に偽手術を施したラットを対照として、術後24, 48, 72, 168時間後にエーテル麻酔下で開腹し、肝臓をPBSで灌流後摘出し液体窒素で凍結し分析まで-80°Cで保存した。

4.2 細胞培養

肝細胞はWistar系オスラット(体重150~180g)から、コラゲナーゼ灌流法により単離した。単離肝細胞は 5×10^4 cells/cm²となるようにtype-1 collagen-coated dishに播種し、5%ウシ胎児血清(FBS), 10^{-8} M insulin, 10^{-8} M glucagonを添加したWilliams medium E (WE)を用いて培養した。播種4時間後、非接着細胞を除去し、1% FBS含有ホルモン不含WEに交換し、さらに20時間前培養後実験に用いた。

4.3 PCNAのウエスタンブロッティング

肝再生の指標としてDNA合成の際に特異的に発現レベルが増大するDNAポリメラーゼの補酵素proliferating cell nuclear antigen (PCNA)をウエスタンブロッティングにより測定した。凍結保存した肝臓を0.5% deoxycholate, 1% SDS, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF含有PBS中でホモジナイズし、ホモジネートを12,000 ×g, 4°C, 15分遠心した。上清中のタンパク質10 μgをウエスタンブロット分析に供した。一次抗体として抗PCNAマウス抗体PC-10 (DakoCytomation, USA), 2次抗体としてhorseradish peroxidase標識抗体を反応させImmunostaining HRP-1000™ (Konica Minolta, Tokyo, Japan)を用いて検出した。

培養肝細胞のPCNAの検出は、細胞を1% Triton X-100, 0.1 M NaCl含有50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)中で超音波破碎し、15,000 rpm, 20 min遠心後、得られた細胞タンパク質(15 μg)をウエスタンブロッティングに供した。

4.4 肝臓からの膜画分の精製

ラットを18時間絶食後、常温の0.25 M STMP (0.25 M sucrose/5 mM Tris-HCl, pH7.4, 1.0 mM MgCl₂, 1 mM PMSF)を用いて脱血し、肝重量を測定した。ポッター型ホモジナイザーに肝臓をいれ、氷冷した0.25 M STMPを肝臓重量の3倍量加えてホモジナイズした。0.25 M STMPをさらに加えて肝重量との比を5:1にした後、ガーゼでろ過した。ろ液を280 ×gで5分遠心分離後、上清を1500 ×gで10分遠心分離した。得られたペレットを0.25 M STMP中でダウンス型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、2.0 M STMを加えて終濃度1.42 Mの懸濁液ができるように調整した。この懸濁液に0.25 M sucrose溶液に重層し82,000 ×g, 60分間遠心分離した。遠心分離後、中間層に得られた画分をextract buffer (2% TritonX-100, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA含有20 mM phosphate buffer, pH 7.4)で溶解し細胞膜画分とした。

4.5 細胞膜結合 plasmin の調製

肝細胞の表面に結合した plasmin はトラネキサム酸を用いて離脱した。培養肝細胞を氷冷PBSで洗浄後0.1 M トラネキサム酸 (TA) 含有PBSを添加して4°Cで10分間反応させた。離脱した plasmin を回収し、-80°Cで保存した。

4.6 Zymography

肝組織中および肝細胞膜中の plasmin, PA, MMP の活性を zymography により測定した。肝臓溶解液、膜画分、膜結合 plasmin 画分を 2 mg/ml plasminogen-rich fibrinogen を含有させた10%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEした。泳動後、ゲルを2.5%Triton-X-100溶液中で振とうし、SDSを除去した(30分, 2回)。その後0.1 M glycine, 50 mM Tris-HCl, pH8.3中で37°C, 48時間インキュベートし染色・脱色した。

MMP活性の測定には2 mg/mlゼラチンを基質とし、incubation bufferとして5 mM CaCl₂, 0.9% NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各施設の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施し、倫理審査承認を得て行った。また、ヒト由来の生体試料は用いなかった。

C. 研究結果

1. TMがHUVECの増殖に及ぼす作用に関する検討

TMは濃度依存的にHUVECの増殖を促進し、至適濃度0.1 pg/mlにおける細胞数はコントロールの141%になった(図1)。ポジティブコントロールとして用いたトロンビンも同様の作用を示し、至適濃度19 ng/mlにおける細胞数はコントロールの151%であった(図2)。一方、培地中に12.3 pg/mlのトロンビン活性が検出されたため、TMの増殖促進作用がこの混入したトロンビンを介している可能性が考えられた。そこで、ヒルジシン(0.2 U/ml)存在下で同様な増殖実験を行った結果、コントロールレベルには影響を及ぼさなかったものの、TM(0.1 pg/ml)の細胞増殖促進効果は完全に消失した(図3)。

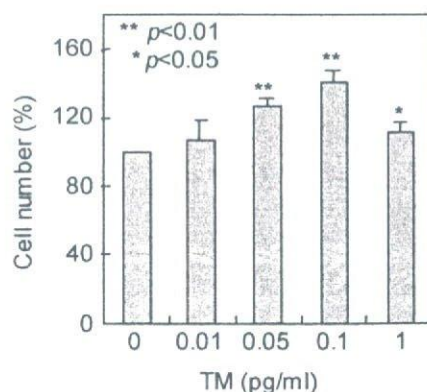


図1 TMがHUVECの増殖に及ぼす影響

2. TM がウサギ角膜における血管新生に及ぼす作用に関する検討

VEGF (10 ng/ml) は血管形成を促進し、その促進は TM 存在下で有意に増強された (図4)。

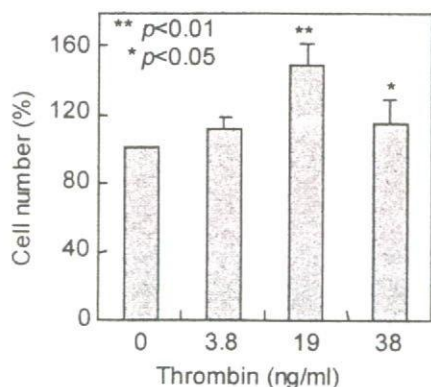


図2 トロンピンがHUVECの増殖に及ぼす影響

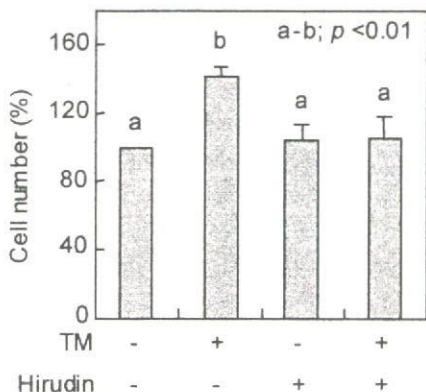


図3 ヒルジン存在下でTMがHUVECの増殖に及ぼす影響

3. TM が炎症に及ぼす作用に関する検討

LPS の投与により、TNF- α および IL-6 が一過性に上昇した (表1)。一方、血小板数はLPS の投与により若干低下した (表1)。TM 投与群(0.2 mg/kg)において TNF- α は、saline 投与群に比べて低値を示す傾向が認められた (表1、図5)。一方、血小板数及び IL-6 は saline 投与群と同程度であった (表1)。

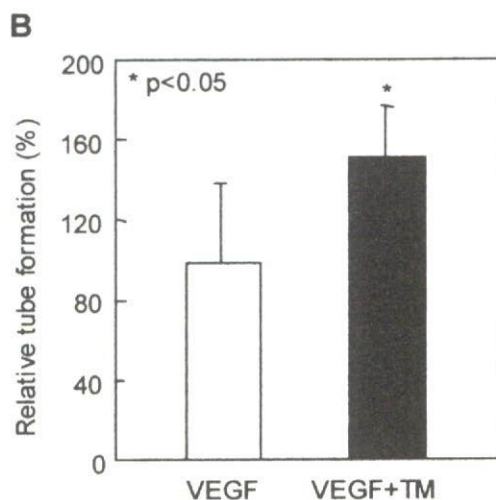
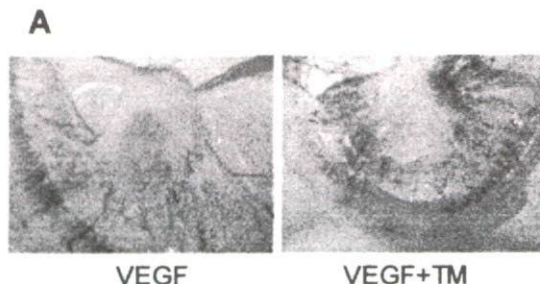


図4 In vivoでの血管新生に及ぼすTMの影響
A、ペレット内の新生血管像
B、ペレット内の新生血管数

表1 血小板数、血漿中TNF-a及びIL-6抗原値の経時変化(平均 ± 標準誤差 (N=4))

測定項目	採血時間 (hr)							
	Pre	0.5	1	2	4	6	8	24
(Saline投与群)								
TNF-a (pg/mL)	< 25	997 ± 202	2,938 ± 787	587 ± 711	< 25	< 25	< 25	< 25
IL-6 (pg/mL)	< 25	86 ± 65	2,301 ± 991	7,347 ± 225	5,413 ± 1,110	3,512 ± 1,444	2,066 ± 1,031	119 ± 24
PLT (x10 ⁴ /mL)	37.9 ± 2.0	36.4 ± 1.7	35.5 ± 2.2	33.5 ± 1.5	31.5 ± 1.0	30.5 ± 1.1	29.2 ± 1.3	27.5 ± 1.8
(TM投与群)								
TNF-a (pg/mL)	< 25	754 ± 189	2,065 ± 1,506	350 ± 443	< 25	< 25	< 25	< 25
IL-6 (pg/mL)	< 25	153 ± 63	2,577 ± 1,061	7,346 ± 450	5,073 ± 919	2,954 ± 962	1,875 ± 1,042	< 25
PLT (x10 ⁴ /mL)	33.9 ± 1.8	32.3 ± 1.9	32.2 ± 2.6	30.4 ± 2.2	30.5 ± 2.3	29.1 ± 2.3	29.0 ± 2.5	26.3 ± 2.6

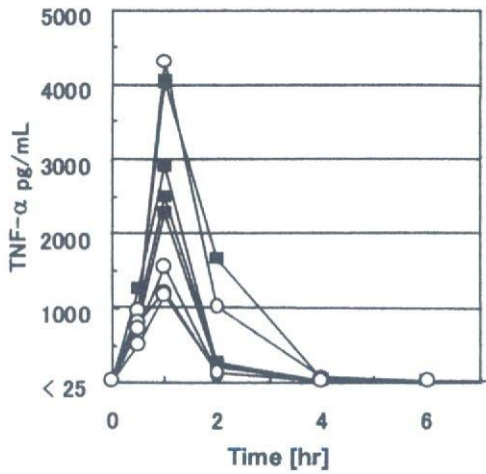


図5 血漿中TNF- α 抗原値の経時変化 (■; saline投与群, ○; TM投与群)

4. 肝細胞の増殖刺激が血管新生促進因子である plasmin, uPA, MMP の活性に及ぼす作用に関する検討

4.1 肝再生過程における PA, MMP 活性の変動

部分肝切除後の肝重量の回復、肝細胞の増殖など肝再生について検討した。部分肝切除後 24 時間から 48 時間にかけて肝重量は急激に回復した。細胞の増殖のマーカータンパク質である PCNA も肝重量の回復とともに増加し 24-48 時間でピークを示した (図 6 A, B)。肝臓中の uPA, MMP-2 の活性も肝重量の回復、PCNA の発現とともに発現して増加したが plasmin 活性は検出されなかった (図 6 C)。

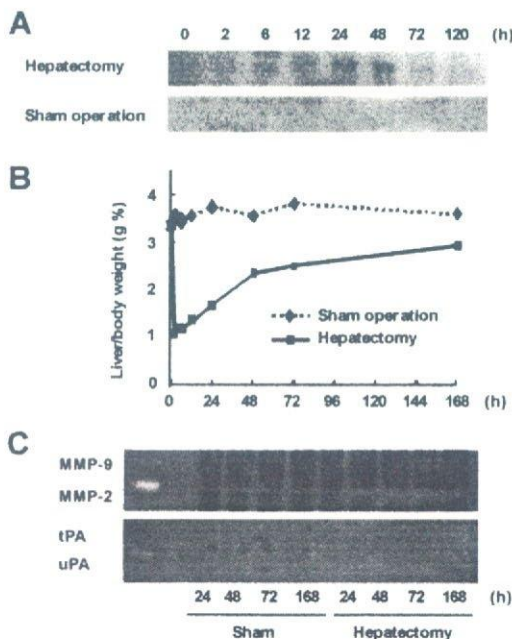


図6 ラット部分肝切除後の肝再生と肝臓中の tPA, uPA, MMP 活性
A, PCNA 発現のウエスタンブロッティング、
B, 肝臓重量の変化、C, MMP のザイモグラフィー

4.2 増殖刺激が plasmin の局在に及ぼす影響

部分肝切除後の肝再生過程における肝細胞膜画分における plasmin 活性について検討した。肝細胞膜 plasmin 活性は、増殖が最大となる 48 時間後に増加した (図 7 A)。初代培養肝細胞に EGF, insulin を添加して増殖を刺激すると、肝細胞膜への plasmin 結合量は増加した (図 7 B, C)。

4.3 肝細胞膜に局在する plasmin が PA 活性に及ぼす影響

細胞膜に結合した plasmin が PA や MMP 活性に及ぼす影響について検討した。初代培養肝細胞に終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ の plasminogen を添加して培養すると培養液中の tPA 活性はほとんど変化しなかったが、uPA 活性は顕著に増加した (図 8, 9)。

Plasminogen のリジン残基結合部位を競合的に阻害する TA やタンパク質の C 末端リジン残基を切断する carboxypeptidase B (CPB) は培養液中の tPA 活性には影響をおよぼさなかったが、uPA 活性を顕著に減少させた (図 8, 9)。

4.4 細胞膜に結合した plasmin が MMP 活性に及ぼす影響

初代培養肝細胞の培養液についてゼラチンを基質とした zymography により分析したところ、肝細胞は主に MMP-2 を産生していた。また、培養液中の MMP-2 の活性は HGF (図 10 A), EGF (図 10 B) により増加した。これらいずれの条件下においても、MMP 活性は TA により影響を受けなかった。

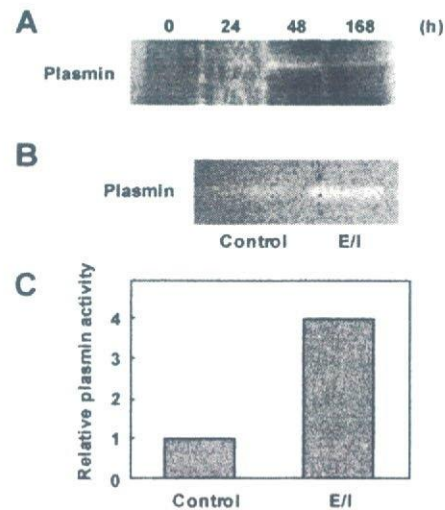


図7 部分肝切除後の細胞膜結合 plasmin 活性の変動と初代培養肝細胞に対する増殖刺激が plasmin の局在に及ぼす影響
A, 部分肝切除後 (細胞膜画分の plasmin の zymography)、B, EGF, insulin (E/I) を添加して培養した細胞 (膜画分の plasmin の zymography)、C, zymography の定量的解析結果

D. 考察

1. TM が HUVEC の増殖に及ぼす作用に関する検討

TM は HUVEC の細胞増殖を促進した。この作用は培地中に混入した、単独では増殖に関与しない低濃度のトロンピンを介していると考えられた。また、培地中のトロンピン濃度は、細胞増殖の促進における至適濃度の 1/1500 程度であったことから、TM は細胞増殖促進におけるトロンピンの有効濃度を顕著に低下させると考えられた。これらの結果は作用は異なるものの、MMT 細胞における結果と一致していた。今後、TM が細胞増殖促進以外に管腔形成、遊走、浸潤など他の血管新生の進展過程についても同様な作用を示すかどうか詳細に検討する必要がある。

2. TM がウサギ角膜における血管新生に及ぼす作用に関する検討

本研究により *in vivo* においても TM が血管新生促進作用を有することが明らかになった。HUVEC においてトロンピンは VEGF 受容体の発現を促進することが明らかになっている。したがって、今回の HUVEC における結果から、TM は VEGF 受容体の発現促進に要するトロンピンの有効濃度を低下させ、結果的に VEGF の反応性を高めた可能性が考えられる。

3. TM が炎症に及ぼす作用に関する検討

LPS 投与による TNF- α 及び IL-6 の経時変化は、これまでに報告されている結果を再現しており、炎症モデルとしての妥当性が示された。一方、LPS 投与による血小板数の低下は軽度であり、LPS の持続的な投与が必要と考えられる。一方、代表的な炎症性サイトカインの一つである

TNF- α が TM の投与により低下したことから、TM が炎症を抑制する可能性が示唆された。なお、その作用機序については、従来報告されている DI によるものかどうかは不明である。

4. 肝細胞の増殖刺激が血管新生促進因子である plasmin、uPA、MMP の活性に及ぼす作用に関する検討

肝部分切除による増殖刺激に伴い、uPA、MMP-2 活性の増加および plasmin 活性の膜への結合の増加がみられた。なお、データは示していないが、遊離および膜結合型を含めた全体としての plasmin 活性は肝部分切除により増加しなかった。また、培養肝細胞において、HGF および EGF は MMP-2 活性および plasmin 活性の膜への結合を増加した。これら増殖因子は肝部分切除において増加することから、肝部分切除における MMP-2 活性および plasmin 活性の膜への結合の増加は HGF および EGF を介していることが示唆された。培養肝細胞において、uPA 活性は plasminogen の添加により増加した。その作用は TA および CPB のような plasmin の細胞膜への結合を阻害する物質により抑制されたことから、uPA 活性の増加には plasmin の膜への結合が関与していることが示唆された。なお、HGF および EGF による MMP-2 活性の上昇は TA および CPB による抑制されなかったことより、plasmin の膜への結合は関与していないことが示された。肝臓における plasminogen 結合たん白質として cytokeratin 8 が報告されているが、その機能については不明である。我々は、増殖刺激した培養肝細胞において CK8 とは異なる plasminogen 結合たん白質が存在することを明らかにし

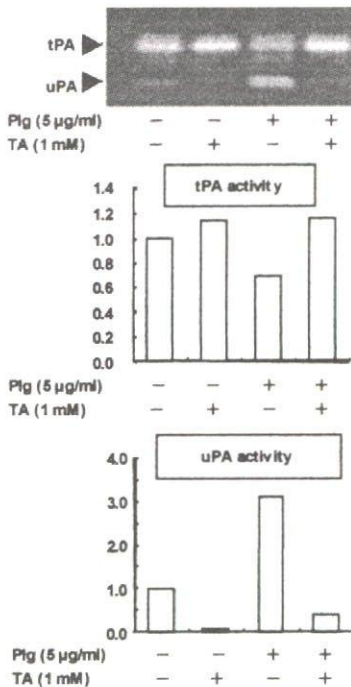


図8 トラネキサム酸がplasminogen添加によるuPA活性の増加に及ぼす影響

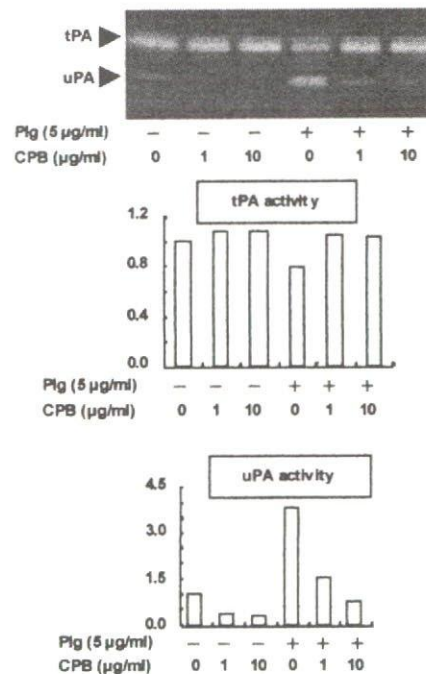


図9 CPBがplasminogen添加によるuPA活性の増大に及ぼす影響

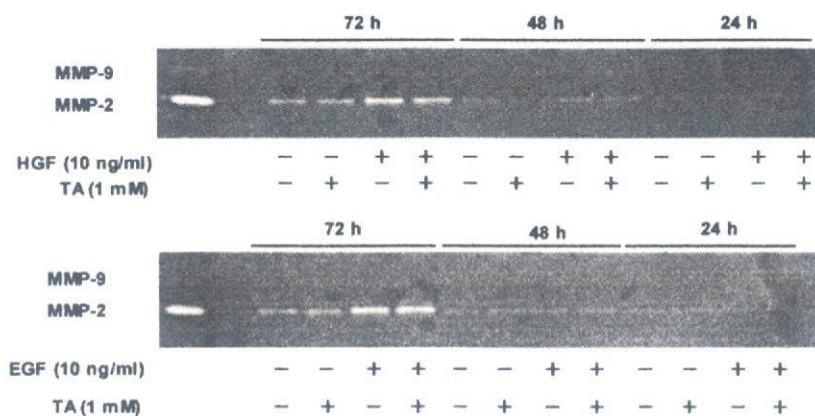


図10 トラネキサム酸がMMP活性に及ぼす影響

ている。今後、この結合たん白質が plasminogen の plasmin を介した uPA 活性の増加に關与する可能性について検討する必要がある。

E. 結論

今回の検討結果から以下の点が明らかになった。
 ①2%FCS 存在下において TM (0.1 pg/ml) は HUVEC の増殖を促進することから、TM が血管新生促進因子として作用することが明らかになった。また、その作用機構として HUVEC の増殖促進に必要なトロンビンの有効濃度を低下させる可能性が示唆された。
 ②ラット角膜における VEGF 依存的な血管新生促進を TM (10 μg/ml) は増強したことから、VEGF の血管新生促進における TM の協調的な作用が明らかになった。
 ③カニクイザルにおいて TM (0.2 mg/kg) は LPS 投与による TNF-α の増加を抑制したことから、炎症の抑制因子として作用することが示唆された。
 ④部分肝切除の増殖刺激により uPA、MMP-2 活性および plasmin 活性の膜への結合が増加した。また、培養肝細胞を用いた検討結果から、MMP-2 活性および plasmin 活性の膜への結合の増加には HGF および EGF、uPA 活性の増加には plasmin 活性の膜への結合がそれぞれ關与していることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

新見伸吾

Niimi, S., Harashima, M., Takayama, K., Hara, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells. *J. Biochem (Tokyo)* 137, 579-586 (2005)

鈴木宏治

1. Nakamura, M., Gabazza, E. C., Yano, Y., Taguchi, O., Horiki, N., Fukudome, K., Suzuki, K., Adachi, Y. Anti-inflammatory effects of activated protein C in gastric epithelial cells. *J. Thromb. Haemost.* 3, 2721-2729 (2005)
2. Sakamoto, T., Ishibashi, T., Sakamoto, N., Sugimoto, K., Egashira, K., Ohkawa, H., Nagata, K., Yokoyama, K., Kamioka, M., Ichiki, T., Sugimoto, N., Kurabayashi, M., Suzuki, K., Takawa, Y., Maruyama, Y. Endogenous NO blockade enhances Ca²⁺ influx through MCP-1 in endothelial cells by monocyte adhesion. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2005-2011 (2005)
3. Kijiyama, N., Ueno, H., Gabazza, E. C., Suzuki, K., Hashimoto, E., Takeya, H. Intracheal gene transfer of tissue factor pathway inhibitor attenuates pulmonary fibrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 1113-1119 (2005)
4. Yamaguchi, M., Gabazza, E. C., Taguchi, O., Ikoma, J., Kaito, M., Kojima, Y., Imoto, I., Satomi, A., Hayashi, T., Mroiwaki, H., Suzuki, K., Adachi, Y. Decreased protein C activation in patients with fulminant hepatic failure. *Scand. J. Gastroenter.* 41, 331-337 (2005)
5. Asanuma, K., Yoshikawa, T., Hayashi, T., Akita, N., Hamada, Y., Nakagawa, N., Nishioka, J., Kamada, H., Gabazza, EC, Ido, M., Uchida, A., Suzuki, K. Protein C inhibitor inhibits breast cancer cell growth, metastasis and angiogenesis independently of its protease inhibitory activity. *Cancer Res* (submitted)

関泰一郎

Hasebe, Y., Okumura, N., Koh, T., Kazama, H., Watanabe, G., Seki, T., Ariga, T. Formation of rat hepatocyte spheroids on agarose. *Hepatology Research*, 32, 89-95 (2005).

鶴田一壽

なし

2. 学会発表

新見伸吾

Seiji Noma, Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Kazuko Takayama, Mayumi Hara, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells. 第78回日本生化学会大会 (2005年)

鈴木宏治

中川典美、浅沼邦洋、吉川智朗、秋田展幸、林辰弥、西岡淳二、鈴木宏治：プロテインCインヒビター(PCI)の血管新生に及ぼす影響。第28回日本血栓止血学会学術集会、2005年、11月、福岡。

関泰一郎

1. 奥村暢章、高智彦、妹尾ありさ、鈴木崇文、下西沙織、前田康孝、長谷部祐一、関泰一郎、有賀豊彦、肝再生過程における Plasmin の局在調節と肝細胞増殖について、第11回肝細胞研究会 (2005年5月)

2. N. Okumura, T. Koh, Y. Hasebe, G. Watanabe, A. Yashiki, A. Seno, T. Suzuki, S. Niimi, T. Kawanishi, T. Hayakawa, T. Seki, T. Ariga, Regulation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene expression in growth-promoted hepatocytes and role of TAFI in liver regeneration. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXth congress (2005年8月)

3. 奥村暢章、下西沙織、前田康孝、関泰一郎、有賀豊彦、肝細胞増殖に及ぼす細胞表面 plasmin 活性とその調節機構について、日本農芸化学会2006年度大会 (2006年3月)

4. 下西沙織、奥村暢章、前田康孝、関泰一郎、有賀豊彦、線溶系因子による肝がん細胞の増殖能の制御、日本農芸化学会2006年度大会 (2006年3月)

鶴田一壽

なし

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