

択し、ATCCより入手した。これを親細胞元株にして我々のVLP産生技術を用いJE-VLP持続産生株CHO-J12、WN-VLP持続産生株CHO-WN12の樹立に成功した。しかし、この樹立細胞はFBS添加培地を要するため、産生されたJE-/WN-VLPワクチンは動物(ウシ)血清由来unknownリスク因子の迷入が問題とされる。そこで、VLP発現CHO細胞の無血清培地/無蛋白培地への馴化を試み、今年度で馴化細胞株樹立を完了させた。

培養細胞を血清不含培地に馴化した場合、細胞性状のみならず、産生蛋白量や産生蛋白の性状も大きく変換することが多々生じる。事実、接着性であったCHO細胞は浮遊性細胞に変換された。しかし、馴化途中のチェックでは産生量が馴化開始前と同等であり、馴化後の産生JE/WN抗原は超遠心で接着性CHO細胞由来のVLPと同様の挙動を示し、抗原構成蛋白もE蛋白とprM/M蛋白を含み、感染防御中和エピトープを保持したJEV/WNV特異抗原であることが示された。従って、馴化CHO浮遊性細胞株は、次世代JE-/WN-VLPワクチン製造用細胞として有用であると思われる。

他方、本年度の研究で明らかになった問題点は、細胞が接着性・浮遊性に拘らず持続発現CHO細胞から産生されたJE-VLP、WN-VLPの粗精製標品中に約30nmの球形粒子と共に、10~20nmの不定形構造が観察されたことである。加えて、粒子抗原精製に汎用される蔗糖密度勾配遠心法を用いると、球形粒子が崩壊して不定形構造に変化する可能性も示された点にある。両者は16時間遠心の平衡密度勾配で同一比重のピーク画分に分画されてしまう。何れの抗原形態でも同等の感染防御抗原活性を保持しているのか、形態崩壊に伴い抗原性が低下するのか検討が必要である。

この点に関して、予試験的に行った粗精製VLPを用いたマウス免疫実験では、感染防御に主要な中和抗体が誘導され、免疫マウスは致死量以上のウイルス感染に対して100%防御された。しかし、不活化ワクチン免疫マウスと比較すると中和抗体のレベルは有意に劣っていた。従って、粒子状抗原と不定形抗原のうち一方は免疫原性が劣っている可能性がある。

そこで、本年度はWN-VLPを中心に形態の異なる2種の抗原の分離精製法の検討に主力を注いだ。しかし、ゲル濾過法では2種の抗原を分離できず、通常のイオン交換クロマトグラフィーでは満足できる精製度が得られなかった。唯一、硫酸基を結合活性基とするCellufine sulfateカラムに両者を分離できる可能性が僅かながら認められた。ホルマリン不活化ワクチン或いは未処理VLPを用い

て分離効果を検討したい。また、蔗糖密度勾配遠心法の蔗糖濃度・遠心時間等についても詳細な検討が再度必要であろう。更には、免疫増強剤としてアジュバント使用についての検討も視野に入れておくべきと考える。

(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：ヒト用ワクチン製造に適した細胞株で産生したウイルス抗原の解析

昆虫細胞は、有用蛋白の大量製造に適するため、近年注目されている。一般の医薬品のみならず、昆虫細胞を用いて製造されたワクチン蛋白は、世界的に臨床試験が進められ、評価されるようになってきた。例えば、ヒトパピローマウイルスに対するワクチンはすでに市場化され、インフルエンザウイルスに対するワクチンは承認申請中である。JEVと同じフラビウイルス属であるウエストナイルウイルス、デングウイルスに対するワクチンも臨床試験中あるいは臨床試験準備中である。

ワクチンは健康人に接種するため、また多くの人に使用するため、その安全性に関しては特に注意が払われる。ワクチン製造における昆虫細胞の哺乳類細胞に対する利点の一つは、生物学的分類上大きく異なるため、哺乳類細胞に含まれるかもしれない未知の(病原性)微生物の可能性が、昆虫細胞では極めて低いことにある。

もう一つの昆虫細胞の利点は、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1グラムの担体に 10^7 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、ミリグラムからグラム単位の蛋白製造がインスリン等で示されている。今回のexpresSF+細胞を用いた安定発現系では、約1 μ g/mlのJEV蛋白産生量であったため、10リットルのバイオリアクターを使用した 10^7 個/グラムの高密度培養では計算上100mgの収量となる。これはワクチン当量で表せば1グラムに相当する。本研究では、expresSF+細胞由来のEPが、Sf9細胞または哺乳類細胞由来のEP、そして感染細胞由来のSHAと同等の生化学的性質を示すことが明らかにされた。さらに、産生量は哺乳類細胞の約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可能性が示された。

E. 結論

小島ら・小西らが其々既に開発してきた「表面はウイルスと同等で内部にウイルスゲノムを含まない非感染性のウイルス様粒子(VLP)/細胞外粒子(EP)」発現技術を用い、感染ウイルス大量培養もその対応施設も不要な、安全/安価な理想の次世代

JEV, WNV ワクチンについて、「細胞培養によるバイオ医薬品製造国際基準」に合致する VLP/EP サブユニットワクチン研究開発を推進した。

小島・東らは、ヒト用医薬品製造に承認されている CHO 細胞を親株に用いた官民共同研究で、

(1) JE-VLP を持続的に大量産生する安定な CHO-JE 細胞株を無血清培地/無蛋白培地に馴化させた細胞株の樹立を完了した。これら細胞株が産生する JE-VLP 抗原の性状を解析し、ワクチンへの有用性を示唆した。

(2) 既に樹立が完了していた持続発現 CHO-WN 細胞株から粗精製した WN-VLP のマウス免疫実験を行い、WN-VLP は高い中和抗体価を誘導すること、免疫マウスは大量 (250 LD₅₀) の WNV 感染に対しても 100% 生存することを示した。

小西らは、米国 FDA のヒト用ワクチン製造認可 expresSF+昆虫細胞を親株に用いた分担研究で、

(3) JE-EP を持続的に大量産生する安定な expresSF+細胞株の樹立に成功した。産生 JE-EP 抗原は感染 C6/36 蚊細胞由来の JEV と糖付加等同等の性状を示すことから、JE-EP ワクチン製造の有力な細胞株になる事を示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishikawa T, Widman D G, Bourne N, Konishi E and Mason P W: Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. *Vaccine* 26: 2772-2781, 2008.

Matsunaga T, Shoda M and Konishi E: Japanese encephalitis remains common in Japan. *Pediatric Infectious Disease Journal* 27: 769-770, 2008.

Konishi E, Yagawa K and Yamanaka A: Vero cells infected with vaccinia viruses expressing Japanese encephalitis virus envelope protein induce polykaryocyte formation under neutral conditions. *Jap J Infect Diseases* 61: 410-411, 2008.

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.

小西英二: 日本脳炎ワクチンに関する最近の話題。臨床と微生物, 36: 41-44, 2009.

小西英二: 日本脳炎 DNA ワクチンの開発。臨床獣医, 27: 22-26, 2009.

2. 学会発表

Mason P W, Widman D, Ishikawa T, Bourne N, Suzuki R, Winkelmann E, Frolov I, Carrion R and Konishi E: Engineering third-generation vaccines for West Nile encephalitis, Japanese encephalitis, and dengue. The 1st Pan-American Dengue Research Network Meeting. Recife, Brazil, January 2009

Yamanaka A, Soegijanto S, Rantam F A and Konishi E: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness using mice. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008

Yamanaka A, Soegijanto S, Fedik A, Rantam F A, Wardhani A P, Helen Susilowati H, Hendrianto E and Konishi E: Complement levels control enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue viruses. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008

Atsushi Yamanaka, Yohei Sakai, Eiji Konishi: High prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, relative to a small pig population. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases Conference. Hanoi, Vietnam, October, 2008

Ohtaki N, Takahashi H, Takasaki T, Sata T and Kojima A: Production and evaluation of virus-like particles of West Nile virus from mammalian cell clones as a novel subunit vaccine. International Union of Microbiological Societies (IUMS2008): XIV. International Congress of Virology (10-15 August 2008, Istanbul).

Yamanaka A, Kosugi S and Konishi E: Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection controlled by complement levels. The 42nd Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences

Program. May, 2008

桑原三和、小西英二：日本脳炎ワクチン抗原を連続産生する昆虫細胞株の樹立。第12回日本ワクチン学会学術集会。2008年11月

大滝尚広、高橋秀宗、田中恵子、石川豊数、東雍、佐多徹太郎、小島朝人：哺乳動物細胞クローンをを用いたウエストナイルウイルス様粒子ワクチン産生系樹立と有効性評価に関する基礎的検討。第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山。

岡本成史、松浦正明、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—日本脳炎ワクチンの1回接種での防御免疫応答の持続性と免疫学的機構。第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山。

宮川優子、山中敦史、小西英二：デング2型ウイルスを用いたマウスモデルにおける中和抗体のウイルス血症防御能。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月

北井陽子、近藤高志、小西英二：補体を利用したウマ血清中ウエストナイルウイルス特異的 NS1 抗体の測定。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月

北井陽子、白藤浩明、金平克史、神尾次彦、近藤高志、小西英二：日本脳炎ワクチン接種後にウエストナイルウイルス (WNV) を実験感染したウマ血清中の WNV 特異 NS1 抗体測定：ブロッキング ELISA 法と CDC 法の評価。第15回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2008年10月

山中敦史、酒井陽平、小西英二：インドネシアのジャワ島住民における日本脳炎ウイルス抗体保有状況。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月

北井陽子、近藤高志、小西英二：ウエストナイルウイルス感染を鑑別する補体利用の抗体測定法。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

国際特許出願：PCT/JP2008/70354.

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がSREBP-2により制御され、LXR依存の末梢型と二重の制御を行うこと、肝型・末梢型の二重システムはラット・マウス・ヒト肝に共通することを見いだした。加えて肝型プロモーターのPitavastatinによる活性化、転写因子AP2αのPKDによるリン酸化を介するABCA1発現制御の解明、核内受容体LXR選択的リガンドRiccardin C骨格の効率的合成法確立により、HDL上昇薬の基盤創製に貢献した。また血管病態の制御に関して、炎症性serum amyloid Aタンパクが形成するHDLとアミロイドーシスの関わり、動脈硬化病変形成時の酸化LDLの挙動を解析し、動脈血管の弾性や血管平滑筋石灰化に関わるエラスチンと、その架橋酵素リシルオキシダーゼの遺伝子を、甲状腺ホルモンを標的として同定した。さらに胆汁酸の肥満抑制に関して、胆汁酸吸着樹脂の小腸でのSHP、FGF-15発現制御を見いだすとともに、胆汁酸を内因性リガンドとしエネルギー消費を刺激するGPCR/TGR-5の新規リガンド創製をめざし、胆汁酸の側鎖と母核の置換基を導入し効果を解析した。

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)東京創薬研究所 前島崇司、田辺宗平
- (3) 田辺三菱製薬(株)薬理研究所 坂井薫、島田浩志、川端(杉本)佳奈美、千葉健治
- (4) あすか製薬(株) 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り、注目されるリスクがHDL低下である。低HDL血症は日本人の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が近年実証され、動脈硬化症の予防と治療にHDL上昇薬が待望されている。その標的として、HDL欠損症の原因遺伝子である膜トランスポーターABCA1が注目される。本研究では、血中HDLの大部分を直接産生する肝のABCA1について、肝特異的なプロモーターを見いだしており、転写制御機構の解明からHDL上昇手段を探る。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与する。本研究では、動脈での「炎症・食害」や「酸化傷害」、「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畳すると動脈硬化リスクを相乗的に増加させる。最近、胆汁酸が G タンパク質共役型受容体 (GPCR) TGR5 のリガンドとしてエネルギー消費促進作用を示す機構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有用な TGR5 リガンドとなる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

肝 ABCA1 は HDL 生産に最重要の役割を持ち、コレステロールにより他組織とは異なる発現応答を示す。昨年度同定した肝型の遺伝子プロモーターのステロイド応答を担う転写因子を、応答領域に結合する候補因子の siRNA ならびに過剰発現の効果を検討し、同定した。肝型および末梢型のプロモーターによる二重の制御が *in vivo* でも機能するかについては、ラットに胆汁酸吸着樹脂コレステリド (田辺三菱製薬 (株) で合成) / プラバスタチンを投与して肝コレステロール低下させ、肝・小腸の mRNA 発現から比較検討した。肝 ABCA1 の二重制御がマウスやヒトにも共通するかどうか、肝 RNA (市販品) の 5' RACE 解析により検討した。

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肝 ABCA1 mRNA 発現、肝型および末梢型プロモーター活性に及ぼす影響を解析し検討した。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 上昇作用を示すことが知られる。本課題主任研究者の最上らが見いだした LXR α 選択的なアゴニスト Riccardin C の構造活性相関の解明と新規誘導体の創製のために、Riccardin C の効率的合成法の解明と立体構造の解析を行った。

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) による HDL 形成に関して、1) SAA による *in vivo* での HDL 新生を、(1) LPS で SAA を誘導したマウスで SAA-HDL の産生、動脈硬化症の発症を検証し、ABCA1 欠損の影響を解析する。(2) SAA による HDL 産生をアポリポ蛋白と比較解析する。(3) 硝酸銀と amyloidosis enhancing factor (AEF) との投与で脾臓などに amyloidosis 形成を誘導し、SAA-HDL の役割

を検証する。2) ABC 蛋白を介した細胞の生体防御機能の制御について、(1) ABCA1 遺伝子の AP2 α による発現制御と細胞周期や増殖との関連、(2) ABCA7 の食食促進作用を ABCA7 欠損・高発現マウス細胞で検証する。ABCA7 の分解による発現制御機構を解析する。

マウス酸化 LDL 測定法を確立し、動脈硬化モデルである ApoE-KO マウスの血中酸化 LDL 濃度を 40 週まで測定した。動脈硬化病変の進展を評価し、病巣切片を作成し、抗酸化 PC モノクローナル抗体 (DLH3)、抗アクロレインモノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学的検討を行い、脂質過酸化物の沈着を検出した。

動脈石灰化の甲状腺ホルモンによる抑制の機序については、①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)、合成型ヒト大動脈平滑筋細胞を T3 で処理し、甲状腺ホルモン核内受容体の発現抑制を行い、T3 による血管弾性関連遺伝子の発現変動を検討した。②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摘出大動脈の進展性を測定するとともに、大動脈の血管弾性関連遺伝子発現を測定した。③培養ラット大動脈平滑筋細胞を T3 処理、可溶性エラスチン量および不溶性エラスチンの変化を検討した。

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、2 型糖尿病モデルの高脂肪食負荷 KKAy マウスにおいて、回腸の終末部の胆汁酸代謝関連の抑制性核内受容体や小腸より分泌されるホルモンの遺伝子発現への影響を解析した。

また、エネルギー消費を刺激する G 蛋白共役受容体 (GPCR) / TGR5 の内因性リガンド胆汁酸の構造活性について検討した。胆汁アルコール 13 種及びケノデオキシコール酸のアルキル同族体を化学合成し、細胞に CMVSPORT6-hTGR5 および CRE-Luc を導入しレポーターアッセイにてリガンド活性を測定した。

(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コレステロールによる転写制御機構 [最上]

肝の 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ち、末梢の ABCA1 とは逆に、コレステロール低下で発現が上昇する。昨年度、ラット肝および肝由来細胞 McARH7777 には肝型と末梢型の mRNA が存在し、肝型と末梢型プロモーターの二重の制御を受けることを見いだした (*J Biol Chem* 282: 21090-21099, 2007)。肝型プロモーターはステロール増で抑制/減で活性化され、その応答は sterol responsive element (SRE) が担う。コレステロール欠乏により SREBP-2 の核内移行型が増加し、SRE に結合し活性化する。さらに SREBP-2 発現ベクターの導入によっても活性化されること、コレステロール欠乏による活性化は SREBP-2 の siRNA 処理により消失することから、肝型プロモーターのコレステロール応答は SREBP-2 が担うことが明らかになった。逆に、末梢型のプロモーターはコレステロール減少により活性が低下するが、SREBP-2 発現や Ebox 変異導入には影響されず、LXR 応答配列の変異で応答が消失することから、LXR 内因性リガンド減少により末梢型プロモーター活性が低下したと考えられる。

ラット肝のコレステロールを胆汁酸吸着樹脂コレステリド/プラバスタチン投与により低下させると、末梢型 ABCA1 mRNA の低下と肝型の増加が認められ、肝 ABCA1 タンパクと血中 HDL が上昇し、in vivo での肝型・末梢型の二重制御が示唆された。

肝型と末梢型の ABCA1 mRNA はラットのみならず、マウスおよびヒト肝(市販品)にも検出され、二重制御が種を超えて存在することが示唆された。

2) 転写制御因子 AP2 α による ABCA1 発現促進 [横山]

細胞周期を制御する転写制御因子 AP2 α はリン酸化を受けて ABCA1 の遺伝子発現を抑制的に制御することを見いだしている (*Circulation Research* 101: 156-165, 2007)。この機序について AP2 α の PKD による機能的リン酸化部位を特定し、in vitro・in vivo での PKD の阻害が HDL 産生を高めることを明らかにした (*ATVB* 28:2282-2287, 2008)。

3) HMG-CoA 還元酵素阻害薬の HDL 代謝調節 [前嶋・田辺]

Pitavastatin は肝由来 McARH7777 細胞において

総 ABCA1 mRNA の発現を増強した。LXR により制御される末梢型 ABCA1 mRNA の発現が減弱したことから、肝型 ABCA1 mRNA の発現増強が示唆された。そこで末梢型・肝型 ABCA1 プロモーター活性に及ぼす影響を検討したところ、末梢型 ABCA1 プロモーター活性は Pitavastatin により減弱された。その作用は LXR 結合部位 (LXRE) 変異により消失し、LXR を介することが示された。一方、肝型プロモーターについては Pitavastatin により活性が増強された。その増強は SREBP2 結合部位 (SRE) に変異を導入すると消失し、Pitavastatin は SREBP2 を介して肝型プロモーターを活性化することが明らかとなった。

4) フェノフィブラートの血糖低下と HDL 上昇 [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。HDL 上昇に関して、アポ A-I、アポ A-II や末梢 ABCA1 発現上昇作用が報告されているが、低 HDL 血症は高血糖と相関することから血糖低下作用の寄与も推定される。本研究では血糖低下機序を解析した。フェノフィブラートはマウス肝において解糖系の *pd4*、脂肪酸 β 酸化酵素 *ech1* や *cpt1a* および *aca2* mRNA 発現を促進し、骨格筋ではむしろ減少させた。これに対しより強力に血糖を低下する PPAR δ アゴニスト GW501516 は肝への影響は小さく、骨格筋の *cpt1a* と *ucp3* を著しく増加させ、エネルギー消費・熱産生系の亢進が推定された。

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。より穏和な条件で環状構造を構築する方法として、SNAR 反応による環化反応を用いる方法を検討した。

Riccardin C の4つの芳香環に相当する各フラグメントを合成し、Suzuki-Miyaura カップリング反応および Wittig 反応により連結し、環化前駆体を合成した。環化反応の条件を検討し、収率 60% で環化成績体を得た。官能基変換、ならびに O-メチル基の除去により、Riccardin C へと導いた。合成した Riccardin C は天然由来の化合物と NMR 等のスペクトルが一致することを確認した。本方法による Riccardin C の合成は、計 20 工程、総収率 6.2% であった。

また、合成した Riccardin C もしくはその O-メチル

化体を用いて、温度可変の $^1\text{H-NMR}$ により、その立体構造を詳細に解析した。その結果、Riccardin C の立体構造と動的な挙動に関する知見を得ることができた。

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、細胞の貪食作用の制御 [横山]

ABCA1 による HDL 形成は apoA-I だけでなく種々のヘリックス型アポリポ蛋白質によって起こる。全身性炎症性蛋白質 serum amyloid A (SAA) も界面活性ヘリックスからなる物理化学的構造を持ち、HDL を形成する。その反応を *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、肝臓の SAA 産生分泌が誘導される。SAA-HDL は野生型マウスでは大量に産生され血漿中に現れるが、ABCA1 欠損マウスでは検出できない。肝細胞を単離し初代培養すると、ABCA1 欠損では遊離の SAA が分泌され、apoA-I と同様に、SAA による HDL 形成も 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)。さらに、SAA-HDL の機能を検討するために、硝酸銀と AEF 注射による慢性炎症における遠隔臓器 amyloidosis 形成のモデルを野生型/ABCA1 欠損マウスで作成し、脾臓 amyloidosis は SAA-HDL が無い ABCA1 欠損でも形成されることを示した(論文投稿準備中)。

ABCA7 は ABCA1 と高い相同性をもち、強制発現させると apoA-I から HDL を形成するが、内因性の ABCA7 は細胞表面に発現せず HDL 産生を起こさない。ABCA1 とは異なりステロールにより SREBP 依存性に転写抑制が起こり、細胞の貪食作用を制御している(*JLR* 47: 1915, 2006)。ABCA1 はカルパインによる限定分解で発現制御を受ける。分解は ABCA1 の endocytosis 後細胞内で起こり、細胞表面で予め apoA-I が結合することにより ABCA1 は分解されずに細胞表面に recycle され、また endocytosis の阻害によっても細胞表面の ABCA1 が増加して HDL 産生が高まることを示した(*ATVB* 28: 1820-1824, 2008)。この機序が ABCA7 の発現制御に当てはまるかどうかを現在検討中である。

2) 細胞内組織内の中性脂質蓄積機構とその制御 [板部]

標準的飼料で飼育した apoE-KO マウス(オス)から、4、10、20、28、40 週目に採血するとともに、大動脈を摘出した。10 週齢の時点では、動脈硬化病巣の領

域は大動脈表面積のわずか 0.5% に留まっているが、20 週齢以降著しく動脈硬化が進展し、40 週齢では表面積の 33% を占めた。同様に 20 週齢以降に病巣断面積が急速に増加することが確かめられた。

これと同じマウスの血漿から LDL を分離し、血漿酸化 LDL レベルを測定した。ApoE-KO マウスの血漿酸化 LDL レベルは、約 0.01 ng OxLDL/ μg LDL 程度であったが、生後 20 週齢をピークに一過的に上昇することを見出した。20 週齢では病巣面積は約 3% で、まだ動脈硬化の進展は強くないが、この後急速に進展が始まる時期に当たっている。つまり、ApoE-KO マウスの血漿酸化 LDL レベルは、病巣の進展期に先だつて一過的な上昇をすることが分かった。

大動脈組織中では、10 週の時点で既に酸化 PC が血管壁内に沈着していた。面白いことに 4-10 週では内膜肥厚部よりも中膜平滑筋において酸化 PC の沈着が認められた。28 週以降は、著しく拡大する内膜肥厚部に広くびまん性に酸化 PC の沈着が認められ、中膜での染色はむしろやや弱まっていた。脂質過酸化反応の生成物の一つ、アクロレインで修飾されたタンパク質の沈着も、酸化 PC 同様に 10-20 週では中膜平滑筋が強く、28-40 週になると内膜肥厚部がびまん性に染色された。4 週齢のマウス大動脈切片を検討したところ、10 週齢に比べてやや弱いものの中膜平滑筋において酸化 PC の存在が認められたことから、血管局所での酸化ストレスが動脈硬化病巣形成のごく初期で既に進行している可能性が考えられた。

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。① 定量性リアルタイム RT-PCR の結果、② 甲状腺機能低下症モデルラット大動脈を用いて、応力-ひずみ関係について検討を行ったところ、甲状腺機能低下ラット(Hypothyroid) 群では正常ラット(Euthyroid) 群と比較して弾性係数が有意に高く、応力-ひずみ曲線が左方にシフトしていた。よって、甲状腺機能低下に伴う動脈の弾性低下が示唆された。また、血管弾性関連遺伝子発現については Eln, Lox, Col1a1 および Col3a1 のすべての遺伝子において Hypothyroid 群では有意に発現が低かった。③ 可溶性エラスチンおよび不溶性エラスチン定量の結果、T3 投与により可溶性エラスチン

量の減少、不溶性エラスチン量が増加し、これらの作用は BAPN により抑制されたことから甲状腺ホルモンが Eln および Lox 発現を上昇させ、LOX の活性化により架橋反応を促進し、不溶性エラスチン量を増加させることが示唆された。以上より、甲状腺ホルモンが血管平滑筋細胞中の核内受容体に直接作用し、Eln および Lox 発現を上昇させ、LOX の活性化により架橋反応を促進し、不溶性エラスチンを増加させることにより血管弾性に寄与している可能性が示唆された。

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 [坂井ほか]

肝臓と同様に、小腸における SHP の遺伝子発現はコレステミドの投与によって顕著に抑制された。FGF-15 の遺伝子発現は、SHP 同様に 1、1.5% のコレステミド投与群でコントロール群と比較して顕著に抑制されていた。この結果により、コレステミドが肝臓のみならず小腸においても、胆汁酸を吸着することで胆汁酸の腸肝循環を阻害し、脂質・糖代謝に関連するたんぱく質の遺伝子発現に対して影響を及ぼしていることが示唆された。

2) 胆汁酸を基本骨格とする TGR5 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 GPCR/TGR5 は脂肪細胞、筋肉細胞において TGR5-cAMP-iodothyronine deiodinase シグナル伝達系を介してエネルギー消費を刺激することが知られている。本研究では、メタボリック症候群の予防・治療薬の開発を志向した新たな TGR5 リガンドの創製を目指し、天然に存在する胆汁酸類縁体、及び胆汁酸を化学修飾した胆汁酸同族体の TGR5 リガンド活性を一斉に検索する。

(1) 胆汁アルコールのリガンド活性:胆汁酸と同じ母核構造を有する胆汁アルコールの活性を検討した。一次胆汁酸の一つコール酸と母核構造が同一かつコレステロールと同じ側鎖構造を持つ 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α -triol(I) 及びその側鎖の C-22 ~ C-26 位に水酸基を一つ有する化合物についてリガンド活性を検討した。24 位、25 位、26 位に水酸基が存在する場合、母化合物に比して高い活性を示したが、22、23 位に存在する水酸基はその立体配置により活性発現効果に顕著な違いが見られた。C-22 及び C-23 水酸化体のうち、22S 異性体及び 23R 異性体には殆んど活性は認められなかったが、22R 体、

及び 23S 体は強い活性を示した。側鎖の水酸基は数が多いほど高い活性を示した。また、側鎖の構造に拘わらず 5 β -体の方が 5 α -体に比して高い活性を示した。

(2) アルキル胆汁酸誘導体のリガンド活性: 内因性胆汁酸の一つケノデオキシコール酸(CDCA)の 7 位へのアルキル基の導入によりリガンド活性は増加した。アルキル基の効果はメチル基<エチル基<プロピル基と置換基のかさ高さに比例して増加した。天然に存在する胆汁酸の中で最もリガンド活性が高いリトコール酸の 7 位へのメチル基の導入はその活性を著しく増強した。

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コレステロールによる転写制御機構 [最上]

HDL (高密度リポタンパク) は低下すると冠動脈疾患のリスクが増加する。また低 HDL 血症はメタボリックシンドロームの危険因子の一つであり、そのリスクは糖尿病や高血圧と重複するとさらに高まる。肝の ABCA1 が血中 HDL の 8 割を生産する最重要の役割を持つ。本研究において、肝 ABCA1 の発現を特異的に制御する肝型プロモーターを見だし (*J Biol Chem* 282: 21090-21099, 2007)、コレステロール応答性転写因子 SREBP-2 が活性化する機構を明らかにした。小腸など末梢型 ABCA1 発現は LXR が制御し、コレステロールが減少すると低下する。これに対して、肝 ABCA1 発現は肝型・末梢型プロモーターの二重の制御を受け、それぞれがコレステロール減少に対してアクセラ・ブレーキとして働く。肝型・末梢型の ABCA1 mRNA はラットだけでなくマウス・ヒト肝にも認められ、二重制御は共通して存在すると推定される。

なぜ肝の ABCA1 発現は二重の制御を受けるのであろうか? 肝は「コレステロール逆転送系」と呼ばれるシステムの終末に位置し、末梢より HDL により輸送されるコレステロールを胆汁酸に転換して排出する役割を担う(図)。末梢型プロモーターは、コレステロール蓄積時に LXR を介して活性化され、ABCA1 発現を増加して細胞外へのコレステロール放出を促進する。一方、SREBP-2 制御の肝型 ABCA1 プロモーターはコレステロール蓄積により活性が低下する。肝 ABCA1 の二重の発現制御システムは、コレステロール蓄積時に LXR の過剰活性化による ABCA1 過剰発現を防ぎ、コレステロールの末梢への再輸送を防ぐ役割を持つと推定される。

肝はアポリポタンパク A-I を合成し、未成熟な(コレステロールに乏しい)HDL のかたちで末梢組織に供給する重要な役割を担っている。肝のコレステロールが欠乏するとLXR 依存の末梢型プロモーターは低下するが、SREBP-2 依存の肝型プロモーターが活性化すれば一定の ABCA1 発現を維持することができる。このように、肝の二重制御システムは、コレステロール逆転送系における肝 ABCA1 の役割に深く関連していると思われ、またこの発見は新薬の開発に大きく貢献できると考えられる。

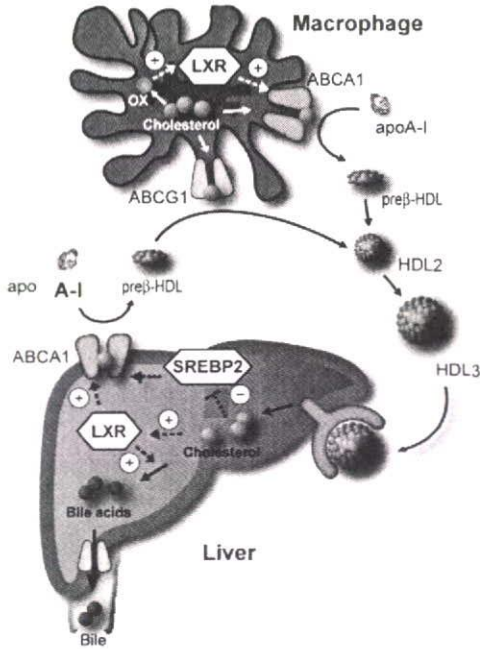


図. 肝はコレステロール逆転送系の末端に位置し、末梢からHDLにより運ばれるコレステロールを胆汁酸に転換する役割を持つ。LXRとSREBP-2 による肝ABCA1の二重の制御は、このような肝の役割と密接に関わっていると推定される

2) HMG-CoA 還元酵素阻害薬の HDL 代謝調節 [前嶋・田辺]

ABCA1 は肝細胞において、ApoA-I に脂質を負荷させ ApoA-I の安定化に寄与する。また、肝特異的 ABCA1 ノックアウトマウスでは血中 HDL-C の 90% が消失し、肝 ABCA1 は HDL 産生に重要な役割を果たすことが知られている。

Pitavastatin はヒト肝ガン由来 HepG2 細胞で ABCA1 mRNA の発現を増強させ CETP mRNA の発現を減弱させる。CETP は LXR により制御され、同じく LXR 制御とされる ABCA1 発現が増強される結果と矛盾していた。しかし、肝の ABCA1 発現は LXR 制御の経路と SREBP2 制御の経路の 2 種類あることが報告されたことから、今回、Pitavastatin による両経路への影響を解析した。その結果、Pitavastatin はラット肝

細胞株 McARH7777 細胞において、SREBP2 による肝型経路を活性化し ABCA1 mRNA の発現を増強することが明らかとなった。

スタチンの LDL コレステロール低下は、肝で SREBP2 活性化により LDL 受容体の発現が増強されることによると考えられている。今回の解析により、スタチンの肝 SREBP2 活性化は血中 LDL-C 低下だけでなく ABCA1 mRNA の発現増強を介して血中 HDL-C の増加につながることを示唆された。

3) フェノフィブラートの血糖低下と HDL 上昇 [青塚]

低 HDL 血症は高血糖と相関することから、フェノフィブラートの血糖低下作用機序について解析した。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。フェノフィブラートはトリグリセリド低下に基づきインスリン感受性を亢進させ、骨格筋において糖代謝を促進させて血糖低下作用を示す可能性が示唆された。これに対し、PPAR δ の選択的アゴニストである GW501516 の血糖低下作用には、骨格筋における ucp3 の発現増強によるエネルギー消費・熱産生系の亢進が影響している可能性が推察された。

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た。鍵反応である環化反応では 60%という比較的良好な収率で環化生成体を得た。本環化反応は従来の方法と比べて非常に穏和な条件で進行することから、各種誘導体合成に汎用性のある方法といえる。また、Riccardin C の立体構造の知見は、新規環状、非環状誘導体の設計に有用な情報である。

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、細胞の貪食作用の制御 [横山]

ABCA1 による HDL 新生の機序とその活性制御について、生体防御反応との関わりを焦点をあてて研究した。1) 炎症性蛋白質である Serum Amyloid A (SAA)が apoA-I と同様 ABCA1 依存性に in vivo で HDL を新生し、これが遠隔臓器の amyloidosis 形成に関わることが示された。2) 細胞周期を制御する転写制御因子 AP2 α が ABCA1 遺伝子発現の負の制御を行い、これは PKD による AP2 α のリン酸化により調節されることが分かった。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与することが分かり、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) 細胞内組織内の中性脂質蓄積機構とその制御 [板部]

本研究では、①マウス血漿中の酸化 LDL 測定法を開発し、②apoE-KO マウスの動脈硬化病巣進展に先立ち、血漿酸化 LDL レベルが一過的に上昇することを見出し、③大動脈組織では病巣形成のごく初期から酸化 PC、アクロレインなど脂質過酸化のマーカ分子の沈着が認められることを見出した。これらの成果は、動脈硬化形成過程における血漿酸化 LDL の経時的変化を初めて明らかにしたものである。また酸化 LDL が病巣形成の結果としてではなく、病巣形成・進展を促す要因として関わっている可能性を支持するものである。

従来、動脈硬化病巣、つまり内膜肥厚部が酸化 LDL 生成の場ではないかと推測されてきたが、今回の結果から、血管中膜における酸化ストレスが、酸化 LDL 生成の要因であるという可能性も考えられた。血漿酸化 LDL レベルの上昇が一過的であり、20 週齢以降再び減少する理由はよく分かっていない。病巣組織の酸化 PC の分布パターンが、初期には中膜、後半は内膜肥厚部に変化することから、組織で生じた酸化 LDL が血漿に現れると、今度はその酸化 LDL が血管内膜に蓄積し病巣進展の要因として作用する可能性も考えられる。

マウスの血漿酸化 LDL の測定系ができたことは、酸化 LDL 研究にモデル動物を用いた遺伝学的アプローチを可能にするものである。今後より広範な研究への応用の可能性が開けていくものと思われる。

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]

本研究により、生理的濃度の甲状腺ホルモンが血管平滑筋細胞中の核内受容体に直接作用し、Eln および Lox 発現を調節することにより血管弾性に寄与していることが明らかになった。動脈硬化には多くの要因と複雑な機序が存在するが、本研究により示された血管弾性関連遺伝子発現調節作用も血管弾性低下に関わっていると考えられ、古くから知られている甲状腺機能低下症における動脈硬化の一因になると考える。近年、医療技術の進歩により動脈弾性を評価できる方法が開発され、今後この分野の重要性は

さらに増してくることが予想される。今後のさらなる研究により動脈硬化の詳細なメカニズムの解明が期待される。

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 [坂井ほか]

本年度は小腸の遺伝子発現に注目し、以前の報告でコレステリドが抗糖尿病作用・インスリン抵抗性改善作用を示した、高脂肪食 KKAY マウスを用いて、FXRの下流にあるSHP、およびFXRにより制御され、小腸から分泌され肝臓に作用するFGF-15の遺伝子発現を検討した。その結果、高脂肪食に1,1.5%のコレステリドを混餌投与することにより、両遺伝子発現増強が顕著に抑制されることが観察された。

近年、肥満・インスリン抵抗性といった病態と小腸の関連が指摘されている(BMC Med Genomics. 2008 May 6;1:14.)。コレステリドは腸管内で胆汁酸を吸着することにより、肝臓のみならず、小腸においても遺伝子発現の制御に関与していることが考えられる。FGF-15は小腸から分泌され肝臓に作用して、胆汁酸合成酵素の制御に関与する蛋白質であるが、胆汁酸の合成以外に糖・エネルギー代謝にも関与することが知られている。コレステリドは体内に吸収されず、腸管内で胆汁酸を吸着することにより、様々な遺伝子の発現を制御し、全身の糖・脂質代謝に作用していることが考えられた。今後はさらにそのメカニズムに関する検討を行い、有効な生活習慣病の予防治療薬開発へ結び付けたい。

2) 胆汁酸を基本骨格とするTGR5リガンドの探索と創製 [宇根]

TGR5は胆汁酸を内因性リガンドとしてエネルギー消費を刺激する。我々はケノデオキシコール酸CDCAの側鎖カルボン酸をアルコールに還元し、リガンド活性が変わらない知見を得た。側鎖のnegative chargeは必須ではなく、胆汁酸様のステロイド母核構造の重要性が示唆されることから、胆汁アルコールの構造活性の検討を試みた。

側鎖の水酸基は数が多いほど高い活性を示した。また、水酸基の存在位置が側鎖末端部位に近づくほど活性増加効果は大きくなった。水酸基が母核に接近しすぎると活性発現効果を示さないものの、その立体配置が活性発現に大きな影響を持つことが示された。また、この結果はメチル基結果とも一致する。これらの結果を総合的に考慮すると、1)母核から離れた位置に置換基を導入することが活性発現には有利に

働くこと、2)母核に近い C-22,C-23 にバルキーな置換基を導入する場合、その立体配置がきわめて重要な要素となり、置換基の極性にはあまり依存しないことが示唆された。

天然に存在する胆汁酸の配位である 5 β (A/B-cis) が 5 α (A/B-trans)体より活性が高く、ステロイドホルモンに関する以前の報告ともよく一致していた。

CDCA の 7 位にアルキル基を導入すると、アルキル鎖が長いほど高い活性を示した。胆汁酸による TGR5 の活性化能はリコール酸 > デオキシコール酸 > ケノデオキシコール酸 > コール酸 > ウルソデオキシコール酸と胆汁酸の hydrophobicity とよく相関している。従って、ステロイド母核の修飾は hydrophobicity を高めることが活性発現に有利に働くことが示唆された。

E. 結論

- 抗動脈硬化性リポタンパク HDL の生産に最重要の肝 ABCA1 について、肝型プロモーターのコレステロールによる転写制御機構を明らかにした。肝 ABCA1 の肝型・末梢型の二重制御が in vivo でも機能し、ラット・マウス・ヒト肝に共通して認められることを示した。
- HMG-CoA 還元酵素阻害薬である Pitavastatin はラット肝細胞において SREBP2 を介して ABCA1 mRNA の発現を増強させ、HDL コレステロール代謝に影響を及ぼしていることが示唆された。
- 血糖と低 HDL は相関する。PPAR α アゴニストのフェノフィブラートはトリグリセリドの低下に基づきインスリン感受性を亢進させ、骨格筋の糖代謝を促進して血糖低下作用を示す可能性が示唆された。
- LXR α 選択的アゴニスト Riccardin C の骨格を作る効率的な合成法を確立した。本方法は幅広い誘導体合成に応用可能であるので、Riccardin C をリード化合物として、高い受容体親和性や選択性をもつ誘導体開発へと展開が期待できる。
- 1)炎症性蛋白質である Serum Amyloid A (SAA) が apoA-I と同様 ABCA1 依存性に in vivo で HDL を新生し、これが遠隔臓器の amyloidosis 形成に関わることが示された。2)細胞周期を制御する転写制御因子 AP2 α が ABCA1 遺伝子発現の負の制御を行い、これは PKD による AP2 α のリン酸化により調節されることが分かった。

- マウス血漿酸化 LDL の測定系を構築した。apoE ノックアウトマウスの大動脈病巣表面積は、20 週齢で約 3%程度であるが、その後著しく進展し 40 週で約 33%に拡大した。血漿酸化 LDL レベルは 20 週齢で一過的に上昇し、その後次第に低下した。生後 4 週の大動脈で酸化ホスファチジルコリンやアクロレインの沈着が認められ、極初期の血管組織に脂質過酸化と組織障害が始まり、酸化 LDL の生成がその後の著しい病巣進展に繋がっている可能性が示された。
- 遺伝子転写因子である甲状腺ホルモン受容体の血管平滑筋での作用点を検討し、動脈血管の弾性に寄与すると同時に石灰化におけるカルシウム沈着の足場となりうるエラスチンと、その架橋酵素リシルオキシダーゼの遺伝子を、甲状腺ホルモンの標的として同定した。
- 胆汁酸吸着樹脂のコレスチミドは高脂肪食負荷 KKAY マウスにおいて、胆汁酸の再吸収を阻害して小腸の SHP の発現を低下し、糖・脂質代謝に関係する FGF-15 発現を強く抑制した。コレスチミドは肝臓のみならず全身の糖・脂質代謝を改善しているものと考えられ、胆汁酸を介した遺伝子発現の制御による生活習慣病予防薬開発の可能性が示された。
- 天然に存在する胆汁酸類縁体、胆汁アルコールにも TGR5 リガンド活性が認められ、側鎖の水酸基導入は分子全体の hydrophobicity を低下させるが、特定の位置、立体配置により活性増強効果が認められることが判明した。また、ステロイド母核の hydrophobicity を高めると活性発現に有利に働くことが示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. Nishimaki-Mogami T, Tamehiro N, Sato Y, Okuhira K, Sai K, Kagechika H, Shudo K, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Inoue K, Sawada J. The RXR agonists PA024 and HX630 have different abilities to activate LXR/RXR and to induce ABCA1 expression in macrophage cell lines. *Biochem Pharmacol* 2008; 76 :1006-1013.
2. Hioki H, Shima N, Kawaguchi H, Harada K, Kubo M, Esumi T, Nishimaki-Mogami T, Sawada J, Hashimoto T, Asakawa Y, Fukuyama Y. Synthesis of riccardin C and its seven analogues. Part I: The role of their phenolic hydroxy groups as LXR α

- agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 738-741
3. Hu W, Abe-Dohmae S, Tsujita M, Iwamoto N, Ogikubo O, Otsuka T, Kumon Y, Yokoyama S. Biogenesis of High Density Lipoprotein by Serum Amyloid A is Dependent on ATP-Binding Cassette Transporter A1- in the Liver in vivo. *J. Lipid Res.* (2008) 49: 386-393.
 4. Nagayasu Y, Ito J, Nishida t, Yokoyama S. Fibroblast Growth Factor-1 for Biogenesis of Apolipoprotein E-High Density Lipoprotein is Down-Regulated by Long-Time Secondary Culture. *J. Biochem.* (2008) 143: 611-616.
 5. Lu R, Arakawa R, Ito-Osumi C, Iwamoto N, Yokoyama S. ApoA-I Facilitates ABCA1 Recycle/Accumulation to Cell Surface by Inhibiting Its Intracellular Degradation and Increases HDL Generation. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* (2008) 28: 1820-1824.
 6. Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Lu R, Yokoyama S. Involvement of Protein Kinase D in Phosphorylation and Increase of DNA Binding of Activator Protein 2 α to Down-Regulate ATP-Binding Cassette Transporter A1. *Arterioscl. Thromb. Vas. Biol.* 28: 2282-2287, 2008.
 7. Ogata M, Tsujita M, Hossain MA, Akita N, Gonzalez FJ, Staels B, Suzuki S, Fukutomi T, Kimura G, Yokoyama S. On the Mechanism for PPAR Agonists to Enhance ABCA1 Gene Expression (2009) *Atherosclerosis* in press.
 8. Lu R, Ito J, Iwamoto N, Nishimaki-Mogami T, Yokoyama S, Fibroblast Growth Factor-1 Induces Expression of LXR α and Production of 25-Hydroxy-cholesterol to Up-Regulate Apolipoprotein E Gene Transcription in Rat Astrocytes. (2009) *J. Lipid Res* in press.
 9. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 (in press)
 10. Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Saito H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T, Kurose H. P2Y6 receptor-Galphan12/13 signaling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. *EMBO J.* 2008;27:3104-15.
 11. Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Suzuki K, Nagao T, Yamaguchi T. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture. *J Biochem.* 2008;144:399-408.
 12. Haghighi K, Chen G, Sato Y, Fan GC, He S, Kolokathis F, Pater L, Paraskevaidis I, Jones WK, Dorn GW 2nd, Kremastinos DT, Kranias EG. A human phospholamban promoter polymorphism in dilated cardiomyopathy alters transcriptional regulation by glucocorticoids. *Hum Mutat.* 2008;29:640-7
 13. Kato R, Mori C, Kitazato K, Arata S, Obama T, Mori M, Takahashi K, Aiuchi T, Takano T, and Itabe H.: Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2009) 29(1):33-39.
 14. Itabe, H.: Circulating Oxidized Lipoproteins and Cardiovascular Risk. *Cur. Cardiovasc. Risk Rep.* (2009) 3:18-22.
 15. 影近弘之:核内受容体を標的とするケミカルバイオロジー研究. 日薬理誌 2008, 132, 11-17.
- G. 知的財産権の出願・登録情報
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし

ライゾーム病の酵素製剤の適正使用法の確立と遺伝子・細胞治療法の開発

所属 国立成育医療センター
臨床検査部
研究者 奥山 虎之

研究要旨

本研究の目的は、ライゾーム病の代表的疾患であるムコ多糖症について、酵素補充療法の日本人患者における効果と安全性の評価を行う臨床研究を行い、さらに、遺伝子細胞治療の有効性について、モデル動物を用いた前臨床試験を行うことである。本年度は、ムコ多糖症I型とII型の酵素補充療法の投与試験結果について検討し、その有用性と安全性が示された。また、遺伝子細胞治療については、その前段階として肝臓移植による治療効果の評価をムコ多糖症VI型モデルラットを用いて行い、その効果を検討した。

分担研究者

ジェンザイム・ジャパン株式会社臨床開発部
丸橋康弘

A. 研究目的

本研究の目的は、(1) ムコ多糖症I型およびII型の酵素補充療法投与試験による効果と安全性を評価すること、および(2) ムコ多糖症VI型ラットを用いて、肝臓移植の治療効果を評価することである。

B. 研究方法

(1) ムコ多糖症II型患者10名に対して、イデュロサルファーゼを1年間投与し、その効果と安全性について詳細した。
(2) ムコ多糖症I型患者3名にラロニダーゼを3年間投与し、その効果と安全性について詳細した。
(3) ムコ多糖症VI型モデルラットに対して、肝移植を行いその治療効果を検討した。生後3ヶ月のムコ多糖症VI型ラットに、正

常ラット肝臓を移植し、脾臓でのムコ多糖沈着により評価した。

C. 研究結果

(1) イデュロサルファーゼ臨床研究
欧米で実施された臨床試験と同様の結果が得られた。とくに、尿中グリコサミノグリカン排泄量の急激な低下、肝臓サイズの縮小(正常化)、6分間歩行距離の増加を認めた。
(2) ラロニダーゼ投与結果
3年間のラロニダーゼ投与により、皮膚の湿潤化、中耳炎・聴力の改善、睡眠時無呼吸の改善、肘・肩関節可動域の改善を認めた。
(3) 前臨床試験
治療後のラット組織HE染色の検討：罹患ラットの脾臓で観察された顕著な沈着

したムコ多糖による脾臓細胞の空胞変化が肝移植後47日目の時点で既に改善されたことが認められた。ラット全身骨X線では、同じ月齢の罹患ラットと治療ラットでは変化は認められなかった。

D. 考察

ムコ多糖症Ⅱ型治療薬イデュロサルファーゼは、2007年10月に承認されたが、海外での臨床試験のデータをもって迅速審査した結果であり、日本での臨床試験は実施されず、日本人での有効性・安全性を評価するデータに乏しい。今回、1年間の臨床研究により、欧米での治験結果と同様の治療効果とともに安全性に関しても貴重な知見が得られた。治験未実施の欠点を補完するデータとしてその価値は高い。

ムコ多糖症の細胞治療法としては、骨髄移植などの造血幹細胞移植が主流であるが、移植に適したドナーが必ず見つかるとは限らず、また、移植に伴う副作用は場合によっては重篤となり、死にいたる場合もまれではない。これに対して、生体肝移植の場合、拒絶反応も少なく、また、両親のいずれかがドナーとなる場合が多く、ドナー確保の問題も少ない。今回の成績は、肝臓移植により肝臓以外の臓器での治療効果が示されたものであり、肝細胞遺伝子治療などの新しい治療法の開発の有用性を示唆する成績といえる。

E. 結論

ムコ多糖症Ⅱ型治療薬イデュロサルファーゼの日本人を対象とした投与試験を開始した。また、ムコ多糖症モデルラットに肝臓移植を行い、有効性を示唆する結果を得

た。今後、長期的な治療効果について検討する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表：なし。

2. 学会発表：

1) 田中藤樹、田中あけみ、鈴木康之、井田博幸、奥山虎之、衛藤義勝、折居忠夫：Hunter 症候群成人 10 例における酵素補充療法 JET Study の治療成績. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会. 米子, 2008.

2) 小須賀基通、田中藤樹、小田絵里、岡田美智代、右田王介、小崎里華、望月弘、小林靖明、奥山虎之：ムコ多糖症Ⅰ型に対する酵素補充療法の治療効果：3年間の成績. 第50回日本先天代謝異常学会総会. 米子, 2008.

3) 小須賀基通、田中藤樹、小田絵里、岡田美智代、右田王介、小崎里華、奥山虎之：ムコ多糖症Ⅰ型に対する酵素補充療法-長期投与における有効性・安全性の評価-. 第13回日本ライソゾーム病研究会. 東京, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし。

2. 実用新案登録 なし。

3. その他 なし。

冠・脳血管攣縮の抑制薬としてのS1P3受容体拮抗薬の開発

所属 国立循環器病センター研究所 循環器形態部
研究者 望月直樹

研究要旨 TY-52156 を改良した新規 S1P(スフィンゴシン 1-リン酸)受容体拮抗薬 TY-52379 は狭心症モデルで心電図から抗狭心症薬効果があること予想できた。これまで不明であった S1P のトランスポーターを同定することができた。血管収縮抑制効果を摘出血管で確認した。S1P3 受容体が動脈硬化巣の集簇した foam cells に発現していた。また、S1P 刺激によって Angiopoietin2 が遊離されるメカニズムを解明するための系を構築した。S1P トランスポーター、S1P 遊離、S1P3 受容体からなるシグナル解析ならびに治療に発展させる可能性のある薬剤を開発できた。

分担研究者

(1) 北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター

澤 洋文

(2) トーアエイヨー株式会社 東京研究所 村上 晶

(3) 国立循環器病センター研究所 福原茂朋

A. 研究目的

本研究の目的はS1P3特異的受容体拮抗薬を創薬して、臨床適応と考える血管攣縮を予防あるいは阻害することである。スフィンゴシン1-リン酸(S1P)は、活性化血小板から分泌され、S1P受容体(これまでにS1P1-S1P5の5つの受容体が明らかにされている)を発現する血管内皮細胞と血管壁細胞に作用することで生物学的作用を示すと考えられている。

本研究ではS1P3の拮抗薬を開発し、血管攣縮に対するこの薬剤の効果を判定して、臨床使用に発展させる。まず、血管攣縮に対しての抑制効果をin vivoの実験で確認すること、薬剤の生体の血管以外への作用、S1P3が発現する内皮細胞への影響、他の組織・臓器でのS1P3の発現を検討して、副作用の発現予想をおこなえるようにしたいと考えた。また、S1Pの情報伝達系異常による病態解明のためにS1Pシグナルで未同定であるS1Pトランスポーター(細胞内から細胞外への排出)をふくめ全貌を明かにすることも目的の一つである。

B. 研究方法と材料

1) バソプレシン誘発狭心症モデル評価

(1) 動物：7週齢のSDラット雄を用いた。7日間の馴化後雄を8週齢で供試した。

(2) 試験物質：TY-52379及び塩酸ベニジピンをを用いた。各投与溶液は必要量に対し0.5w/v%トラガントゴム溶液を添加、5mg/mL又は2mg/mL濃度に調製した。

(3) 投与方法及び期間：投与方法は5ml/kgあるいは10mL/kgの条件で、金属製胃ゾンデ又はディスポーザブルシリンジを用いた強制経口投与(10、30及び100mg/kg)とした。TY-52379及び

塩酸ベニジピンの投与回数は一回とし、バソプレシン投与4hr及び1hr前とした。バソプレシンは0.25IU/kgを大腿静脈に挿入したカテーテルより投与した。

(4) 評価項目：試験動物はペントバルビタールナトリウムで麻酔を施し、背位に固定した。心電図波形は、標準第II誘導で測定用アンプとポリグラフシステムを介して、循環動態解析ソフトウェア(MP/VAS3, Ver. 1.1R17b, 株フィジオテック)で記録した。心電図の解析はバソプレシンの投与前から投与後5minまで連続しておこなった。ST下降面積(AUC)を算出し、虚血に対する改善度を客観的に測定した。

2) ラット4日間反復経口投与毒性試験

(1) 動物：5週齢のSDラット雄を7日間の検疫・馴化後6週齢で供試した。

(2) 試験物質：TY-52379を用いた。投与溶液は必要量に対し0.5w/v%トラガントゴム溶液を添加し、超音波処理下で懸濁溶液を調製した。

(3) 投与方法及び期間：投与方法は5ml/kg又は10mL/kgの条件で、胃ゾンデを用いた強制経口投与(100、500及び1000mg/kg)とした。投与期間は4日間とした。反復投与で発現した毒性変化の可逆性を検討するため、1週間の回復期間を設けた。各用量、4日間投与後の剖検群(主群)及び回復群を設定し、各群3例で実施した。

(4) 評価項目：生存例の行動、外観、尿検査(電解質バランス)、体重、摂餌量、摂水量等の一般状態を観察した。血液学的検査及び血液化学的検査は、投与又は回復期間終了後、絶食(16hr以上)し、採血したものを用いた。血液化学的検査は血漿及び血清を用いた。剖検時には、右大腿骨から骨髓を採取し骨髓塗抹標本作製し骨髓検査(赤芽球、顆粒球、単球及びリンパ球の比率検査)を実施した。臓器を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定

し、パラフィン包埋、薄切後にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を作製し鏡検し、病理組織学的検討を行った。

(5) TY-52379 血漿中濃度：主群及び回復群と独立した化合物投与群 (各群 3 例) で、各用量投与後 1、2、4、6、8、10 及び 24 hr に頸動脈より採血し、血漿中 TY-52379 濃度を LC/MS/MS で測定し、最高血漿中濃度 (C_{max})、最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) 及び濃度時間曲線下面積 ($AUC_{0-24\text{ hr}}$) を算出した。

3) ヒト剖検材料ならびに単球細胞を用いた SIP3 受容体の発現の検討

1) 抗体：SIP3/Edg3 および SIP1/Edg1 に対する抗体は MBL 社 (MA) から販売されている抗体を用いた。ヒト各種臓器のパラフィン切片を用いた。

2) 免疫染色方法：

通常免疫染色に従った (臓器は中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、エタノールで脱水した後、パラフィン包埋し、薄切し、シランにてコートしたスライドガラスに乗せ、以下の染色を行なった)。

1,000mL の 0.01M Citric acid (pH 6.0) を入れ、加圧下にて、2 分 30 秒間加熱することで、抗原賦活化を行った。ABC 法にしたがって、一次抗体、二次抗体 (Peroxidase label) を用い 3, 3'-diaminobenzidine を含んだ基質溶液で発色させた。検鏡は Nikon 社 Eclipse 80i を用い画像 file を作製した。

4) 単球細胞株 (U937 および THP-1 細胞) での SIP3/Edg3 および SIP1/Edg1 の検討

1) phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で 100 ng U937 細胞は 3 日間、THP-1 細胞は 24 時間培養し単球マクロファージに分化させた後、イムノプロット解析で SIP 受容体の発現を確認した。

2) Flowcytometry による解析分化前後での SIP 受容体の発現の検討

Clear Block (MBL) にて室温 5 分間 Fc receptor blocking を行った。抗 SIP1/Edg1 抗体は 1000 倍希釈で抗 SIP3/Edg3 抗体は 500 倍希釈で、対照群の isotype control は 1 $\mu\text{g/ml}$ で室温 1 時間反応させた。その後 5% FCS/PBS 洗浄後 FITC-anti Rabbit IgG を 500 倍で室温 1 時間反応させ 5% FCS/PBS 洗浄後 FACS Canto にて解析した。

4) Zebrafish を用いた SIP トランスポーターの同定

ENU 変異により心臓に発生異常を起こした変異体 (Cardia Bifida 変異体) を Cmlc2:RFP との交配により確認した。Cardia bifida は SIP 受容体異常が原因の一つになっており、この表現型を示すものは SIP トランスポーターの異常である可能性があるため cardia bifida に着目してスクリーニングを行った。

5) SIP 刺激による血管内皮細胞からの Ang2 の遊離作用を検討

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を用いて SIP による Ang2 の遊離作用を検討するための実験系の構築をおこなった。Tie2-EGFP の局在変化

の検討と細胞間接着を live animal で可視化するための Zebrafish も作製した。

(倫理面への配慮)

北海道大学での研究は 2008 年 9 月 30 日付けで「病理検体を用いた宿主タンパク質および感染等による外来タンパク質の発現の検討」の内容として、北海道大学医学研究科・医学部 医の倫理委員会で承認されている。国立循環器病センターでの Zebrafish を用いた動物実験は、申請を行い遺伝子組み換えの許可も得た後に動物実験の取扱い指針に従って実験を行った。トーアエイヨー株式会社における実験動物の飼育管理及び動物実験 (動物を利用する試験研究) の計画・実施に際し、科学的及び動物福祉の観点からも遵守すべき事項を定め、実験動物の飼育管理及び動物実験を適正に実施することを目的に制定された、トーアエイヨー実験動物利用に関する規程に基づき実施した。

C. 研究結果

C-1 TY-52379 の作用

(1) 冠攣縮抑制効果

TY-52379 投与群及び塩酸ベニジピン投与群の ST 電位変化値及び AUC を Fig. 1 に示す。溶媒投与群では、バソプレシン静脈内投与後 1 min から ST 電位の下降が観察され、AUC は -0.517 であった。バソプレシン投与による ST 電位低下に対し、TY-52379 の 30 及び 100 mg/kg 投与群で、AUC は -0.216、及び -0.212 mV \cdot min と ST 電位低下の抑制傾向を示し、また 100 mg/kg 投与群では、バソプレシン投与後 3 min での ST 変化率に対して有意な抑制効果を示した。

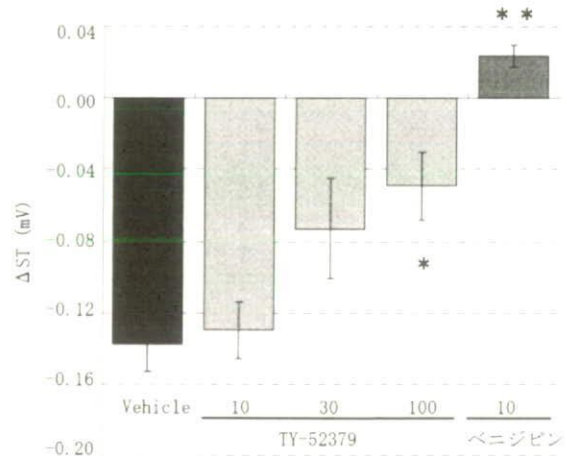


Fig.1 ラットバソプレシン誘発狭心症モデルにおける TY-52379 の効果

バソプレシン投与後、1-5 min の時間-ST 下降面積 (AUC) を計算した結果、TY-52379 がバソプレシン投与による ST 電位低下を抑制した。以上の結果から TY-52379 が冠攣縮抑制効果を有することが示唆された。

(2) 毒性評価

初期毒性試験として、TY-52379 の 4 日間反復経口投与毒性試験を実施した。その結果、いずれの投与量でも死亡例は認められなかった。体重推移及び摂餌量は溶媒対照群に比べ 500 mg/kg 以上の群で低値傾向を示したが、休薬により順調な体重及び摂餌量の増加が認められ、回復性が確認された。尿検査、摂水量は溶媒対照群に比べ有意な差は認められなかった。500 mg/kg 以上の群でヘモグロビン濃度の低値傾向、1000 mg/kg 群で赤血球、ヘマトクリット値の低値傾向が認められた。回復群では、溶媒対照群に比べ 500 mg/kg 以上の群で赤血球数 (500 mg/kg のみ低値傾向) 及びヘモグロビン濃度の有意な低値、網状赤血球の比率及び絶対数の有意な高値、1000 mg/kg 群でヘマトクリット値及び平均赤血球ヘモグロビン濃度の有意な低値が認められた。上記変化より TY-52379 による貧血が疑われたが、骨髄検査では主群でいずれの用量においても溶媒対照群との間に顕著な変化は認められなかった。しかし回復群では 1000mg/kg 群で赤芽球の比率の有意な増加が観察された。

病理組織学的検査では 500 mg/kg 以上の群で軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。脾臓では、主群において 1000 mg/kg 群の 1 例で軽微な髄外造血の亢進が認められた。胸腺では、軽度な萎縮が認められる例があった。

C-2 SIP 受容体の局在

(1) マクロファージでの SIP 受容体の発現

SIP1/Edg1 は血管平滑筋および動脈硬化巣に集簇した foam cells、一方 SIP3/Edg3 は血管平滑筋にはタンパク質の発現は認められず、動脈硬化巣に集簇した foam cells に免疫陽性反応現を認めた

分化前と分化後の SIP 受容体の発現を調べたところ、U937 細胞で軽度の SIP3/Edg3 の発現が変化していることが示唆された。しかし、Flowcytometry にて SIP3/Edg3 および SIP1/Edg1 の発現を検索した結果、SIP3/Edg3 および SIP1/Edg1 は発現を認めたが、分化の前後でいずれのタンパク質も著明な変化は認められなかった。

C-3 SIP トランスポーター Spns2 の同定

Zebrafish の変異体 (cardia bifida) を呈する変異体の詳細な解析を行った。まず二股心臓を Cmlc2:RFP line で確認した。さらに in situ hybridization で心室ミオシン・心房ミオシンの mRNA の発現も調べたところ二箇所に分れていたため、間違いなく cardia bifida の変異体であることが証明できた。

この変異体の変異責任遺伝子をポジショナルクローニングで調べていったところ、Spinster2 遺伝子の 153 番目の Arg が Ser に置換されたために心臓が二つになっていることがわかった。以降 zSpns (R153S) と命名した。

Spns2 が細胞膜を 1 2 回貫通するアミノ酸の 2 次構造をとっていることが判明した。トランスポーター分子であることが予想できたので、Sphingoinase kinase を安定に発現する CHO 細胞に zSpns2-EGFP(R153S)あるいは ZSpns2-EGFP WT あるいは hSpns2-EGFP (WT ヒト)を発現させて SIP の細胞外への排出を検討したところ Zebrafish, human Spns2 とともに SIP の排出を促進した。しかし、Spns2(R153S)はまったく SIP の排出が認められなかったことから、SIP のトランスポーター活性が消失した変異体であることがわかった。

C-4 SIP の血管接着における機能

(1) Ang2 は SIP によって血管内皮細胞からの分泌が促進される: HUVECs に Ang2-EGFP を発現させて HUVECs 内に蓄積された EGFP でマークされる Ang2 が SIP により減少するか否かを検討して、SIP 刺激による Ang2 分泌機能を検討した。

(2) Ang1 により Tie2 受容体は細胞間接着部位へ局在化する

(3) 細胞間接着にかかわる Tie2 と VE-cad の動態をモニターリングするための Zebrafish を構築した。SIP の細胞間接着機能を調べるための、モデル動物を作製した: z(Zebrafish)Tie2-EGFP, zVE-cad-EGFP を血管内皮細胞特異的に安定に発現するように Fli1 プロモーターあるいは Flk1 プロモーターで zTie2-EGFP, zVE-cad-EGFP を発現する Zebrafish の構築をおこなった。このための plasmid を作製し、さらに野生型 Zebrafish の embryo に plasmid とトランスポゼース mRNA を injection して血管での発現を確認できた。Germline に引き継がれるか否かは、次世代の Zebrafish での血管での緑色蛍光を確認することで、これらの line の establishment を検証できる。

D. 考察

我々はこれまでに市販化合物ライブラリーに対して SIP₃ 受容体拮抗作用の *in vitro* スクリーニングを行い、得られたヒット化合物からドラックライクな構造への変換、及び活性の向上を指向した化合物展開により、医薬として有望な選択的 SIP₃ 受容体拮抗薬、TY-52156 を見出した。昨年度には本化合物が SIP による冠血管及び脳底動脈収縮作用に対し拮抗作用を示し、医薬として有望であることを確認している。そこで、本研究では TY-52379 (TY-52156 の塩酸塩)を含む SIP₃ 受容体拮抗薬の医薬としての有用性及び安全性を確認すべくラットを用いた狭心症モデル評価及び初期毒性評価に着手した。

本年度の検討から SIP₃ 受容体拮抗薬が攣縮性狭心症に対し有用な治療薬となることが示された。しかし TY-52379 は狭心症症状を寛解させたがまだ十分強力とはいえない。SIP が直接冠攣縮反応を生じる報告は未だない。しかし、SIP は活性化

血小板から放出されること、S1P 血漿中濃度と冠動脈疾患に相関があること、S1P が著しい冠血流量の低下作用を示し S1P₃ 受容体拮抗薬が有意な寛解作用を示すことから、S1P が血管攣縮性疾患の発症に寄与し、その機序に S1P₃ 受容体が関与することが想定される。これらを鑑みると、急性冠動脈疾患に代表される血栓が引き金となった冠血管攣縮に伴う広範囲の梗塞形成に S1P-S1P₃ 受容体が重要な役割を果たし、S1P₃ 受容体拮抗薬がその治療法として極めて有用であることを示唆するものである。今後、S1P の冠動脈投与による狭心症症状の誘発可能性及び拮抗薬の効果について検証する必要がある。

毒性に関しては 100 mg/kg で若干の貧血状態は TY-52379 が生体内で代謝され何らかの PHZ 様の代謝物が生じた結果と考え、化合物由来の毒性と推察している。また貧血の改善の休業後の遅延は TY-52379 の脂溶性による脂肪組織への蓄積による毒性の遷延化の可能性もあり今後の無毒化にむけた薬剤の改変に活用していくべき結果と判断した。

本研究では動脈硬化巣を伴った動脈において局在の相違を認めた。S1P1/Edg1 は血管平滑筋および動脈硬化巣に集簇した foam cells、一方 S1P3/Edg3 は血管平滑筋にはタンパク質の発現は認められず、動脈硬化巣に集簇した foam cells にタンパク質の発現を認めたことからマクロファージにおける S1P の作用と S1P3 拮抗薬の作用も重要であることが示唆された。動脈硬化症の進展には、マクロファージをふくめた炎症機転が関与しており S1P3 の拮抗薬が動脈硬化症の治療にも使用可能であることが予想できた。

S1P の拮抗薬を開発する上で S1P の生理作用、分泌のメカニズムを解明することは必須であると考えた。S1P1-S1P3 特異的拮抗薬が開発されても、上流の S1P の排出機構がわからないと S1P シグナルの全貌が解明されたとはいえない。特に受容体拮抗薬が生理的な S1P の作用を抑制してしまうことによる副作用の出現を回避できるような思案も必要であろう。

もともと S1P1 が血管内皮細胞で作用するときには血管弛緩 (AKT-eNOS を介して) をおこし、S1P2, S1P3 は血管平滑筋に発現して血管収縮をおこすと考えられている。正常血管における S1P トランスポーターの機能を解明していくことが今後の S1P-S1P 受容体を介した生理的機能の解明には必須であると考えた。

血管平滑筋にも Spns2 が発現するのか？血小板から遊離される S1P は Spns2 を介して排出された S1P であるのか？を今後調べていく必要がある。とくに S1P が血栓症のない状態で如何なる生理作用を示しているのかは、全貌が解明されておらず骨髄からの破骨細胞の骨外への遊走誘導による骨粗鬆症の抑制など新たな知見も得られており、S1P1 受容体の発現細胞の同定とともに S1P の遊離機構の解明は平行しておこなっていくべきと考

えられた。

S1P が抗炎症作用、催炎症促進に作用するのは重要である。なぜならば、血栓症だけに S1P 受容体拮抗薬を投与するだけでなく、毎日服薬することになると、炎症を抑制する作用を抑制してしまうことになり、臨床的問題が生じるからである。本研究課題では、S1P による内皮細胞接着への影響を検討するための実験系の構築を試みて、最終年度ではこれらの系を用いて S1P3 拮抗薬の血管内皮細胞への接着への生体での効果を検証可能にすることを計画することが重要であると考えている。

E. 結論

S1P3 特異的阻害剤 TY-52156 からさらに改良した TY-52379 の冠攣縮抑制効果を確認した。また血栓症あるいは動脈硬化症における病態を解明するための S1P トランスポーター Spns2 も同定した。さらに S1P-S1P3 の炎症における機能を示唆する S1P3 のマクロファージでの発現、また炎症への関与を調べるモデルを構築できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Orba Y, Sunden Y, Suzuki T, Nagashima K, Kimura T, Tanaka S, Sawa H*: Pharmacological cdk inhibitor R-Roscovitine suppresses JC virus proliferation. **Virology** 370: 173-183, 2008 (* corresponding author)

2) Matoba T, Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Shichinohe H, Kuroda S, Ochiya T, Itoh H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H*: An siRNA against JC virus (JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. **Neuropathology** 28: 286-294, 2008 (* corresponding author)

3) Koyama T, Nakaoka Y, Fujio Y, Hirota H, Nishida K, Sugiyama S, Okamoto K, Yamauchi-Takahara K, Yoshimura M, Mochizuki S, Hori M, Hirano T, Mochizuki N. Interaction of scaffolding adaptor protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates IGF-I-dependent myogenic differentiation via the ERK1/2 signaling pathway. **J. Biol. Chem.** 283:24234-24244, 2008

4) Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. **EMBO J.** 27: 522-534, 2008

2. 学会発表

- 1) Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Nagakawa K, Sawa H, Ijiri K: Solid surface-promoted cellular uptake of immobilized virus-like particles. The 9th RIES-Hokudai International Symposium, January 2008, Sapporo, Japan
- 2) Niikura K, Ohtake N, Suzuki T, Nagakawa K, Sawa H, Ijiri K: Package of Desired Proteins into Self-assembled Virus-like Particles. International Symposium on Engineering Micro-/Nano-Materials based on Self-Assembling and Self-Organization (ISEM2008), March 2008, Tokyo, Japan
- 3) Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Nagakawa K, Sawa H, Ijiri K: Sialic Acid-Promoted Cellular Uptake of Immobilized Virus-Like Particles. XXIV International Carbohydrate Symposium, July 2008, Oslo, Norway
- 4) Nagakawa K, Niikura K, Ohtake N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijiri K: Gold nanoparticle Array based on viral structure. Korea-Japan Joint Forum (KJF) 2008 on Organic Materials for Electronics and Photonics (KJF2008), Chitose, Japan
- 5) Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Nagakawa K, Sawa H, Ijiri K: Protein-enclosed nano capsules based on the self-assembly of viral proteins. The 2008 Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology (AsiaNANO2008), November 2008, Biopolis, Singapore
- 6) Nagakawa K, Niikura K, Ishizuka N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijiri K: The array of Gold nanoparticle based on a viral structure using sugar recognition. The 2008 Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology (AsiaNANO2008), November 2008, Biopolis, Singapore
- 7) 鈴木 忠樹、大場 靖子、寸田 祐嗣、木村 享史、長嶋 和郎、澤 洋文: ポリマウイルス粒子放出の分子機構。第6回感染症沖縄フォーラム、2008年2月14-16日、沖縄県中頭郡、サンセット美浜
- 8) 永川 桂大、新倉 謙一、大竹 範子、鈴木 忠樹、松尾 保孝、澤 洋文、居城 邦治: ウイルスカプセルを鋳型とした金ナノ粒子 3D アレイの作製。2008年3月、日本化学会第88春季年会、東京
- 9) 大竹 範子、新倉 謙一、鈴木 忠樹、永川 桂大、澤 洋文、居城 邦治: シアル酸提示基板への固定化によるウイルス様微粒子の細胞内取り込み促進。2008年5月、第57回高分子学会年次大会、横浜
- 10) 長谷川 秀樹、辻 隆裕、澤 洋文、佐多 徹太郎: 成人 T 細胞性白血病マウスモデルにおける細胞走化因子の解析。第97回日本病理学会総会 2008年、5月、金沢
- 11) 大西 なおみ、湯浅 眸、田中 伸哉、澤 洋文、三浦 太浩、松井 敦史、東 秀明、岩淵 和也、武蔵 学、鈴木 操、山田 源、東 健、畠山 昌則: ヘリコバクター・ヒロリ cagA 遺伝子導入マウスにおける消化管腫瘍ならびに血液系腫瘍の発生。日本分子生物学会第8回春季シンポジウム、2008年5月25-27日、札幌
- 12) 川口 晶、大場 靖子、木村 享史、伊波 英克、緒方 正男、佐多 徹太郎、澤 洋文、長谷川 秀樹: ATL 腫瘍細胞の走化性における CXCR4 を介したシグナル経路の解析。第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会・第19回日本生体防御学会学術総会・第45回補体シンポジウム 合同大会、2008年7月10-12日、北海道大学学術交流会館、札幌
- 13) 木村 享史、山口 拓、奥村 恵、吉岡 充弘、伊藤 茂男、梅村 孝司、澤 洋文: 日本脳炎ウイルス感染ラット中枢神経系におけるウイルス持続感染。第12回日本神経ウイルス研究会 屋久島研究会、2008年7月17-19日、屋久島環境文化村センター、鹿児島
- 14) 長谷部 理絵、牧野 吉倫、鈴木 忠樹、前田 秋彦、堀内 基広、澤 洋文、木村 享史: ウエストナイルウイルスの血液脳関門の通過には E タンパク質の複数のアミノ酸が関与する。第42回日本ウイルス学会北海道支部会夏季シンポジウム、2008年7月26-27日、ニセコいこいの村、ニセコ
- 15) 川口 晶、大場 靖子、木村 享史、伊波 英克、緒方 正男、辻 隆裕、佐多 徹太郎、澤 洋文、長谷川 秀樹: HTLV-I Tax トランスジェニックマウス由来腫瘍細胞の SDF-1 α に対する走化性とその阻害。第1回 HTLV-1 研究会・合同班会議、2008年8月23-24日、東京大学医科学研究所、東京
- 16) 木村 太一、酒井 美恵子、榎 康一、王 磊、津田 真寿美、澤 洋文、畠山 鎮次、長嶋 和郎、西原 宏史、田中 伸哉: ヒト滑膜肉腫関連遺伝子 SYT は初期発生に必須であり、細胞運動の制御に重要である。第88回北海道医学大会 腫瘍系分科会 2008年9月6日、旭川医科大学、旭川
- 17) 永川 桂大、新倉 謙一、大竹 範子、鈴木 忠樹、松尾 保孝、澤 洋文、居城 邦治: 光局在場を目指したウイルスカプセル表面における金ナノ粒子の規則配列化。第69回応用物理学会学術講演会、2008年9月、名古屋
- 18) 新倉 謙一、永川 桂大、大竹 範子、鈴木 忠樹、松尾 保孝、澤 洋文、居城 邦治: ウイルスの糖鎖認識能を利用した金ナノ粒子規則配列化。第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008年9月、横浜
- 19) 大竹 範子、新倉 謙一、鈴木 忠樹、永川 桂大、澤 洋文、居城 邦治: ウイルスタンパク微粒子への薬剤内包と高効率細胞内導入。第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008年9月、横浜
- 20) 牧野 吉倫、鈴木 忠樹、長谷部 理絵、前田 秋彦、高橋 秀宗、木村 享史、澤 洋文: 蛍光ウイルス粒子を用いたウエストナイルウイルス侵入過程の可視化。第56回日本ウイルス学会総会、2008年10月26-28日、岡山コンベンションセンター、岡山
- 21) 川口 晶、大場 靖子、木村 享史、伊波 英克、緒方 正男、辻 隆裕、佐多 徹太郎、澤 洋文、長谷川 秀樹: ヒトATL細胞及びTaxトランスジェニックマウス由来腫瘍細胞のSDF-1 α に対する走化性とその阻害。第56回日本ウイルス学会総会、2008年10月26-28日、岡山コンベンションセンター、岡山
- 22) 大場 靖子、鈴木 忠樹、木村 享史、澤 洋文: ヒトポリオマウイルスJCVのLarge T AntigenによるG2チェックポイント活性化機構。第56回日本ウイルス学会総会、2008年10月26-28日、岡山コンベンションセンター、岡山

- 23) 大西 なおみ、田中 伸哉、澤 洋文、三浦 太浩、東 秀明、東 健、畠山 昌則:ヘリコバクター・ピロリ cagA 遺伝子導入マウスにおける消化管腫瘍ならびに血液系腫瘍の発生。第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28-30 日、名古屋国際会議場、名古屋
- 24) 大場 靖子、鈴木 忠樹、木村 享史、澤 洋文: JC ウイルス large T antigen による G2/M check point 活性化機構の解析。第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会 2008 年 12 月 9-12 日、神戸
- 25) Sawa H: Cellular factors exploited by neurotropic virus. The 9th International Symposium Hamamatsu University School of Medicine COE Program Medical Photonics "Viruses Shed Light on Neuroscience", February 9th, 2008, Congress Center, Act City Hamamatsu, Japan (invited speaker)
- 26) 福井一、花岡龍毅、川原敦雄、望月直樹 ゼブラフィッシュ Seryl-tRNA synthetase (SerRS) の新たな血管形成調節機能 第 14 回小型魚類研究会 岡崎、2008/9/20,21

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願: 抗 JC ウイルス剤及び進行性多巣性白質脳症治療剤 (特願 2008-276126)。発明者: 大場靖子、澤洋文。出願年月日 平成 20 年 9 月 30 日

特願 2008-245177

「スフィンゴシン 1-リン酸の新規トランスポーター分子」 望月直樹他、3 名

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし