

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的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 …… 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

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

所属 旭川医科大学 医学部
研究者 若宮 伸隆

研究要旨：肝臓分泌型 MBL は SCIDhu マウスで HIV 感染阻止効果を確認し、その新規培養法を検討した。CL-P1 は細胞でエンドサイトーシスやファゴサイトーシス機能に深く関わることや個体レベルで形態発生に関与することなどの基盤的な知見を得た。

分担研究者

- (1)国立感染症研究所エイズ研究センター 駒野 淳
- (2)扶桑薬品工業(株)研究開発センター 岸 雄一郎
- (3)筑波大学大学院人間総合科学研究科
応用先端医学専攻臨床免疫学 堤 明人
- (4)昭和大学薬学部 板部 洋之

A. 研究目的

血管は現代の高齢化社会において大きな問題となっている虚血性心疾患、脳血管障害、糖尿病などの生活習慣病において最も重要な臓器である。また人口の急速な高齢化とともに、疾病全体における難治の血管炎に付随する血管障害の割合は著しく増加しており、その原因のひとつとして血管内皮への微生物感染や微生物の結合が加齢とともに蓄積され、そのことがトリガーになって血管内皮障害をおこす可能性が示唆されている。我々が発見した血管内皮存在型のスカベンジャー受容体遺伝子CL-P1の研究は、微生物や変性LDLなどが関与する血管炎の発症要因の解明には欠くべからざる方向性のひとつであり、また血管虚血・再灌流の際における血管損傷においてMBLを中心とするコレクチンの補体活性化や血管における微生物感染に対するMBLの役割を明らかにすることは非常に重要な研究課題であると認識している。本研究の結果として血管炎や異物の接着によっておこる血管の梗塞や損傷などの予防や新たな治療法・医薬品開発にユニークで大きな知的な貢献をもたらす可能性があり、ひいてはその

ことが生活習慣病の予防や治療に結びつき、社会に多大な貢献ができると考えている。

B. C. 研究方法と成果

若宮らは、ゲノムデータベースが充実してきた1996年に、新規コレクチン遺伝子断片を発見し、その断片から新規コレクチン遺伝子のクローニングに成功した(JBC1999, 2001)。それらのホモロジーから、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ CL-P1cDNA のクローニングを行い、その遺伝子ファミリーを明らかにしている。また、MBL は最初に発見されたコレクチンであるが、その生体での感染実験など、未だ明らかになっていない部分が多い。最終年度では、特に個体レベルの実験系では、MBL による HIV の動物感染抑制の確認実験を、若宮・岸・駒野の3つのグループで進めた。また、CL-P1 の個体レベルの研究のために、ゼブラフィッシュ遺伝子ノックダウン実験の確認実験とその裏打ち実験を行い、そのメカニズムについて検討した。さらに、MBL では、ヒトでの役割について堤らは、新たな研究を進め、板部らは、酸化 LDL についての動物モデル作成と質量分析による新しい治験を発見している。以下に現在行っているそれぞれの研究について、方法とその成果をまとめる。

1. MBL 高発現株から得られる MBL の検討 (岸・本多・若宮・鈴木)

共同研究者である北海道大学鈴木定彦教授の協力により、従来までの、MBL 高発現株を引き続き、

培養を行い、細胞レベル、動物レベルの両 HIV ウイルス感染阻止実験においての、陽性コントロールとするために以前と同じ条件で培養精製し実験に供した。一方、本研究で、新規作成した、新規 MBL 高発現株は、それぞれを、市販培養液のいろんな種類の CD (chemical defined) 培地で培養し、細胞密度を調節し、MBL サンプルを収集した。初年度行った、単純な比較では、ウェスタンブロット分析では、新規 MBL 高発現細胞株は非常に高分子量型の MBL を産生する可能性のあることが推測された。得られた MBL 高発現株は、従来の発現株に比べて発現量の多い点やより多量体形成が進んでいることが認められた。本年度は、これまでと同じ培養条件で、発現させたすべてのリコンビナント MBL を同一条件で精製をおこない、その状態を確認したのち、国立感染症研究所駒野分担研究者により、それぞれの MBL の *in vitro* 実験における抗ウイルス力価の定量を行った。その結果、分子量やそのゲルろ過パターンでは、抗 HIV 効果の有無を推測することはできなかった。しかしながら、10 株中 2 株以上は、少なくとも。従前の MBL クローンに比して、優位に高い抗 HIV 活性を示した。一方、従来株由来 MBL は、抗ウイルス中和能は、新規 MBL 発現株由来のものに若干劣るが、安定的に生産能を保持し、その生物学的活性についても、濃度依存性で常に安定して活性が検証され、非常に良いスタンダードになると考えた。ちなみに、近年血液銀行からの血液が入手困難なために、ヒト血液由来 MBL スタンダード生産が現時点では難しく、旧発現株由来の MBL を、基準 MBL とすることにした。次に、新規 MBL 発現クローンを 2 つの株に絞って、培養条件を多様に変化させて、MBL の性状を比較検討した。つまり、培養液を市販されているものを複数用意し、さらに培養環境を複数の条件に設定して、この培養液と培養条件の 2 つを組み合わせ、その培養経過中での培養液を一部、採取して、その性状の検討を行った。その結果、同じ細胞株でも、培養液や条件が変化すれば、MBL の分子

量に変化が起ること、また、そのゲルろ過のパターンにも変化が見られることが明らかになった。しかも、その性状の変化を単純に比較検討したぐらいでは一定の法則を見出すことはできなかった。また、培養環境を変化させて、既存のリコンビナント MBL と現時点での新規 MBL 産生株からのいくつかのものをを用いて、HIV 臨床分離株において、抗ウイルス力価の比較定量をおこなうための試料づくりをおこない供与した。一方、MBL 自体の抗 HIV 作用の検討については、既存のリコンビナント MBL と現時点での新規 MBL 産生株からのいくつかのものをを用いて、実験室株とは異なる HIV 臨床分離株や多剤耐性 HIV に対して、抗ウイルス力価の比較定量をおこなうための、試料づくりをおこない、本多研究員に供与を行った。また、現在のところ、一次スクリーニングの段階での MBL 高発現細胞株の一次ストック後の、ストックからのもどし回復試験を行い、適正条件でストックがなされていることが確認できた。さらに、今後の実験には均一で、大量の MBL の産生が必要となることや、培養条件を常に同一条件に規定するためには、現在のフラスコ培養では、限界があり、ファーメンターを用いた、培養が重要な鍵になると考え、鈴木教授の協力を得て、培養条件のさらなる検討を共同で行っている。その後、これらの抗 HIV 作用の最も優れている MBL 発現細胞株の選別を行いつつ、2 次スクリーニングを並行して行い、株をプログラミングフリーズして、Master cell bank (MCB) とする予定となっている。これらの MBL 産生株実験の詳細な検討とともに、並行して、既存リコンビナント MBL と現時点での有力株からのリコンビナント MBL を用いて、SCIDhu マウスにおける、HIV 感染阻止実験を実験 2. の如く、小規模であるが開始したので、そのサンプル供与も同時に行った。

2. リコンビナント MBL 投与による HIV 感染阻止確認実験 (岸・本多・若宮・鈴木)

リコンビナント MBL を用いて、個体レベルの両 HIV ウイルス感染阻止実験を行った。これらの

すべての作業は、旭川医科大学、感染研、扶桑薬品工業の3機関と北大鈴木教授との協力で施行された。はじめに、NOD scid マウスへの正常ヒト PBMC の腹腔移植により、2週間後にヒトリンパ組織の移植が成立したマウス (SCIDhu マウス) を作成し、このマウスの系に、HIV を接種し、抑制実験システムを作った。既存リコンビナント MBL (2-12 株) と現時点での有力株 (MO1P05) よりリコンビナント MBL を精製して、上記 SCIDhu マウスを用いた HIV 感染阻止実験を開始した。上記2種類のリコンビナント MBL を腹腔内に 45 mg/kg の濃度で投与し、その後 HIV 野生株 HIV-1 MNp を 200 TCID₅₀ にて腹腔接種した。2週間後に血中ウイルスコピー数を測定することで各 MBL の HIV-1 感染防御能を都合三回にわたって評価した。リコンビナント MBL では、抗 HIV-V3 モノクローナル抗体を高単位使った感染防御試験のような、完全な Protection はおこらなかったが、*in vitro* 同様に、明らかに 2-12 株はウイルスに対して増殖抑制活性を示した。リコンビナント MBL を腹腔投与した時の SCIDhu マウスの血中濃度変化に示した腹腔投与した時のリコンビナント MBL 血中濃度を見ると、腹腔接種した中和抗体が持続して血中に存在しているのに対し、2種の組換え MBL は血中への移行率が悪く、さらに半減期が短く、早期に血中から消失していること示唆された。そのため腹腔内で中和しきれなかったウイルスが血中に移行し、各組織に生着したヒト細胞で増幅されるため中和抗体を用いた場合に起こる完全な防御反応が認められないと考えられた。

3. CL-P1 の細胞レベルの発現検討 (若宮)

CL-P1 を発現する細胞としては、すでにヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell = HUVEC) が明らかになっているが、それ血管関連細胞である、ヒト臍帯動脈血管内皮細胞 (human umbilical artery endothelial cell = HUAEC) やヒト大動脈血管内皮細胞 (human aortic endothelial cell = HAEC) などにおいて CL-P1 発現を、mRNA レベルで測定した。方法とし

ては、培養細胞から、TRIzol Reagent を用いて、全 RNA を調整し、クロロホルム、2-プロパノールで RNA を分離した。75%エタノールで洗浄後、ペレットを乾燥し、DEPC 処理水にて溶解した。抽出した総 RNA は分光光度計を用いて濃度を測定した。cDNA の調製は TaqMan Reverse Transcription Reagent (アプライドバイオシステムズ社製) により行った。得られた total RNA 1 µg に、5 µl 10x RT Buffer、11 µl 25mM MgCl₂、10 µl dNTP Mixture、2.5 µl Oligo(dT)₁₈ primer、1 µl RNase Inhibitor、1.25 µl MultiScribe Reverse Transcriptase を添加し、DEPC 水で総量 50 µl とした。25°C 10分、48°C 30分、95°C 5分のプロプログラムで逆転写反応を行い、cDNA を調製した。相対定量は、7500 Real-Time PCR System (アプライドバイオシステムズ社製) を用いた方法で行った。リアルタイム PCR は TaqMan Universal PCR Master Mix およびプライマーとプローブのセットである TaqMan Gene Expression Assays (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて行った。逆転写反応を行って得た cDNA 2.5 µl に Universal Master Mix 12.5 µl および TaqMan Gene Expression Assay 1.25 µl を添加し、滅菌蒸留水で総量 25 µl とした。ヒト CL-P1, LOX-1, MBL の Gene Expression Assay はアプライドバイオシステムズ社のウェブサイトの検索ツールを用いて選択、購入した。内部標準には GAPDH (アプライドバイオシステムズ社) を用いた。Uracil N-glycosylase 活性化 50°C 2分、プレヒート 95°C 10分の後、95°C 15秒、60°C 1分を 60 サイクル行う標準プログラムで PCR を行った。PCR 後 RQ ソフトウェア (アプライドバイオシステムズ社) を用い、比較 C_T 法 (ΔΔC_T 法) にて解析を行った。Real time PCR 法による、HUVEC、HUAEC、HAEC の mRNA の定量では、それぞれ C_T 値は、28, 30, 30-32 前後くらいであった (内部標準 18S rRNA=18-18.7 のとき)。一方、血管内皮細胞に存在するとされる Lox-1 は、40 以下と非常に低値を示すことが明らかになった。その他のスカベンジャー受容体では、すべての種類の内皮細胞において、SR-B1 が C_T 値 28 前後と高い値を示した。

4. CL-P1の機能ドメインの検討(若宮)

CL-P1の細胞内領域における抗体を作成した。細胞内には、シグナル伝達領域が存在し、その機能の阻害や膜型CL-P1の定量をするために、N末領域の抗体が必要であると考えた。細胞内領域において、2つの部位を想定し、そのペプチドを人工合成し、アジュバントに混ぜて、ウサギに過免疫し、ポリクローナル抗体を2種作成した。得られた抗体は、CL-P1発現CHO細胞(CL-P1/CHO)を用いて、その特異性の検討を行った。蛍光抗体染色による検討で、膜蛍光抗体法では両抗体とも染色されず、パラホルムアルデヒド固定細胞においても、染色されなかった。次に、固定後にdetergent処理後の染色では、核をのぞく、細胞質と細胞膜の内側に、CL-P1分子の存在を認めた。また、western blot解析では、両抗体とも、CL-P1のサイズに一致したバンドのシグナルを認めた。これらの抗体を用いて、可溶化したCL-P1膜型分子の免疫沈降解析や細胞質内領域に結合する分子の探索を行い、今後さらなる機能解析を行う計画をしている。

5. ヒト血管内皮細胞のCL-P1の役割検討(若宮)

ヒト臍帯静脈細胞株(HUVEC)において、CL-P1の細胞レベルでの機能をあきらかにする目的で、CL-P1のsiRNAを行い、一分子抑制による、機能動態を観察した。NucleofectorIIを用いて、CL-P1のsiRNAを行い、CL-P1の発現抑制は、real time PCRにてmRNAの定量を行い、比較検討した。HUVECをCL-P1siRNAを行ってから、2日後35mmガラスボトムディッシュに培養し、zymosan Aを培地に添加し、4°C、30分間インキュベートし、洗浄後、さらに2時間37°Cにて培養した。4°C下、抗zymosan Aポリクローナル抗体およびAlexa488標識抗ウサギIgGでラベルした。細胞を固定後、浸透化し、細胞内に取り込まれたzymosan Aおよび細胞外に結合したzymosan Aを抗zymosan Aポリクローナル抗体およびAlexa594標識抗ウサギIgGでラベルした。Alexa594およびAlexa488で検出される粒子は細胞外に結合したものの、Alexa594のみで検出される粒子は細胞内に取り込まれたものであると

見なし、両者を判別して、ファゴサイトーシスされたzymosan Aを測定した。zymosan Aの取り込みについて、siRNA群では、明らかにコントロール群に比較して、優位に低いことが認められた。その他の因子についての関与は、通常、ファゴサイトーシスに関与する分子についての、siRNAではzymosan Aの低下は観察できなかった。さらに、実験1で明らかになった、CL-P1発現細胞である、HUAEC、HAECにおいても、同様の実験を行い、優位にzymosan Aの取り込みの低下することが認められた。一方、これらの細胞は、それぞれの一人の個体由来の細胞株であることより、個体差を検討する為に、10株の異なるHUVEC細胞株を入手し、同様の実験を行い、程度の差は多少あるがすべての細胞株で、優位にzymosan Aの取り込みが低下されることを確認した。次に、以前検討した、CL-P1結合蛋白adaptin μ 2chainについて、上記と同様に、siRNAを行い、その際におけるzymosan Aの取り込みについての影響を測定した。その結果、adaptin μ 2chainとそれに結合する因子として考えられているclathrin heavy chainの両者のときのみ、取り込み低下が認められた。一方、この処理では、細胞表面へのzymosan Aの結合には、変化がないことが確認できた。しかしながら、adaptin α 2chainのsiRNA時にはzymosan A取り込み低下は認められなかった。

6. CL-P1のヒトにおける組織発現解析(若宮)

ヒトCL-P1における抗体解析の検討により、通常の血管組織以外に組織内で少ないながら発現しているCL-P1遺伝子を探るために、血球細胞と扁桃臓器由来のmRNAを用いて、RACE用cDNAライブラリーを作成し、新規のCL-P1関連遺伝子の有無の検討を行った。10のPCRバンドを認められ、それらをすべて、direct sequenceを行い、遺伝子配列を決定した、3つの新規spliced variantsを認めた。B8、9は、CRD・Neck領域と一部collagen領域を含む同じCL-P1spliced variantであった。B5は、上記クローンより、若干短いcollagen領域を含むCL-P1spliced variantであった。また、B6は、第一エクソンに新規のエク

ソン（便宜上エキソン 2.5）をもつ、新規の CL-P1spliced variant であった。これらの組織における実際の新規 CL-P1spliced variant の発現と他の動物種において、同様のことが存在するのか、現在解析している。

7. 個体レベルでの CL-P1 発現意義の解析（若宮）
CL-P1 の個体レベルの研究のために、ゼブラフィッシュ CL-P1 (zCL-P1) 遺伝子のノックダウン解析を行った。昨年度は、モルフォリノオリゴヌクレオチドを用いた、zCL-P1 遺伝子のノックダウン解析で、形態形成の不全が認められた。遺伝子ノックダウン実験では、モルフォリノオリゴの量依存性に形質変化が見られることが明らかになった。本年度は、この遺伝子ノックダウン試験における形態変化が zCL-P1 遺伝子ノックダウン依存性に起こったか？その特異性をいくつかの方法により、検証を行った。はじめにモルフォリノオリゴ投与時に、投与量を変化させた zCL-P1 mRNA の同時添加を行い、形質変化が正常に回復することを確認した。その形質変化の回復は、投与量された zCL-P1 mRNA の量依存性が観察された。また、全体の形質変化の重症度における検討でも、投与量された zCL-P1 mRNA 量の多い群が、軽度の変化になることが明らかになった。また、この遺伝子ノックダウンしたゼブラフィッシュにおいて、血管増殖因子関連遺伝子の real time PCR を行い、遺伝子の増減を比較検討した。その結果、VEGF のみが、その形質変化の重症度に一致して、さらに、基幹形態形成でもっとも重要な受精後 24 時間期に、低下していることが認められた。さらに、この事実から、zCL-P1 遺伝子ノックダウン実験において、zVEGF mRNA の同時投与を行い、形質変化回復実験を行った。結果としては、一部形質は、重症から、軽症へと回復する傾向は見られたが、zCL-P1 mRNA 投与時に見られたように、劇的な回復は認められなかった。次に、CL-P1 遺伝子ノックダウン実験に、部分 CL-P1 mRNA を同時投与することによって、細胞内部へシグナル伝達が可能になるには、どの領域が必要な領域かをあらかじめしようと考えた。結果としては、コラーゲン、CRD どちらの欠損

領域遺伝子投与群も回復がみられ、その差異が見出せず、どちらがシグナル伝達に重要であるか決定できない結果がでている。

8. マウスにおける OxLDL の測定系の構築と質量分析による OxLDL の解析（板部）

マウス LDL は、apoE-KO マウスを麻酔下腹部大静脈より全採血し、その血漿から EDTA 存在下で超遠心分離を繰り返し分画した。得られた LDL 画分のタンパク濃度は、BCA 法を用いて測定した。脱塩用ゲルろ過カラムを通して EDTA を除去した LDL (0.2mg/ml) に対して硫酸銅 (5 μ M) を加え 37°C で 3 時間インキュベートし、マウス酸化 LDL を調製した。当研究室で開発した、サンドイッチ ELISA によるヒト酸化 LDL 高感度測定法 (Itabe, H. et al., J. Lipid Res. (1996) 37:45-53) を改変し、マウス酸化 LDL 測定法を確立した。マウス動脈硬化病変形成度の測定コレステロール添加食、あるいは通常食を与えて 18 週間飼育した apoE-KO マウスから、大動脈を心臓から始まる起枝部から腹部大動脈まで全体を摘出し、周囲の結合組織、脂肪組織を丁寧に剥離した後、大動脈全体の内面が見えるように血管を縦に切開した。この血管組織を Oil red O 染色液に浸して脂質蓄積部位を赤く染め分けた。実体顕微鏡下 CCD カメラで写真を取って記録し、赤く染まった領域の面積比をコンピューター上で計測した。さらに、本年度は、この条件を実際に活用し、apoE-KO マウスでの酸化 LDL の挙動を調べた。分画した LDL 中の酸化 LDL 量は、20 週齢の時点で血漿 LDL 酸化レベルは、10 週齢に比べて約 3 倍に上昇しており、この差は有意であった。さらに飼育期間を延ばして、28 週、40 週になると、血漿 LDL 酸化レベルは最初と同程度煮まで低下した。この飼育期間を通して、血漿リポタンパク質プロファイル、総コレステロール量、総 TG 量に大きな変動は見られていない。このことから、アポ E ノックアウトマウスにおいては、20 週齢の時点で一過的に血漿中の酸化 LDL 濃度が増加することが見出された。また、10~40 週まで飼育した同じマウスから摘出した大動脈を Oil red O で染色し、動脈硬化病変部分の面積比を求めた。

その結果、動脈硬化病変形成率の上昇は20週まで非常に緩やかで、28週を越えると顕著に病変部分が拡大していることが明らかになった。

9. SLE患者と慢性歯周病患者のMBL遺伝子解析とMBLに対する自己抗体検出(堤)

SLEもしくは慢性歯周病患者および健常人の末梢血よりゲノム遺伝子を調整し、MBLコドン54遺伝子多型(アレルA/B)をPCR-RFLP法により判定した。血中のMBL濃度はELISA法により測定した。また抗MBL自己抗体はMBLとIgGの糖鎖との結合を阻害するためEDTAを加えたELISA法にて測定した。抗MBL抗体価は日本人SLE患者132名中12名で健常人の平均+2SDより高値であり、健常人の113名中2名より有意に高頻度であった。さらにヨーロッパ人SLE患者についても検討したところ、比較的活動性の低い100名中15名で抗体価が上昇していた。抗体価高値と筋肉痛、神経症状既往との間に関連がある傾向が見られた。また、抗MBL抗体価と血中IgG、抗核抗体価、抗DNA抗体価との間に有意な正の相関が見られた。さらに別のヨーロッパ人SLEコホートで活動性の高い患者も含む149名で同様に測定したところ24名で抗体価が高値であった。うち現時点でSLEの活動性が評価可能であった50名においてSLE活動性指数SLEDAI(SLE disease activity index)と抗MBL抗体価との間に有意な正の相関を認めた($p=0.0314$, $r=0.303$, Spearman's rank correlation)。一方、血中MBL濃度とSLEDAIとの間には関連を認めず、全149名において血中MBL濃度と抗MBL抗体価の間にも有意な関連を認めなかった。

慢性歯周病患者98名のMBL遺伝子解析を行ったところ、AA58名、AB36名、BB4名であり、歯周病を有さない健常人は67名中AA45名、AB18名、BB4名であった。さらに、慢性歯周病の重症度との関連を検討したところ、軽症4名は全員AA、中等症43名はAA29名、AB14名、重症51名はAA25名、AB22名、BB4名であり、アレル頻度で比較すると健常人と重症患者との間、軽症/中等症患者と重症患者との間に有意な差がみられた。このコホートにおいては歯周病重症化に関し年齢、性、喫煙、

ブランクの比率は有意ではなかったのに対し、MBL遺伝子Bアレルを保持することはOdd ratio 3.01, 95% CI 1.23-7.35, p -value 0.015と有意なリスクファクターであった。

(倫理面での配慮)ヒトゲノム検査や組織採取は、旭川医科大学・筑波大学の倫理委員会の承認を得て、その規定に基づき、各位に書面によるインフォームドコンセントをとり、了解の得られた人のみに採血や組織採取を行い、実験材料として用いた。歯周病患者および対象健常人についても新潟大学で同様の手続きを経て採取されたものを使用した。ヨーロッパの共同研究施設より得たSLE患者血清も同様の手続きを経た後採取されたものである。また、動物実験においては、動物愛護の精神にのっとり、旭川医科大学実験動物取り扱い規定に従い、国立感染症研究所では、所内の規定にのっとり、行った。HIVを用いた病原性ウイルス検討のための動物モデルの検体はすべてP3レベルの病原体として扱い、個々の研究所、大学、病院のバイオハザード関連委員会において承認を得ている。組換えDNA実験に関しては、組換えDNA実験指針に従い、各機関の委員会の許可を得ている。

D. 考察

コレクチン分子については、約100年前から、その存在は明らかになっていたが、川崎らの発表が生化学的な最初の同定であった。その後、肺に存在するサーファクタントからの2種のアポリポプロテインの存在が明らかになり、古典的には3つのコレクチンファミリー(MBL, SP-A, SP-D)が報告されてきた。主任研究者である若宮はreverse geneticの手法を用いて新たに3つのコレクチン遺伝子群(CL-L1=COLEC10, CL-P1=COLEC12, CL-K1=COLEC11)を同定した。その中でCL-P1は、組織における免疫染色で、血管内皮細胞に存在する膜型のコレクチンであった。本研究では、特にMBLとCL-P1の2つのコレクチンに焦点をあてて、その血管における生体防御への応用を目指している。特に、MBLにおいては、前年度までの3カ年

において、*in vitro* で抗 HIV 効果を広範に検討してきた。MBL 研究は、レクチンプロジェクト班のメインテーマと捉えており、若宮、本多、岸（大学、国立研究所、会社）による産官学 3 者と共同研究者である北大鈴木教授とで取り組んでいる。最終年度は、ヒトリンパ組織の移植が成立したマウス（SCIDhu マウス）に、HIV を接種し、腹腔内に 45 mg/kg の濃度でのリコンビナント MBL の投与で、HIV-1 感染防御能を再確認できた。効果としては、抗 HIV-V3 モノクローナル抗体の高単位投与に比べると、完全な Protection はおこらなかったが、*in vitro* と同様、明らかに 2-12 株は増殖抑制活性を示した。マウス血中濃度について、腹腔接種した中和抗体が持続して血中に存在しているのに対し、リコンビナント MBL は血中への移行率が悪く、さらに半減期が短く、早期に血中から消失していること示唆された。リコンビナントヒト MBL の投与方法の検討や感染予防実験について再検討する可能性が考えられた。つまり、細胞レベルでの研究の正当性がすでに完全に確認された段階なので、よりヒトに近いサルモデルへの実験が

リコンビナント MBL 発現系においては、従来はリコンビナント蛋白質の高い産生量と安定性が、もっとも重要なポイントであると通常は考えられてきたが、本実験系では、遺伝子発現細胞株ごとにおいて生物学的活性が異なっていることが明らかになり、リコンビナント MBL 作成方法について、非常に重要な基盤的な知見を得られたことは意味があったと考えている。

CL-P1 の検討では、まず細胞レベルでは、ヒト血管内皮細胞株では、SiRNA 実験によりエンドサイトーシスやファゴサイトーシス機能において、おもに CL-P1 が関与することが明らかになった。以前同定された CL-P1 細胞内領域に結合する分子である adaptor 複合体の $\mu 2$ サブユニットと CL-P1 の関わりも明らかになり、これらの分子の自然免疫における重要性が明らかにされたと考える。

CL-P1 発現の広範な免疫組織染色の検討から、血管部位以外にも CL-P1 が認められたことは、われわれにとって大きな驚きであった。いまだ、蛋白

レベルでの正確な同定は出来ていないが、遺伝子解析により、いくつかの spliced variants の存在が明らかに出来た。さらに、今後その詳細については、*in situ hybridization* や今年度作成した新規抗体などを用いて検討するつもりである。

下等な脊椎動物である魚類においても、ヒトやマウスと同様に血管に CL-P1 発現があることと、ゼブラフィッシュ CL-P1 遺伝子ノックダウン予備実験による形態形成不全という形質変化がおこることを報告してきた。今年度は、さらに、本現象が、CL-P1 遺伝子特異的におこることを、代償実験から明らかにした。さらに、その際血管増殖因子関連経路が一部、関与することが認められた。スカベンジャー受容体が初期形態形成に関わる報告はなく、従来、スカベンジャー受容体はマウスのノックアウト実験から、自然免疫の面に焦点が当てられており、類似の機能を持つと予想されてきた本遺伝子であるが、この初期形態形成の関与や高度に動物間で遺伝子が保存されている事実などから、その新たな生理的な重要な役割が期待された。MBL の遺伝子多型と SLE との関連はメタアナリシスでも示されており、MBL を欠損するタイプのアリールを保持することは SLE 発症のリスクファクターであると考えられている。MBL はアポトーシス細胞に結合することが示されており、アポトーシス細胞の排除、ひいては自己抗原の排除促進を通じて自己免疫疾患発症の抑制に寄与していると推測されている。抗 MBL 自己抗体が存在した場合、MBL と血中で結合して血中の MBL 濃度を低下させたり、すでに組織に沈着している MBL にさらに結合して組織障害を助長する可能性が考えられる。MBL と類似した構造を持つ補体 C1q に対する自己抗体が存在し、SLE 患者で高頻度にみられることが報告されている。本研究で、実際日本人、ヨーロッパ人ともに SLE 患者で抗 MBL 抗体は健常人より有意に高頻度にみられた。ヨーロッパ人患者において抗 MBL 抗体価は SLEDAI や抗 DNA 抗体価と有意に関連しており、抗 MBL 抗体価はある程度 SLE の病勢を反映していると考えられた。抗体陽性者の臨床的特徴は現時点では十分に明らかではなく

今後の課題である

慢性歯周病は世界で罹患者が最も多い感染症の一つであり、その進行は高齢者の生活の質に大きな影響を与える。喫煙や糖尿病などが悪化のリスクファクターになることが知られている。慢性歯周病は *Porphyromonas gingivalis* などの細菌感染が発症と進展に関与しており、局所での感染防御に MBL が役立っている可能性が考えられる。今回のコホートにおける解析では MBL 欠損型遺伝子の保有は慢性歯周病の重症化に関して年齢、性別や喫煙の有無とは独擅した危険因子となっており、今後この結果が確認できれば、歯周病発症早期に重症化するリスクの高い患者群を明らかにして、適切な患者教育などにより予後を改善させることが期待できると考えている。

E. 結論

前回3カ年でのHS総合事業では、遺伝子クローニングとその細胞レベルでの解析が進み、その後の研究のための材料作りに集中したが、本3カ年の取組では、より個体レベルでの機能解析に焦点をおいている。第3年度の成果の総括としては、MBL では、岸・駒野研究員と共同で、国立感染症研究所 P3 実験室において、SCIDhu マウスでの HIV 感染抑制実験で、MBL の抑制効果の一端が明らかになった。同時に、実験に使用する MBL の大量作成システムの遂行とマウスで投与された MBL モニターリングも成功し、大動物やヒトへの着実なステップが得られた。また、CL-P1 の動物レベルの実験では、マウスのノックアウト実験では、やっとES細胞への打ち込みが成功した。さらに、ゼブラフィッシュの遺伝子ノックダウン実験で、受精後初期の分化発生や形態形成に CL-P1 が深く関わっていることが再確認された。CL-P1 のみによってげっし類以下の下等動物での初めてのスカベンジャー受容体の発見とその分子が発生早期の血管形成に重要な役割をもつことが初めて明らかになった。最後に、CL-P1、MBL 研究ともに、リコンビナント蛋白発現系や抗体作成による測定系やすべての実

験系は自前で作成しているのが、研究成果がでるのに時間はかかっているが、動物モデルやヒトでの個体レベルでのコレクチンの機能が明らかになり、医薬品への道を開いた、最終年度に大きな進展があったと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Koide T, Nishikawa Y, Asada S, Yamazaki CM, Takahara Y, Homma DL, Otaka A, Ohtani K, Wakamiya N, Nagata K, Kitagawa K.: Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. J. Biol. Chem. 281(16): 11177-85, 2006.
- Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, Ohtani K, Katoh T, Jang S-J, Motomura W, Yoshizaki T, Fukuda M, Koyama S, Fukuzawa J, Fukuoh A, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N.: Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. Microbiol. Immunol. 50(12):1001-1013, 2006.
- Kawai T, Kase T, Suzuki Y, Eda S, Sakamoto T, Ohtani K, Wakamiya N. Anti-influenza A virus activities of mannan-binding lectins and bovine conglutinin. J Vet Med Sci.69(2):221-4. 2007.
- Suzuki, Y., Ohtani, K., Wakamiya, N.: Collagen-related lectins in innate immunity. The novel collectins, CL-L1, CL-P1, CL-K1. in press.
- Kawamoto R, Yamashita A, Nishihira K, Furukoji E, Hatakeyama K, Ishikawa T, Imamura T, Itabe H, Eto T, Asada Y.: Different inflammatory response and oxidative stress in neointimal hyperplasia after balloon angioplasty and stent implantation in cholesterol-fed rabbits. Pathol Res Pract. 202:447-56.2006.
- Sergiy Sukhanov, Yusuke Higashi, Shaw-Yung Shai, Hiroyuki Itabe, Koichi Ono, Sampath Parthasarathy, and Patrick Delafontaine: Novel

- Effect of Oxidized Low-Density Lipoprotein. Cellular ATP Depletion via Downregulation of Glyceraldehyde-3- Phosphate Dehydrogenase. *Circulation Research*, 99: 191-200.2006.
- Matsumoto H, Ishikawa K, Itabe H, Maruyama Y.: Carbon monoxide and bilirubin from heme oxygenase-1 suppresses reactive oxygen species generation and plasminogen activator inhibitor -1 induction. *Mol Cell Biochem*. 291 :21-28.2006.
 - Fujimoto Y, Onoduka J, Homma KJ, Yamaguchi S, Mori M, Higashi Y, Makita M, Kinoshita T, Noda J, Itabe H, Takano T.: Long -chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of acyl-CoA synthetase. *Biol Pharm Bull*. 29: 2174-2180.2006.
 - Itabe, H. and Ueda, M.: Measurement of plasma oxidized low-density lipoprotein and its clinical implications. *J. Atheroscler. Thromb.* 14: 1-11.2007.
 - Futahashi Y, Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Sci*. 98(3): 373-9, 2007.
 - Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex. *AIDS*. 21(5):575-82, 2007.
 - Miyauchi K, Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother*. 17(4): 167-174, 2006.
 - Miyauchi K, Curran R, Matthews E, Komano J, Hoshino T, Engelman DM, Matsuda Z. Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions. *Jpn J Infect Dis*. 59(2): 77-84, 2006.
 - Wakamatsu E, Matsumoto I, Yasukochi T, Naito Y, Goto D, Mamura M, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Overexpression of phosphorylated STAT-1alpha in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 54(11):3476-84.2006.
 - 大谷克城、鈴木定彦、若宮伸隆：コレクチンとその免疫応答における役割 *臨床免疫* 43(3):266-274, 2006
 - 吉田逸朗、張成宰、若宮伸隆：薬剤耐性菌と院内感染対策 *北海道医報 道医シリーズ第45編 感染症* 71-74, 2007
 - 2. 学会発表
 - 福澤純、小山聡、長谷部直幸、菊池健次郎、大谷克城、若宮伸隆：バイオインフォマテイクスを応用した新規スカベンジャー受容体の発見、第38回日本動脈硬化学会総会（東京）2006.7.13-14
 - 大谷克城、芥子宏行、坂本隆志、吉崎隆之、本村 亘、張 成宰、福田光子、野村直樹、佐藤秀憲、福澤 純、小笠原正洋、吉田逸朗、若宮伸隆：コレクチン CL-K1 の機能についての解析、第26回日本糖質学会年会（仙台）2006.8.23-25
 - 堀端重男、大谷克城、坂本隆志、岸雄一郎、木佐木博、鈴木定彦、駒野淳、山本直樹、若宮伸隆、本多三男. ヒト PBMC 移植 NOD/SCID マウスを用いた in vivo におけるマンノースバインディングレクチンの抗 HIV 活性の評価. 第36回日本免疫学会学術集会. Dec 13-15, 2006. 大阪
 - Jang S-J, Ohtani K, Fukuzawa J, Motomura W, Koyama S, Wakamiya N.: CL-P1 controls the

- yeast phagocytosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. (kyoto) 2006.6.18-23
- Jang, S.J., Ohtani, K., Fukuzawa, J., Motomura, W., Koyama, S., Yoshida I., Wakamiya, N.: Scavenger receptor CL-P1 is mainly involved in yeast phagocytosis in human umbilical vein endothelial cells. The 18th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. Seoul (Korea), 2006.10.12-13
 - Itabe H., Masuda Y, Arai H, Mori M, Fujimoto Y, and Takano T.: Adipose differentiation-related protein (ADRP) is a key component of lipid storage and mobilization in macrophage foam cells. The 20th IUBMB and 11th FAOBMB, Kyoto, Japan
 - Kato R, Mori C, Kitazato K, Takahashi K, Arata S, Obama T, and Itabe H.: Quantification of mouse oxidized low-density lipoprotein by sandwich ELISA. Showa International Symposium for Life Science, 2006, 東京
 - Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb). May 23-27, 2006. CSH Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY
 - Komano J. Characterization of neutralizing antibodies found in long-term non-progressors of Japanese hemophiliacs. 3rd Taiwan-Japan Symposium on HIV/AIDS. Sep 7-9, 2006. Center for Disease Control Department of Health, Taiwan, R.O.C.
 - Komano J., Futahashi Y, Isogai M, Hamatake M, Matsuda Z, Shiino T, Takebe Y, Sato H, Yamamoto N. Drug Resistance Mutations in the Polymerase Catalytic Domain Negatively Affect the RNase H Activity of HIV-1 Reverse Transcriptase. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. 2006 Nov 12-15. Chantilly VA, USA
 - Komano J. Myristoylation independent assembly, transport, and VLP formation of HIV-1 Gag. 第20回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京
 - 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 武部豊, 山本直樹. HIV-1の逆転写酵素に内在するRNase H活性阻害薬の開発(1) —小分子化合物ライブラリーからのスクリーニング. 第20回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京
 - Akito Tsutsumi, Nades Palaniyar, Mizuko Mamura, Daisuke Goto, Isao Matsumoto, Satoshi Ito, Takayuki Sumida : Detection of IgG binding to surfactant protein D by single molecular fluorescence spectroscopy. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2006.12.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

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