

有小川培地上で非含有培地とほとんど等しく増殖したこと、ワクチン中に有毒結核菌は存在しないこと、接種 12 週後の臓器からもプラスミドが検出されたことにより、その安定性、安全性が示された。

4) 本邦で使用されている slc:Hartley の TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-18 遺伝子のクローニングを行ったところ、既に報告されている配列とほぼ同様であった。IL-2 遺伝子では、1 アミノ酸変異の遺伝子多型が認められた。

5) BCG Tokyo ワクチンは、アカゲサル結核に対して、防御効果を示した。

III. TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

RSV 感染 pDC では、IFN- α 転写因子 IRF-7 の活性化のプロセスが RSV 由来蛋白によって阻害され、IFN- α の産生を誘導するには IRF-7 活性化抑制解除の工夫が必要と思われる。CpG DNA アジュバントの開発には、pDC の状態に応じた創薬設計が必要であると思われる。

IV. 劇症型連鎖球菌の病原因子の特定

Nga 等の劇症型 A 群連鎖球菌由来の毒素が、好中球を破壊し、免疫細胞の誘導を抑制しているため、これらの毒素が劇症型 A 群連鎖球菌感染症の発症防御抗原として考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naito S, Maeyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant. *Vaccine*, 25, 8762-8770, 2007
- 2) Fujita Y, Okamoto Y, Uenishi Y, Sunagawa M, Uchiyama T and Yano I. Molecular and supramolecular structure related differences in toxicity and granulomatogenic activity of Mycobacterial cord factor in mice. *Microb. Pathog.* 43(1):10-21, 2007
- 3) Kai M, Fujita Y, Maeda Y, Nakata N, Izumi S, Yano I and Makino M. Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in *Mycobacterium leprae*. *FEBS Lett.* 581(18):3345-3350, 2007.
- 4) T. Katsube, S. Matsumoto, M. Takatsuka, M. Okuyama, Y. Ozeki, M. Naito, Y. Nishiuchi, N. Fujiwara, M. Yoshimura, T. Tsuboi, M. Torii, N. Oshitani, T. Arakawa, and K. Kobayashi. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in mycobacteria. *J. Bacteriol.* 2007; 189:8241-8249.
- 5) N. Nakata, N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, K.

Kobayashi, and S. Maeda. Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure of glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 2008; 190:1064-1071.

6) N. Fujiwara, N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* (In press).

7) Chiba, T., Takii, T., Nishimura, K., Yamamoto, Y., Morikawa, H., Abe, C., and Kikuo Onozaki: Synthesis of new sugar derivatives from *Stachys sieboldi* Miq and antibacterial evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17(9), 2487-91 (2007).

8) Yamamoto S and Yamamoto T: Historical review of BCG vaccine in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 331-336 (2007).

9) Yamamoto T, Lasco TM, Uchida K, Goto Y, Jeevan A, McFarland C, Ly L, Yamamoto S and McMurray DN.: *Mycobacterium bovis* BCG vaccination modulates TNF-alpha production after pulmonary challenge with virulent *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *Tuberculosis (Edinb)*. 87:155-65 (2007).

10) Sugawara I, Li Z, Sun L, Udagawa T, Taniyama T. Recombinant BCG Tokyo (Ag85A) protects cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) infected with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 87: 518-525, 2007.

11) 大澤陽子, 伊保澄子, 藤枝重治. 花粉症に対する DNA ワクチン療法. *アレルギーの臨床*, 27 (12), 965(67)-969(71), 2007.

12) N. Hosono, S. Kishi, S. Iho, Y. Urasaki, A. Yoshida, H. Kurooka, Y. Yokota, T. Ueda. GSTM1 induces dexamethasone resistance by NF-kB p50/Bcl-3 pathway in T-ALL. Submitted.

13) Takahashi Y, Kumada H, Hamada N, Haishima Y, Ozono S, Isaka M, Yasuda Y, Tochikubo K, Umemoto T. Induction of immune responses and prevention of alveolar bone loss by intranasal administration of mice with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and recombinant cholera toxin B subunit. *Oral Microbiology Immunology*: 22: 374-380, 2007

14) Tatsuno I, Sawai J, Okamoto A, Matsumoto M, Minami M, Isaka M, Ohta M, Hasegawa T. Characterization of the NAD-glycohydrolase in streptococcal strains. *Microbiology*:153:4253-4260, 2007

15) M, Isaka., Y, Zhao., E, Nobusawa., S, Nakajima., K, Nakajima., Y, Yasuda., H, Matsui., T, Hasegawa., J, Maeyama., K, Morokuma., K, Ohkuma., K, Tochikubo. Protective effect of nasal immunization of influenza virus hemagglutinin with recombinant cholera toxin B subunit as a mucosal adjuvant in mice (accepted)

16) T, Kutsuna., A, Nakamura., M, Kato., H, Morita., Y, Iwashima., M, Isaka., T, Joh. Systemic and mucosal immune responses in mice after intranasal immunization with pneumococcal polysaccharide conjugate vaccines with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant (accepted)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：特許出願中：瀧井猛将 他、結核菌に抗菌活性を示す N-アシル-D-ヘキソサミニルジアルキルジチオカーバメイト誘導体

2. 実用新案登録・その他：該当なし

クロイツト・フェルト・ヤコブ病 (CJD) 特異的な、 簡便かつ迅速髄液検査法の開発

所 属 国立感染症研究所 感染病理部
研究者 飛梅 実

プリオン病の生前診断は、臨床所見から判断されるが、他の疾患との共通症状も多く、客観的診断材料を提供する検査法が存在しない。本研究では、プリオン病特異的に脳脊髄液中に放出される疾患マーカーを高精度に検出する系の開発を目指す。

分担研究者

- 1) 国立感染症研究所 感染病理部、
佐多 徹太郎、高橋 秀宗
- 2) 北海道大学大学院医学研究科・大場 雄介
- 3) (株) 苫小牧臨床検査センター・伊藤 禎司

A. 研究目的

本研究で申請者らは、CJD に代表されるヒトプリオン病を早期にかつ特異的に診断しうる検査法を開発する。

プリオン病の一つであるクロイツト・フェルト・ヤコブ病 (CJD) は、年間 100 万人に 1 人の発症率の疾患であり、治療法は存在しない致死性疾患である。本邦では毎年 120 人程度が報告されている。臨床症状は、他の神経症状等を伴う疾患と重複するものが多い。また、CJD の確定診断は脳組織からのプリオン蛋白質の検出により下されるため、生前の確定診断は困難である。CJD 発症の原因となるプリオン蛋白質は伝達性 (感染性) で、不活化が難しく手術機器等を介した水平伝播が懸念される。食人に起因する kuru 病、狂牛病 (BSE) に由来するバリエーション CJD (vCJD) や硬膜移植における医原性 CJD (iCJD) の解析からプリオン暴露後、臨床症状を呈するまで長期の潜伏期が存在することが報告されている。実際に海外では、狂牛病 (BSE) に由来するバリエーション CJD (vCJD) 罹患患者からの輸血によりプリオン病が伝播した例が報告されている。臓器移植技術が飛躍的に向上した現在、本邦でもこのようなリスクは存在し、簡便、迅速かつ特異的なプリオン病の早期確定診断系の確立は急務である。

プリオン蛋白質は中枢神経系の神経細胞の変性・脱落を誘導することが知られている。この神経細胞崩壊に際し、患者髄液中に障害された神経細胞由来と考えられる 14-3-3 γ 蛋白質が検出される。申請者らは現在、国内の病院からの依頼に答え、髄液中の 14-3-3 γ 蛋白質濃度測定を行っており、結果は判断材料の一つとして用いられている。しかしながら、検出系は手技等が煩雑で濃度測定には不向きなウエスタンブロット法であり、検出できる施設は国内では限られている。本研究で申請者らは、髄液中の CJD 特異的な 14-3-3 蛋白質濃度を簡便、迅速かつ特異的に検出できる系の開発を行うと同時に、他疾患との鑑別マーカーの検索を行い、臨床への有効な判断材料を提供できる系の開発を行う。

B. 研究方法

① GST 融合 14-3-3 γ タンパク質を標準試料とした髄液中 14-3-3 γ タンパク質濃度測定系確立

髄液中に放出された 14-3-3 タンパク質の濃度を算出するため、標準試料として大腸菌発現系を用いた GST 融合 14-3-3 γ タンパク質を精製した。ヒト 14-3-3 γ タンパク質 cDNA を PCR 法にて増幅し pGEX ベクターに組み込み、GST 融合 14-3-3 γ タンパク質発現プラスミドを構築した。作製したプラスミドを大腸菌 DH5a 株に導入し、アンピシリンによる薬剤選択後、IPTG を用いたタンパク質発現誘導を行った。IPTG による発現誘導 12 時間後に、大腸菌を遠心法にて回収した。回収された大腸菌は 1% トライトン含有細胞溶解液で溶解後、GST に親和性の高いグルタチオンセファロースカラムを用いて GST 融合 14-3-3

γタンパク質を精製した。SDS-page および抗 14-3-3γタンパク質特異的マウスモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて、GST 融合 14-3-3γタンパク質の精製度等の確認を行った。

②His 融合 14-3-3 タンパク質発現系の構築

各種抗体との反応性、ウエスタンブロット法を用いた髄液中 14-3-3γ濃度測定の精度向上のため、哺乳動物細胞発現 His 融合 14-3-3γタンパク質発現系の構築を行った。ヒト 14-3-3γおよびβタンパク質 cDNA を特異的プライマーを用いて PCR により増幅した。増幅した cDNA を His 融合タンパク質発現ベクター-pc DNA HisMax に導入した。構築した発現ベクターをヒト腎臓由来細胞株 293T 細胞に導入した。導入 48 時間後に細胞を回収し、1%トライトン含有細胞溶解液で溶解後、His に親和性の高いニッケルカラムを用いて His 融合 14-3-3タンパク質を精製した。

③14-3-3 タンパク質特異的抗体の選定

14-3-3タンパク質には7種のアイソフォームが存在することが報告されている。これらのうち神経細胞に多く含まれるアイソフォームが 14-3-3γおよび 14-3-3βである。また、CJD 患者での病態の進行に伴い上昇が報告されている 14-3-3 タンパク質も 14-3-3γおよび 14-3-3βであることが報告されている。髄液中に含まれるこれらアイソフォームを高感度かつ特異的に検出できる抗体の選別を行った。標的として His 融合 14-3-3γおよび 14-3-3β アイソフォームを標的としたウエスタンブロット法を用いて、抗体の特異性および感度について検討した。SDS-Page には、12%アクリルアミド NuPage gel (invitrogen 社)を用い、50ug/lane および 5ug/lane の精製 14-3-3 タンパク質を泳導したのち、PVDF メンブレンに転写した。5%スキムミルク含有 0.1%Tween20 PBS 溶液で室温 30 分間ブロッキングを行った。抗 14-3-3γ及びβ抗体は最終濃度 1ug/ml の濃度になるよう 5%スキムミルク含有 0.1%Tween20 PBS 溶液で希釈し、4℃で 12 時間反応させた。0.1%Tween20 PBS 溶液で洗浄後、Dako 社の HRP 標識抗マウス抗体または HRP 標識抗ウサギ抗体を室温で 1 時間反応させた。0.1%Tween20 PBS 溶液で洗浄後、ECL 発光システムを用いて発光させ、フジフィルム社の LAS3000 システムを用いて検出した。

④サンドイッチエライザを用いた 14-3-3 タンパク質検出法の作製

エライザ法としては 96well マイクロプレートを用いる 2 抗体サンドイッチ法にて行った。マイクロプレートへの固相化は物理吸着法、酵素標識にはペルオキシダーゼを用いた。抗体は購入可能なモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体 (ウサギ) としエピトープ領域が異なる 2 種の組み合わせにてサンドイッチ法の検討を行った。測定サンプルは、国立感染症研究所にて調製されたリコンビナント 14-3-3γ蛋白及び 14-3-3β蛋白を用いて感度と特異性の確認を行った。反応は固相抗体と測定サンプルの第一反応と洗浄後の酵素標識抗体の第二反応に分けた 2 ステップ法にて実施し、反応時間を十分かけて測定した。検出はペルオキシダーゼの基質として TMB を発色剤として用い、硫酸反応停止後の波長 450nm の吸光度を測定して比較した。目標感度として、14-3-3γについては現在ウエスタンブロット法を用いた髄液検査のカットオフ値である 25ng/ml 以下が必要であり、下限濃度数 ng/ml を目標にアッセイの確認を行った。

⑤14-3-3γタンパク質特異的に結合するペプチド選定

14-3-3γタンパク質は細胞中で豊富に含まれる細胞内シグナル伝達分子である。細胞外からの種々の刺激を細胞内へ伝える仲介の機能を果たしていると考えられる。細胞内シグナル伝達分子の一つである Raf-1 はリン酸化特異的に 14-3-3γタンパク質と結合することが報告されており、この 14-3-3γタンパク質に対する結合配列を合成し、14-3-3γタンパク質を検出できるか否かについて検討した。Raf-1 に存在する 14-3-3タンパク質結合配列を合成し、ファウエスタンブロット法を用いて検出した。Raf-1 はリン酸化特異的に 14-3-3γに結合することから、リン酸化フォームおよび非リン酸化フォームのペプチドを合成し、個々の反応性について検討した。

⑥エライザ法による 14-3-3γタンパク質検出法の作製

現状では髄液中の 14-3-3γタンパク質濃度はウエスタンブロット法を用いて行っている。

ウエスタンブロット法は検出感度および特異性に優れるが、簡便かつ迅速な方法ではない。この問題に対し、エライザ法による髄液中 14-3-3 γ 検出系作製を試みた。通常の抗原検出エライザではマイクロプレート上に抗原捕捉抗体を固相化させ検体中に含まれる抗原を捕捉する。捕捉された抗原に対する特異的な抗体をさらに添加し、抗原を検出するサンドイッチエライザが一般的である。しかしながら、14-3-3 タンパク質は 7 種のアイソフォームを有し、各アイソフォーム特異的な抗体の作製が難しいため、マイクロプレート上に固相化する抗体に抗 14-3-3 γ マウスモノクローナル抗体を用い、検出用抗体の代用として 14-3-3 γ 結合ペプチドを用いた。

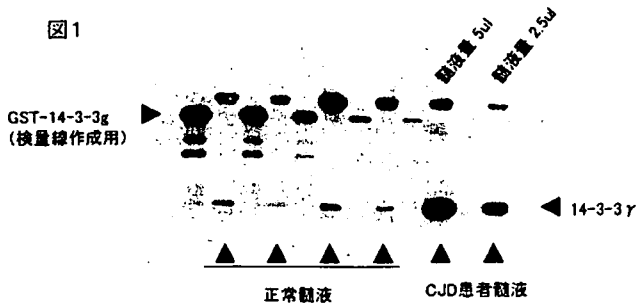
(倫理面への配慮)

検討に供した髄液は、採取された施設において実験に供する旨のインフォームドコンセントが得られている。

C. 研究結果

① GST 融合 14-3-3 γ タンパク質を標準試料とした髄液中 14-3-3 γ タンパク質濃度測定系確立

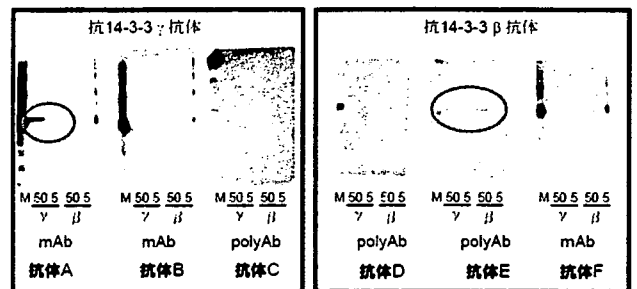
大腸菌内での GST 融合ヒト 14-3-3 γ タンパク質発現は可能であった。精製タンパク質の SDS-Page 後の CBB 染色および 14-3-3 γ 特異的抗体を用いたウエスタンブロットによる解析から、目的の分子量を有し、抗体との反応性も有していることを確認した。精製 14-3-3 γ タンパク質を段階希釈してのウエスタンブロットでは、濃度計測に必要な標準曲線作製に十分耐えうる直線性を有していた (図 1)。また臨床検体の髄液中に含まれる 14-3-3 γ 濃度も精製 14-3-3 γ で作製する標準曲線のレンジ内であり、濃度測定に供する精製標準品として使用可能であることが明らかとなった。



② His 融合 14-3-3 タンパク質発現系の構築
ヒト細胞内での His 融合ヒト 14-3-3 タンパク質

発現は可能であった。ヒト 14-3-3 γ および 14-3-3 β を精製タンパク質の SDS-Page 後の CBB 染色および 14-3-3 γ 特異的抗体を用いたウエスタンブロットによる解析から、目的の分子量を有し、抗体との反応性も有していることを確認した。精製 14-3-3 γ タンパク質を段階希釈してのウエスタンブロットでは、濃度計測に必要な標準曲線作製に十分耐えうる直線性を有していた。

③ 14-3-3 タンパク質特異的抗体の選定
市販抗体の 14-3-3 γ 及び β タンパク質に対する特異性を検討した結果、 γ アイソフォームに対しては 1 種類の特異的な抗体が存在した。しかしながら、 β アイソフォームに対する特異的な抗体は存在せず、 γ および β アイソフォームの両者に反応性を有した。

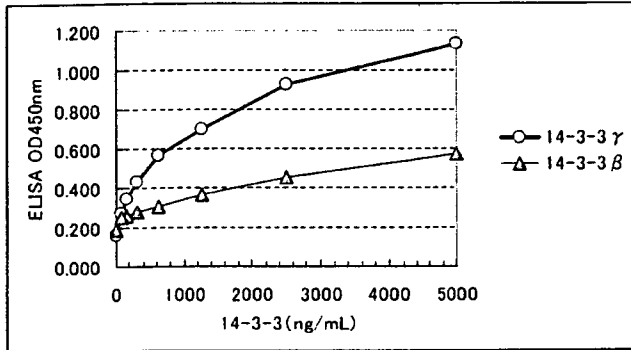


④ サンドイッチエライザを用いた 14-3-3 タンパク質検出法の作製

用いた抗体によりアッセイ系を構築した結果では、何れの抗体の組み合わせにおいて目標とする感度は得られず、カットオフ値の検出も難しい結果となった。14-3-3 γ のエライザ法検討において、 γ 以外のアイソフォームを認識しない様に γ 特異的なペプチド配列領域を合成し免疫して調製されたウサギポリクローナル抗体とアイソフォーム選択性の低い領域のペプチドを免疫して調製されたウサギポリクローナル抗体のサンドイッチ系は 14-3-3 γ 蛋白を完全特異的に検出することはできず、検出感度も 100ng/ml 程度と目標に達せず、ブランク発色が高めになる傾向が確認された。14-3-3 β については認識領域が異なるモノクローナル抗体にてサンドイッチ系を検討したが、特異性はさらに低い結果となった。結果を以下に示す。

14-3-3 ELISA測定系の結果

固相抗体：合成ペプチド免疫 14-3-3 ヲウサキホリクローナル抗体 (IgG)
 標識抗体：合成ペプチド免疫 14-3-3 各アイソフォーム認識ウサキホリクローナル抗体
 HRP 標識
 2ステップ反応
 サンプル：100 μL
 発色反応：TMB



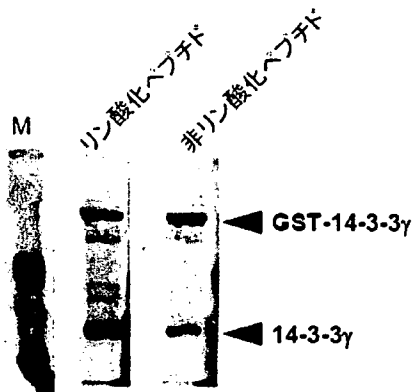
⑤14-3-3・タンパク質特異的に結合するペプチド選定

N末端にビオチンを標識したRaf-1の14-3-3タンパク質結合配列ペプチドを合成した。Raf-1はリン酸化特異的に14-3-3タンパク質に結合することから、同時にリン酸化フォームのペプチドを作成した。配列を以下に示す。

非リン酸化ペプチド：Biotin-GGQRSTSTP

リン酸化ペプチド：Biotin-GGQRSTpSTP

これらペプチドの14-3-3gタンパク質への反応性を調べるため、精製GST融合14-3-3gタンパク質をSDS-Pageで展開し、PVDFメンブランに転写した。BSA含有0.1%Tryton PBSで0.5ug/mlの濃度に希釈したペプチドを反応させた。結合したペプチドの検出にはHRP標識ストレプトアビジンを用い、ECL発色法にて可視化した。結果を以下に示す。

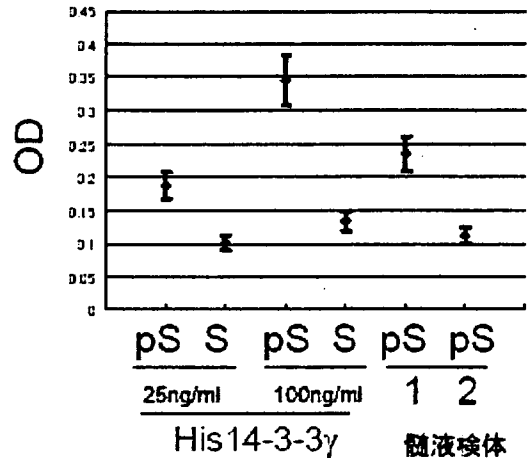


リン酸化ペプチドおよび非リン酸化ペプチドともにGST融合14-3-3gおよびHis融合14-3-3gタンパク質を認識した。しかし、その反応性はリン酸化ペプチドの方が強く、図1で用いた抗

14-3-3g マウスモノクローナル抗体と同等以上の反応性を有していた。

⑥エライザ法による14-3-3・タンパク質検出法の作製

上述の通り14-3-3タンパク質には7種のアイソフォームが存在する。14-3-3gタンパク質を特異的に検出するため、マイクロプレート上に図1で用いた抗14-3-3gマウスモノクローナル抗体を物理的吸着法を用いて固相化した。1ug/mlに希釈した抗体を96wellプレートの1wellあたり100ul添加し、4℃で12時間吸着させた。洗浄およびブロッキング操作の後、His融合14-3-3gタンパク質を25ng/mlおよび100ng/mlの濃度で100ul添加した。37℃で2時間反応させた後、洗浄を行った。検出にはRaf-1タンパク質の14-3-3g結合配列を有したペプチドを用いた。結果を以下に示す。



pS：リン酸化ペプチド、
 S：非リン酸化ペプチド
 1および2：CJD患者髄液

リン酸化ペプチドを用いて検出した場合、添加したHis14-3-3gタンパク質濃度依存的に吸光度の上昇を認めたと、非リン酸化ペプチドを用いた場合では、吸光度の値は低く、バックグラウンドレベルであった。

またリン酸化ペプチドを用いた検出法では、CJD患者髄液に含まれる14-3-3gタンパク質を検出することが可能であった。

D. 考察

CJDの確定診断は脳組織からのプリオン蛋白質の検出により下されるため、生前の確定診断は困難である。しかしながら、CJD発症の原因となるプリオン蛋白質は伝達性(感染性)

で、不活化が難しく手術機器等を介した水平伝播が懸念され、生前での早期診断法の確立が望まれている。

神経細胞中には細胞内シグナル伝達分子である 14-3-3 γ および β アイソフォームタンパク質が豊富に含まれており、プリオンが神経細胞に蓄積し、細胞の崩壊を誘導する際に髄液中へ放出されることが報告されている。本研究では、この 14-3-3 タンパク質を高感度かつ簡便に検出する方法の開発を目指しており、本年度の研究により、エライザ系での検出が可能であることが明らかとなった。これまでの我々の研究結果より CJD 患者ではおよそ 25ng/ml 以上の濃度で 14-3-3 γ が髄液中に含まれることが分かっており、今回作製した検出系では、まだ感度に余裕が無く更なる改変が必要である。現在入手可能な市販の 14-3-3 タンパク質に対する抗体では、特異性、感度に問題を有していることが今回の結果から判明しており、新規の抗体が必要である。ペプチドを検出用プローブとしたエライザ系においても、感度、特異性に優れた抗体と組み合わせることで、更なる感度上昇が期待され、臨床応用に可能な検査系となりうると考えられる。

E. 結論

① 髄液中に含まれる 14-3-3 タンパク質濃度測定に用いる精製標準品を作成した。大腸菌発現系およびヒト細胞発現系で作製した 14-3-3 タンパク質は既存の抗体との反応性に問題はなく、標準品としての使用に耐えるものであった。

② 7種のアイソフォームを有する 14-3-3 タンパク質に対する入手可能な市販抗体ではアイソフォームに対する特異性、検出感度にばらつきが存在した。また β アイソフォーム特異的な抗体を入手することは出来なかった。

③ 抗体が変わる 14-3-3 γ タンパク質検出プローブとして Raf-1 の 14-3-3 結合配列を用いることが可能であることを明らかにした。

④ 抗体を用いた 14-3-3 γ 検出サンドイッチエライザおよびリン酸化ペプチドを用いた髄液中 14-3-3 γ タンパク質検出エライザを作製した。

F. 研究発表

1. 論文発表

・Hagiwara K, Yamakawa Y, Sato Y, Nakamura Y, Tobiume M, Shinagawa M, Sata T. Accumulation of mono-glycosylated form-rich, plaque-forming PrPSc in the second atypical bovine spongiform encephalopathy case in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2007 Sep;60(5):305-8.

・K. Tabu, Y. Ohba, T. Suzuki, Y. Makino, T. Kimura, A. Ohnishi, M. Sakai, T. Watanabe, S. Tanaka and H. Sawa. OLIG2 inhibits the motility of a human glial tumor cell line by activating RhoA. *Mol. Cancer Res.*, 5(10): 1099-1109 (2007)

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当事項なし。

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

多様な生理活性を持つ機能性成分の安定化による新たな難治性慢性疾患の予防および治療法の構築

所属 (独) 国立健康・栄養研究所 食品保健機能
研究者 矢野 友啓

研究要旨

新規トコトリエノール安定化体(トコトリエノール・シクロデキスト包接体とトコトリエノールエーテル誘導体)を用いて、酸化的ストレスや慢性炎症等が要因となって引き起こされる慢性疾患(難治性腫瘍、変形性関節症等)に対する予防・治療の可能性を探るために、本年度は安定化体の製造法の確立、評価に使う各モデル系の構築やその作用機構の解析を行なった。

分担研究者

- (1) 医薬基盤研究所 野村大成
- (2) 大阪大学大学院 宮崎純一
- (3) 東北大学大学院 小野哲也
- (4) 静岡県立大学大学院 大島寛史
- (5) 名古屋学芸大学 池田彩子
- (6) お茶の水女子大学大学院 池本真二
- (7) 日本アムウエー(株) 技術部 栗下昭弘
- (8) オリザ油化(株) 岡田忠司
- (9) シクロケム(株) 寺田啓二

A. 研究目的

アスベストが主因で引き起こされる中皮腫、C型肝炎により誘発される肝臓癌、食事の欧米化により増加し続ける乳癌、肥満、ストレス等で引き起こされる2型糖尿病、変形性関節症等の慢性疾患について、その治療にかかる医療費の増加、慢性疾患の難治性、長期薬剤の服用に伴った副作用等の問題から、現在の治療法に加えて、これらの慢性疾患の予防・治療に有効と考えられる新たな予防・治療戦略が必要になってくる。

ビタミンE同族体であるトコトリエノールは抗酸化作用に関与するOH基以外の構造部分に基づく新たな生理作用として、1) コレステロール合成阻害による高コレステロール症の改善、2) Ras family シグナル伝達系抑制による細胞増殖および骨代謝抑制作用、3) cytokine 産出制御による抗炎症作用、4) 血管新生抑制作用が報告され、これ以外にも脳機能障害の予防等のいくつかの慢性疾患の予防効果が期待されている。しかしながら、トコトリエノールは生体内で非常に不安定で、

生物学的半減期が非常に短く、経口摂取した場合、血中や各組織のトコトリエノール濃度は、多くの生理作用が期待できるレベルまで上昇しないことが知られている。そこで、我々はトコトリエノールの抗酸化および非抗酸化作用に基づく多様な生理活性を実際に生体内で十分に活かして、厚生行政的に至急に新たな予防・治療法の構築が求められている慢性疾患に対する予防・治療法を確立するために、今までに試みられていない次の新たな方法で生体内でのトコトリエノールの安定化をはかり、その有用性を評価する。

B. 研究方法

トコトリエノール安定化体の作成：米ぬかよりヘキサソ抽出後、高温真空条件化で蒸留および濃縮し、ビタミンE高濃度画分を分取した。この高濃度画分から合成吸着剤を充填したカラムを用いて、トコトリエノール(T3)のみを分取し、T3含量が70%以上のT3素材を得た。このT3素材をガンマーシクロデキストリン(CD)と水と攪拌し、凍結乾燥し、T3-CD包接体を得た(T3含量、13.73%)。また、T3の水酸基の部分にコハク酸をエーテル結合で結合させたエーテル誘導体6-O-carboxypropyl- α -tocotrienol(T3E)を合成した。合成したT3EはGC-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, IRで構造を確認した。

T3の生体内動態の解析：ラットにビタミンE無添加飼料を4週間摂取させた。12時間の絶食後、T3を含む試料溶液を強制的に経口摂取させた。用いたT3は、 α -T3と γ -T3の混合物であり、試料溶液を経口投与して6時間後にラットを屠殺し、血清および主要臓器中のT3およびその主代謝物の濃度をHPLC法により測定した。

T3の抗酸化および抗炎症作用評価系の構築：in vitroでの抗酸化評価系構築のために、細胞よりミトコンドリア成分を抽出し、再構成し、complex IとcomplexIVの機能を評価する系の妥当性を評

価した。また、in vivoでの各臓器における抗酸化能を評価するために、大腸菌のlacZ遺伝子をラムダゲノムに組み込んだものを受精卵に導入したマウス(Muta)を用い、X線0.72Gy/minの線量率で総線量20Gyをマウスに全身照射した。照射後3.5日を経た所で肝臓、脾臓、脳を摘出し、lacZ上での突然変異を解析した。さらに、in vitroで新たな抗炎症作用評価のマーカーを検索するために、HL-60細胞をPMAで刺激後、コレステロール酸化物をHPLC-MSで同定した。

T3の機能性評価のためのモデル系の構築：変形性膝関節症自然発症マウスは健康なC57BL/6JNOs原種と自然発生した変形性膝関節症マウスとの遺伝子交配により、運動制限もなく、生殖力も高く、かつ、変形性骨関節症を自然高発する改良系を作成した。また、scid遺伝子を導入したC57BL/6JNOsマウスの中で、IgG, IgMが検出限界以下のものを兄妹交配することによりLeaky, 白血病を自然発生しないSCIDマウスを作成し、このマウスにヒト中皮腫培養細胞を移植するモデル系を構築した。さらに、2型糖尿病マウス(db/dbマウス)の膵ベータ細胞に抗酸化ストレス蛋白チオレドキシシン(TRX)を発現させたトランスジェニックマウスを作成した。

T3Eの機能性評価：T3の非抗酸化作用に基づく生理活性を解析するために、癌細胞培養系を用いて、T3EのRasシグナル伝達系および低酸素分圧条件への適応に対する作用を解析した。

倫理面への配慮：遺伝子の取り扱いについては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に従って行い、遺伝子組み替え実験に関しても当該委員会の承認を受けた上で遂行した。動物実験に関しては当該委員会の承認を受けた上で行った。

C. 研究結果

T3安定化体の作成：米ぬかよりT3の効率的単離・

分離技術の検討を行い、実験室レベルではトコフェロールを殆んど含まない T3 が 70%以上含む包接化に使用できる T3 精製品を作成できた。また、T3 の包接化技術についても、数百グラムレベルでは CD 包接化が可能であり、包接化による T3 の変化がないことを確認した。また、T3E の合成については、純度 90%以上の合成品が得られた。

T3 の生体内動態の解析： α -T3 濃度は副腎が最も高く、次に、小腸、肝臓、肺が高かった。 γ -T3 濃度は、小腸、副腎で高く、肝臓、心臓、肺が同程度であった。 α -T3 の代謝産物である α -CEHC と、 γ -T3 の代謝産物である γ -CEHC は、T3 を投与して 24 時間後に小腸、血清、肝臓、腎臓に検出され、副腎、心臓、肺、脳には検出されなかった。T3 投与量は、 α -T3 よりも γ -T3 の方が多かったにもかかわらず、血清と臓器の CEHC 濃度は、 α -CEHC に比べて γ -CEHC の方が高かった。また、小腸の CEHC 濃度が、他の臓器に比べて最も高かった。

T3 の抗酸化および抗炎症作用評価系の構築：細胞よりミトコンドリア成分を抽出し、再構成し、complex I と complexIV の機能を評価する系が抗酸化成分の機能を評価するために適していることを確認した。また、Muta マウスを用い 20Gy の放射線照射を行えば肝臓、脾臓、脳のどの臓器でも突然変異を増加させることができることがわかり、Muta マウス—放射線照射系は *in vivo* で臓器別の T3 安定化体の抗酸化作用を評価するのに適していることが確認された。さらに、ヒト HL-60 細胞を好中球様に分化させた後、フォルボールエステルを加えて活性化させ、細胞抽出液中に生成するコレステロール酸化物を分析したところ、Atheronal A と Atheronal B が生成していることを見出し、この両成分が炎症性病変の主要分子である可能性が示された。

T3 の機能性評価のためのモデル系の構築：健康な C57BL/6JN0 s 原種と自然発生した変形性膝関節症マウスとの遺伝子交配により、運動制限もなく、生殖力も高く、かつ、変形性骨関節症を自然高発する改良系の作成に成功し、また、Leaky, 白血病

を自然発生しない SCID マウスにヒト中皮腫培養細胞を移植するモデル系の構築に成功した。さらに、2 型糖尿病マウス (db/db マウス) の膵ベータ細胞に抗酸化ストレス蛋白チオレドキシン (TRX) を発現させたトランスジェニックマウス (db/db-TRX マウス) を作成し、検討した結果、血糖値は db/db マウス群では 1 5 週から糖尿病状態となり増加してゆくが db/db-TRX マウス群では db/db マウス群に比し有意に低値であり、糖尿病状態の改善が認められた。

T3E の機能性評価：T3 の抗酸化作用に依存しない機能性を評価するために、T3 の非抗酸化誘導体である T3E を用いて、肺癌細胞の Ras シグナル系の活性化と低酸素分圧条件下への適応に対する作用を検討したところ、T3E は Ras の活性化および低酸素条件で活性化される Src の活性を抑制することにより、肺癌細胞の酸素分圧に関わらず、その増殖・生存を抑制することが示された。

D. 考察

米ぬかから効率的に T3 を抽出・精製する方法論および T3 を安定して CD 包接化する技術が実験室レベルで確立された。また、T3 包接化による T3 の生体内動態の変化を検討する予備的検討として、フリーの T3 の生体内動態を解析したところ、 α -T3 の方が γ -T3 に比べて分解にくく、各臓器の貯留量も高い傾向を示した。米ぬかから精製した T3 には主に γ -T3 が含まれているので、CD 包接化により γ -T3 の各臓器への貯留量の増加が期待され、それにより T3 の機能性が生体内で生かされる可能性が推測される。

T3 の抗酸化作用の評価系として、ミトコンドリア機能評価および Muta マウス放射線照射系、炎症作用の新たな原因およびマーカーとして、コレステロール酸化物が同定されたので、来年度以降、これらの系やマーカーを使った T3 の抗酸化および抗炎症作用の評価が的確に行なわれると推測される。

T3 の機能性評価のためのモデル系として、変形

性膝関節症自然発症マウスおよび Leaky, 白血病を自然発生しない SCID マウスにヒト中皮腫培養細胞を移植するモデル系が構築され、来年度以降、これらの系を用いて T3 の CD 包接化の効果が検証できる。また、2型糖尿病マウスの膵β細胞に TRX を発現させたマウスを用いた解析から、膵β細胞への酸化ストレスによる障害を酸化因子で防御することが、2型糖尿病発生予防につながる事が予測される。

T3E を用いた解析から、T3 の非酸化作用に依存して、常圧での癌細胞の増殖のみならず、低酸素分圧条件での生存・増殖が抑制されたことから、T3E がよい抗癌成分として期待されると同時に、T3-CD 包接化による生体内の T3 濃度の上昇は、癌予防の有効な手段となる事が期待される。

E. 結論

- 1) 米ぬかから効率的な T3 抽出法ならびに安定した T3-CD 包接化技術を確立した。
- 2) T3 の生体内動態の詳しい解析を行なった。
- 3) T3 の酸化および抗炎症作用を評価するための新たな系を構築した。
- 4) T3 の機能性評価のための新たな複数のモデル系の構築を行なった。
- 5) T3E を用いて、T3 の非酸化作用に依存した機能を評価した。

F. 研究発表

Kashiwagi K, Harada K, Yano Y, Kumadaki I, Hagiwara K, Takebayashi J, Kido W, Virgona N & Yano T. A redox-silent analogue of tocotrienol inhibits hypoxic adaptation of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 365, 875-881(2008).

Yano T, Virgona N: Anti-cancer effects of tocotrienols and tocopherols irrespective of anti-oxidant properties. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. AOCS press, in press.

Taisei Nomura. Transgenerational effects from exposure to environmental toxic substances. *Mutation Research Review* (2008, in press).

Satoru Endo, Kenicji Tanaka, Kazuo Fujikawa, Twtsuo Horiguchi, Tetsuo Itoh, Gerald Bengua, Taisei Nomura and Masaharu Hoshi. Distortion of Neutron Field during Mice Irradiation at Kinki University Reactor UTR-KINKI. *Applied Radiat. Isotope*, 65, 1037-1040 (2007).

Taisei Nomura, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Li Ya Li, Mukh Syaifudin, Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Rajamanickam Baskar, Kazuyasu Fukuda, Yoshihiro Oka, Haruo Sugiyama, and Fumio Matsuzuka. Differential radiation sensitivity to morphological, functional and molecular changes of human thyroid tissues and bone marrow cells maintained in SCID mice. *Mutation Research* (2008, in press).

Yamamoto M, Yamato E, Toyoda S, Tashiro F, Ikegami H, Yodoi J, Miyazaki J. Transgenic expression of thioredoxin, antioxidant protein, in pancreatic β cells prevents the progression of type 2 diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 10,43-49 (2008).

Araki E & Miyazaki J. Metabolic disorders in diabetes mellitus: Impact of mitochondrial function and oxidative stress on diabetes and its complications. *Antioxid Redox Signal*. 9, 289-291 (2007).

Rakugi H, Matsukawa N, Ishikawa K, Yang J, Imai M, Ikushima M, Maekawa Y, Kida I, Miyazaki J & Ogiwara T. Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation. *Endocrine* 31, 82-87 (2007).

Ikehata H. & Ono T. Significance of CpG methylation for solar UV-induced mutagenesis and carcinogenesis in skin. *Photochem. Photobiol.*, 83, 196-204 (2007).

Ikehata H., Ono T, Tanaka K. & Todo T. A model for triplet mutation formation based on

error-prone translesional DNA synthesis opposite UV photolesions. DNA Repair, 6, 658-668 (2007).

Komura J., Ikehata H. & Ono T. chromatin fine structure of the c-MYC insulator element/Dnase I-hypersensitive site I is not preserved during mitosis. Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 15742-15746 (2007).

Otsuki M., Ono T., et al., Functional interactions between BLM and XRCC3 in the cell. J. Cekk Biol., 179, 53-63 (2007).

Tazawa H., Tatemichi M., Sawa T., Gilibert I., Ma N., Hiraku Y., Donehower L.A., Ohgaki H., Kawanishi S., & Ohshima H. Oxidative and nitrate stress caused by subcutaneous implantation of a foreign body accelerate sarcoma development in Trp53+/- mice. Carcinogenesis, 23, 191-8 (2007).

Ohshima H., Tomono S., Lai Y-L. & Miyoshi N., Inflammation Induced Carcinogenesis and Chemoprevention. In: Knasmüller S. DeMarini D.M., Johnson I.T. & Gerhäuser C. eds. Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim(“WILEY-VCH”), in press.

大島寛史、三好規之、がん予防『酸化ストレスの医学』、診断と治療社、2008年刊行予定

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

メタボリックシンドローム予防・治療薬の開発のための の基盤研究

所 属 独立行政法人国立健康・栄養研究所 基礎栄養プログラム
研究者 江崎 治

研究要旨：運動による骨格筋での PGC-1 α 発現増加や運動トレーニングによる肥満抑制作用に交感神経系が関与していることを明らかにした。絶食や筋萎縮により骨格筋において核内受容体 RXR γ の遺伝子発現が著しく低下する。骨格筋特異的に RXR γ を過剰発現するトランスジェニックマウス (RXR γ マウス) を作製し、RXR γ は脂質合成のマスターレギュレーターである SREBP1c 遺伝子の筋肉における発現調節因子であることを見出した。インスリンシグナル伝達機序に主要な役割を持つ IRS-1/2 に結合するタンパクとして、prolyl isomerase 1 (Pin1) を新規に同定した。肝臓や筋肉における Pin1 のタンパク発現量は、高脂肪食負荷によって増加した。現在、Pin1 増加の病的意義を解明中である。砂糖や脂肪の多い食事は脂肪肝の原因である。ddY マウスに高スクロース食、あるいは高脂肪食 (サフラワー油またはバター) を 11 週間摂取させたところ、脂肪肝を発症した。このモデルマウスを用い、10en%魚油の脂肪肝への効果について調べた。その結果、高スクロース食による脂肪肝を魚油は抑制したが、高サフラワー食による脂肪肝を魚油はさらに悪化させ、脂肪肝の原因により、魚油の作用は異なった。これらの機序を明らかにした。

分担研究者

- (1) 広島大学大学院 浅野知一郎
- (2) 持田製薬株式会社 河野浩之
- (3) アステラス製薬株式会社 後藤正英
- (4) キリンホールディングス株式会社 吉田有人

A. 研究目的

糖尿病・肥満症は、遺伝的素因を背景とし、近年の食生活 (生活様式) の変化によって発症・進展すると考えられる“生活習慣病”である。この基本治療は食事療法と運動療法である。運動は、ミトコンドリア機能を活性化させ、脂肪の燃焼や糖の利用能を高め、生体内エネルギーの消費をもたらす。PGC-1 α (PPAR γ coactivator-1 α) は筋細胞のミトコンドリア量や機能 (酸素消費) を活性化させる因子である。運動による筋

肉での PGC-1 α 発現に β 受容体刺激が関与するか調べる。次に、運動トレーニングによる肥満抑制作用に β アドレナリン受容体刺激が関与するかどうか、3 種類 (β 1, β 2, β 3) のアドレナリン受容体すべてを欠損した β レスマウスを用いて検討する。「寝たきり」や「ギプス固定」による筋萎縮 (廃用性筋萎縮) により骨格筋ではフォークヘッド型転写調節因子である FOXO1 が増加し、核内受容体型転写調節因子 RXR γ が減少する。トランスジェニックマウスを用いた検討により、RXR γ の役割を明らかにする。

インスリンは細胞膜上の特異的な受容体に結合した後、活性化され、IRS-1/2 をチロシンリン酸化する。IRS-1 に結合し、高脂肪食によって発現が増加するタンパクを同定

する。

砂糖や脂肪の摂りすぎは、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) の原因である。NAFLDは可逆性があり良性疾患と軽く考えられているが、脂肪性肝炎にいたる場合があるだけでなく、メタボリックシンドローム発症にも関係し、さらに近年、日本人中年男性を対象とした研究から、NAFLDはII型糖尿病の危険因子であると報告され、臨床的に重要な疾患として認識されるようになってきた。魚油は、血中TG濃度を下げること、肝臓でのde novo脂肪合成を低下させることが知られている。そこで、砂糖、サフラワー油、またはバター過剰摂取による脂肪肝を作成し、各脂肪肝に対する魚油の効果について調べる。

B. 研究方法

a) 運動による骨格筋PGC-1 α 発現増加機序

C57BL6Jマウス、または β レスマウス(β 1、 β 2、 β 3アドレナリン受容体を欠損したマウス)とその野生型マウスを用い、 β 遮断薬、運動のPGC-1 α 発現量変化を調べた。

b) 運動トレーニングによる肥満抑制作用の機序

8週齢の野生型と β レスマウスにそれぞれ、脂肪エネルギー比56.7%の高脂肪食を与えながら、「運動トレーニングをさせる群(運動群)」と特に運動を強くない「安静群」に分けて、体重変化、体組成変化を調べた。

c) RXR γ トランスジェニックマウスの作製と表現型の分析

骨格筋特異的に発現する α アクチンプロモーターを使用し、FOXO1のドミナントネガティブ変異体、RXR γ あるいはそのドミナント

ネガティブ変異体を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、表現型を分析した。

d) IRS-1結合タンパクとしてのPin1の同定
IRS-1のcDNAをMEFタグ発現ベクターのマルチクローニング部位に、それぞれ挿入し、N端にMEFを取り付けた融合蛋白発現ベクターを作成した。各アデノウイルスを各種培養細胞に導入し発現させ、MEF融合蛋白を含む細胞抽出液を調製し、myc-抗体を不溶化したセファロースビーズを加えて免疫沈降を行った。検出したタンパク質バンドを、ゲル内でトリプシン消化し、消化物をダイレクトナノフローLC-MS/MSシステムにより分析する。得られたMS/MSスペクトルを、タンパク質データベース(Mascot)に照合し、タンパク質を同定した。普通食および50%高脂肪食をマウスに2週間投与し、肝臓、筋肉、脂肪を摘出し、これらの臓器におけるPin1の発現量の変化を検討した。

e) 砂糖過剰摂取による脂肪肝に対する魚油の効果

ddYマウス(オス、7週齢)に、コントロール群にはスターチ食、スクロース食摂取群にはスターチ食を食べさせ20%スクロース水を11週間摂取させた。魚油の効果を調べるために、魚油摂取群には、それぞれの群に対して10en%サフラワー油を10en%魚油に置換したエサを11週間投与し、脂肪肝の程度、肝臓mRNA発現変化を調べた。

f) サフラワー油あるいはバター過剰摂取による脂肪肝に対する魚油の効果

ddYマウス(オス、7週齢)に、コントロール群にはスターチ食、高サフラワー油食摂取群には高サフラワー油食(60en%サフラワー油)、高バター食摂取群には高バター

食（60en%バター）を11週間摂取させた。魚油の効果を調べるために、魚油摂取群には、それぞれの群に対して10en%分の脂肪を魚油に置換したエサを投与した。脂肪肝の程度、血液検査、肝臓mRNA発現変化を調べた。

（倫理面への考慮）

研究所の動物管理規約に従い研究を行った。

C. 研究結果

- a) 運動終了3時間で比較すると、プロプラノロール前投与は運動によるPGC-1 α の増加を69%阻害した。運動によるPGC-1 α 発現増加が、 β レスマウスでは野生型よりも36%低かった。
- b) 野生型マウスでは、運動トレーニングを行うと体重増加、体脂肪が抑制されたが、 β レスマウスでは、運動トレーニングによる体重、体脂肪量増加抑制作用は認められなかった。
- c) 骨格筋特異的にRXR γ あるいはそのドミナントネガティブ変異体を過剰発現するトランスジェニックマウス（RXR γ マウスおよびDN-RXR γ マウス）を作製し、その骨格筋ではそれぞれSREBP1cの遺伝子発現が著しく増加あるいは減少していることを見出した。しかし、RXR γ マウスでは筋萎縮を抑制しなかった。FOXO1ドミナントネガティブ変異体を発現するトランスジェニックマウスに関しては筋萎縮の表現型を現在解析中。
- d) IRS-1と共沈物中にPin1が同定された。Pin1との結合が検出されたのは、IRS-2とTORC2であった。2週間の高脂肪食負荷によって、筋肉と肝臓におけるPin1発現量は3-8倍程度に増加した。

e) 肝臓TG量はスクロース摂取により増加したが、魚油摂取でその増加が抑制された。砂糖過剰摂取による脂肪肝では転写因子SREBP-1cやChREBPの活性化が認められ、SREBP-1cのtarget遺伝子であるFASやACC1、ChREBPのtarget遺伝子であるLPKの発現が増加した。しかし、10en%魚油の添加により、これらの遺伝子の活性化が抑制され、砂糖過剰摂取による脂肪肝が完全に予防された。

f) 肝臓TG量は、コントロールに比べ、高サフラワー油食摂取で増加したが、高バター食摂取での増加の方が著しかった。魚油を合わせて摂取した場合は、高サフラワー油・魚油食では、高サフラワー油食よりもさらに肝臓TGの蓄積がみられた。しかし、高バター・魚油食では高バター食と差がなかった。

スターチ食に比べ、高サフラワー油食では、PPAR γ 1、PPAR γ 2、およびPPAR γ のtarget遺伝子CD36の発現が増加、高サフラワー油・魚油食では、これらの遺伝子、すなわち、PPAR γ 1、PPAR γ 2、CD36の発現がさらに増加した。高バター食では、高サフラワー油食と同様にPPAR γ 1、PPAR γ 2、およびCD36の発現が増加、しかし、同じ高脂肪食でも魚油の効果は異なり、高バター・魚油食では、高サフラワー油・魚油食に比べ、PPAR γ 1、PPAR γ 2、およびCD36の魚油によるさらなる増加は見られず、むしろ発現が減少した。SREBP-1cのtarget遺伝子、FAS、SCD1、ACC1の発現が魚油によって顕著した。

高サフラワー油・魚油食では空腹時血糖およびインシュリン濃度が増加しており、マウスのインシュリン感受性を示すQUICKIの値も減少し、インシュリン抵抗性がみられた。血中TG濃度は、高サフラワー油食、

高サフラワー油・魚油食、高バター食、高バター・魚油食いずれも空腹時よりも再摂食後の方が増加していた。

D. 考察

- a) 運動による筋肉でのPGC-1 α 発現増加を β 受容体、特に $\beta 2$ 受容体の活性化で約70%説明できることがわかった。運動によるPGC-1 α 発現増加にも、CREBのCREへの結合が関与していることが考えられる。
- b) 今回認められた作用は、運動トレーニングによる生体内のいずれかの組織におけるエネルギー消費効率の変化、もしくは基礎代謝量の変化に起因すると考えられた。一方、 β レスマウスではこれらの作用が認められず、さらに、運動トレーニングによるエネルギー消費効率や基礎代謝量の変化に β 受容体が必要であることが示唆された。
- c) 肥満者や糖尿病患者の骨格筋で含有量の多い筋肉内脂肪量はインスリン抵抗性など骨格筋機能不全に関与する可能性が注目されている。本研究結果は、骨格筋の脂質代謝にRXR γ とFOXO1が重要な役割を果たす事を示すものであり、脂質代謝異常（脂肪毒性）のような観点から、新たな研究のターゲットとなると考えられる。
- d) Pin1は、リン酸化セリン-プロリンを含む配列を認識して結合し、プロリンをcis構造からtrans構造へと変換する。これによって、タンパクの立体構造が変化することが示されている。高脂肪食による糖、脂質代謝の変化に、Pin1の発現増加からIRS-1/2、TORC2への結合を介するメカニズムの存在が推測される。
- e, f) ddYマウスを用いた研究から、スクロース食摂取による脂肪肝が10en%魚油

で予防できること、高サフラワー油食による脂肪肝は10en%魚油でさらに悪化すること、高バター食による脂肪肝は10en%魚油で変化しないことが明らかになった。スクロース食ではSREBP-1c、ChREBPが活性化されていたが、魚油によってこれらの活性化が抑制され肝臓における脂肪酸合成が抑制されたことが、脂肪肝発症予防につながった。一方、高サフラワー食による脂肪肝発症は主にPPAR γ の活性化によるものであったが、魚油はこのPPAR γ をさらに活性化してしまうために脂肪肝をさらに悪化させるものと考えられた。一方、高バター食と高バター・魚油食では脂肪肝の程度に差はみられなかった。高バター食によるPPAR γ の活性化は魚油により抑えられていたが、食後血中TG濃度が食前に比べ増加しており、このTGの肝臓への流入が脂肪肝を改善できなかった原因と考えられた。

E. 結論

- a) 運動による筋肉でのPGC-1 α の発現増加には β 受容体、特に $\beta 2$ 受容体の興奮が関与することがわかった。
- b) 運動トレーニングによる体重増加抑制作用に β 受容体が必要なことがわかった。
- c) 本研究により、骨格筋においてRXR γ およびFOXO1がSREBP1cの遺伝子発現を調節する事が明らかとなった。
- d) 高脂肪食は、肝臓や筋肉におけるPin1発現量を顕著に増加させることが明らかになった。さらに、Pin1がIRS-1/2、TORC2と結合することが示された。
- e, f) 脂肪肝の発症原因によって魚油の効果は異なることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamazaki T, Nakamori A, Sasaki E, Wada S, Ezaki O. Fish oil prevents sucrose-induced fatty liver but exacerbates high-safflower oil-induced fatty liver in ddY mice. *Hepatology*; 46(6); 1779 -1790, 2007
- 2) Miura S, Kawanaka K, Kai Y, Tamura M, Goto M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Ezaki O. An Increase in Murine Skeletal Muscle PGC-1 α mRNA in Response to Exercise is Mediated by β -Adrenergic Receptor Activation. *Endocrinology*; 148(7); 3441 -3448, 2007
- 3) Tsuboyama-Kasaoka N, Sano K, Shozawa C, Osaka T, Ezaki O. Studies of UCP2-transgenic and -knockout mice reveal that liver UCP2 is not essential for the anti-obesity effects of fish oil. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007
- 4) Southgate RJ, Neill B, Prelovsek O, El-Osta A, Kamei Y, Miura S, Ezaki O, McLoughlin TJ, Zhang W, Unterman TG, Febbraio MA. FOXO1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* ; 282(29); 21176 -21186, 2007
- 5) Kamei Y, Miura S, Suganami T, Akaike F, Kanai S, Sugita S, Katsumata A, Aburatani H, Unterman TG, Ezaki O, Ogawa Y. Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: role of RXR/LXR and FOXO1. *Endocrinology*, 2008
- 6) Koketsu, Y., Sakoda, H., Fujishiro, M., Kushiya, A., Fukushima, Y., Anai, M., Kikuchi, T., Fukuda, T., Kamata, H., Uchijima, Y., Kurihara, H., and Asano, T. Hepatic overexpression of a dominant negative form of Raptor enhances Akt phosphorylation and restores insulin resistance in K/K^{ay} mice. *Am. J. Physiol. Endo. Metab.* 2007
- 7) Kurihara, Y., Kawamura, Y., Uchijima, Y., Amano, T., Kobayashi, H., Asano, T. and Kurihara, H. Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1 *Developmental Biology.* 313; 335-46, 2008
- 8) Ikegami, Y., Inukai, K., Awata, T., Asano, T., Katayama, S. SH3 domain of the phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit is responsible for the formation of a sequestration complex with insulin receptor substrate-1 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365; 433-8, 2008
- 9) Fujio, J., Kushiya, A., Sakoda, H., Fujishiro, M., Ogihara, T., Fukushima, Y., Anai, M., Horike, N., Kamata, H., Uchijima, Y., Kurihara, H., and Asano, T. Regulation of gut-derived resistin-like molecule expression by nutrients *Diab. Res. Clin. Pract.* 79; 2-10, 2008
- 10) Ono, H., Sakoda, H., Fujishiro, M., Anai, M., Kushiya, A., Fukushima, Y., Katagiri, H., Ogihara, T., Oka, Y., Kamata, H., Horike, N., Uchijima, Y., Kurihara, H., Asano, T. Carboxyl-terminal Modulator Protein (CTMP) Induces Akt phosphorylation and activation, thereby enhancing anti-apoptotic, glycogen synthetic and glucose uptake pathways. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 293; C1576-85, 2007
- 11) Tonami K, Kurihara Y, Aburatani H, Uchijima Y, Asano T, Kurihara H. Calpain 6 is involved in microtubule stabilization and cytoskeletal organization. *Mol. Cell Biol.* 27: 2548-61, 2007
- 12) Takagi, H., Matsui, Y., Hirotsu, S., Sakoda, H., Asano, T., and Sadoshima, J. AMPK mediates autophagy during

- myocardial ischemia in vivo. *Autophagy* 3: 405-7, 2007
- 13) Tonami, K., Kurihara, Y., Aburatani, H., Uchijima, Y., Asano, T., Kurihara, H. Calpain 6 is involved in microtubule stabilization and cytoskeletal organization. *Mol. Cell Biol.* 27: 2548-61, 2007
 - 14) Namikoshi T, Tomita N, Fujimoto S, Haruna Y, Ohzeki M, Komai N, Sasaki T, Yoshida A, Kashihara N. Isohumulones derived from hops ameliorate renal injury via an anti-oxidative effect in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res.* 2007;30(2):175-84.
 - 15) Ohkoshi E, Miyazaki H, Shindo K, Watanabe H, Yoshida A, Yajima H. Constituents from the leaves of *Nelumbo nucifera* stimulate lipolysis in the white adipose tissue of mice. *Planta Med.* 2007;73(12):1255-9.
 - 16) 齋藤亮、河野浩之、中久木正則、水口清 EPA-E とクロピドグレル、およびその併用が血小板凝集と出血時間に及ぼす影響薬理と治療. 35(2):179-85, 2007
 - 17) Itoh M. Suganami T. Satoh N. Tanimoto-Koyama K. Yuan X. Tanaka M. Kawano H. Yano T. Aoe S. Takeya M. Shimatsu A. Kuzuya H. Kamei Y. Ogawa Y. Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. [Journal Article. Research Support, Non-U.S. Gov't] *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology.* 27(9):1918-25, 2007
2. 学会発表
- 1) Miura S, Kawanaka K, Ezaki O. An Increase in Murine Skeletal Muscle PGC-1 alpha mRNA in Response to Exercise Is Mediated by Beta2-Adrenergic Receptor Activation. American Diabetes Association, 67th Scientific Sessions , 2007 .06 .24, Chicago, IL, USA
 - 2) Zapater J, Zhang W, Unterman A, Larsen P, Kamei Y, Miura S, Ezaki O, Unterman T,. Effects of FoxO1 on Gene Expression in Skeletal Muscle. American Diabetes Association, 67th Scientific Sessions , 2007 .06 .24, Chicago, IL, USA
 - 3) Kubota N, Yano W, Kubota T, Ueki K, Yamauchi T, Itoh S, Terauchi Y, Ezaki O, Tobe K, Minokoshi Y, Kadowaki T,. Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. Sessions 67th American Diabetes Association , 2007 .06 .24 , Chicago, IL, USA
 - 4) 江崎治、栄養素(マクロニュートリメント)摂取制限と運動による体脂肪減少効果:理論と実際 第11回日本病態栄養学会年次学術集会, 2008.01.12, 国立京都国際会館(京都)
 - 5) 江崎治、肥満予防のための骨格筋の役割 第61回日本栄養・食糧学会大会/日本栄養・食糧学会創立60周年記念式典. 2007.05.19, (京都)
 - 6) 和田智史、山崎聖美、中森明子、佐々木江梨子、川野因、江崎治、ゾンデ投与によるアルコール性脂肪肝発症モデルマウスの作成 日本栄養・食糧学会創立60周年記念式典, 2007.05.19, 国立京都国際会館(京都)
 - 7) 三浦進司、江崎治、運動による筋肉での PGC-1 α 発現増加は β 2-アドレナリン受容体の活性化を介している 28回日本肥満学会, 2007.10.20, (東京)
 - 8) 亀井康富、菅波孝祥、赤池史子、金井沙綾香、岡淳一郎、三浦進司、江崎治、小川佳宏、骨格筋で転写因子 FOXO1 を過剰発現させ筋萎縮が生じたマウスでは体脂肪量の増加をきたす 第28回日本肥満学会, 2007.10.20, (東京)
- G. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許出願
 1. 浅野 知一郎:大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出方法 特願2007-321240号
 2. 実用新案登録
 - なし
 3. その他
 - なし

慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体検出のための 診断用プロテインチップの開発および抗体産生機序の 解明に関する研究

所属 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部
研究者 梨井 康

研究要旨： 慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体診断用プロテインチップの開発のため、本研究は日本人の多様性、抗原特異性、安定性などを考慮し、HLA-DR4およびHLA-A2を選択し、HLAタンパク抗原基板上の固相化および抗体認識部位構造の保持等について検討した。また、ヒトHLA-A2 Tgラット作成するための遺伝子発現カセットの作製し、その発現を確認した。さらに、慢性移植腎症に深く関わっているglycocalyx傷害の移植腎障害へ及ぼす影響を明らかにした。

分担研究者

- | | |
|--------------------------------|------|
| (1) 国立成育医療センター研究所
共同研究管理室 | 木村廣光 |
| (2) (株)メディビック | 中江裕樹 |
| (3) 大阪大学大学院医学系研究科
先端移植基盤医療学 | 高原史郎 |
| (4) マイクロ化学技研(株) | 江端智彦 |
| (5) 東京女子医科大学医学部
解剖学・発生生物学講座 | 江崎太一 |
| (6) アステラス製薬(株) | 浅野雅之 |
| (7) 中外製薬(株) | 内田智昭 |
| (8) 田辺三菱製薬(株) | 沢 治樹 |
| (9) 旭化成ファーマ(株) | 伊東裕通 |

のHLA多様性に対応した血清学的検出方法も開発されていない。本研究は、慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体を検出するための、日本人のHLA多様性に対応した高精度で簡便なプロテインチップの開発および抗体産生機序の解明による新規治療法の確立を目的とする。本年度は、研究班全体が主に 1. 抗HLA抗体診断用プロテインチップ作成するための抗原の選択； 2. 免疫マイクロチップ法によるHLAタンパク抗原基板上の固相化および抗体認識部位構造の保持等； 3. ヒトHLA-A2トランスジェニックラット作成； 4. 遺伝子改変ラットの移植医療への応用研究； 5. 慢性移植腎症に深く関わっているglycocalyx傷害の移植腎障害へ及ぼす影響など、5つのテーマを分けて検討を行った。

A. 研究目的

近年、種々の免疫抑制剤の開発により移植腎の短期生着率は飛躍的に向上した。しかし、腎移植患者の約半数は術後10年以内に移植腎機能不全にて透析に移行しており、その8割は慢性移植腎症によるものである。慢性移植腎症の発症には、抗体関連型拒絶反応が深く関わっていると報告されているが、その発症機序、診断法および治療法は確立されていない。一方、古典的血清学的交差試験に加え、抗ドナー抗体関連拒絶反応の病態と病理解析が進んできたが、いずれも実用化レベルに至っておらず、日本人

B. 研究方法

①抗HLA抗体診断用プロテインチップの開発
慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体診断用プロテインチップを開発するための予備実験として、パブリックに公開されているHLAに関する多様性の情報を収集し、日本人の多様性、抗原特異性、抗原性、安定性などを考慮し、幾つかの代表的なHLA抗原を選択した。また、選択されたHLA抗原においては、検出に最適な当該抗原領域を、アミノ酸一次配列および立体構造からの適正評価を行った上決定した。さらに、

設計した抗原のアミノ酸配列を元に、コドン最適化および遺伝子合成を行い、バキュロウイルスを用いたタンパク質発現ベクターを構築し、遺伝子組換えウィルス感染カイコ蛹より、タンパク質の生産およびニッケルカラムにての精製を行った。

②慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体診断用のプロテインチップ作製のためには、抗HLA抗体が結合するHLA分子あるいはそのミミックを基板上に固相化する技術が必要である。さらに、抗HLA抗体を正しく検出するためには、これらタンパクが固相化された後も抗体認識部位構造の保持していることが重要である。

タンパクの固定化方法としては、主に物理吸着法、化学結合法、タグ結合法などの方法がある。しかし、これらの方法は、タンパクの固定性、タンパク活性の保持、操作が煩雑であるといった課題を有する。また、タンパクは各々性質が異なるため、種々のタンパクを単一の方法で固相化を行なうことは非常に困難である。以上の課題を解決するために、我々のグループでは、マイクロチップ流路内に微小ポリスチレンビーズに結合した抗体を含む親水性の光硬化性樹脂を導入し、光照射を行なうことにより抗体を固相化する基盤技術の開発を行なった(WO 2007/074756)。この技術によって、任意の形状で抗体を液相と同様の状態で容易に固相化することが実現された。さらに、マイクロチップを用いることにより、分子の移動距離が短縮され迅速に結果が得られる、またキャピラリー力のみで送液が可能であることから操作が容易であるといった特長を有する。

本年度では、この基盤技術をもとに抗HLA抗体診断用プロテインチップ開発を行なうため、光硬化性樹脂濃度、マイクロチャンネルサイズ及びパターンニング、抗体固相化に用いる微小ポリスチレンビーズ径、抗体濃度、抗体吸着時間、光硬化性樹脂に抱合するビーズ濃度、ヒトIgEマイクロチップイムノアッセイ等について、諸条件の最適化の検討を行なった。

③ヒトHLA-A2トランスジェニック(Tg)ラット作成するための遺伝子発現カセットの作製および遺伝子発現の確認においては、当該ヒトHLA-A2 Tgラット作成するため、発現ベクターであるpCAGGSベクターにヒトHLA-A2(0201)およびヒトβ2-microglobulin(HuB2m)遺伝子へ

の組み換えを行い、各発現カセットを作製した。また、作成したpCAGGS-HLA-A2、pCAGGS-HuB2m発現カセットプラスミドを制限酵素切断後電気泳動による確認を行った。さらに、ハムスター卵巣由来細胞株のCHOを用いて、発現カセットの遺伝子導入を後の細胞表面のタンパク発現パターンについて検討した。

④遺伝子改変ラットの移植医療への応用研究においては、慢性移植腎症をはじめとする、各種慢性臓器拒絶モデルでは、同種異系間臓器移植における抗主要組織適合抗原抗体が関与する慢性拒絶反応の免疫病理学的メカニズムを明らかにする目的で、EGFP-transgenicラットを用い、アロ異所性心臓移植、皮膚移植を実施した。また、リンパ球増殖反応、細胞性傷害反応、flowcytometry(FACS)解析、定量PCR法、ウィルススペクター(アデノ・レンチウイルス)を用いた遺伝子導入等を用いた遺伝子解析した。

⑤慢性移植腎症に深く関わっているglycocalyx傷害の移植腎障害へ及ぼす影響の検討においては、正常ヒト、慢性移植腎症、およびC4d陽性移植腎患者の腎生検検体を用いて陽性荷電鉄コロイド染色を行った。まず、正常ヒト腎生検組織を用い、鉄コロイド染色を行う際の最適のpH条件を決定したうえで、慢性移植腎症、C4d陽性移植腎患者の生検における染色性を正常腎と比較検討した。また、ラットモデルを用いて、慢性移植腎症の原因であるシクロスポリンがglycocalyx傷害をきたすかどうか、glycocalyxに対して保護的に作用することが期待されるヘパリンのglycocalyx傷害に与える影響についても検討を加えた。

(倫理面への配慮)

本実験を遂行するにあたり、動物実験では各施設の実験動物指針マニュアルに則り、また、遺伝子操作に関しては、各施設の遺伝子組み換え実験等の規約・マニュアルを遵守し、実験を遂行した。動物愛護の観点にも配慮し、実験に用いる動物は最低限とすると共に、出来る限りin vitroの系で代用するように心がけた。尚、移植患者からサンプルの提供および使用については大阪大学の倫理委員会に申請を行い、承認を得た上で研究を進めた。

C. 研究結果

①抗 HLA 抗体診断用プロテインチップの開発においては、代表的な HLA として、HLA-DR4 および HLA-A2 を選択し、これらを中心に次のステップに沿って研究を行った。

HLA-DR4 および HLA-A2 に関して、日本人に多いアレルタイプと頻度を、公共のデータベースや論文情報をもとに調査し、それらの傾向から、ターゲットとするアレルを絞り込んだ。DR4 に関しては DRB1*0403、DRB1*0405、DRB1*0406 など、A2 に関しては A*0201、A*0206 などの頻度が高いことを確認した。一方、抗原設計のために、公表されているすべてのアレルのアミノ酸配列を用いてマルチプルアライメントを行い、コンセンサス配列の確認および多様性領域の確認を行った。また、分析して抗原設計するために、頻度の高い HLA-DR4 および HLA-A2 のみにフォーカスしたコンセンサス配列も確認した。さらに、HLA-DR4 および HLA-A2 が、他の HLA-DR や HLA-A に対し、特異的に検出できる領域を絞り込むため、HLA-A2 および HLA-DR4 のマルチプルアライメントを行った。日本人特有の多様性を識別できる領域を調べたところ、非常に限定されたわずかな領域しかなく、タンパク質抗原として特異的に識別できるものを設計することが非常に困難であることが分かった。そのため、他の HLA-A や HLA-DR に対し、特異性を有する領域を調べたところ、HLA-DR4 の場合 38-43 a. a. および 55-60 a. a.、HLA-A2 の場合 86-140 a. a. および 166-191 a. a. が、特異的な領域であることが分かった。

アミノ酸一次配列および立体構造からの適正評価においては、ターゲット HLA のアミノ酸配列の親水性、疎水性、抗原性、アクセスビリティなどを調査し、抗原としての適正を有していることを確認した。また、既存の立体構造データベースや論文情報をもとに立体構造を予測し、前述の絞り込んだ領域が、生体内で抗原提示されやすい場所に位置しているかどうか確認したところ、比較的抗体がアクセスし易い場所であることが予測できた。これらの結果を踏まえて、タンパク質発現系について検討した。哺乳類のタンパク質構造に類似したリコンビナントタンパク質を、短期間で大量に得るための手段として、昆虫細胞の発現系を利用した。設計したタンパク質抗原を、より多く、より安定に生産するために、昆虫細胞の発現系に最適なコードン配列を設計し、その塩基配列を含む発現ベ

クターを構築した。また、抗原特異性が高い領域だけの設計の場合、サイズが小さいため、タンパク質として十分に得られない可能性があるため、少し領域を広げた 3 種類のサイズのタンパク質を、HLA-DR4 および HLA-A2 それぞれにおいて設計（本研究におけるコンストラクト名：DRB4-1、DRB4-2、DRB4-3、A2-1、A2-2、A2-3）し、各発現ベクターを構築した。次に、タンパク質の生産・精製のため、遺伝子組換えウィルス感染カイコ蛹を、磨砕・可溶化処理後に超遠心分離を行い、可溶性画分と不溶性画分を分離し、SDS-PAGE およびウェスタンブロットで、目的のタンパク質の量や質の確認を行った。その結果、HLA-DR4 に関しては、DRB4-1、DRB4-2、DRB4-3 のいずれにおいても、SDS-PAGE およびウェスタンブロットでタンパク質が確認できたが、その大半が不溶性画分から検出された。一方、HLA-A2 に関しては、A2-2 および A2-3 において、タンパク質が確認できたが、A2-1 のタンパク質は確認できなかった。また、A2-2 および A2-3 いずれも、大半が不溶性画分から検出された。A2-1 に関しては、再度組換えウィルスの作製からやり直したが、やはり検出できなかったため、DRB4-1、DRB4-2、DRB4-3、A2-2、A2-3 のみタンパク質の精製を行った。精製後、SDS-PAGE およびウェスタンブロットでタンパク質の量と質を確認したところ、いずれのタンパク質も、回収率は悪いながらも比較的高純度で精製されていることが確認できた。

②光硬化性樹脂濃度の検討においては、スライドガラス上に滴下した各濃度の光硬化性樹脂に対して光照射を行ない、光硬化状態について検討を行った。その結果、6%以上の濃度の光硬化性樹脂については、光照射による硬化が認められた。さらに、30%以上の濃度の光硬化性樹脂については、硬化した樹脂がスライドガラスから脱落することが明らかとなった。以上の結果から、本プロテインチップに用いるのに最適な光硬化性樹脂濃度は、6-20%であることが示された。パターンニングの検討においては、深さ 50-500 μm のマイクロチップを、エッチングまたはドリル加工の後、熱融着を行なうことにより作製し、各種マイクロチャンネルに 10%の光硬化性樹脂を導入し、マスクを介して光照射を行うことにより樹脂硬化パターンの作製を行なった。以上の工程によって作製した硬化樹脂を含むチャンネルに、超純水をピペットにより導入し、