

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

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

所属 国立成育医療センター 母児感染研究部
研究者 綱脇 祥子
研究機関 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 川崎病急性期に血中濃度が上昇する neopterin および TNF- α がヒト冠動脈内皮細胞の自発的な活性酸素生成能を増強した。神経ペプチド (PACAP) が、脳海馬領域の酸化ストレスを抑制し、エダラボンが頭部外傷を軽減させた。核タンパクの餌負荷が、リウマチ様関節炎に対して改善効果を持つことが明らかになった。

分担研究者

- (1) 日生バイオ株式会社 松永政司
- (2) 昭和大学医学部 塩田清二

A. 研究目的

近年、様々な疾患に活性酸素等のフリーラジカルが関与することが指摘されている。食細胞の O_2 生成酵素 (phagocyte NADPH oxidase) は、生体組織で最大の酸素ラジカル発生源であり、一酸化窒素と共同して殺菌を行う。しかし、活性酸素は諸刃の剣であり、過剰あるいは不適切な生成は細胞障害を引き起こす。最近、食細胞活性酸素生成系のホモログ遺伝子が様々な組織に発見され、Nox family NADPH oxidases と命名されている。これら Nox family NADPH oxidases は血管内皮細胞にも発現しており、今後、nitric oxide synthase を含めてフリーラジカルに起因する病態の解明と抗フリーラジカル療法の確立は益々重要になるであろう。本研究では、川崎病、神経疾患、関節リウマチの発症に於けるフリーラジカル関与を明らかにすることを第一義の目的とし、抗フリーラジカル剤エダラボンの効果、核タンパク食の有用性を検討する。

B. 研究方法

1. 川崎病に於ける血管内皮細胞とフリーラジカル

1) ヒト冠動脈血管内皮細胞の H_2O_2 生成活性

正常ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) は Cambrex 社より購入し、添加因子を含む増殖培地中で継代した。6 割以上の培養密度に達した細胞に TNF- α および neopterin を添加した。 H_2O_2 の定量はスコポレチン法を用い、Mithras LB940 プレートリーダーで測定した。

2) Nox family NADPH oxidases の mRNA 発現

HCAEC から total RNA を抽出し、各種 Nox (Nox1, Nox2, Nox4)、活性調節因子 (p22, p67, p47, p41, p51)、

Rac1, Rac2 に対する特異的プライマーセットを用いた RT-PCR を行い mRNA の発現量を調べた。Nox4 に関しては、更に、5 種類の splicing variants (A~E) を区別できるプライマーセットを用いた。配列解析は、ダイターミネータ法による direct sequencing で行った。

3) Nox family NADPH oxidases の蛋白質発現

HCAEC を回収した後、核画分および非核画分を調整し、各構成因子に於ける抗体を用いてイムノプロット法で検出した。Nox2 型 NADPH oxidase 構成因子 (Nox2, p22, p67, p47) の発現解析は、コントロールとして好中球の膜およびサイトゾル画分を用いた。Nox4 の検出は、全ての splicing variant に共通である "loop region" 配列に対する抗体を作成して行った。

4) Nox2 および Nox4 に於ける糖鎖修飾の解析

食細胞の Nox2 は N-glycosylation を受けているが、他の細胞で発現した場合、糖鎖を持たない可能性が示唆されている。そこで、HCAEC に発現している Nox2 および Nox4 の糖鎖修飾の有無について調べるため、peptide:N-glycosidase F (PNGase F) で処理した後、イムノプロット法にて解析した。

2. 神経疾患とフリーラジカル

1) 動物実験モデルおよびペプチド

マウス一過性中大脳動脈閉塞モデルは、全身麻酔下、中大脳動脈の血流を遮断し 1 時間後再び再灌流を施した。ラット頭部損傷モデルは、液体窒素で冷却した直径 4 mm の金属棒を大脳皮質表面に 1 分間接置して作成した。PACAP-KO マウスは馬場明道先生 (大阪大学) より提供された。PACAP38 は Peptide 研より購入し、エダラボンは三菱ウェルファーマより供与を受けた。

2) 酸化ストレスの測定

フリーラジカルによる血中酸化ストレスは、ROM (reactive oxygen metabolite) として測定した。ROM は

脂質過酸化物質であるヒドロキシペルオキシド (R-OOH) より生じるアルコキシラジカル (R-O[•]) およびペルオキシラジカル (R-OO[•]) を測定した。更に、electron spin resonance (ESR) 法により直接アルコキシルラジカル (RO[•]) を検出した。

3) 組織学的解析

フリーラジカルによる脳組織の DNA 酸化は、抗 8-OH-dG 抗体による免疫染色で検出した。脳内の O₂ 検出はヒドロキシエチジウム (HEt) の投与により行った。細胞局在性は neurofilament 200 (神経細胞)、細胞内局在性は、cathepsin-D (リソソーム)、COX2 (ミトコンドリア) に対する抗体と、DAPI (核) を用いて解析した。ミトコンドリアからの cytochrome c の放出はイムノプロット法で、アポトーシス様細胞死は TUNEL 法を用いて確認した。抗酸化物質の発現量は、Zn/Cu-SOD、Mn-SOD、HO-1、-2 に対する抗体で解析した。更に、電子顕微鏡で観察した。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

1) 動物、餌負荷スケジュール

関節リウマチを自然発症する HILV-I Tg マウスは、岩倉洋一郎教授 (東京大学医科学研究所) から供与された。6 週齢時に 3 群に分けた後、無核タンパク餌 (NF)、核タンパク (NP) を 0.6% もしくは 1.2% 含有した餌を 18 週齢まで自由摂取させ、1 週間おきに体重、関節厚を計測した。餌負荷終了時に関節を摘出すると共に、血清を分離して rheumatoid factor (RF) と ROM の測定に用いた。

2) 関節厚の計測および組織学的解析

関節厚は、前肢と後肢を、餌負荷期間中 1 週間おきに 8 回計測し、体重増加に伴う関節の成長を考慮して関節計測値を体重で除した。結果は、計測開始時を 100% として 0~3 の 4 段階にスコア化 (大きくなる程肥大) した。関節の組織学的変化は、組織染色後グレード 0~4 の 5 段階に分けた。関節の炎症が悪化するほどグレードが高くなる。関節への IgG 沈着は抗 IgG 抗体による免疫染色、血清中の RF 値は ELISA 法で測定した。

3) 血中および関節組織に於ける酸化ストレスの評価

血中の酸化ストレスは ROM として求めた。関節に於ける酸化ストレスは、NO ラジカルによって組織蛋白質中のチロシンがニトロ化された 3-nitrotyrosine (3-NT) を、抗 3-NT 抗体を用いて検出した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、当該研究機関の遺伝子組み換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認の下に行った。

C. 研究結果

1. 川崎病に於ける血管内皮細胞とフリーラジカル

1) ヒト冠動脈血管内皮細胞の H₂O₂ 生成活性

初めに、ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) の H₂O₂ 生成活性を調べた。食細胞は異物を認知して初めて活性酸素を生成するが、興味深いことに、HCAEC は自発的に H₂O₂ を生成することが分かった。最大活性を示す 4 日目の H₂O₂ 生成活性は、PMA で刺激したマクロファージより 6 倍高い値であった。

2) Neopterin および TNF-α の影響

Neopterin は、各種冠動脈疾患の診断に於ける臨床マーカーになっている。更に、TNF-α は冠動脈瘤の発症に於いて決定的な役割を担うことが報告されている。川崎病急性期の患児では、これら neopterin および TNF-α の血中濃度が上昇していることが報告されている。Neopterin は、活性化マクロファージ・単球が産生するが、その生理活性および冠動脈疾患に於ける発症病理への関与は不明である。そこで、HCAEC (day 2) を neopterin 共存下で培養したところ、4 時間で濃度的に H₂O₂ 生成活性が亢進した。更に、TNF-α も 6 時間で HCAEC の自発的 H₂O₂ 生成活性を亢進した。

3) 各種 Nox 構成因子の発現および TNF-α の影響

HCAEC の H₂O₂ 生成能を裏付ける Nox family NADPH oxidases について解析した。mRNA の発現について解析したところ、酸化還元中心である各種 Nox 中、Nox4 が最も多く発現していた。次いで Nox2 が認められ、Nox1 も僅かに発現していた。Nox1 と Nox4 はそれぞれ大腸粘膜上皮細胞および腎皮質に高発現する Nox として発見され、前者の活性調節因子として p51 (食細胞 p67 のホモログ) および p41 (食細胞 p47 のホモログ) の関与が報告されている。HCAEC は、mRNA としてこれら活性調節因子中、p47、p67、p51、更に、Rac1 および Rac2 を発現していた。TNF-α 存在下で培養したところ、Nox2 および p67 の発現量は上昇したが、他の構成因子に関しては影響がなかった。Nox4 は、データベース上 5 種類の splicing variants (A~E) が登録されているが、HCAEC では isoform A と isoform B のみが発現していた。

次に、蛋白質の発現を解析した。Nox2 蛋白質は HCAEC の非核画分にのみ約 80 kDa のバンドとして確認され、核画分には検出されなかった。食細胞の Nox2 (~85 kDa) は、糖鎖切断後のコア蛋白質 (~65 kDa) が同じ抗体で認識されるが、HCAEC の Nox2 (~80 kDa) は PNGase F 処理しても分子量は変化せず、糖鎖修飾を受けていないことが分かった。この糖鎖の欠損およびコア蛋白質の分子量の違いは、HCAEC に於ける Nox2 の細胞内局在性および機能が食細胞と異なる可能性を示している。p67、p47 についても蛋白質の発現が認められ、

TNF- α 処理後、p67の発現増強が非核画分に観察された。p67はNox2、p22、p47、Rac2と複合体を形成することにより高い活性酸素生成能を発揮することから、血管内皮細胞障害に対する影響は大きいと予想される。

4) Nox4の解析

RT-PCRの結果より、HCAECではNox4が最も多く発現しており、isoform Aとisoform Bの存在も明らかになった。この結果から、HCAECに於けるH₂O₂生成を担う責任分子としてNox4の可能性は高いと考えられる。そこで、Nox4蛋白質の発現を検証するため、全てのsplicing variantsを認識できる"loop region"に対する抗体を作成し、核画分および非核画分のイムノプロットを行った。その結果、非核画分および核画分に異なる分子量(約75 kDaおよび68 kDa)のバンドが認められた。この結果は、mRNAで確認したisoform Aとisoform Bがそれぞれ非核画分および核画分に選択的に局在していることを示している。

2. 神経疾患とフリーラジカル

1) 神経細胞ミトコンドリアに於ける8-OH-dGの発現

脳虚血・再灌流後、8-OH-dG陽性反応が神経細胞のミトコンドリアDNAに生じることが明らかになった。ミトコンドリアに対する酸化ストレスは、ミトコンドリアから細胞質へcytochrome cの放出を誘導し、アポトーシスの引き金になると考えられている。そこで、cytochrome cの細胞質への放出を解析したところ、脳虚血前は殆ど観察されないが、脳虚血6時間後に細胞質への増加が認められ、24時間後では顕著になった。TUNEL染色を試みたところ、脳虚血6時間後に僅かな陽性反応が認められ、24時間後では明らかに増加し、アポトーシスが引き金となって神経細胞死を引き起こすことが明らかになった。

2) PACAPによる酸化ストレスの抑制

PACAPが脳虚血後の神経細胞死を抑制することを報告してきた。今回、野生型マウスにPACAP38を単回投与すると、血清中の酸化ストレス(ROM)が有意に低下することが分かった。そこで、PACAP-KOマウス血清中のROMを測定したところ、老齢PACAP-KOマウスでは野生型に比べて有意にROMが高かった。次に、血清で認められたPACAPの抗酸化ストレス活性が脳組織でも認められるか、海馬のCA1領域に着目してO₂の発生をHEtを用いて観察したところ、野生型マウスに比べ有意に増加していることが分かった。そこで、脳内の抗酸化物質の発現量を比較したところ、Mn SOD、HO-1、HO-2の発現量がPACAP-KOマウスで有意に低下していた。次に、O₂の細胞内発生部位を解析したところ、リソソームおよびミトコンドリアと重なった。電

子顕微鏡による形態観察により、PACAP-KOマウスでは、一部ミトコンドリアが凝集・変形しており、そこにリソソームが融合した自己食像観察された。

3) エダラボン投与による頭部外傷改善効果

ラット頭部外傷モデルを作成し、強い抗酸化能を持つエダラボン投与後の障害領域とフリーラジカルの関連を解析した。頭部外傷48時間後の損傷領域を比較した結果、エダラボン投与群(5.0 \pm 2.1 mm²)では対照群(7.8 \pm 3.6 mm²)に比べて有意に損傷領域が減少していた。次に頭部外傷後の血液中のアルコキシルラジカルをESR法により直接定量した。頭部外傷6時間後、アルコキシルラジカル濃度は上昇を始め、対照群では24時間後にかけて更に増加した。エダラボン投与群では投与24時間後に於けるアルコキシルラジカル濃度の上昇が対照群よりも有意に低下した(223.8 \pm 17.9 v.s. 78.9 \pm 58.6)。血清中のROMを同様に測定した結果、頭部外傷6、12時間後において、エダラボン投与群では対照群と比べて有意に減少していた。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

1) 体重の経時的変化

HILV-I Tgマウスの体重は、餌負荷開始時(6週齢)に於いてNF群、NP-0.6%群、NP-1.2%群の3群間でほとんど差は認められなかった。餌負荷期間中(6~18週齢)、NF群の体重は10週齢まで増加したが、12週齢時より徐々に減少した。それに対して、NP-0.6%群の体重は殆ど変化せず、NP-1.2%群の体重は徐々に増加した。野生型マウスの体重は、餌負荷期間中、3群間で殆ど差は認められなかった。

2) 関節の肥大

HILV-I Tgマウスの後肢関節に於ける関節肥大率のスコアを比較したところ、18週齢時におけるNF群は1.2であったが、NP-1.2%群のスコアは0であった。NP-0.6%群のスコアも上昇したが、NF群より低かった。前肢に於いても同様の傾向が認められた。野生型マウスのスコアは、3群とも餌負荷終了時まで殆ど変化しなかった。

3) 関節の組織学的変化

核タンパク負荷による関節組織の形態変化を観察した。餌負荷終了時、後肢に於いて、グレード4の割合は、NF群が70%であったのに対し、NP-0.6%群は44%、NP-1.2%群は28%とそれぞれ減少した。グレード0の割合は、NF群の0%に対し、NP-0.6%群は14%、NP-1.2%群は27%と、核タンパクの濃度に依存して増加した。前肢に於いても、後肢と同様に、核タンパクの濃度に依存してグレード4が減少し、グレード0が増加して改善が認められた。後肢関節のIgG陽性反応は、野生型マウスでは殆ど認められなかった。HILV-I Tgマウスの場合、NF群

では100%滑膜細胞に強い陽性反応が認められ、NP-0.6%群は60%、NP-1.2%群は33%に減少した。前肢関節に於いても、核タンパク負荷群のIgG陽性反応は、NF群に比べ弱かった。最後に、関節リウマチの指標である血清中のRF値を調べたところ、NP-1.2%群は、NF群およびNP-0.6%群に比べ有意に低下していた。

4) 酸化ストレスの評価

関節組織の3-NT免疫染色を行った。野生型マウスでは3-NT陽性反応は殆ど認められなかったが、HILV-1 Tgマウスでは軟骨細胞に強い3-NT陽性反応が認められた。それに対し、NP-1.2%群ではこの陽性反応が消失していた。餌摂取終了後、マウス血清中のROMを測定したところ、NF群およびNP-0.6%群に比べ、NP-1.2%群では有意に低下していた。

D. 考察

1. 川崎病に於ける血管内皮細胞とフリーラジカル

本研究では、ヒト冠動脈血管内皮細胞(HCAEC)が自発的に H_2O_2 を生成し、川崎病急性期に血中濃度が上昇するneopterinおよびTNF- α がその生成活性を亢進することが明らかになった。冠動脈瘤の発症に至る過程でTNF- α が決定的な役割を果たしていることが報告されている。HCAECに於ける H_2O_2 生成活性の責任酵素群としてNox family NADPH oxidasesが考えられ、今回mRNAおよび蛋白質レベルの発現を解析した。その結果、食細胞のNox2型NADPH oxidaseの全構成因子(Nox2, p22, p67, p47)およびNox4の異なる2つのisoform(A and B)の発現が蛋白質レベルでも確認された。この様に、HCAECには3つの酸化還元中心(Nox1, Nox2, Nox4)が発現しているが、蛋白質発現が確認できたNox2とNox4が主に H_2O_2 生成に関与すると考えられる。TNF- α はNox2およびp67の発現を誘導した。

自発的な H_2O_2 生成は血管内皮細胞の増殖に必要である。しかし、この自発的な H_2O_2 生成が川崎病急性期に上昇するサイトカイン(特にTNF- α)により賦活化されて、その酸化ストレスによって細胞成分やtight-junctionを構築する構造蛋白質の酸化が進行して血管内皮細胞の傷害、ひいては、血管壁全層の傷害に至り、動脈瘤を形成する可能性が考えられる。現在、川崎病モデルマウスを作成しており、冠動脈血管内皮細胞の弱体化を確認している。この川崎病モデルマウスを用いて、冠動脈瘤の形成に食細胞が生成する O_2 が関与するかNox2-KOマウスで検証する予定である。

2. 神経疾患とフリーラジカル

本研究では、酸化ストレスによるDNA損傷を示す8-OH-dGの脳虚血後の脳内動態を明らかにした。8-OH-dG

は、脳虚血・再灌流後、数時間で主に神経細胞のミトコンドリアで増加した。このミトコンドリアに於ける酸化ストレスの増加が、ミトコンドリアから細胞質へのcytochrome cの放出を促し、アポトーシスを介して脳虚血性神経細胞死を誘導することが分かった。DNAの酸化障害は核の酸化障害を意味していた。しかし、本研究の結果は、ミトコンドリアが発達している神経細胞では癌や炎症の際とは異なる酸化障害機構があることを示している。

次に、神経ペプチドPACAPの抗酸化ストレス作用をPACAP-KOマウスおよびPACAP38投与により明らかにした。PACAP-KOマウスのROMは野生型マウスにくらべ有意に高く、老齢PACAP-KOマウスでは顕著であった。そこで、PACAP38を正常マウスに単回投与したところ、ROMは有意に低下した。次に、PACAPの抗酸化ストレス作用が、循環レベルだけでなく脳内の組織レベルでも認められかHEt投与による O_2 の検出で解析したところ、PACAP-KOマウスでは明らかに脳内での O_2 生成の上昇が認められ、PACAPが脳内のラジカル産生抑制に寄与することが明らかになった。PACAP-KOマウスでは、ミトコンドリアに局在するMn SODとHO-1の発現量が野生型に比べて低下しており、PACAPがこれら抗酸化物質の発現を促す可能性が明らかになった。更に、電子顕微鏡的観察により、老齢PACAP-KOマウスでは神経細胞内のミトコンドリアに形態異常が認められ、そこにリソソームが融合して自己食食を起こしている像が多数認められた。

エダラボンは抗酸化物質であり、現在、心循環器系障害および脳梗塞患者に対する治療薬として認可されている。しかし、生体内におけるフリーラジカルの半減期は数秒単位であり、その検出は困難であることから、エダラボンが実際に体内における酸化ストレスを軽減させているかについては不明な点が多かった。本研究に於いて、頭部外傷モデル動物ではエダラボン投与により損傷面積が減少することから、エダラボンが脳虚血のみならず頭部外傷にも予防・治療効果のあることが明らかとなった。さらに、エダラボン投与により血中の酸化ストレス度およびフリーラジカルであるアルコキシルラジカル濃度が有意に減少した。以上の結果から、エダラボン投与は生体内で抗酸化的に働き、組織障害を抑制していると考えられる。

フリーラジカルは中枢・末梢組織の損傷、炎症反応に伴って増加し、障害を引き起こすのみならず生活習慣病や老化とも深く関与することが知られている。PACAPのような内因性抗酸化物質誘導作用を持つペプチドや、エダラボンのような抗フリーラジカル剤の更なる機能解析を進めることは、幅広い酸化ストレスに起因する疾患の

画期的な治療薬の開発に繋がると確信する。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

本研究では、リウマチ様関節炎を自然発症する HTLV-I Tg マウスを用いて NF、NP-0.6%、NP-1.2%を含有した餌を6週齢から18週齢まで長期負荷し、体重、関節厚、関節の組織学的変化を比較した。最後に、フリーラジカルに対する核タンパク摂取の効果を検討するために、関節に於ける 3-NT 染色を行うと共に、血中の ROM を測定した。

関節リウマチは関節炎を主徴とする自己免疫疾患の一つである。ヒト関節リウマチの主な症状は体重減少や関節肥大などである。餌負荷後 HTLV-I Tg マウスの体重は、NF 群では12週まで増加したが、その後は徐々に減少した。これに反し、NP-1.2%負荷群では、加齢に伴い徐々に増加した。次に、前後肢関節厚を計測したところ、NF 群では8週齢以降そのスコアが増加したが、NP 群では濃度に依存して抑制された。次に、餌負荷終了時の関節を組織学的に調べた。NF 群は前肢、後肢ともに重篤な炎症所見であるリンパ小節の出現や骨・軟骨の破壊が明瞭に認められたが、NP 群ではこれらの所見が減少し、前肢・後肢共に約3割の動物に病理所見を認めなかった。更に、NF 群の関節は、全個体が滑膜細胞を中心に強い IgG 陽性反応を示したが、NP 群は濃度依存的に IgG の陽性反応を抑制した。これらの結果は、NP 群に認められた体重減少や関節肥大の抑制が、核タンパク摂取により関節炎が改善した結果であることを示している。

これまで、核タンパク負荷の関節リウマチに対する有用性は全く報告されていない。HTLV-I Tg マウスに認められる体重の減少、関節の肥大、関節炎の悪化および IgG の上昇は、関節リウマチ患者に於ける主要な症候と非常に類似している。更に、関節リウマチ患者の約3%が HTLV-I に感染していることが報告されている。従って、本研究で示された核タンパクの長期間負荷による HTLV-I Tg マウス関節炎の症候改善および発症遅延は、核タンパクの摂取がヒトの関節リウマチに対しても有効である可能性を示している。関節リウマチは、病気の進行や薬剤の長期使用による副作用が引き起こす QOL の低下が問題になっている。核タンパクによる代替医療が可能になれば、関節リウマチのみならずフリーラジカルが原因となっている多くの疾患に有用であると考えられる。

E. 結論

1. 川崎病に於ける血管内皮細胞とフリーラジカル

川崎病急性期に血中濃度が上昇する neopterin および

TNF- α が、ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) の自発的 H₂O₂ 生成能を増強した。HCAEC には、Nox4 および Nox2 が発現しており、TNF- α がこれらの Nox を活性化して血管内皮細胞に傷害を与え、冠動脈瘤発症の引き金になると考えられる。

2. 神経疾患とフリーラジカル

脳虚血時に、ミトコンドリア DNA が酸化障害を受け、ミトコンドリア誘発性のアポトーシスによって神経細胞死が起こることが分かった。PACAP は生体内の内因性抗酸化物質の誘導因子としての作用を持ち、抗フリーラジカル剤であるエダラポンは体内のフリーラジカル量を減少させて頭部外傷を軽減することが示された。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

サケ白子由来核タンパクは、HTLV-I Tg マウスの関節炎に対し改善効果が認められた。このことより、核タンパクの摂取は、ヒト関節リウマチに対しても有用性があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohtaki H, Takeda T, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Satoh K, Hiraizumi Y, Miyaoka H, Shioda S. 2007 Appearance of oxidative damage of mitochondria after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Res* (in press).

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

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