

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonics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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
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 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
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 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
KH21013	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	阿部 淳 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非品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 …… 358
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 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
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 …… 466
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 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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 …… 551
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 龍兒 …… 566
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 …… 576

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

所 属 東京西小児難病センター
研究者 香坂隆夫
研究期間 平成16年4月より19年3月

JAG1の肝における個体誕生以降の働きに注目し、HGFの発現調節、肝での炎症抑制、macrophage活性化因子の抑制の三つの働きを見出した。肝繊維症への進展として、繊維細胞自身が炎症を促し増悪させる機序を想定し、その妥当性とJAG1とSAPの関係を検討した。

分担研究者

株式会社 ユーエムエー 多々納 俊雄
国立成育医療センター 鈴木 輝明

A. 研究目的

JAG1遺伝子はAGSの責任遺伝子であるが、この遺伝子異常を肝疾患のみの患者についても見出した。すなわち胆道閉鎖症や乳児期、新生児期の肝疾患にmissense mutationが10%程度に見出したという臨床結果をもとに、JAG1遺伝子の肝の炎症に対する働きを検討した。

AGSの胆管形成不全は発生段階の異常であるが、この疾患において個体発生後も持続する肝障害、肝の繊維化も長期予後を決する因子である。胎生期の肝の胆管形成不全の発症のみならず、生後のJAG1遺伝子の肝障害の持続に対する役割の検討は重要と考える。胆道閉鎖症や劇症肝炎、新生児期の肝炎は、その予後不良例は繊維化の進展を認める。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—の進展に際し、繊維化

自身が炎症免疫反応を引き起こし、増悪傾向を生むという仮説のもとにそれを立証するための因子とその機序について検討した。肝の炎症との関連では、JAG1遺伝子の炎症作用の関与、その機序の解明を目的とした。肝繊維化の機序として、繊維細胞上清に認められるmacrophage活性化現象に注目し、JAG1の作用とこの因子の同定を目標とした。

さらに繊維細胞におけるmacrophage活性化因子の臨床的意義について検討し、臓器繊維疾患とくに肝硬変症や腎硬化症の進展機序解明および治療判定に役立てる系の開発を試みる。このことを通して、終末期の臓器不全の患者の治療に役立ち、疾患の予後改善に寄与することを目的とした。

B. 研究方法および対象

1). 対象

臨床研究として、患者検体を用いて、JAG1遺伝子解析、HCMV 特異的 T 細胞の測定、SAPの測定を行なった。当難病センターならびに成育医療センターに通院中の患者で遺伝子検

索ならびに本研究の趣旨につき了解の得られた 108 名の患者を対象とした。

2). 研究方法

1. 肝細胞株に対する効果と JAG1 遺伝子導入の抗炎症作用との関連

ACHN、Hucct1、Huh7、KMST 細胞、ヒト各種樹立細胞株、3T3 細胞マウス繊維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。HGF は大阪大学より譲渡されたものを用いた。

細胞に対する JAG1 遺伝子、JAG2 遺伝子の導入は、SuperFect Transfection Reagent を用いる指示書に従って行った。肝細胞株である Hucct1、Huh7 を $TNF\alpha$ で各種細胞を刺激したときの細胞増殖能と cytokine の測定はそれぞれ MTT 法、ELISA 法で行なった。Luciferase assay についてはすでに発表した方法に準じて行った。

Wild type と mutant JAG の作成、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。

2. 繊維細胞に対する JAG1 遺伝子および産物の効果と SAP との関連に関する検討

細胞培養は Dulbecco's modified Eagle's medium に 10% FBS を添加して使用した。3T3 細胞や KMST 繊維細胞などの細胞上清と THP-1 細胞との関連の検討では、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。

2. SAP の測定

多々納らの報告に示した ELISA の系を用いて患者血清により測定した。すなわちスキムミルクと phosphorylethanolamine を第一抗体の代用として用い、glyceraldehyde によって固定し、検体を添加、検出は mouse SAP

monoclonal 抗体を用いた。

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、東京西徳洲会病院、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。

C. 結果

1. 胆道閉鎖と新生児期発症の肝炎における JAG1 遺伝子異常の存在

肺動脈狭窄の心疾患と新生時期発症の肝疾患において、JAG1 遺伝子異常を 3 年間にわたり遂行し調べた。肺動脈狭窄例では異常例なく、肝疾患に対する調査を、JAG1 遺伝子異常を胆道閉鎖症、新生児肝炎、劇症肝炎などに 10% に見出し、その変異は肝炎、胆道閉鎖症では missense mutation であった。

2. JAG1 遺伝子の肝への作用機序- HGF の抑制作用

AGS における胆管形成不全と JAG1 遺伝子異常の関連を調べるためと HGF について検討した。wild type と mutants を COS-7 に導入し、HGF の mRNA の量、蛋白について検討した。wild type の JAG1 遺伝子は、HGF の転写を抑制し、JAG1 mutant 遺伝子の変異部位によって異なる抑制を示した。Notch2-JAG1 の系が HGF の産生を調節していると考えられた。

3. JAG1 遺伝子の肝への作用機序- $TNF\alpha$ の肝細胞への炎症作用の抑制

Huh7 に対して $TNF\alpha$ で刺激したときの細胞増殖能と IL-8 産生を比較した。増殖には変化を認めず、 $TNF\alpha$ の濃度に比例して、IL-8 産生が増加した。Huh7 では JAG1 遺伝子導入により、 $TNF\alpha$ で刺激したときの IL-8 産生増強効果は抑制された。Huh7 の細胞内伝達機構の変化を $NF\kappa B$ の変化、luciferase assay の

結果、TNF α の刺激は apoptosis よりも炎症系により強く関連しており、JAG1はこの作用を抑制すると考えられた。

5. JAG1 遺伝子の肝への作用機序—線維細胞上清中の macrophage 活性化因子の抑制

線維細胞上清中には THP1 細胞を活性化する因子の存在を見出した。その作用は、細胞増殖作用、炎症性 cytokine の産生亢進、分化促進作用の 3 作用であるが、JAG 遺伝子の導入を行いその効果について検討した。JAG1 遺伝子導入により THP1 を活性化する因子の産生は抑制されるが、JAG2 遺伝子では無変化であった。さらに KMST を始めとするヒトの繊維細胞樹立株、肝、腎由来のヒト繊維細胞でも同様の結果が得られた。

THP-1 細胞の細胞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。

THP-1 細胞の炎症性 cytokine の産生能の変化は、TNF α 、IL-1、IL-6、IL-8 などについて検討した。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 CD16、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. 線維細胞上清中の THP1 活性化因子の同定

JAG1 および JAG2 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。繊維細胞の産生する THP1 活性化因子は JAG1 遺伝子導入により消失するが、JAG2 遺伝子導入では影響はなかった。両者を 3T3 細胞に導入し、DNA チップによる解析を試み、その相違によ

り、SAP が THP-1 に対し、線維細胞上清と同様の作用を有することを確認した。

8. SAP の測定法の開発とその臨床応用

SAP は Stx2 と結合し、その作用を抑制する。Stx2 側の結合部位は monoclonal 抗体による解析から Gb3 の結合部位にあることが判明した。ペプチド解析、や VLDH が結合に干渉するという結果からリン脂質における SAP-Stx2 結合に関する検討を行った。

phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, phosphorylethanolamine の 4 種で検討し、Phosphorylethanolamine のみが、顕著な相違を示し、この物質は SAP の STX2 に対する結合を容量依存性に抑制した。他の 3 種類は、多少の結合促進が認められるが、抑制は全く認められなかった。

Blocking 剤として用いられる block Ace (スキムミルク) は SAP を吸着する。このことを利用して BlockAce と Phosphorylethanolamine を coating して SAP を添加することにより、濃度依存性に測定可能で特異性の高い測定系を確立し得た。

この測定系を用いて、SAP と肝繊維化との関連を検討した。胆道閉鎖症の年長者では肝の繊維化の進行に伴い肝体積の減少がみとめられるが、この値と SAP は逆の関係を示した。また HCMV の持続感染者と未感染者を比較し、肝炎活動性の高いグループで高値が認められた。一般の肝炎では有意な変動のないことより肝の繊維化との関連が示唆された。

9. 線維細胞上清中の macrophage 活性化因子と SAP の異同

繊維細胞の上清中に存在する macrophage 活性化因子は、THP-1 細胞に作用し、細胞の増殖、CD16 の発現促進、炎症性 cytokine の

産生促進の 3 つの作用を示す。SAP 刺激によっても同様の効果を確認し得た。抹消血の monocyte でも同様のことが確認された。なお THP-1 の成熟型とされる ATHP-1 では、刺激無しで CD14 の発現が認められ、かつ SAP の添加に対しても変化を示さなかった。

SAP 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。SAP は肝細胞株に対しては作用しないことが確認された。逆に TNF α に対し、SAP の産生の亢進が mRNA によって確認された。

D. 考察

JAG1 遺伝子異常は、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検討した。

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。JAG1 遺伝子は、HGF の転写を抑制し、肝の発生時に胆管形成への関与するばかりでなく、肝細胞障害後の肝の再生を規定するものとして重要と考える。AGS に認められる JAG1 遺伝子の heterozygous な異常は HGF の過剰発現を引き起こし、肝の発生分化に影響を与えていると考えられる。

JAG1 異常者の肝障害性の持続の機序として、cytokine の調節不全による、炎症持続の機序が想定した。TNF α は肝炎の一次的な炎症性 cytokine であり、apoptosis の誘導など、劇症肝炎などで中心的な役割を果たす。肝細胞株を用いた *in vitro* の結果では、JAG1 遺伝子およびその蛋白は、TNF α の刺激による cytokine の産生亢進を抑制していた。TNF α 刺激による cytokine の産生亢

進は、細胞内情報伝達系の NF- κ B 系を介する炎症系によるものであり、JAG1 遺伝子はこの系を抑制することを確認した。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、肝炎持続の因となっていることが示めされた。

肝硬変、腎硬化症などの繊維化を主体とする病変の進展に際し、繊維化自身が免疫反応を引き起こし、増悪傾向を生むという仮説のもとにその機序について検討した。

線維細胞上清中の因子の示す 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 細胞の CD14、CD16 の発現増強の効果を確認した。繊維芽細胞の産生する THP-1 活性化因子としては、fibronectin や CD137 の報告があるが、これらの因子との異同を検討し、異なるものであることを確認した。

繊維細胞の放出する macrophage 活性化因子の産生は JAG1 遺伝子により調節されるが、JAG2 遺伝子の影響は受けない。この両者を 3T3 細胞に導入し、DNA チップによる解析を試み、SAP が一つの候補となった。SAP について検討では、THP-1 細胞に対する線維細胞の上清の因子と SAP の働きの異同について検討し、線維細胞の上清の示す増殖分化、IL-8 の産生亢進、CD14、CD16 の発現増強の効果を SAP においても確認した。繊維化が進展し、SAP の産生亢進やその沈着により、macrophage の活性化、炎症の増強、肝繊維症の進展、肝硬変へと移行すると考えられる。

炎症蛋白である SAP が macrophage を活性化するという事は、肝の繊維化が炎症によって増悪するという現象を説明しており、臨床の結果をよく反映する機序と考える。SAP 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する機序と考えられる。繊維化してからの変遷は臨床的には様々な経過をとり、このような病態に移行してからの検討は、臓器不全への移行阻止という観点からも重要である。

E. 結論

小児期発症の肝疾患における JAG1 遺伝子異常を調べ、10%に missence mutation を見出し、個体誕生後の肝における JAG1 の働きについて検討した。HGF の発現調節、肝細胞の NF- κ B 系を介しての IL-8 産生抑制などの作用から JAG1 は肝炎の進展阻止に働いていることが示された。

JAG1 は繊維細胞の培養上清中の macrophage 活性化因子の産生抑制により繊維化の進展抑制にも関与する。繊維芽細胞培養上清中は、THP-1 に対し、増殖促進、IL-8 の産生亢進、細胞膜上での CD14 の発現などの作用を示す。繊維細胞上清と同様の作用を有するものとして、SAP を見出し、その作用を確認した。

SAP と JAG1 の関係と肝に与える効果の解明は、炎症と繊維化の機序解明と繊維化阻止への治療の開発へと道が開かれることが期待できる。

F. 研究発表

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 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.

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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