

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

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 ……	589
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 ……	636
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 ……	656
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 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
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 ……	691
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 ……	707
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 ……	720
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 ……	728
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 ……	740
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 ……	761
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 ……	772
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 ……	783
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 ……	795
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 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
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 ……	836
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 ……	839
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 ……	919
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 ……	939
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の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
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 ……	966

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 ……	979
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 ……	1000
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 ……	1021
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 ……	1042
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 ……	1054
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 ……	1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 ……	1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 ……	1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 ……	1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 ……	1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 ……	1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 ……	1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 ……	1115

腹膜癒着予防剤の開発と応用

所属 国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部
研究者 土肥 多恵子

研究要旨 外科侵襲や炎症に伴っておこる腹膜癒着の防止剤の開発を目的に、低分子化合物によるケモカイン作用の *in vitro* 阻害試験および *in vivo* 癒着防止試験を行った。また、ヒト腹腔内洗浄液を手術の様々なタイミングで採取し、その細胞成分と蛋白成分の解析を開始した。

分担研究者

- (1) 国立国際医療センター研究所 代謝疾患研究部・鎌木 康志
- (2) 国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部・名取 泰博

A. 研究目的

本研究はケモカインを標的とした新規癒着防止剤の創製を目指すものである。

開腹手術後や消化管炎症による腹膜の炎症から起こる腹腔内臓器の組織癒着は、イレウス、不妊など重篤な合併症をもたらし、再手術の原因となるだけでなく、長期にわたる深刻な後遺症を引き起こして患者の QOL を著しく損なう。また、無症候性であっても再手術の際の手術時間延長・出血・他臓器損傷のリスクが高くなることは多くの外科医が認識している。癒着は、救命のため最初に行われる手術の際には重大に取り上げられない合併症で、その実態報告も多くないが、開腹術を受けた患者の 34.1% がその後 10 年間に癒着が原因と思われる理由で再入院しているという報告がある。このように、癒着が原因で医療に費やされる負担は実は非常に大きく、医療経済的にも問題である。このため有効な癒着防止法の開発が強く求められている。近年、吸収性の膜を手術臓器と腹壁との間におく方法が行われるよ

うになり、腸管-腹壁の癒着の頻度は減少したといわれている。しかし、臓器間の癒着防止はこの方法では困難であり、腹腔内に分散して癒着を防止する方法の開発がさらに求められている。また、腹腔鏡下の手術では比較的癒着の発生頻度は低いとされているものの、挿入創への癒着は発生しており、問題が解決されたわけではない。

我々は、これまでにマウスを用いて腹腔マクロファージが炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見だし、そのメカニズム研究を行った。その結果、腹腔壁と臓器を包む中皮細胞が、炎症刺激を受けるとケモカイン CCL1 を産生しその CCL1 および炎症刺激によって腹腔マクロファージも CCL1 を産生し、さらにその受容体 CCR8 のみをケモカイン受容体として特異的に発現することが明らかになった。このように CCL1 のオートクリン機構には **positive feedback** 機構が働くことが明らかとなり、このため腹腔マクロファージは傷害中皮細胞の局所にとどまって細胞塊を形成すると考えられた。この機構は炎症や外傷などのストレスが腹腔内に及んだときの生体防御機構として機能していると考えられるが、同時に癒着を誘導するトリガーになっている。我々は、抗 CCL1 抗体投与により炎症に伴う癒着及び開腹手術後の癒着

のいずれの *in vivo* モデルにおいても顕著な防止効果が認められ、CCL1/CCR8 が、慢性炎症や術後の腹膜癒着防止のための標的となりうることを明らかにした。さらに、我々は腹膜中皮細胞と腹腔マクロファージ凝集現象の *in vitro* での再現に成功した。これは *in vitro* 腹膜癒着のモデルであり、独自のスクリーニング系として使用してきた。

平成18年度の目的は、マウスにおいて腹膜癒着のトリガーとなることが明らかとなったケモカイン CCL1 の低分子阻害剤を *in silico* 及び *in vitro* でスクリーニングすることである。また、*in vivo* 癒着モデルにおいての効果を評価すること、および癒着のメカニズムをヒト外科侵襲時の応答で検証することである。

B. 研究方法

1. マウス CCL1/CCR8 阻害剤の *in silico* スクリーニング

CCR8 は HIV の coreceptor であることがすでに知られており、この情報により、2. 3 の低分子阻害剤構造が公開されている。民間企業研究所の協力を得て *in silico* スクリーニング技術を応用し、既成の低分子化合物ライブラリー (LaboTest) から、低分子化合物約 25 種を選定し購入した。

2. マウス CCL1/CCR8 阻害剤候補の *in vitro* 試験

1-a 細胞凝集試験によるスクリーニング

我々の作成したマウス中皮細胞とマクロファージの CCL1 誘導細胞凝集試験に低分子化合物を加えて阻害効果を解析した。

1-b Ca²⁺ flux assay

マウス CCR8 をクローニングし、CHO 細胞での発現系を作製した。このマウス CCR8 発現細胞を低分子化合物存在下で CCL1 刺激したときの Ca²⁺ 流入を測定した。

3. ヒト CCL1/CCR8 阻害剤 *in vitro* スクリーニングの準備

検出系をヒトの系でおこなうため、ヒト CCR8-EGFP 発現細胞を作製した。

4. マウス CCL1/CCR8 阻害剤候補の *in vivo* 効果

In vitro 試験のいずれかにおけるヒット化合物のうち、比較的阻害活性の強かったものについて、腹膜癒着阻害活性をマウス術後癒着モデルで判定した。マウスを正中で開腹し両側の腹壁の腹膜を切子でつまんで絹糸で強く結紮した ischemic button を作製し、6 日後開腹して観察する。無処置の場合はほとんどの ischemic button に癒着が見られる。*In vitro* で得られた阻害活性のある化合物 (100 μM, 0.5ml) を手術直後から連日腹腔内投与し、*in vivo* での癒着阻害効果を判定した。

5. ヒト腹腔内洗浄液中の細胞解析

開腹術、腹腔鏡手術の両方を含む、12 例の下部消化管手術時の様々な時点で、腹腔内洗浄液を採取し、ギムザ染色、フローサイトメトリー、免疫染色などによってその細胞成分を同定、解析した。定量解析のために、洗浄に用いる生理的食塩水の液量を一定にしておき、回収できた液を解析に用いる方法をとった。

6. 外科手術時の洗浄液中のケモカイン検出、プロテオーム解析のための条件検討

上記の術中洗浄液の上清の総タンパク定量、SDS-PAGE などを行い、アルブミンなどの夾雑物除去の条件などを検討した。また、ELISA またはビーズ法によるケモカインの測定のための標本採取・処理方法を検討した。

倫理面の配慮

動物実験は動物愛護の立場からも考慮して計画し、施設の委員会の承認を得て行った。手術時の標本採取に関しては、被験者の自由意志による

研究協力に基づいて、その安全とプライバシーの確保を担保した計画を立て、国立国際医療センターおよび共同研究先である自治医大大宮医療センターの倫理委員会の審査を受けて承認を得た後に開始した。

C. 研究結果

1. マウス CCL1/CCR8 阻害剤スクリーニングおよびその *in vivo* 効果

In silico で候補となった低分子化合物を用いて *in vitro* 細胞凝集試験の阻害活性を調べたところ、9種類の低分子化合物に細胞塊形成阻害活性が認められた。このうち比較的活性の強かったものについては術後癒着形成の阻害効果を *in vivo* モデルを用いて試験した。術後6日間 100 μM , 0.5 ml の連日投与を行ったところ、非投与群に比べて明らかに癒着の程度が軽減していた。

2. マウス CCL1/CCR8 阻害剤候補化合物の Ca^{2+} 流入試験阻害効果

マウス細胞凝集試験で阻害効果のあった、9種の化合物について、マウス CCR8 発現細胞を用いて Ca^{2+} 流入試験を行った。その結果、*in vivo* で効果のみられた化合物は、20-60 μM ではじめて30%程度の阻害効果がみられた。その他の化合物については、10 μM で測定を行ったが、特異的に阻害効果を示すものがなかった。

3. ヒト腹腔内洗浄液中の細胞解析

下部消化管切除開腹術において、開腹直後、回復後2時間、翌日のドレーン液を採取し、ギムザ染色で細胞解析を行った。その結果、術後2時間、翌日のドレーン液の細胞成分は好中球が90%以上を占め、フローサイトメトリーではCD14あるいはCD89陽性のマクロファージと考えられる細胞はごくわずかであった。開腹直後の洗浄液では術中、術後に比べて細胞数は少なく、サイトスピ

ンにより細胞を直接観察すると、大型で明るい胞体を持つ中皮細胞の凝集塊に、さらにマクロファージ様細胞が付着している像が頻りに観察された。しかしながら、Ficoll分画により好中球を除くことができ、約50 mlの洗浄液より $2-3 \times 10^6$ 個の細胞を解析に用いることができた。また、CCR8に対するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体を購入し、腹腔内洗浄液中の細胞のCCL1刺激前後の発現解析を試みたが、いずれの抗体を用いてもバックグラウンド染色が高く、明らかなCCR8発現は検出できなかった。これらの抗体はスクリーニング目的で作製したCCR8強制発現細胞を用いても検出が困難で、感度の非常に低い質のものであった。

4. 外科手術時の洗浄液中のケモカイン検出、プロテオーム解析のための条件検討

外科手術時の腹腔内洗浄液の総タンパク質濃度は開腹直後6例、開腹術中1例、術後ドレーン液1例で0.5-6 $\mu\text{g/ml}$ (平均2.6 $\mu\text{g/ml}$)であった。採取のタイミングによる総タンパク量の差は今回解析した中では明確でなかった。これに対して、腹腔鏡手術直後4例のうち2例では原液では検出感度以下で(これらを0としたときの平均値0.3 $\mu\text{g/ml}$)、蛋白の滲出量が開腹術に比べて低い傾向がみられた。電気泳動(SDS-PAGE)を行い、クマジーブリリアントブルー染色を行った結果、滲出蛋白の大部分がアルブミンであったため、サンプル濃縮とアルブミン除去法の検討を開始した。現在Amicon Ultra-15 Ultracel-5K(Millipore)による限界濾過濃縮法と、Albumin and IgG Removal Kit(GE)の組み合わせでケモカインなどの検出もできると考えている。

この前処理を行った腹腔内洗浄液中からは、ELISA(ELISA Kit Quantikine human I-309/CCL1, R&D)により、CCL1を検出することができた。

洗浄液原液で検出できたのは、術中1例とドレーン液1例のみ(4.3 および 3.1 pg/ml)であったが、濃縮・アルブミン除去することによって、開腹直後・腹腔鏡手術直後のサンプルからも検出された。

D. 考察

In vitro 細胞凝集試験で、阻害活性のある化合物が見いだされ、その中の一つは *in vivo* でも腹膜癒着阻害効果を示したので、本化合物は阻害剤候補であるといえる。しかしながら、*in vivo* では 100 μ M という高濃度を使用していたこと、 Ca^{2+} 流入試験での阻害効果がつよくなかったことから、この化合物は CCL1/CCR8 相互作用のほかにも細胞凝集に至る別なステップの阻害作用を持つことが示唆された。そこで、より低濃度で得意的な効果のある化合物をあらたに探索する必要があると考え、次年度はこれまでの *in silico* スクリーニング方法ではなく、リガンド認識仮説に基づく GPCR 活性型構造を利用したケモカイン受容体フォーカストライブラリー（ファルマデザイン社）からの Ca^{2+} 流入試験によるスクリーニングを行う予定としている。また、GPCR リガンドは種間で認識分子がかなり異なるという報告もあるため、スクリーニングシステムをマウスからヒトに替える必要があると考えた。

手術中の腹腔洗浄液を用いた細胞解析では、マクロファージ系の細胞がみられるのは、手術開始直後であり、開始後2時間ではほとんどが好中球となる。開腹直後には好中球はほとんどみられないことから、外科ストレスにより、腹腔内のレジデントとしてのマクロファージは非常に早い時期に浮遊細胞画分から消失し、好中球が信心するものと考えられる。この現象は我々のマウスでの観察と一致する。すなわち、マウスに穿孔性の大腸炎を誘導すると、腹腔内滲出細胞の中からマク

ロファージは消失し、好中球タイプの細胞がほとんど占めるようになる。ラベルしたナイーブ腹腔マクロファージを前もって移植しておき腸炎を誘導する実験から、マクロファージは炎症部位の消化管に凝集・付着するために浮遊細胞画分からは回収されないことがわかっている。ヒトにおける外科ストレスによっても同様の応答が起こっていると予測している。

ヒトにおいても CCL1/CCR8 がこのマクロファージ活性化に重要である可能性は、洗浄液から、CCL1 が検出されたことから示唆される。特に手術中やドレーン廃液から比較的高い濃度が検出されていることが興味深い。しかし、市販の抗ヒト CCR8 抗体には、生体材料に使用できる質のものがなかったことから、今後の細胞解析は新たな抗体を作製するか、生成した細胞の RT-PCR などの系の確立が必要である。

E. 結論

マウス細胞凝集を阻害する低分子化合物を見だし、*in vivo* でも腹膜癒着阻害効果があった。しかし高濃度を要し、CCL1/CCR8 特異的な阻害剤でないことがわかったためさらにスクリーニングを続けることとした。ヒトサンプルでの細胞、液成分の解析も継続する。

F. 研究発表

1 論文発表

1. Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Toyama-Sorimachi N, Yamamoto K, Matsukawa A, Lira SA, Dohi T: Inhibition of CCL1-CCR8 interaction prevents aggregation of macrophages and development of peritoneal adhesions. J Immunol In press: 2007
2. Yamashita R, Fujiwara Y, Ikari K, Hamada K, Otomo A, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y.

Extracellular proteome of human hepatoma cell, HepG2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Mol Cell Biochem. In press.

3. Shibata N, Jishage K, Arita M, Watanabe M, Kawase Y, Nishikawa K, Natori Y, Inoue H, Shimano H, Yamada N, Tsujimoto M, Arai H: Regulation of hepatic cholesterol synthesis by a novel protein (SPF) that accelerates cholesterol biosynthesis. FASEB J 20:2642-2644, 2006
4. Nishikawa K, Kita E, Omata K, Igai K, Watanabe M, Yaffe MB, Natori Y: A multivalent peptide-library approach identifies a specific inhibitor for a carbohydrate-recognizing molecule. FASEB J 20:2597-2599, 2006

2. 学会発表

1. 土肥多恵子: 半導体ナノ粒子を用いた、腹腔内炎症における細胞交通と腹膜癒着機構の解明, Biomarker と DDS-ナノ技術の多元と諸相, 神戸, 2007年2月15日
2. 土肥多恵子, 中島 淳: 炎症における Th2 免疫応答の偏りによる大腸炎症発癌の促進, DDW-Japan, シンポジウム 1 炎症と消化器発がん, 札幌, 2006年10月11日、札幌.
3. Mizutani N, Kawashima R, Kawamura YI, Imai T, Toyama-Sorimachi N, Dohi T: Fractalkine negatively regulates macrophage function, 第36回日本免疫学会学術集会, 大阪, 2006年12月13日
4. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Kawamura Y, Dohi T: Aberrant responses of colonic macrophage-type cells to lipopolysaccharide (LPS) in ulcerative colitis (UC), 第36回日本免疫学会学術集会, 大阪, 2006年12月13日
5. 土肥多恵子, 川島 麗, 河村由紀, 中島 淳, 中釜 齊: T ヘルパー2 型サイトカインによ

る消化管上皮修復の遅延と発癌の促進, 第65回日本癌学会学術総会, 横浜, 2006年9月28日

6. 井狩高平, 山下亮, 浜田圭子, 大友明日香, 安田和基, 鎗木康志: IRS-1, IRS-2 高発現ヒト肝細胞のプロテオーム解析, 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 2006年12月、名古屋
7. 浜田圭子, 山下亮, 井狩高平, 大友明日香, 安田和基, 鎗木康志: インスリン/IGF 受容体による遺伝子発現制御の比較解析, 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 2006年12月、名古屋

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18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

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