

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	バイオフィトニ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	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 謙 …… 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	網 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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨：肝臓由来コレクチン MBL は、細胞や SCIDhu マウスを用いた感染実験で HIV 感染阻止活性を示した。膜型コレクチン CL-P1 は、ヒトやマウスや魚類の血管に存在し、発生初期では形態形成に、成体では微生物排除に主に関与することが明らかになった。

### 分担研究者

- (1)国立感染症研究所エイズ研究センター 本多三男 (平成16年～17年度) 駒野淳 (平成18年度)
- (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重要な臓器であり、人口の急速な高齢化とともに、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いる。その原因の一つとして血管内皮への微生物感染や微生物の結合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。血管内皮型コレクチン分子CL-P1は、微生物や変性LDLなどに結合すること、また血管虚血・再灌流の際における血管損傷におけるコレクチン補体活性化やコレクチンの血管における微生物感染の機能など、生体でのこれらコレクチンの意義を明らかにすることは非常に重要な課題であると捉えている。本研究により、血管炎や微生物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、さらに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. 研究方法と結果

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、その断片が3つの新規コレクチン遺伝子群のクローニングに成功した(JBC1999, 2001, Microbiology & Immunology2006)。さらにそれらのホモロジーから、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ遺伝子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。本申請研究では、第一に MBL コレクチンについて、その医療応用のための MBL による HIV の動物感染抑制実験を、若宮・岸・本多(駒野)らの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、ラットやゼブラフィッシュを用いた実験とその基礎である細胞レベルでの検討を行った。以下に、方法とその成果をまとめる。

#### 1. MBL 高発現株からの MBL 産生系開発(岸・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、新規 MBL 発現細胞株が樹立された。従来までの、MBL 高発現株も引き続き、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、実験に供した。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。ウエ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。さらに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。一次スクリーニングの段階で MBL 高発現細胞株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。元株をプログラミングフリーズにて保存し、Master cell bank(MCB)とした。

## 2. リコンビナント MBL 投与による HIV 感染阻止実験と MBL monitoring システム構築 (岸・本多(駒野)・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。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 SCIDhu マウスを作成し、このマウスに 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 と現時点での有力株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、都合 3 回行った。つまり上記 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 TCID<sub>50</sub> 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ような、完全な感染阻止は認めなかったが、*in vitro* 同様に明らかな HIV-増殖抑制活性を示した。上記 SCIDhu マウスにおいて MBL のマウス血中でのモニターリングを行った。マウス血中では投与一日後に 5~10 % になることが明らかになり、その 2 日後にさらに 0.5~1%前後に減衰し 10 日後には全群において MBL が完全に消退することを認めた。

## 3. HIV における *in vitro* MBL 感染阻止実験 (本多(駒野)・岸・若宮・鈴木)

末梢血単球 (PBMC) を用いたウイルス抑制効果の測定を行った。サブタイプ、トロピズム、PI/TCLA を越えて、MBL が HIV の感染抑制をおこすことが明らかになった。さらに薬剤耐性株においては MBL で効率に抑制されるウイルスや高濃度で抑制されるウイルスなどさまざまだったが、薬剤耐性株においても MBL で有為に中和されることが確認され、これら MBL の有用性や優位性が明らかとなった。

## 4. CL-P1 の細胞レベルの発現調節の検討 (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 (HUVEC) が明らかになっているが、ヒト臍帯動脈血管内皮細胞 (HUAEC) やヒト大動脈血管内皮細胞 (=HAEC) などにおいて CL-P1 発現を、mRNA レベルで測定した。相対定量は、7500 Real-Time PCR System を用いた方法で行った。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。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。

## 5. CL-P1 の機能ドメインの検討 (若宮)

CL-P1 発現 CHO 細胞 (CL-P1/CHO) を用いた、CL-P1 分子の機能ドメインの役割を明らかにするために、CL-P1 の機能ドメイン欠損発現 CHO 細胞株を新たに樹立した。新たな細胞株は、レクチン部分欠損株とコラーゲン領域欠損株で各種リガンドに対する、ドメインの結合機能解析を行い、糖特異性では、GalNAc, Gal, Lex, Glu, Man6P, NeuAc の結合を検討し、GalNAc, Gal, Lex, Glu に特異的な結合が認められた。また、OxLDL の結合にお

いては AcLDL の結合に比べて、CL-P1/CHO では、優位に結合することが認められた。しかし、AcLDL についても弱い結合が認められ、OxLDL の CL-P1 に対する強い結合特異性には劣るが、AcLDL に対しても、弱い結合活性があることが確認できた。

#### 6. ヒト血管内皮細胞における CL-P1 のエンドサイトーシスと貪食における役割検討 (若宮)

HUVEC において NucleofectorII で CL-P1 の siRNA を行い、zymosan A ファゴサイトーシス低下率を測定した。zymosan A の取り込み低下は、siRNA 群でコントロール群に比較して、優位に低下することが認められた。さらに他の血管内皮細胞株である HUAEC、HAEC において zymosan A 取り込み低下することが明らかになった。次に、エンドサイトーシスにおいて CL-P1 依存性の経路があることを明らかにし、CL-P1 結合分子であるアダプチン $\mu$ 2 鎖がそれらに関わることを見出した。

#### 7. CL-P1 のヒトにおける組織発現解析 (若宮)

ヒト組織を、マウスモノクローナル・ウサギポリクローナル抗体を用いて組織免疫染色法を行い、ヒト組織における種々の血管部位に、普遍的に CL-P1 の発現が観察できた。しかも発現はすべての血管に均一に発現するのではなく、組織種類や血管径で差のあることが明らかになった。

#### 8. 個体レベルでの CL-P1 発現意義の解析 (若宮)

ゼブラフィッシュ CL-P1 (zCL-P1) 遺伝子のノックダウン解析で、形態形成の不全に関与することが認められた。形態形成不全は、血管形成不全によることが血管染色や血管造影によって明らかになった。遺伝子ノックダウン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、zVEGFmRNA のみが、その形質変化の重症度に一致して優位に低下していることが認められた。zCL-P1 遺伝子ノックダウン実験で zVEGFmRNA の同時投与を行った結果、重症から軽症へと回復傾向は見られたが、劇的な回復は認め

られなかった。

#### 9. 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)

マウス動脈硬化病変形のために、高コレステロール添加食を与えて 18~40 週間飼育した apoE-KO 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した。同じマウスから摘出した大動脈を Oil red O で染色した結果、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。

#### 10. SLE 患者と慢性歯周病患者の MBL 遺伝子解析 (堤・若宮)

SLE で、MBL コドン 54 遺伝子多型 (アリル A/B) を PCR-RFLP 法で、血中抗 MBL 自己抗体は ELISA 法にて測定した。抗 MBL 抗体価は日本人 SLE 患者で高値であり、ヨーロッパ人 SLE 患者で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 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。

慢性歯周病患者 98 名の MBL 遺伝子解析を行い、慢性歯周病の重症度との関連を検討したところアリ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。コホート解析から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 アリルを保持することは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、行われた。歯周病患者および対象健常人についても新潟大学や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。また、動物実験においては、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、所内の規定によつ

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、それぞれバイオハザード関連委員会において承認を得た。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行った。

#### D. 考察

MBL 研究では、ヒトリンパ組織の移植が成立した SCIDhu マウスモデルで HIV-1 感染防御能を見出した。抗 HIV モノクローナル抗体投与との比較で効果が弱い原因は、血中濃度の monitoring から血中動態に原因があると考えられた。MBL 細胞レベル検討では上記抗体では不可能な幅広い種の HIV への中和効果が示されることや多剤耐性ウイルス株でも感染が抑制される実験結果が得られ、その有用性と優位性が明らかにされた。

CL-P1 細胞レベル検討ではヒト血管内皮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重要な役割をすることが明らかになった。下等な脊椎動物である魚類において魚類の血管に存在する CL-P1 を証明し、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なった。また、スカベンジャー受容体が初期形態形成や血管形成に関わる報告はなく、驚くべき結果が得られた。

日本や外国で SLE での MBL の自己抗体の存在が明らかになった。慢性歯周病において MBL の遺伝子多型検査で重症化する高リスク患者群を明らかにでき、予後改善に応用できると考えられた。

#### E. 結論

MBL では、岸・駒野（本多）研究員と共同で、国立感染症研究所 P3 実験室で 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

量作成システム系樹立とマウスで投与された MBL モニターリングも成功し、大動物やヒト試験への着実な知見が得られた。CL-P1 では、ラットで、虚血・再灌流刺激により CL-P1 の遅延型亢進の起こること、ゼブラフィッシュの遺伝子ノックダウン実験では、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見出された。CL-P1 は、細胞レベルでは血管内皮細胞で主に存在し、微生物のエンドサイトーシスや貪食に主に関わるということが明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Takahashi, R. Tsutsumi, A. Ohtani, K. Mukai, Y. Goto, D. Matsumoto, I. Wakamiya, N Sumida, T.: Association of mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 64: 311-314, 2005.
- Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Wakamiya N, Sumida T.:Lack of relationship between mannose-binding lectin variant alleles and risk of arterial thrombosis in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Mod. Rheumatol.* 15: 459-460, 2005.
- Koide T, Nishikawa Y, Asada S, Yamazaki CM, Takahara Y, Homma DI, 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.
  - 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.
  - 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.
  - 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 proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. *J. Lipid Res.* 48 (2006) 87-98
  - 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, Chi ba 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.
  - Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin KQ, Yamamoto H, Okuda K, Yamamoto N, and Honda M. Induction of positive cellular and humoral immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus *gag/pol.* *J. Immunol.* 179: 1784-1795, 2006.
2. 学会発表
- 若宮伸隆:コレクチンに関する臨床応用開発研究と基礎機能解析:第3回糖鎖コンソーシアム 2005.12.東京
  - 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
- 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  
特記なし



---

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