

図 2: VEGF で誘導されるウシ網膜周皮細胞の分裂増殖とファスジルの抑制作用

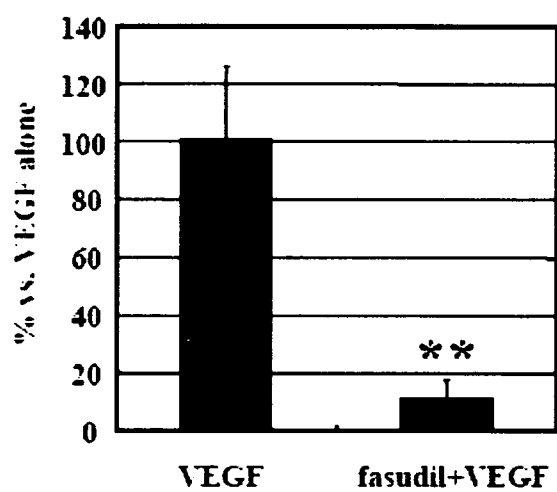


図 3: VEGF で誘導されるマウス角膜における血管新生とファスジルの抑制作用

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

所属 (独) 国立病院機構京都医療センター 展開医療研究部
研究者 長谷川 浩二
研究期間 平成 17 年 4 月-平成 20 年 3 月

研究要旨 内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法を確立するため、低用量 G-CSF による細胞動員、並びに増殖因子徐放化を介した幹細胞の生着促進療法の確立を目指し、さらに幹細胞分化効率を上げるため心筋細胞分化制御機構の解明を行った。

分担研究者

- (1) キリンファーマ(株)R&D推進室
主務 桑木 知朗
- (2) 京都大学大学院医学研究科心臓血管外科
教授 米田 正始
准教授 池田 義
- (3) 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻
教授 藤田 正俊
- (4) (財)生産開発科学研究所心血管分子細胞生物学研究室
主任研究員 森本 達也

A. 研究目的

生活習慣の欧米化に伴い増加した重症びまん性冠動脈病変は血行再建困難で、現存の薬物治療に対して抵抗性の重症末期心不全を合併する。心不全の予後は薬物療法の進歩により改善傾向にあるものの、薬物療法に抵抗性の重症末期心不全は悪性腫瘍の予後より不良といわれる。成人の心筋細胞は増殖能を喪失しているため、心臓は創傷治癒過程における組織再生能力が非常に乏しい臓器であり、ドナー不足のため臓器移植が困難な状況の我が国では、重症末期心不全に対する再生医療の確立は、国家的、社会的急務と考えられている。

このような状況のなか、心筋再生療法の確立へ向けて、これまで内因性幹細胞を採取して、これらを *ex vivo* 培養系で増殖、心筋に分化させて移植するアプローチが試みられようとしている。しかし、骨髄、骨格筋、心臓あるいは脂肪組織内の幹細胞が心筋細胞へ分化する可能性が報告されているものの、その増殖能・分化効率は極めて低く、臨床応用できる段階ではない。胚性幹 (ES) 細胞は無限増殖能を保ちつつ多分化能を有するため、倫理的問題をクリアすれば大いに期待されるアプ

ローチである。しかし、ES 細胞から心筋細胞への分化効率は依然低く、また、分化した細胞を移植しても組織に生着する細胞数が少ないという欠点がある。内因性幹細胞を顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) により心臓内へ動員させるアプローチは、患者に対する侵襲も少なく簡便な治療である。しかし急性心筋梗塞後のリモデリング抑制や、代償期から心不全発症の予防に奏功するという報告は多いが、病変が完成した心不全末期における治療効果に関しては不明である。

そこで本研究の目的は、重症末期心不全に対する心筋再生療法を確立することであり、この目的を達成するため

- (1) 慢性期における重症心不全に対して G-CSF、増殖因子を介した内因性幹細胞の動員、生着を促す再生療法の確立
 - (2) 幹細胞の分化効率を上げるための心筋細胞への分化制御機構の解明
- の 2 つに焦点をおいた

B. 研究方法

分担研究者の桑木らは G-CSF に加えてエリスロポイエチンを用いた動員療法に関して検討し、池田らは増殖因子徐放化投与による幹細胞生着療法の確立を目指し、藤田らは心筋細胞分化機構の解明を行った。

(倫理面への配慮)

培養細胞の遺伝子を扱う実験については、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年 6 月 18 日公布) に基づいて施行した。

動物実験に関しては各実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に従い実施した。

C. 研究結果

桑木らは主任研究者と共に Bio14.6 心筋症ハムスターの心不全末期における G-CSF 療法に関して検討し、長時間作用型 peg-G-CSF を週 1 回、皮下注するよりも、少量の G-CSF を週 3 日、皮下注した方が良いこと、その量としては 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ が最も適当であり、10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超えると無効であることを見出した。しかし心不全の発症程度により治療効果に差があることが判明し、本治療法をヒト臨床応用するためには G-CSF による動員に加えて生着、分化療法を加えることの重要性が認識された。そこで造血ホルモンであるエリスロポイエチンによる細胞動員に関して検討し、G-CSF とエリスロポイエチンの併用により造血幹細胞の動員量に相乗的な増加が認められることを見いだした。

米田、池田らは生体吸収性ゼラチン水和ゲルを用いた蛋白徐放システムを利用して半減期の短い bFGF, HGF, IGF-1 などの細胞増殖因子を徐放化することにより、虚血性心筋症モデルや拡張型心筋症モデルにおいて心機能が改善することを示してきた。そしてその機序として血管新生の誘導と心筋アポトーシス減少、組織線維化の抑制が関与していることを示した。そこで本研究では抗アポトーシス作用、血管新生作用を有するエリスロポイエチンに関して検討し、その心臓局所徐放化投与が心筋梗塞モデルにおいて心機能を改善することを見出した。また分担研究者藤田らならびに主任研究者との共同研究で、少量 G-CSF とエリスロポイエチンの併用により心筋梗塞後の心機能が相乗的に改善することを見出した。

本研究グループは ES 細胞においてヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤 Tricostatin A により GATA-4 がアセチル化し心筋細胞分化亢進が誘導されることを報告した。藤田、森本らは心筋細胞分化において、心筋特異的転写を統制する GATA-4 因子の活性化機構に関して検討するため、プロテオミクスにより GATA-4 複合体の精製を行った。そして GATA-4 の結合蛋白として Cdk9/Cyclin T1 が存在することを見出し、Cdk9 阻害薬である 5,6-dichloro-1-h-ribofuranosyl-benzimidazole (DRB) が転写コアクチベーター p300 による GATA-4 のアセチル化ならびに GATA-4 依存性転写活性の亢進を抑制すること、また ES 細胞において Tricostatin A による心筋細胞分化亢進を DRB ならびに Cdk9 ドミ

ナントネガティブ変異体が抑制することを示した。さらに心不全発症の心筋細胞核内情報伝達に p300 のヒストンアセチル化酵素活性による核の過剰なアセチル化が重要であるという事実を見出し、健康食品として使用され天然物ウコンの成分で p300 の特異的アセチル化阻害作用を持つクルクミンが、高血圧性心疾患ならびに心筋梗塞後の心不全発症を抑制することを動物モデルで確認した。

D. 考察

少量 G-CSF 単独による心不全治療では、対象動物の心不全の重症度により効果の差があることが判明し、臨床応用するためには G-CSF による幹細胞の動員に加えさらなる効率の上昇が必要と考えられ、ヒトでの臨床試験までは至らなかった。しかし少量 G-CSF (動員) とエリスロポイエチン (生着) の併用により相乗的に梗塞後心機能が改善するという新たな事実を見出し、また心筋分化促進に関する多くの重要な知見を得ることができた。幹細胞の動員、生着、心筋分化を組み合わせた心筋再生療法に向けて、着実に前進し、さらに心不全発症の情報伝達機構を標的とした新規薬物療法に関しても大きな展開が見られた。

血管再生療法は既にヒトにおいて臨床試験が行われているが、重症末期心不全に対する心筋再生療法は未だ確立していない。本研究の目指す内因性幹細胞の活性化による心筋再生療法は、外因性幹細胞の注入より安全で、臨床上有用性が高いと考えられる。今回、G-CSF (動員) とエリスロポイエチン (生着) の併用による相乗的な心機能改善効果を見出したことは極めて意義深い。さらに心不全発症の情報伝達機構を解明し、そこを標的としたクルクミン療法を動物モデルにおいて世界で初めて確立した。21世紀の高齢化社会の到来と共に増加しつつある心不全を新たな視点から解決することは臨床的にも社会的にも最重要課題のひとつである。

E. 結論

本研究グループは幹細胞の動員、生着、分化のそれぞれのステップにおいて新たな知見を見出し、動物レベルにおいてこれらを組み合わせた治療法を検討し、成果を上げた。心不全に対する新規治療法の臨床応用を目指し前進している。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K: The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. *J Clin Invest.* 2008;118:868-878
- 2) Hosseinkhani M, Hasegawa K, Ono K, Kawamura T, Takaya T, Morimoto T, Wada H, Shimatsu A, Prat SG, Suemori H, Nakatsuji N, Kita T. Trichostatin A induces myocardial differentiation of monkey ES cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;356:386-91.
- 3) Lin X, Fujita M, Kanemitsu N, Kimura Y, Tambara K, Premaratne GU, Nagasawa A, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M. Sustained-release erythropoietin ameliorates cardiac function in infarcted rat-heart without inducing polycythemia. *Circ J.* 2007;71:132-137.
- 4) Miyamoto S, Kawamura T, Morimoto T, Ono K, Wada H, Kawase Y, Matsumori A, Nishio R, Kita T, Hasegawa K. Histone acetyltransferase activity of p300 is required for the promotion of left ventricular remodeling following myocardial infarction in adult mice *in vivo.* *Circulation.* 2006 113:679-90
- 5) Kanemitsu N, Tambara K, Premaratne GU, Kimura Y, Tomita S, Kawamura T, Hasegawa K, Tabata Y, Komeda M. Insulin-like growth factor-1 enhances the efficacy of myoblast transplantation with its multiple functions in the chronic myocardial infarction rat model. *J Heart Lung Transplant.* 2006;25:1253-62.
- 3) Tomohide Takaya, Teruhisa Kawamura, Koh Ono, Rieko Takanabe, Shinji Kaichi, Toru Kita, Hiromichi Wada, Tatsuya Morimoto, Akira Shimatsu, Koji Hasegawa. "Regulated expression of microRNAs during differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiac myocytes" 第71回日本循環器学会、2007年3月15日~17日、神戸
- 4) Kaichi S, Takaya T, Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Ono K, Kita T, Hidaka K, Morisaki T, Baba S, Heike T, Nakahata T, Hasegawa K. Cyclin-dependent kinases-9, as a novel component of p300/GATA-4 complex, is involved in the differentiation of mouse ES cells into cardiac myocytes. 2007年11月アメリカ心臓協会(AHA)年次学術集会、オランダ、米国
- 5) Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Miyamoto S, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K. Curcumin, a Natural p300-specific Histone Acetyltransferase Inhibitor, Prevents the Development Heart Failure in rats 2007年11月アメリカ心臓協会(AHA)年次学術集会、オランダ、米国
- 6) Morimoto T, Kawamura T, Wada H, Sunagawa Y, Fujita M, Kita T, Hasegawa K. p300-mediated Inhibition of Doxorubicin-induced Myocardial Cell Apoptosis Involves Ubiquitin-dependent p53 Degradation. 2006年11月アメリカ心臓協会(AHA)年次学術集会、シカゴ、米国

~17日、神戸

G. 知的所有権の出願・取得状況

なし

2. 学会発表

- 1) 森本 達也、川村 晃久、和田 啓道、宮本昌一、砂川 陽一、藤田 正俊、北 徹、長谷川 浩二 「天然物成分クルクミンは心筋細胞核内アセチル化抑制を介して心筋細胞肥大を抑制する」第43回日本臨床分子医学会、2006年7月20-21日、札幌
- 2) Yoichi Sunagawa, Tatsuya Morimoto, Teruhisa Kawamura, Tomohide Takaya, Hiromichi Wada, Akira Shimatsu, Masatoshi Fujita, Toru Kita, Koji Hasegawa. "Cyclin-dependent kinase-9 is a novel component of p300/GATA-4 complex required for hypertrophic responses in cardiac myocytes." 第71回日本循環器学会、2007年3月15日

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

所属 (独) 国立病院機構京都医療センター 展開医療研究部
研究者 長谷川 浩二

研究要旨 内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法を確立するため、低用量 G-CSF による細胞動員への追加として、増殖因子徐放化を介した幹細胞の生着を促す再生療法の確立を目指し、さらに幹細胞分化効率を上げるため心筋細胞分化制御機構の解明を行った。

分担研究者

- (1) キリンファーマ(株)R&D推進室
主務 桑木 知朗
- (2) 京都大学大学院医学研究科心臓血管外科
准教授 池田 義
- (3) 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻
教授 藤田 正俊

A. 研究目的

生活習慣の欧米化に伴い増加した重症びまん性冠動脈病変は血行再建困難で、現存の薬物量に対して抵抗性の重症末期心不全を合併する。心不全の予後は薬物療法の進歩により改善傾向にあるものの、薬物療法に抵抗性の重症末期心不全は悪性腫瘍の予後より不良といわれる。成人の心筋細胞は増殖能を喪失しているため、心臓は創傷治癒過程における組織再生能力が非常に乏しい臓器であり、ドナー不足の我国において臓器移植が困難な状況では、重症末期心不全に対する再生医療の確立は、国家的、社会的急務と考えられている。

このような状況のなか、心筋再生療法の確立へ向けて、これまで内因性幹細胞を採取して、これらを *ex vivo* 培養系で増殖、心筋に分化させて移植するアプローチが試みられようとしている。しかし、骨髄、骨格筋心臓あるいは脂肪組織内の幹細胞が心筋細胞へ分化する可能性が報告されているものの、その増殖能・分化効率は極めて低く、臨床応用できる段階ではない。胚性幹 (ES) 細胞は無限増殖能を保ちつつ多分化能を有するため、倫理的問題をクリアすれば大いに期待されるアプローチである。しかし、ES 細胞から心筋細胞への分化効率は依然低く、また、分化した細胞を移植しても組織に生着する

細胞数が少ないという欠点がある。内因性幹細胞を顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)により心臓内へ動員させるアプローチは、患者に対する侵襲も少なく簡便な治療である。しかし急性心筋梗塞後のリモデリング抑制や、代償期から心不全発症の予防に奏功するという報告は多いが、病変が完成した心不全末期における治療効果に関しては不明である。

そこで本研究の目的は、重症末期心不全に対する心筋再生療法を確立することであり、この目的を達成するためには

- (1) 慢性期における重症心不全に対して G-CSF、増殖因子を介した内因性幹細胞の動員、生着を促す再生療法の確立
 - (2) 幹細胞の分化効率を上げるための心筋細胞への分化制御機構の解明
- の2つが極めて重要である

B. 研究方法

分担研究者の桑木らは梗塞後心不全に対して G-CSF とエリスロポイエチンの併用療法に関して検討し、池田らは増殖因子徐放化投与による幹細胞生着療法の確立を目指し、森本らは転写因子 GATA-4 による心筋細胞分化機構の解明を行った。

C. 研究結果

桑木らは主任研究者と共に Biol4.6 心筋症ハムスターの心不全末期において低用量 G-CSF の隔日投与が、心機能と生存率を改善することを見出した。しかし臨床応用するためにはさらにその効果を増強する必要がある。そこで本年度においては少量 G-CSF と抗アポトーシス作用、血管新生作用を有する造血ホルモンであるエリスロポイエチンを組合せた治療法の検討を行っ

た。その結果、ラット梗塞後心不全において、両者の併用により心筋梗塞後の心機能が相乗的に改善することを見出した。

池田らは生体吸収性ゼラチン水和ゲルを用いた蛋白徐放システムを利用して半減期の短い塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF), HGF, IGF-1 などの細胞増殖因子を徐放化することにより、虚血性心筋症モデルや拡張型心筋症モデルにおいて心機能が改善することを見出した。そしてその機序として血管新生の誘導と心筋アポトーシス減少、組織線維化の抑制が関与していることを示した。本年度はラット虚血性心筋症モデルに対する左室縮小術と bFGF び局所徐放投与の併用療法について検討し、bFGF 局所徐放投与が左室縮小術後のリモデリングを抑制し、左室縮小術単独に比べてより高い心機能改善効果を示すことを証明した。また主任研究者ならびに分担研究者の藤田、森本らとの共同研究でクルクミンが心筋梗塞後の心機能を改善することを示した。

本研究グループは転写コアクチベーター p300 が心筋特異的転写の統制において中心的役割を担う GATA-4 をアセチル化し、その DNA 結合能を増加させること、胚性幹 (ES) 細胞においてヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤 Tricostatin A により GATA-4 がアセチル化し心筋細胞分化亢進が誘導されることを報告した。藤田、森本らは心筋細胞分化における GATA-4 因子の活性化機構に関して検討するため、プロテオミクスにより GATA-4 複合体の精製を行った。そして GATA-4 の結合蛋白として Cdk9/Cyclin T1 が存在することを見出した。そこで本年度は、ES 細胞において Cdk9/Cyclin T1 の心筋細胞分化における役割を検討し、Cdk9 阻害薬である 5,6-dichloro-1-h-ribofuranosyl-benzimidazole (DRB)、ならびに Cdk9 のドミナントネガティブ変異体が Tricostatin A による心筋細胞分化亢進を抑制することを示した。

D. 考察

血管再生療法は既にヒトにおいて臨床試験が行われているが、重症末期心不全に対する心筋再生療法は未だ確立していない。今回、我々は平成 17 年度に見出した心不全末期から低容量 G-CSF による細胞動員の追加療法として、増殖因子徐放投与の有効性を動物レベルで証明すると同時にそのメカニズムに関して検討した。心筋分化効率の上昇に向けた新たな知見も集積しつつある。本治療法を確立するためには幹細

胞の動員、生着、分化を組み合わせた治療法の確立が必要であると考えられる。

E. 結論

本研究グループは幹細胞の動員、生着、分化のそれぞれのステップにおいて新たなる知見を見出し、動物レベルにおいてこれらを組み合わせた治療法を検討し、重症末期心不全に対する心筋再生療法の臨床応用を目指している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hosseinkhani M, Hasegawa K, Ono K, Kawamura T, Takaya T, Morimoto T, Wada H, Shimatsu A, Prat SG, Suemori H, Nakatsuji N, Kita T. Trichostatin A induces myocardial differentiation of monkey ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;356: 386-391
- 2) Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K: The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. *J Clin Invest*. 2008;118:868-878

2. 学会発表

- 1) Shinji Kaichi, Tomohide Takaya, Tatsuya Morimoto, Yoichi Sunagawa, Teruhisa Kawamura, Kou Ono, Toru Kita, Kyoko Hidaka, Tatsutoshi Nakahata, Koji Hasegawa. Cyclin-dependent kinases-9 is required for the differentiation of mouse ES cells into cardiac myocytes. 第 72 回日本循環器学会、2008 3.28~31、福岡
- 2) Shinji Kaichi, Tomohide Takaya, Tatsuya Morimoto, Yoichi Sunagawa, Teruhisa Kawamura, Kou Ono, Toru Kita, Kyoko Hidaka, Tatsutoshi Nakahata, Koji Hasegawa. Cyclin-dependent kinases-9, as a novel component of p300/GATA4 complex, is involved in the differentiation of mouse ES cells into cardiac myocytes. American Heart Association, Scientific Sessions, 2007 11.4~7、米国 Orland
- 3) 砂川陽一 梗塞後心不全に対する G-CSF/エリスロポイエチン組合せ療法 平成 19 年度臨床心血管再生研究会、2007 年 1 月 30 日、京都
- 5) Tatsuya Morimoto, Yoichi Sunagawa, Teruhisa Kawamura, Tomohide Takaya, Hiromichi Wada, Shoichi Miyamoto, Atsushi Nagasawa, Masashi

Komeda, Masatoshi Fujita, Akira Shimatsu, Toru Kita, Koji Hasegawa Curcumin, a Natural p300-specific Histone Acetyltransferase Inhibitor, Prevents the Development of Heart Failure in Rats. American Heart Association, Scientific Sessions, 2007 11.4~7、米国 Orland

6) Yoichi Sunagawa, Tatsuya Morimoto, Teruhisa Kawamura, Tomohide Takaya, Hiromichi Wada, Akira Shimatsu, Masatoshi Fujita, Toru Kita, Koji Hasegawa Proteomics Analysis Identifies Positive Transcription Elongation Factor b as a Novel GATA-4-binding Partner Involved in Hypertrophic Responses in Cardiomyocytes. American Heart Association, Scientific Sessions, 2007 11.4~7、米国 Orland

4) Tomohide Takaya, Teruhisa Kawamura, Koh Ono, Rieko Takanabe, Shinji Kaichi, Toru Kita, Hiromichi Wada, Tatsuya Morimoto, Akira Shimatsu, Koji Hasegawa. Roles of muscle-specific microRNAs during differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiac myocytes. American Heart Association Scientific Sessions, 2007 11.4~7、米国 Orland

5) Tomohide Takaya, Teruhisa Kawamura, Koh Ono, Rieko Takanabe, Shinji Kaichi, Toru Kita, Hiromichi Wada, Tatsuya Morimoto, Akira Shimatsu, Koji Hasegawa. Overexpression of microRNA-1 in mouse embryonic stem cells represses myocardial differentiation. 第72回日本循環器学会、2008 3.28~31、福岡

3. 出版物

1) 森本 達也、長谷川 浩二 「転写因子のアセチル化と心臓リモデリング」細胞工学 Vol. 26 No4 2007年4月

2) 森本 達也 「心筋細胞核をターゲットとした新しい心不全治療の可能性」 適応医学誌 Vol. 11. No. 2: 2007年12月

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

ワクチン創生の新テクノロジーによる新規ワクチンの開発

所属 国立感染症研究所 感染病理部
研究者 小島 朝人

研究要旨 地球温暖化に伴い我国での再燃が危惧されている日本脳炎 (JE) の、不活化新ワクチンに次ぐ安全/安価な理想の JE サブユニットワクチン開発を目標に分担研究を実施した。

東らは、安全なワクチン開発に必須な製造用発現細胞の適合性を確保するため、

(1) 細胞親株及び FBS 中の感染性 BVDV を感度良く検出できる検査法を確立した。

また、安価なワクチン製造のための抗原産生培養工程を検討し、

(2) 発現細胞を継代無しに長期間連続培養して大量の JE-VLP を回収できる方策を示した。

一方、JE はブタ等哺乳類中間宿主を吸血した昆虫類の蚊が媒介することに着目し、小島ら/小西らは、以前から研究開発してきたウイルス様粒子 (VLP)/細胞外粒子 (EP) 産生技術を用いて、

(3) JE-VLP を大量に、かつ、持続的に産生する安定な細胞クローン株を ATCC 由来哺乳動物細胞親株から樹立することに成功した。

(4) JE-EP を、バキュロウイルス発現系を用いることなく、昆虫細胞において高効率で生産できることを示した。

分担研究者

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| (1) 国立感染症研究所・感染病理部 | 小島 朝人
高橋 秀宗
田中 道子 |
| (2) 神戸大学・医学部 | 小西 英二 |
| (3) (財) 阪大微生物病研究会 | 東 雍 |

A. 研究目的

WHO は熱帯・亜熱帯地域を視野に「ワクチンの改善・改良・新開発」の提言を行っている。フラビウイルス流行圏外の我国も、温暖化によりその脅威に再度曝される危険が現実化しつつある。

国内各地のブタ血清検査では、日本脳炎ウイルス (JEV) の国内土着が示されており、JE 制圧に貢献した現行のマウス脳由来ワクチンは、積極的な接種の勧奨が差控えられて基礎免疫を持たない小児世代が拡大し、昨年度には幼児患者の発生をみた。細胞培養不活化新ワクチンの供給で接種は再開されようが、大量の感染性ウイルスを取扱う製造工程の安全性は解決されない。

この問題を克服するため、既に小島・東ら及び小西らのグループは、表面は JEV 粒子と同等ながら内部にコア・RNA ゲノムを持たない非感染性のウイルス様粒子 (VLP: virus-like particle)/細胞外粒子 (EP: extracellular particle) の作製につ

いて、旺盛に開発研究を行ってきた。

しかし、本課題の目指す次世代新ワクチン開発ではバイオ医薬品製造の国際基準をクリアする必要がある。RK-13 細胞を親株に JE-VLP 持続発現細胞樹立技術 (特開 2004-65118「日本脳炎抗原及びその製造方法」:官民共同出願) を開発してきたが、牛下痢症ウイルス (BVDV) 遺伝子が検出され適合性に問題が生じた。

バイオ医薬品製造には履歴の明確な ATCC の細胞株が汎用されるが、多くは培養用 FBS 中の BVDV で汚染している。ワクチン製造に適合する JE-VLP 持続発現細胞の新規樹立には、親細胞/FBS 中の感染性 BVDV 検出法の検討は必須であり、微研会が分担した。また、培養法は製造コストに直結するため、無継代/長期/連続/培養法による JE-VLP 産生量を以前の持続発現細胞を用いて調査した。

一方、バイオ医薬品基準に適合する JE-VLP/EP サブユニットワクチンを、新技術により新規に研究開発することを小島/小西らの分担とした。JE は感染ブタ等 (哺乳類) 中間宿主を吸血した蚊 (昆虫類) が媒介する。そこで、小島らは哺乳動物細胞、小西らは昆虫細胞に着目し、臨床試験が進められている細胞株での JE-VLP/EP 産生に取り組んだ。

B. 研究方法

(1) 感染性 BVDV の検出法及び製造培養法の検討：

ウイルス・検出細胞/抗体・蛍光抗体法：BVDV は細胞変性型の Nose 株及び細胞無変性型の No. 12 株を使用した。BVDV 抗原の検出は市販抗体による蛍光抗体法で行った。直接法には FITC 標識抗 BVDV ブタ IgG を、間接法には 3 種類の抗ペスチウイルス単クローン抗体及び抗 BVDV 山羊 IgG を使用した。検出用細胞には BVDV 感染感受性の牛鼻甲介細胞 (BT ; Bovine turbinate) 及び牛腎臓細胞 (MDBK ; Mardin Derby bovine kidney) を用いた。階段希釈した BVDV を細胞に接種し、4 日間隔で 3 回継代培養した後、感染検出感度を細胞変性の有無と蛍光抗体法で調査した。無継代/長期/連続/培養法の検討：2.5L の J12#26 細胞 (42 継代) を 6% FBS-MEM で 1×10^5 個/mL に調製し、多段培養容器 (セルファクトリー) で 25 日間培養した。培養開始後、毎日培養上清の一部を採取した。3、7、13 及び 19 日目には 3% FBS-MEM で培養液を全量交換した。採取した培養上清について、JEV 特異的中和単クローン抗体 503 を用いたサンドイッチ ELISA で JE-VLP 抗原量を測定した。標準抗原のマウス脳由来不活化日本脳炎ウイルス (北京株) 参照品 (TJP**012) を 100 とし、相対値を算出した。

(2) VLP 形成技術による JE ワクチンの開発

発現細胞の親株及び培養用 FBS の選定：ヒトの臨床試験が進行している培養細胞由来医薬品の製造用細胞親株について調査し、数種の候補株を選別した。細胞培養用 FBS も BSE 非汚染国に認定されている国の市販ロットを書類選考し、約 20 ロットを選別した。前期の研究で確立した nested RT-PCR 法を用いて、候補細胞株及び FBS 中の BVDV RNA ゲノム迷入の有無を検討した。JE-VLP 発現の検討：JEV prM-E cDNA 発現ベクターは新技術開発で樹立した J12 プラスミドを用いた。候補細胞親株にトランスフェクトし、培養上清および超遠心沈降画分の JEV-E 蛋白量をサンドイッチ 503-ELISA 系 (阪大微研会提供) で測定した。JE-VLP 持続発現細胞株の樹立：一過性発現系で最良の結果を与えた細胞親株に J12 DNA を導入し、薬剤耐性とペニシリンカップ法・限界希釈法で 503-ELISA 最高値を示すコロニーを順次クローニング・リクローニングした。503 抗体を用いた間接蛍光抗体法で 100% の発現細胞頻度を確認後、初代細胞株として凍結保存した。発現 JE-VLP の性状解析：樹立細胞株の培養上清からポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法、蔗糖密度勾配遠心法で発現蛋白を粗精製した。JEV 特異抗体、フラビウイルス交叉性抗体、ポリクローナル抗体等を用いた

ELISA・免疫プロット法等で、中和エピトープの有無・構成蛋白の性状を解析した。抗原形態は、蔗糖密度勾配遠心法でのピーク画分を濃縮後ネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察した。

(3) 昆虫細胞を用いて生産した次世代 JE ワクチンの基礎的評価：一時発現系で産生したウイルス抗原の解析

細胞・ウイルス・発現プラスミド：昆虫細胞はカイコ由来 Sf9 細胞、哺乳類細胞は CHO 細胞及び既に構築した JEV prM/E 遺伝子を安定的に発現する CHO 細胞 (F 細胞) を用いた。ウイルスは JEV 中山株を C6/36 細胞で調整し、Vero 細胞を用いたブランク法により感染力価 (PFU) を求めた。CHO 細胞での JEV 蛋白一時発現には既に pcDNA3 ベクターに JEV 中山株 prM/E 遺伝子を組込んだ pcJEME を使用した。Sf9 細胞での発現には、OpIE2 プロモーターと OpIE2 ポリ A 配列を搭載した市販の昆虫細胞用発現プラスミド pIB/V5-His に、JEV 中山株 prM/E 遺伝子を組込んで pIBJEME を作製した。Sf9 細胞には FuGENE、CHO 細胞にはリポフェクトアミン LTX を用いてトランスフェクトした。発現 JEV 蛋白の解析：トランスフェクトした細胞をアセトン・メタノール (1:1) 固定し、抗 JEV E モノクローナル抗体 (JE-10B4) 或いは抗 prM/M モノクローナル抗体 (J2-2F1) で反応後 ABC 試薬により免疫染色した。培養上清中の抗原量は、抗 JEV ウサギ血清を感作したマイクロプレートに、検体・JE-10B4 抗体・ALP 標識抗マウス IgG・パラニトロフェニルリン酸を順に反応させる ELISA で、標準抗原を用いて抗原量を算出した。培養上清中のウイルス蛋白は PEG 沈殿法及び 10-40% 蔗糖密度勾配遠心法により精製し、SDS-PAGE 後 JE-10B4 抗体及び J2-2F1 抗体を用いた免疫プロット法で解析した。精製蛋白を N-グリコシダーゼ F (PNGaseF) で 37℃・24 時間処理し糖鎖付加修飾を解析した。マウス免疫実験：4 週齢・雄 ICR マウス (各群 5 匹) に、精製 EP 抗原 (1 µg) とアジュバントとして pcDNA3 (7.3 µg) の混合液 50 µl を、ジェット式針無注射器を用いて 6 週間隔で 2 回、右大腿部に投与した。投与 3 週間後から 2 週毎に眼窩静脈叢より部分採血し、血清中の中和抗体価を測定した。中和試験は、Vero 細胞を用い、70% フォーカス減少法で抗体価を求めた。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は動物愛護倫理規程に則り、実験実施機関において申請・承認を受けた方法で実施した。即ち、必要最小限のマウス数を使用し、採血時にはマウスに対して麻酔処置を施して負担を最大限軽減し、実験終了後は安楽死の

処置を行った。

C. 研究結果

(1) 感染性 BVDV の検出法及び製造培養法の検討

感染性 BVDV の検出法：BVDV 検出細胞に用いた BT 及び MDBK 細胞が単層を形成するのに、それぞれ約 7 日と 3 日を要した。Nose 株を接種した場合は BT 及び MDBK 細胞のいずれも 3 日目には細胞変性が確認された。一方、No. 12 株ではいずれの細胞でも細胞変性は確認されなかったが、蛍光抗体法によりウイルスの増殖が確認された。蛍光抗体法による BVDV 抗原検出感度は、Nose 株・No. 12 株共に間接法において高く、調査した抗体の中では BVD 特異的抗ペスチウイルス単クローン抗体が最も優れていた。MDBK 細胞を用いた BVDV の検出感度は、細胞変性及び蛍光抗体法共に 4 日間隔で 2 代継代培養することで最も高くなることが明らかになった。

無継代/長期/連続/培養法の検討：持続発現細胞 J12#26 (継代数：42) を 37℃ で 25 日間培養した。その結果、細胞は異常なく良好に成育し、JE-VLP を定常的に産生した。無継代で 25 日間に亘る長期連続培養において培養液を 4 回全量交換したが、培地交換後 4 日目で ELISA 価は約 80 単位まで上昇し、6 日後には 100 単位以上の値を示した。また、培養 3、7、13、19 および 25 日目で採取した培養上清の全量をプールし、JE-VLP 抗原量を測定したところ 88 単位の高値であった。

(2) VLP 形成技術による JE ワクチンの開発

発現細胞の親株及び培養用 FBS の選定：持続発現細胞樹立のための親細胞を哺乳動物由来細胞株に絞って選択し、一過性の JE-E 蛋白発現を以前の高産生ウサギ腎由来 RK-13 細胞と比較した。その結果、ATCC 由来の CHO-K1 及び Vero 細胞が RK-13 細胞を上回り、ほぼ同等の結果を示した。しかし、JEV 感染による細胞融合が Vero 細胞において顕著であったことから、CHO-K1 細胞を第 1 位に選定し凍結保存した。なお、ATCC 由来の RK-13 細胞は BVDV 陽性であったが、CHO-K1 細胞は陰性であった。一方、培養に用いる FBS は、感受性細胞を用いた蛍光抗体法による調査では品質保証書記載のとおり陰性であったものの、nested RT-PCR 法では大多数のロットが BVDV RNA 陽性を示した。唯一 2 ロットのみが陰性であり、両者に細胞増殖支持能に差のないことから、ロットサイズの大きな FBS を選定した。

JE-VLP 持続発現細胞株の樹立：選定した CHO-K1 細胞 (購入後 4 継代) に J12 プラスミド DNA をトランスフェクトし、プラストサイジン S (10µg/ml)

を含む選択培地で耐性細胞の 24 コロニーを回収した。これらの細胞は、1 コロニーを除き全て JE-E 蛋白発現陽性であったが、発現量には大きな差が認められた。ELISA により 75 単位 (標準不活化 JEV=100 単位：蛋白含量 9.1µg/ml、阪大微研会提供) 以上を示した #10 細胞を元株とした。この J12#10 細胞を限界希釈法でクローニングし、全 29 クローン中発現陽性 19 クローンを得た。細胞形態・細胞増殖速度も評価対象に加えて、発現量のほぼ同等な #10.13 と #10.16 の 2 クローンを選定した。

発現 JE-VLP の性状解析：J12#10.13 細胞の間接蛍光抗体法により 100% の細胞が 503 中和エピートープを保持した JEV-E 蛋白を発現していた。クローン #10.13 細胞を 1% FBS 添加培地で培養し、培養上清から JEV-E 蛋白を粗精製した。この蛋白は、10-45% 蔗糖平衡密度勾配遠心法による解析で比重 ≈ 1.15 に単一のピークを形成した。ピーク画分を濃縮後、電子顕微鏡で観察したところ、球形の粒子構造が認められた。

(3) 昆虫細胞を用いて生産した次世代 JE ワクチンの基礎的評価：一時発現系で産生したウイルス抗原の解析

EP ワクチンの作製：pIBJEME を導入した Sf9 細胞を免疫染色した結果、E 及び prM/M 抗原が細胞内で発現していることが示された。pIBJEME を Sf9 細胞に導入後、48-72 時間目の培養液から、PEG 沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法で精製して、Sf9 細胞由来 EP ワクチン (EP-Sf9) を得た。哺乳類由来の対照として、pcJEME を導入した CHO 細胞の培養液から、上記と同様の方法で精製して、CHO 細胞由来 EP ワクチン (EP-CHO) を得た。

生化学的解析：pIBJEME を導入した Sf9 細胞の培養液を蔗糖密度勾配遠心法で分画した。E 抗原のピークは、JEV 感染 C6/36 細胞培養液で示された SHA (Slowly sedimenting hemagglutinin) 粒子のピーク及び pcJEME を導入した CHO 細胞培養液中の E 抗原と同等の密度を示した。この結果は、pIBJEME を導入した Sf9 細胞からは、E 抗原が本来の JEV 感染細胞から放出される SHA 粒子と同様に、また哺乳類細胞の prM/E 発現系で産生された EP と同様に、粒子状で放出されたことを示唆する。

pIBJEME 導入 Sf9 細胞培養液を PEG 沈殿法により濃縮後、蔗糖密度勾配遠心法で得られた EP-Sf9 の分画を免疫プロット法で解析した。E に対する抗体 (JE-10B4) あるいは prM/M に対する抗体 (J2-2F1) により、染色された E 及び prM に相当するバンドは、pcJEME 導入 CHO 細胞培養液及び F 細胞培養液から得られたバンドより低い位置であったが、糖鎖を切

断するPNGaseF処理後は同等の分子量であった。この結果は、細胞種の違いにより付加される糖鎖が異なることを示すが、骨格となる蛋白部分については、EP-Sf9は本来の抗原と同等であることを示す。なお、Mに相当するバンドについてはPNGaseF処理による泳動度の違いは認められなかったが、これはMが糖蛋白でないことに基づく。

マウスにおける免疫原性：哺乳類細胞由来のEPとしてF細胞培養液から精製したEP (EP-F) を対照に用いて、EP-Sf9の免疫原性を評価した。アジュバントとして、pcDNA3プラスミド（遺伝子アジュバントであるCpGモチーフを含む）を用いた。2回目の投与後に1:20前後の中和抗体価が認められた。EP-Sf9投与マウスはEP-F投与マウスより低い中和抗体価を示したが、有意差は検出されなかった。これらの結果から、Sf9由来蛋白ワクチンは哺乳類細胞由来蛋白ワクチンと同等の免疫原性もつことが示された。

産生量：培養液中に放出される E 抗原量を、pIBJEME 導入 Sf9 細胞と pcJEME 導入 CHO 細胞と比較した。導入後、24 時間目には同等の抗原量であったが、48 時間目には約 10 倍の差を認めた。この結果は、昆虫細胞は哺乳類細胞より高い E 抗原産生能力をもつことを示す。

D. 考察

(1) 感染性 BVDV の検出法及び製造培養法の検討

現在市販の細胞及びFBS中にはBVDV遺伝子が検出され、感染性ウイルスの存在を完全には否定できない。ワクチン製造用細胞の適合性に係る重大な問題である。そこで、細胞及びFBS中の感染BVDV検出法について検討した。その結果、検体をMDBK細胞に接種し、4日間隔で継代培養を2代行い、細胞変性を観察すると共に、2継代目の細胞を抗ペスチウイルスノクローナル抗体（BVD特異的）を用いた間接蛍光抗体法で検索することにより、感染性BVDVの有無を感度良く検出できることが示された。本方法の確立により、新規にJE-VLP持続発現細胞を樹立するための親細胞及びFBS中の感染性BVDV迷入を否定できることになり、本課題全体の根幹に係る貴重な成果と言えよう。

培養系を用いたワクチン製造工程では、複数回の培養を繰返し行うか1回の連続培養で完了するかは製造コストを大きく左右する。そこで、前回樹立したJ12#26細胞を用いて、継代無しに長期間連続培養可能か調査した。その結果、25日という長期間培養しても5回の培地交換により細胞に異常は生じず、定常的にJE-VLPを産生することが示された。しかも抗原量は培地交換後6日目には100

単位以上に達し、不活化ワクチン製造のためJEVを培養細胞で増殖させた場合と同等であった。一回培養の培地交換を行うだけでそれだけの抗原量を5回以上回収可能とすると、コストに及ぼす効果は極めて大きいと思われる。

(2) VLP形成技術によるJEワクチンの開発

東らの研究報告に示されたように、不活化ワクチンに次ぐ安価/安全なJE-VLPサブユニットワクチン開発では、発現細胞親株がバイオ医薬品製造基準に合致するかが焦点の1つである。ワクチン等の医薬品開発で履歴の明確なATCC由来細胞が多用される理由になっているが、その細胞の多くはFBSに由来するBVDVに汚染されている。VLP産生新技術開発に以前用いたRK-13細胞も汚染されていた。本課題では、この点に関して東らの研究と連携し、細心の注意を払って非汚染細胞株とFBSを選定した。

発現細胞を変更した場合、産生される抗原の量のみならず、目的とした抗原の性状も大きく変換することが多々生じる。E蛋白産生量及び中和抗原活性を一過性発現系でRK-13細胞と比較することにより、適合性を満足する親株を選定したものの、新規の持続産生細胞株でこの形質が維持される保証は無い。しかし、結果(2)項に示したように、産生量の低下・発現の不安定化・中和エピトープの消失等もなく、球形の粒子状抗原(JE-VLP)を定常的に産生する細胞クローンの樹立に成功したと思われる。

フラビウイルスにおいては、ウイルス粒子表面上の中和エピトープ形成とprM蛋白開裂によるM蛋白生成がカップリングしている。従って、この点も含めて発現抗原の性状をさらに詳細に解析する必要がある。それを踏まえて、抗原精製後マウス免疫実験に進む成果は十分に達成されたものとする。

(3) 昆虫細胞を用いて生産した次世代JEワクチンの基礎的評価：一時発現系で産生したウイルス抗原の解析

昆虫細胞の中には、Sf9細胞のクローンであるexpresSF+やショウジョウバエ由来のSchneider 2細胞(S2細胞)が開発されている。前者は米国FDAの承認を受けており、後者はハワイバイオテク社がこの細胞を用いて製造した Dengue ワクチンの臨床試験を行っている。アレルギーが懸念されたため、1990年前後のバキュロウイルスを用いたワクチン蛋白の製造には必ずしも賛同が得られたわけではなかったが、近年ではそれを上回る生産量等の利点があるためか、精力的に開発が進められてきた。

昆虫細胞の利点は、高密度培養が一般的に容易なことである。浮遊細胞培養系で1gの担体に10⁷個オーダーの細胞培養が可能であることがHigh Five細胞やSf9細胞で示され、バイオリアクターを使用すれば、mgからg単位の蛋白製造がインスリン等で示されている。今回のSf9細胞を用いた発現系では、遺伝子導入後48時間目には1 µg/mlのオーダーのJEV蛋白産生量であったため、10Lのバイオリアクターを使用した高密度培養では計算上10mgオーダーの収量となる。

本研究では、Sf9細胞由来のEPがCHO細胞由来のEPと同等の生化学的性質及び免疫原性を示し、産生量は約10倍であったため、昆虫細胞がウイルス蛋白(EP)の生産に使用できることが強く示唆された。今後、安定的にJEVのprM/E遺伝子を発現する系をexpresSF+やS2細胞で構築するための検討を行う予定である。

E. 結論

安価/安全なJE-VLPワクチン開発に必要な製造用発現細胞の適合性を確保するため、東らは、

- (1) 細胞親株及びFBS中の感染性BVDVを感度良く検出できる検査法を確立した。
 - (2) 発現細胞を継代無しに長期間連続培養して大量のJE-VLPを回収できる方策を示した。
- 一方、JEはブタ等哺乳類中間宿主を吸血した昆虫類の蚊が媒介することに着目し、小島ら及び小西らは以前から研究開発してきたウイルス様粒子(VLP)/細胞外粒子(EP)産生技術を用いて、
- (3) JE-VLPを大量に、かつ、持続的に産生する安定な細胞クローン株をATCC由来哺乳動物細胞親株から樹立することに成功した。
 - (4) JE-EPを、バキュロウイルス発現系を用いることなく、昆虫細胞において高効率で生産できることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Konishi E, Kitai Y and Kondo T: Utilization of complement-dependent cytotoxicity to measure low levels of antibodies: Evaluation in a model of Japanese encephalitis nonstructural protein 1. Clin Vaccine Immunol, 15:88-94, 2008.

Yamanaka A, Kosugi S and Konishi E: Infection-enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. J Virol, 82: 927-937, 2008.

Ishikawa T, Takasaki T, Kurane I, Nukuzuma S, Kondo T and Konishi E: Co-immunization with West Nile DNA and inactivated vaccines provides synergistic increases in their immunogenicities in mice. Microbes Infect 9:1089-1095, 2007.

Kitai Y, Shoda M, Kondo T and Konishi E: Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections in equine sera. Clin Vaccine Immunol, 14:1024-1031, 2007.

2. 学会発表

Ishikawa T, Kitai Y, Kondo T, Mason P W, Konishi E: Current status of Japanese encephalitis virus circulation in Japan: surveys of antibodies to NS1 and implications of deletions in the 3'-untranslated region. Forty-First Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, Baltimore, July 2007.

岡本成史、吉井洋紀、小島朝人、石川豊数、明石満、高橋理明、山西弘、森康子：ポリ-γ-グルタミン酸ナノ粒子の日本脳炎ワクチンアジュバントとしての可能性。第11回日本ワクチン学会学術集会、2007年12月。

岡本成史、吉井洋紀、小島朝人、石川豊数、明石満、高橋理明、山西弘一、森康子：アジュバントとの併用による効果的な日本脳炎ワクチンの1回接種法の検討。第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月。

井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林昌宏、濱野正敬、高崎智彦、小西英二：ブタにおける日本脳炎DNA/蛋白ワクチン混合針無投与法の有用性評価。第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月。

桑原三和、小西英二：昆虫細胞を用いた Dengue 蛋白ワクチン大量生産系確立の基礎的検討。第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月。

北井陽子、近藤高志、小西英二：補体を利用した日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法の開発。第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月。

山中敦史、小西英二：Dengue ワクチンの防御効力を評価するマウスモデル。第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月。

酒井陽平、小西英二：インドネシアにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の調査。第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月。

糸田川優、小西英二：抗 Dengue 1 型マウスモノクローナル抗体を用いた中和活性及び感染増強活性の解析。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月。

糸田川優、小西英二：中和活性または感染増強活性を示す抗 Dengue 1 型マウスモノクローナル抗体。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月。

井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林 昌宏、濱野正敬、高崎智彦、宇田川晴英、向田嘉宏、小西英二：ブタ流産予防を目的とした日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合投与方法及び針無投与方法の併用効果。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月。

北井陽子、近藤高志、小西英二：新しい日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法：補体媒介性細胞傷害の利用。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月。

山中 敦史、小西 英二：ウイルス血症に対する防御を評価するマウスモデルの確立：Dengue 2 型ウイルスを用いた予備的検討。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

「フラビウイルス感染症ワクチンおよびフラビウイルス感染症ワクチン用アジュバント」、平成 19 年 12 月 21 日出願（発明者：森康子、小島朝人、明石満、石川豊数、他）。

「ウエストナイルウイルスワクチンおよびその製造方法」、平成 19 年 11 月 7 日出願（発明者：小島朝人、高橋秀宗、石川豊数）。

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

転写制御因子ネットワークによる次世代の動脈硬化予 防治療薬開発に関する基礎的研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
研究者 最上知子

動脈硬化性疾患とそのリスクを高めるメタボリックシンドロームについて、複数のリスクをコントロールする新たな予防治療薬への貢献をめざし、ステロール・胆汁酸に感受性の転写因子/核内受容体による病態制御メカニズムの解明を試みた。血中HDLの大部分を産生する肝の膜トランスポーターABCA1について、肝特異的な遺伝子プロモーターを見いだし、コレステロールによる制御を明らかにした。加えて転写因子 AP2 による ABCA1 発現制御、スタチンのアポ A-I 産生促進の機序解明、核内受容体 LXR 選択的リガンド Riccardin C の誘導体展開により、HDL 上昇薬の基盤に貢献した。また血管病態の制御に関して、炎症性 serum amyloid A タンパクと HDL 形成の関わり、生理的病的脂質蓄積時の脂肪滴蛋白 ADRP の挙動を解析し、甲状腺ホルモン受容体の血管平滑筋石灰化抑制の作用点として TGF- β 3 およびデコリンを同定した。さらに胆汁酸の肥満抑制に関して、胆汁酸吸着樹脂の解糖系遺伝子発現制御を見いだすとともに、FXR を制御する胆汁酸誘導体の合成を行った。

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 佐藤陽治
- (2) 興和(株)東京創薬第一研究所
佐藤文泰、山崎裕之
- (3) 田辺三菱製薬(株)薬理研究所
坂井薫、喜多田好、島田浩志、川端佳奈美
- (4) あすか製薬(株)創薬研究センター 青塚知士
- (5) 名古屋市立大学大学院医学研究科 横山信治
- (6) 昭和大学薬学部 板部洋之
- (7) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所
影近弘之
- (8) 広島国際大学薬学部 宇根瑞穂

A. 研究目的

心筋梗塞・脳卒中などの動脈硬化性疾患は、日本人の死亡統計で大きな位置を占める。さらに、動脈硬化になりやすい病態メタボリックシンドロームの患者数増加が社会問題化しており、重点的な対策が必要とされる。本研究では (1) 低 HDL (高比重リポタンパク)血症、(2) 動脈血管の石灰化、炎症反応および脂質沈着、(3) 動脈硬化になりやすい病態であるメタボリックシンドロームの最主要の危険因子「肥満」を対象とする。コレステロール/胆汁酸に感受性の転写因子/核内受容体を介した病態の制御メカニズムを明らかにすることにより、複数の病態をコントロールする、動脈硬化予防治療の新たな手法確立に貢献する。

心疾患患者の1/3はLDLコレステロールが正常である。HDL低下は日本人の10~20%に認められ、動脈硬化の発症率を高める。HDLは細胞からコレステロールを引き抜き、粥状硬化巣を積極的に退縮させる機能を持つことから、動脈硬化症の予防と治療にHDL上昇薬が待望されている。HDL上昇にはHDL欠損症の原因遺伝子である膜トランスポーターABCA1が最有望の標的である。本研究では、血中HDLの大部分を直接生産する肝ABCA1について、肝特異的なプロモーターを見いだすとともに、スタチン、胆汁酸吸着樹脂、フィブラートによるHDL上昇の機構を明らかにする。またHDL生産を促進する核内受容体LXRについて制御リガンドを創製し、強力なHDL上昇薬の可能性を高める。

動脈硬化の進展には、血管壁での細胞内脂質沈着、細胞増殖、食作用など多様な反応の集積が関わる。本研究では、「脂肪滴形成」や「炎症・食作用」、「動脈石灰化」の新たな制御を明らかにし、冠動脈疾患および動脈瘤等の予防に貢献する。

「肥満」は、「低HDL血症」や高トリグリセリド、高血圧や糖尿病など複数の病態と重責すると動脈硬化リスクを相乗的に増加させる。最近、胆汁酸のエネルギー消費促進作用やコレステロール低下薬「胆汁酸吸着樹脂」の抗肥満・抗糖尿病作用が明らかになり、肥満・糖尿病と胆汁酸の意外な関係が脚光を浴びている。本研究では機序の解明とともに制御に有効な

胆汁酸誘導体を合成することにより、肥満抑制の可能性を探る。

B. 研究方法

B-1 HDL 産生の促進

血中 HDL の大部分は肝の ABCA1 が産生する。肝独自の ABCA1 遺伝子転写調節の機構を、末梢細胞とは異なった独自のコレステロール応答に着目して解析した。コレステロール応答は、ラットに胆汁酸吸着樹脂コレステリド/プラバスタチンを投与して肝コレステロール低下させ、あるいはラット肝由来細胞 McARH7777 をスタチンの一種コンパクチンやステロールで処理して検討した。肝特異的な ABCA1 転写産物とそのプロモーターを見だし、コレステロール応答配列を同定した。末梢細胞における ABCA1 発現調節については、末梢型プロモーターの LXR 非依存の活性制御から検討した。

HDL 上昇作用を示す臨床薬の作用機序については、HMG-CoA 阻害薬ピタバスタチンの HDL 生産、代謝ならびに HDL クリアランスに及ぼす影響を解析して検討した。また TG 低下薬フェノフィブラートについては、HDL 低下と相関する血糖低下作用の解明を試みた。

LXR アゴニストは HDL 上昇作用を示す。Riccardin C は天然由来の環状フェノール誘導体であり、最上(本研究課題研究総括)らによって、LXR α 選択的なアゴニストであることが示されている。Riccardin C の立体構造(活性コンフォメーション)および構造活性相関を解明するために、Riccardin C の効率的合成法の開発と、新規誘導体の設計、合成と LXR リガンド活性を検討した。

B-2 炎症・脂質沈着・動脈石灰化と動脈硬化

全身性炎症性蛋白質 serum amyloid A(SAA)の HDL 新生反応と細胞コレステロール除去への関わりについては、1)SAA による HDL 新生反応の *in vivo* での検討を、(1)ipopolysaccharide (LPS)の皮下注射により SAA 産生を誘導したマウスで SAA-HDL の産生を解析する。コレステロール負荷などによる動脈硬化症の発症を検証するとともに、ABCA1 欠損など HDL 産生異常のあるモデルを用いて解析する。(2) SAA による HDL 産生反応と通常の apolipoprotein による反応を *in vitro* で体細胞と肝細胞で比較解析する。2)ABC 蛋白質を介した細胞の生体防御機能の制御を検討する。体細胞レベルで確認した ABCA7 の貪食促進作用を、ABCA7 欠損マウスと ABCA7 が

高発現する ABCA1 欠損マウスを用いて、*in vitro* で検証する。

細胞組織内の脂肪滴形成機構は、正常 C57BL/6 マウスあるいはコリン・メチオニン欠乏食を与えた NASH モデルを用い、各組織の ADRP タンパクおよび mRNA 発現、肝における ADRP の細胞内局在を解析し検討した。

動脈石灰化は甲状腺ホルモンによる抑制の機序については、合成型表現型および収縮型表現型のラット大動脈平滑筋細胞(RAOSMC)を T3 で処理し、あるいは甲状腺ホルモン合成阻害剤メチマゾール投与により調製した甲状腺機能低下症モデルラットの大動脈平滑筋を用いて、mRNA 発現を定量性 RT-PCR ならびに GeneChip RG-U34A (Affymetrix)により解析した。

B-3 胆汁酸による糖・脂質代謝制御

胆汁酸吸着樹脂(田辺三菱製薬(株)で合成したコレステリド(2-methyl imidazole-epichlorohydrin copolymer))を用い、高脂肪食負荷 KKAY マウスにおける肝臓の核内受容体 FXR 活性制御、糖代謝に関わる遺伝子への影響を評価した。また、FXR について生理リガンド胆汁酸の構造と活性について検討を行った。天然胆汁アルコールは各種下等脊椎動物胆のう胆汁より単離精製し、各種胆汁酸メチル誘導体は合成により調製した。

(倫理面への配慮) 当該研究においては、ヒト組織を研究材料とする実験、ヒト遺伝子の解析は行っていない。動物の取り扱いには「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」等、各研究機関の指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を行った。

C. 研究成果

C-1 HDL 産生の促進

1) 肝 ABCA1 発現を制御する特異的プロモーターの発見 [最上]

肝の膜トランスポーター ABCA1 は抗動脈硬化性リポタンパク HDL の生産に最大の役割を持つ。ラット肝および肝由来細胞 McARH7777 の ABCA1 タンパクおよび mRNA の発現は、胆汁酸吸着樹脂/スタチン処理によるコレステロール低下で上昇、ステロール処理で低下した。この応答は、小腸や繊維芽細胞とは逆の方向を示し、肝特異的な ABCA1 発現制御機構の存在が強く示唆された。5' RACE 解析により、肝に

はエクソン 1 からの転写される末梢型 ABCA1 mRNA に加えて、エクソン 2 から転写が開始される肝型 ABCA1 mRNA が主に存在していることが判明した。肝由来細胞をスタチンで処理すると、末梢型 ABCA1 mRNA が低下し、肝臓型が増加した。エクソン 1 上流の末梢型プロモーターは LXR により制御され、ステロールで活性化され、スタチンで活性が低下した。これに対し、エクソン 2 上流に見いだした肝臓型プロモーターは、スタチンにより活性化され、ステロールで抑制された。肝臓型プロモーターのスタチン/ステロール応答は -221 領域に存在する sterol responsive element (SRE) が担うことを見だし、EMSA アッセイによりこの配列に SREBP-2 が結合することを確認した (J Biol Chem 282: 21090-21099, 2007)。

2) 転写制御因子 AP2 による ABCA1 発現促進 [横山]

末梢細胞において、ABCA1 遺伝子はオキシステロール受容体 LXR により細胞コレステロールレベルを感知して発現が促進されるが、LXR とは独立に転写制御される現象がいくつか報告されている。これらについて検討し、細胞周期制御を通じてその増殖を制御する転写制御因子 AP2 が ABCA1 の遺伝子発現を抑制的に制御することがわかり、これが AP2 のリン酸化を通じて行われることが分かった。これは、ABCA1 が細胞の基本的機能と本質的に関わっていることを示している (Circulation Research 101: 156-165, 2007)。ABC 蛋白質による HDL 新生反応についてのこれまでの我々の研究成果について review 論文がまとめられた (Annals of Medicine 40: 29-38, 2008)。

3) HMG-CoA 還元酵素阻害薬の HDL 代謝調節 [佐藤文]

HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) による HDL 上昇機構を解明するために、ピタバスタチンの HDL 代謝調節作用を解析した。ピタバスタチンはヒト肝ガン細胞 HepG2 において、HDL 主成分のアポ A-I mRNA 発現と分泌を促進するとともに、HDL を形成する ABCA1 mRNA 発現を促進した。また、HDL 粒子の成熟化を促進する LCAT mRNA 発現を上昇、CETP mRNA 発現を抑制した。アポ A-I は PPAR α により発現誘導されることが知られているが、ピタバスタチンは PPAR α のリガンドとして機能しないことを確認した。また、ピタバスタチンはアトルバスタチンとは異なり、モルモットにおいて HDL コレステロールのクリアランスを上昇させなかった。

4) フェノフィブラートの HDL 上昇作用 [青塚]

フェノフィブラートは PPAR α アゴニストであり、強力な中性脂質、LDL コレステロール、血糖低下作用とともに HDL 上昇作用を示す。低 HDL 血症は高血糖と相関することから、血糖低下作用の機序を解析した。フェノフィブラートはマウスにおいて解糖系でアセチル CoA 生成に関与する pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4)、脂肪酸 β 酸化酵素 enoyl-CoA hydratase 1 (ECH1) およびコレステロールアシル化酵素 acetyl-CoA acyl-transferase 2 (ACAT2) の mRNA を対照群と比較して、それぞれ 69.8、2.3 及び 1.5 倍増加させ、解糖系の亢進作用が血糖低下作用の一部に関与することが推察された。

5) 天然物をリードとした新規 LXR リガンドの創製 [影近]

LXR は HDL 産生を担う ABCA1 および ABCG1 の発現を直接促進する。LXR α 選択的アゴニストである Riccardin C の立体構造や構造活性相関を解明するために、その効率的合成法を検討した。4つの芳香環からなる鍵中間体の合成法を確立し、その環化反応の条件を検討し、Riccardin C の O-メチル体の合成に成功した。さらに、Riccardin C の立体構造を吟味し、その部分構造を模倣する非環式誘導体を設計し、化合物 40 種を合成した。LXR α および β を用いた転写活性化試験により、幾つかの化合物に弱いながらも Riccardin C 類似の LXR α 選択的アゴニスト活性が認められた。

C-2 炎症・脂質沈着・動脈石灰化と動脈硬化

1) 細胞内コレステロール代謝平衡と炎症反応、細胞の食食作用の制御 [横山]

ABCA1 を介した HDL 新生反応は種々のヘリックス型アポリポ蛋白質によって起こり、その特異性は低い。それらの中で、全身性炎症性蛋白質 serum amyloid A (SAA) はアポリポ蛋白質と同様の界面活性ヘリックスからなる物理化学的構造を持つ。SAA による HDL の新生反応を、in vivo で観察した。ABCA1 欠損と野生型マウスに LPS を注射して炎症反応を起こすと、いずれのマウスでも肝臓の SAA 産生分泌が誘導される。野生型マウスでは SAA-HDL が大量に産生され血漿中に現れるが、ABCA1 欠損マウスでは HDL が形成されず血漿中に SAA は殆ど検出できない。一時培養肝細胞による実験で、ABCA1 欠損では SAA は遊離の状態で分泌されていることがわかり、apoA-I による

HDL 新生と類似して、SAA による HDL 新生も ABCA1 とのオートクリン作用により起こることが示された。(J. Lipid Res. 49: 386-393, 2008)。

ABCA7 は ABCA1 と高い相同性をもち、強制発現させると apoA-I などに反応して HDL を産生するが、内因性 ABCA7 は細胞表面に発現せず HDL 産生を起ささない。転写制御は ABCA1 とは異なり SREBP 依存性にステロールによる抑制が起こり、細胞の貪食作用を制御することが判明した。この機能と関連した ABCA7 の in vivo に於ける役割を解明するために ABCA7 欠損マウスを MGH から導入し、そのコロニーの確立を行っている。

2) 細胞内組織内の脂肪滴形成の機構と制御

[板部]

細胞内に脂肪が蓄積し脂肪滴が形成される機序、退縮の機構は全身の脂質代謝調節の基盤であるとともに脂質蓄積疾患に深く関わる。脂肪滴局在タンパク質 ADRP の生理機能、病的変化への関わりを知る目的で、マウス各組織における発現量および細胞内局在について検討した。ADRP は、mRNA、タンパク質ともに肝臓において非常に発現レベルが高いことが明らかになった。臓器間の mRNA レベルとタンパク質発現レベルの相関はなく、脂質供給がないと ADRP は分解されてしまう性質が反映していると考えられた。肝臓の ADRP は、絶食後のマウス肝では3倍以上に増加しており、脂質代謝変動に伴って、脂質蓄積と ADRP 誘導が生理的条件下でも起こっていることがわかった。肝の脂肪滴をショ糖密度勾配遠心で分画したところ、絶食した肝では、やや高比重の(つまり脂質含量の低い)画分に ADRP が現れ、脂肪蓄積時に異なる状態の脂肪滴の形成が起こることを見出した。中間比重画分には ADRP と CRP78/BiP が共存していた。このような細胞内部分布は、コリン・メチオニン欠乏食飼育した非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルのマウス肝においても観察された。

3) 動脈血管の石灰化を制御する遺伝子転写因子に関する研究 [佐藤陽]

動脈石灰化の機序解明をめざし、甲状腺ホルモン受容体の血管平滑筋細胞での石灰化抑制作用における作用点を検討した。生理的濃度の甲状腺ホルモン(27pM free T3)により合成型ラット大動脈平滑筋細胞(RAOSMC)において TGF- β 3 の遺伝子発現が上昇すること、TGF- β 3 の遺伝子発現は甲状腺機能低下症ラットの血管平滑筋では正常ラットと比較して低

下することが観察された。また甲状腺ホルモンの TGF- β 3 の発現上昇作用は、RNAi を用いて α 型甲状腺ホルモン受容体の発現を 30%まで低下させたところ消失した。

甲状腺機能低下症および正常ラットの大動脈平滑筋を用いて GeneChip による網羅的遺伝子発現解析を行い、パスウェイ解析を行うことにより、TGF- β 3 と関連した遺伝子発現変動を抽出した。*Colla1*、*Sparc*、*Vcam1* の発現上昇および *Dcn* と *Casp1* の発現低下が検出された。骨石灰化と関連する *Colla1* と *Dcn* を定量性 RT-PCR で検討し、*Dcn* について甲状腺ホルモンによる発現低下が確認された。

C-3 胆汁酸による糖・脂質代謝制御

1) 胆汁酸吸着樹脂の糖代謝制御 [坂井]

胆汁酸吸着樹脂の抗肥満・抗糖尿病作用の機序解明をめざし、2型糖尿病モデルの KKAY マウスを用いて糖代謝遺伝子の発現について検討した。1、1.5%のコレスチミド投与により、肝臓における SHP の発現減少と *cyo7 α* の発現上昇が観察され、コレステミドにより肝臓における FXR 活性が抑制され、胆汁酸合成の負の制御が解除されたことが示された。肝臓における解糖系の律速酵素の1つである pyruvate kinase の遺伝子発現に関しても、約2倍の増加が観察され、コレステミドの抗糖尿病作用のメカニズムとして、FXR-SHP を介した肝臓における糖代謝関連の遺伝子発現制御が示唆された。

2) 胆汁酸を基本骨格とする FXR リガンドの探索と創製 [宇根]

胆汁酸を内因性リガンドとする核内受容体 FXR は胆汁酸の生合成、分泌、吸収を転写レベルで統括し、糖質および脂質代謝にも関与することが明らかとなっている。新たな FXR 制御リガンドの創製をめざし、天然胆汁酸類縁体、および胆汁酸を化学修飾した胆汁酸同族体の FXR リガンド活性を検証した。胆汁酸の A/B 環の配座が胆汁酸(A/B cis)と同じ 5 β -cyprinol は FXR を活性化したが、trans 型の 5 α -cyprinol は内因性リガンド CDCA 及び合成 FXR リガンド GW4064 による活性化を競合的に阻害し、アンタゴニスト活性を示した。しかし、CDCA の 5 α -isomer、アロケノデオキシコール酸(Allo-CDCA)は CDCA とほぼ同等の活性を認めた。また、内因性リガンドとして最も活性の強い CDCA の3位への疎水性置換基を導入すると、3 β -位へのメチル基導入により活性は 60%程度減弱したが、3 α -位へのメチル基の

導入は活性にはほとんど影響を与えなかった。この置換は 3β位への水酸基転移を引き起こす。そこでリトコール酸の 3β-エピマーを合成し活性を測定したところ、リトコール酸の半分程度に低下した。したがって、3α-位メチル基には活性を高める効果があると推定された。

D. 考察

D-1 HDL 産生の促進

1) 肝 ABCA1 発現を制御する特異的プロモーターの発見 [最上]

HDL は低下すると動脈硬化のリスクが上昇する。そのリスクは糖尿病や高血圧と重複するとさらに高まり、メタボリックシンドロームの危険因子の一つとなっている。本研究では、血中 HDL の8割を生産する肝 ABCA1 について、肝での発現を特異的に制御する肝型プロモーターを見いだした (J Biol Chem 282: 21090-21099, 2007)。この発見は新薬開発に大きく貢献できると考えている。

末梢組織の ABCA1 は細胞内にコレステロールが蓄積すると LXR 活性化を介して発現が上昇し、細胞外に HDL としてコレステロールを放出する。一方、肝は末梢から輸送される HDL コレステロールを取り込み、胆汁酸に転換して排出する役割を担う。肝 ABCA1 はコレステロールの乏しい pre β HDL 粒子を形成し、末梢組織にコレステロールアクセプターとして供給する役割を持つことが示されている。本研究で肝 ABCA1 はステロール応答性 SRE をもつプロモーターにより発現が制御されることを明らかにした。したがって、肝 ABCA1 はコレステロール蓄積により発現が低下することが予想されるが、この応答は、末梢へのコレステロール再輸送を回避する役割をもつと考えられる。肝型と末梢型のプロモーターが、スタチン、胆汁酸吸着樹脂、高コレステロール食にどのように応答しているのか、in vivo での解析が必要と考えられる。

2) HMG-CoA 還元酵素阻害薬の HDL 代謝調節 [佐藤文]

スタチンは臨床において HDL を上昇させることが明らかになっている。ピタバスタチンは肝細胞において、主成分のアポ A-I 産生の亢進、肝臓型 ABCA1 発現を促進させた。さらにピタバスタチンは、LCAT mRNA 発現を上昇、CETP mRNA 発現を抑制した。LCAT は HDL 粒子にコレステロールを付加することで HDL 粒子の成熟化を促進し、CETP は HDL から LDL へ

のコレステロール移送を促進し、肝での発現低下が HDL 上昇につながる事が知られている。したがって、これらの変化が HDL 上昇に寄与することが示唆され、さらなるメカニズムの解明が望まれる。同じ HMG-CoA 還元酵素阻害剤アトルバスタチンは HDL コレステロールのクリアランスを上昇させ、HDL 低下をきたすことが知られるが、ピタバスタチンについてはクリアランス上昇は認められなかった。

3) フェノフィブラートの HDL 上昇作用 [青塚]

高トリグリセリド血症では脂肪細胞より分泌される TNF α がインスリン反応性を低下させ、肝や骨格筋での糖取込を低下させる”Lipotoxicity”仮説が提唱されている。Pyruvate dehydrogenase 4 (PDK4) は解糖系において pyruvate dehydrogenase を活性化するリン酸化酵素である。対照群の肝臓における PDK4 の mRNA は、骨格筋の PDK4 の mRNA の約 1/90 であり、肝臓での糖分解の寄与は小さいものと推察される。しかし、フェノフィブラートの投与により、肝臓の解糖系の活性は骨格筋のレベルに相当するまで亢進する可能性が示唆され、”Lipotoxicity”に加えてフェノフィブラートの血糖透過作用に寄与することが推察された。

4) 天然物をリードとした新規 LXR リガンドの創製 [影近]

Riccardin C の骨格を合成する効率的な方法を確立しつつある。鍵反応である環化反応の収率向上が必要であるが、最終工程の脱メチル化は通常の方法で進行すると思われるので、この方法を用いて、様々な誘導体の合成が可能である。

また、環構造をもたない Riccardin C の誘導体を見いだした。現在合成した化合物には、活性の向上が望まれるが、非環式誘導体に類似の活性があることは、多様な構造へと展開できると考えられる。

D-2 炎症・脂質沈着・動脈石灰化と動脈硬化

1) 細胞内コレステロール代謝平衡と炎症反応、細胞の食食作用の制御 [横山]

全身性炎症反応と動脈硬化の接点を探索するには、(1)全身性炎症性蛋白質 serum amyloid A (SAA) により形成される HDL の細胞コレステロール搬出機能など、動脈硬化症の進展抑制機能を検証、(2)SAA による HDL 新生がおこる病態と機序の解析を行い、SAA-HDL の増加が動脈硬化症や全身性炎症に果たす役割を検討、(3)SAA による HDL 新生反応の特

徴を解析し、急性・慢性の炎症時のコレステロール代謝平衡について明らかにする必要があると考えられる。本研究により、ABCA1 や ABCA7 による細胞ステロール代謝制御は、生体防御反応に関わる細胞の基本的機能に深く関わる事が分かり、動脈硬化症の予防・治療法の研究に新しいアプローチの可能性が広がった。

2) 細胞内組織内の脂肪滴形成の機構と制御

[板部]

本研究により、肝臓が ADRP タンパク質の主要発現臓器であり、ADRP タンパク質と mRNA 発現量は臓器により一致しないことを見いだした。また、絶食時のように生理的な、NASH のような病的な肝脂質蓄積時のどちらでも ADRP タンパク質が発現増加した。ADRP は肝の脂肪滴だけでなく膜画分にも存在し、脂肪蓄積時には中間比重画分にも存在していた。中間比重画分の粒子は ADRP と、GRP78/Bip が共存しており、ER 由来の可能性が考えられた。

細胞内脂肪滴の形成機構に関しては、ER 発芽説あるいは細胞質内の ADRP がコアとなって形成される説がある。本研究により、ADRP が肝の脂肪蓄積量変動に伴い動的に変動し、多様な比重の脂肪滴が形成されることを見いだした。中間比重の ADRP 含有粒子の実態は ER 由来の初期の脂肪滴と推定される。この粒子の形成因子を探索し、脂肪滴形成機構を解明し、組織内脂肪蓄積の制御や NASH の治療法、動脈硬化巣の泡沫細胞などの病変制御につなげることができればと考えている。

3) 動脈血管の石灰化を制御する遺伝子転写因子に関する研究 [佐藤陽]

生理的濃度の甲状腺ホルモンが血管平滑筋に直接作用して TGF- β 3 の遺伝子発現を促進することは、合成型および収縮型の RAOSMC での発現促進、甲状腺機能低下症ラットの血管平滑筋での低下より示唆された。DNA マイクロアレイ-パスウェイ解析により、*Colla1*、*Sparc*、*Vcam1* の発現上昇および *Dcn* と *Caspl* の発現低下が検出された。

Colla1 は I 型コラーゲンの α 鎖をコードしている。動脈におけるコラーゲンは組織の強度に寄与しているが、I 型コラーゲンは骨形成における石灰化の主要な基質としても重要である。*Dcn* は非コラーゲン性骨基質の一つであるデコリン (decorin; bone proteoglycan II) をコードする。また、デコリンは TGF- β に結合し、その活性調節を抑制することが報

告されている。デコリンは、ヒト粥状硬化巣の石灰化部位に高発現していることが知られているとともに、大動脈平滑筋細胞の石灰化を誘導することが知られている。したがって、甲状腺ホルモンの *Dcn* の発現阻害作用は、その血管石灰化阻害作用と矛盾しない。本分担研究者らのこれまでの研究によって、甲状腺ホルモンによる血管石灰化抑制作用には、甲状腺ホルモンの MGP 遺伝子発現促進作用が関与することが明らかにされているが、これに加え、甲状腺ホルモンのデコリン発現阻害作用も寄与していることが考えられる。

D-3 胆汁酸による糖・脂質代謝制御

1) 胆汁酸吸着樹脂の糖代謝制御 [坂井]

胆汁酸吸着樹脂のコレステリドは、抗肥満・インスリン抵抗性改善作用を示し、抗糖尿病作用を示す。本研究の成果より、コレステリドは肝臓への胆汁酸再吸収を抑制することで、胆汁酸の受容体 FXR の活性を抑制し、その標的遺伝子 SHP 発現を低下させ、SHP により負の制御を受ける *cyo7 α* の発現上昇を引き起こしたと考えられる。SHPko マウスは脂肪肝やインスリン抵抗性を改善し、SHP は糖・脂質代謝に広く作用していることが知られる。そこでコレステリドがインスリン抵抗性改善作用を示した KKAy マウスを用いて検討したところ、糖代謝に関連する解糖系律速酵素 pyruvate kinase の遺伝子発現増強が観察された。したがって胆汁酸吸着樹脂は、胆汁酸の再吸収を抑制することで、糖代謝遺伝子発現に影響を与え、血清コレステロール低下のみならず、抗糖尿病・抗肥満作用を示すことが期待される。

2) 胆汁酸を基本骨格とする FXR リガンドの探索と創製 [宇根]

FXR の活性を制御する新たなリガンドの創製をめざして検討を行い、胆汁酸のもつステロイド母核の重要性を示した。3 β 位へのメチル基導入は活性を著しく低下させ、3 α 位への導入は 10% 低下を引き起こした。リコール酸の 3 β エピマーの著しい活性低下から、3 β 位への水酸基転移は活性低下を引き起こすと予想され、3 α 位へのメチル基導入は活性を高める効果があると推定される。現在 UDCA の 3 位へのメチル基導入をすすめており、活性を高める効果が期待できる。天然胆汁酸をシードとした新しい化合物の創製が期待される。

E. 結論