

究（以上、衛研受託研究）、TRX誘導物質の解析（京大補助金型研究、誘導機構研究）の4課題を設定し、IIでは、個別課題開発研究としては、TRX誘導物質のスクリーニング（ライブラリー・スクリーニング）、抗酸化分子関連の新規バイオマーカーに対する測定系の開発（バイオマーカーと測定系開発）、抗酸化分子高発現を促す新しい健康増進食品の開発（有効性研究）、抗酸化分子の機能性評価法の開発（評価法開発）を設定し、また、III. では、TRXなど抗酸化活性酸素種消去分子の高発現性食品や医薬候補物質の探索の一環として、ニュートリジノミクスの探索を計画し、以下の要領で研究を行った。

I. 分子レベル研究では、HPLCにより分離したタンパク質への結合微量元素を、オンラインでHR-ICP-MSにより検出した。試料としては、酸化的ストレスに対して感受性が高いとされる骨髄細胞および肝組織を用いた。細胞レベル研究では、RBL-2H3細胞（ 5×10^4 cells/mL）と、市販の三次元培養ヒト皮膚モデル（Vitrolife-skin® Gunze Co., Kyoto, Japan）を用い、それぞれ0~100 μ Mの黒糖抽出分画成分を培地に添加し、 β -hexosaminidaseの分泌量や、TetraColor ONEによる細胞増殖活性を測定、結果を評価した。個体レベル研究では、酸化的ストレスの生体異物応答の個体レベルでのアッセイ系を明らかにすることを目的として、TRXの過剰発現（Tg）やノックアウト（KO）等のマウスも導入して生体応答を野生型（WT）マウスと比較した。

II. TRXの血中半減期の延長を目的としてTRX分子中のシステイン残基を標的にポリエチレングリコール（PEG）による修飾（PEG-TRXの作成）を行い、ラットにおける血中濃度の経時変化を、非修飾TRXと比較検討した。また、植物に含有される成分についての生化学的解析では、TRXの遺伝子発現誘導活性を指標にK562細胞を利用したスクリーニングを行い、誘導成分を同定した。測定系の開発研究では、電気化学発光免疫測定法（electro chemiluminescence immuno assay: ECLIA）を原理とする、ピコルミシリーズによる高感度（分析感度0.04ng/mL）、ワイドレンジ（0.04ng~140ng/mL）、ハイスループット測定（100検体/90分、200検体/バッチ）の可能なヒトTRX-1測定系の開発を計画した。応用健康食品候補物質の開発研究では、酸化ストレスの指標として血中TRX、糖分解代謝物でカルボニルストレスの原因とされ、酸化能をしめす指標として血中methylglyoxalおよび3-deoxyglucosone、および抗酸化能の指標としてBAP（Biological anti-oxidant potential）を用いた。また、黒糖の非ショ糖成分の分析研究のために、黒糖水溶液をポリスチレン系樹脂に通じて非ショ糖成分を吸着

させ、糖質を除去後、エタノールにより非ショ糖成分による分留を得て、これを有効性成分の解析に供した。

III. ニュートリジノミクス情報は、予算の関係で、各異なった遺伝子型のマウスにおける無処置状態のグローバル遺伝子発現のプロファイリングのみ採取し、参照例データベースとして、これまでに採取されていた2ヶ月齢の若齢マウスと21ヶ月齢の加齢マウスそれぞれの発現プロファイリングも比較検討に供した。

（倫理面への配慮）

本研究では、野生型並びに人為的に遺伝子改変を施した動物を使用することによって、酸化的ストレスに対する生体影響を的確かつ他の方法では得られない方策を駆使することで、研究の目的を達成させることを企図している。これに基づき、動物の福祉の観点から必要な、動物の不安や苦痛の排除もしくは低減などに最大限留意した。

C. 研究結果と考察

結果の概要としては、TRXの作用機構については、TRX-Tg及びTRX-KO動物などを駆使して、TRXの発現が長寿・制癌に有効な役割をし、また既知の当該食品がTRX発現モデルと同様の生物反応を引き起こす事を個体レベルのモデル動物で初めて証明した。またここにチオレドキシシン・リダクターゼの維持に必要なセレンの動態に関与するという結果が得られ、さらにTRXの分子機構の解析からは、このものの細胞周期の調節、細胞増殖や生存シグナルの調節に果たす役割の重要性が明らかになり、新しい医薬品・医薬部外品・食品の開発への基盤を整える道筋が得られた。これと併行して、医薬品の開発の展望については、種々のシード化合物に対するハイスループットに寄与するアッセイ系（ヒトTRX測定系）が完成し、医薬品開発のための課題が前進した。

医薬部外品については、培養細胞を用いた酸化的ストレスに対する生体影響防御活性を指標とするアッセイ系を開発するとともに、これに黒糖などの医薬部外品の新しい候補産物を適用し、それらの製品化の為の検討が進んだ。

個々の結果の概要及びその考察は以下の通りである。

I. 創薬課題基盤研究

I. 1. 衛研受託研究

I. 1-1) 分子レベルの研究：まず骨髄細胞における微量元素の存在状態を解析するために、WTマウスの骨髄細胞をホモジナイズし、遠心上清を

HPLC/ICP-MSで解析した。まず、UVでたんぱく質をモニターした時には、多くのピークが認められた。次にSレベルでモニターしたところ、14.3 minに大きなピークが見られ、分子量マーカーを用いた検討から、分子量はおおよそ3000以下であることがわかった。Znレベルでモニターしたところ、分子量が2万~6万に3本のピークが認められた。そのうちの1本は、Cuのピークとほぼ同じ保持時間に検出されたこと、ZnとCuの存在比が1:1であることから、Cu/Zn-SODと考えられた。

S含有化合物を分析する方法について検討し、GSHとGSSGを分離できたAscentis RP-Amide columnとHydrosphere C18 columnを用いて、骨髓細胞上清、肝臓上清を解析した。

Ascentis RP-Amide columnを用いた場合には、骨髓細胞においては低分子量のS化合物の割合が他の臓器に比べて大きい、肝臓と比べて、新規のS化合物を見出すには至らなかった。

一方、Hydrosphere C18 columnを用い場合には、GSHやGSSG以外のSピークとして、骨髓細胞では8.4、9.7、10.7 minに3本のピークが見られ、肝臓では9.5、10.8 minに2本のピークが見られた。骨髓細胞の9.7、10.7 minのピークはそれぞれ肝臓の9.5、10.8 minのピークとほぼ同じであることから同一の成分と考えられた。保持時間の差は、肝臓でのS強度は骨髓細胞のS強度と約5倍大きいことが影響したと考えた。骨髓細胞で見られた8.4 minのピークは肝臓では全く見られないピークであった。以上のように、Hydrosphere C18 columnを用いた場合には、骨髓細胞においては肝臓と比べて、新規のS化合物を見出した。

次に、WT、TG、KOマウスの骨髓細胞について、HPLC/HR-ICP-MSで解析して比較した。Znについて、保持時間13.0 minのピークがKOで若干大きい傾向が見られた。Seについても分析したが、各群で明瞭なピークは検出できなかった。

I. 1-2) 細胞レベルの研究：まずRBL-2H3細胞に対する黒糖抽出物分画の細胞毒性を検討した結果、2回の試験のIC50の平均値は**1**が464 μM 、**2**が124 μM 、**3**が502 μM 、**4**が5.5 μM 、**5**が5.4 μM と、**4,5**が非常に強い細胞毒性を示した。細胞毒性の見られない濃度において活性試験を行ったところ、**1**では10及び50 μM 添加時にdi-TBHQにより誘導された β -hexosaminidase放出量増加が濃度依存的に有意に抑制された。**2-5**において同様に活性試験を行ったところ3回の試験のEC50の平均値は細胞毒性の弱い**1,3**が9.5 μM と他よりも弱い活性を示し、**2**が0.38 μM 、**4**が0.1 μM 、**5**が0.35 μM と強い細胞毒性を示した**4**が最も強い β -hexosaminidase放出量抑制効果を示した。Vitro-life Skinに対する黒糖抽出物分画**4**の細胞毒性を検討した結果、50 μM までは細胞毒性を示さず、

100 μM で生存率88%と、有意な生存率の減少が観察された。一方、20%エタノールで可溶化したSQOOHを添加したところ、有意な生存率の減少が観察されたが、20%エタノール単独でも生存率が約18%と顕著な生存率の減少が観察された。

I. 1-3) 個体レベルの研究：個体レベルでのTRXなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子をめぐる生体異物応答のアッセイ系として、TRX遺伝子の遺伝型に応じたマウス個体レベルでの探索とともに、同活性酸素種応答の生体内でもっとも鋭敏かつ知見の集積しつつある造血幹細胞系と、このもののROSからの隔離に働く造血幹細胞ニッチ(niche)をめぐる諸分子を対象として、個体レベルのみならず、in vitro (ex vivo)のアッセイ系研究開発・検討を行った。

- (1) 各TRX遺伝子型の異なるマウスでのROSとの相互作用を指標とする個体レベルでのアッセイ系(省略：平成18年度報告等参照)
- (2) 造血前駆細胞のクローナルアッセイ系の応用：非コロニー性前駆細胞、培養性コロニー前駆細胞などの定量的アッセイ系の適用(省略：平成18年度報告等参照)
- (3) 造血前駆細胞の細胞内ROSの蛍光定量法：セルソーターを使用したDCFH-DAによる検討
- (4) 造血前駆細胞、side population (SP)細胞の色素排出能試験：SP分画細胞のRhodamine123やHoechst33342等のATP binding cassette transporterなどによる色素排出能アッセイ系の検討。尚、非SP分画の数量的変化を指標とした細胞周期内造血幹細胞の消失(分化型細胞への排出)とN-acetyl cystein (NAC)による抑制試験。
- (5) 造血幹細胞におけるROSによるForkhead Box O (Foxo) familyのFoxo3の発現を指標とする分子指標アッセイ系の検討。尚、Fox欠失細胞系におけるROSとの相互作用後のLKS分画と骨髓系分画における分化比を、細胞数、並びに骨髓ペルオキシダーゼ活性により定量する系(in vivo)もしくはin vitroによるNAC投与の対照実験も行われる。
- (6) 造血幹細胞におけるROSに対するhypoxia inducible factor (Hif) 1 α 発現試験とTRXの影響に関するアッセイ系：通常のNicheに局在する造血幹細胞においてはHif1 α などの発現が認められないことが知られている。TRX-Tgマウスにおいては、諸報告を参照すると、このHif1 α の発現が認められる可能性が高いものと判断される。そうした系を念頭においてROSに対する異物応答により造血幹細胞に発現するHif1 α の発現定量試験が成立し、in vitro (ex vivo)における試験系として役割を果たすことが考えられ、優れたスクリーニング系となるものと判断される。
- (7) CD34陽性造血幹細胞における抗酸化系代謝

試験：CD34陽性細胞におけるmicrosomal glutathione-S-transferase (MGST1) 及びBCL2-interacting killer (BIK) などのin vivo ROS曝露に対する応答をRT-PCRにて定量するアッセイ系。
(8) Nucleophosminのknock down細胞系による造血幹細胞のDNA障害、酸化ストレス、ならびに造血障害の鋭敏アッセイ系における試験

I. 2. 誘導機構研究

I. 2-1) TRX誘導物質医薬品の開発：ヨモギおよび青じそからの抽出物に強いTRXの遺伝子発現誘導活性を認め、青じその抽出物のTRX誘導物質として香り成分ペリルアルデヒドを同定した。ペリルアルデヒドによるTRX遺伝子発現誘導の分子機構を明らかにした。

I. 2-2) TRXの分子機構の解析：TRXは細胞周期制御蛋白の発現調節を行うことにより細胞生存調節を行っていることを明らかにした。さらに、TRXはMAPキナーゼシグナル伝達に重要な役割を果たすことを明らかにした。

I. 2-3) TBP-2ノックアウトマウスの解析：TBP-2はインシュリン分泌制御と糖脂質代謝に重要な転写因子peroxisome proliferator activator receptor (PPAR) α のシグナル制御を行う糖・脂質代謝統合制御因子であることを明らかにした。

II. 個別課題開発研究

II. 1 ライブラリー・スクリーニング

II. 1-1) TRXやその修飾体の個体投与における薬物動態の解析：PEG-TRXを作成した。即ち、遺伝子組換えTRXをPBS(pH7.5)に濃度1mMに溶解し、分子量約2万のポリエチレングリコールマレイミド誘導体(SUNBRIGHT@ME-200MA 日油株式会社)の濃度を室温にて30分間反応させ、TRX分子中システイン残基のポリエチレングリコール修飾をおこなった。これを用いてラットにおける血中動態を非修飾TRXと比較検討した。非修飾TRXまたはPEG-TRX蛋白2mg/kgをラットに尾静脈より静脈内投与し、頸静脈より経時的にヘパリン採血し血漿を得た。血漿中TRXおよびPEG-TRX量に関する分析をSDS-PAGE/ウェスタンブロット法により行った。同時に、非修飾TRXを投与した際の血中動態はELISA法によっても測定した。その結果、非修飾TRXの血中濃度は投与後1時間で約1/24に低下した。また、ウェスタンブロット法によってもTRXに対応する分子量約1万2千のバンドの大幅な減少が観察された。一方、PEG-TRXでは、分子量約6万のバンドは投与1時間後でもほとんど減少しなかった。しかし、サンプル中に約15%不純物として含まれる非修飾TRXに対応する分子量約1万2千のバンドは投与1時間後には大幅に減少した。

以上の結果より、PEG-TRXは血中濃度の持続時間

が非修飾TRXより長い事が明らかとなった。

II. 1-2) TRXによるMIFを標的とした炎症制御機構の解明に関する研究：ATL-2細胞の細胞内、細胞外においてTRXとMIFが結合していることが分かった。さらにBIAcore解析の結果、TRXとMIFはタンパク同士が直接結合していることが分かった。また、LPS, MIFの刺激によって産生されるサイトカイン(TNF- α)はTRX存在下では抑制された。

II. 2. バイオマーカーと測定系開発

リコンビナントADFを過酸化水素およびTCEPを用いて、それぞれ酸化、還元処理を行い、HPLC(カラム：Superdex75 10/300GL)を用いてゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行い、溶出液を時間分取した。過酸化水素処理時間を調整し、1量体および2量体の両者が存在する条件を設定し、HPLCからの溶出直後のフラクションを測定した結果、r-ADF2量体は1量体に比べて、約4倍の定量値を示した。その後、それぞれのピークをリクロマトグラフィーにて溶出fractionを測定した結果、2量体は、より高分子側にも測定値が認められ、1量体は、より低分子側にも定量値が認められた。また、各種疾患検体を測定した結果、慢性肝炎は健常人とほぼ同等であり、アルコール性肝炎、肝がんおよびNASHの測定値の分布は、健常人に比べて、高い値を示した。

II. 3. 有効性研究

黒糖抽出物(黒糖の0.3~0.5%)について、酸化および抗アレルギー活性成分の特定のため、LC/MSによる成分分析を検討した。主な活性成分として、メトキシフェニルグルコシド類 **1~5** が認められた。黒糖抽出物を水/メタノールの比率を変えて分画し、各分画物中に含まれるメトキシフェニルグルコシド類を同定した。共同研究者による抗アレルギー活性のスクリーニング結果を合わせることで、スキンケア化粧品および医薬部外品の候補原料として基礎的な原料開発に成功した。また、TRX誘導能を有するヨモギ抽出物、黒糖を配合した抗酸化ストレス剤製剤を開発に成功し、初期的な製造性、安定性を確認した。

II. 4. 評価系開発

慢性腎臓病における腎機能ステージを、糸球体濾過量を基準にステージ3(30~60ml/min)、ステージ4(15~30ml/min)、ステージ5(15ml/min未満)に分けた。測定の結果、血中メチルグリオキサール濃度は腎機能の低下に従い有意に上昇した。血中TRX濃度も腎機能の低下に従い有意に上昇した。また血中メチルグリオキサール濃度と血中TRX濃度との間には正の相関が認められた(P<0.001, R=0.6589)。一方、糖尿病と関係の深いカルボニルストレスの原因物質である

3-デオキシグルコゾンと腎機能、血中TRX濃度との間には特に関連が認められなかった。また、BAPは特に腎機能レベルによる違いは認められなかった。

III. ニュートリジノミクス

ニュートリジノミクスの探索に先立って、個体差や週齢差などに起因するグローバル遺伝子発現プロファイリングや、種々の遺伝子用量のTRX遺伝子改変動物を用いた定常状態におけるグローバル遺伝子発現のプロファイリングの整備を進めた。また背景データとして、経口投与した抗酸化剤による個体レベルでの酸化的ストレス緩和モデル実験を行った。即ち、抗酸化剤としてTRX誘導能の知られるスルフォラファン(SF)を用い、TRX過剰発現マウスで障害性が緩和されることを示してきたベンゼンによる造血障害が、SFの投与によっても緩和されるのか解析し、末梢白血球や、培養性造血前駆細胞数のベンゼンによる減少がSFの前処置によって全くみられなくなることを明らかにした。

D. 結論

本研究では、その酸化的ストレスの消去に対して中心的な役割を果たすTRXと、その活性維持に役割を果たす調節酵素に注目し、それらのさらなる作用機構の個体、細胞、分子レベルの基盤を明らかにすると同時に、これを直接的に応用した健康増進に役割を果たす医薬品・医薬部外品並びに食品の開発に向けて班員が協力・分担して取り組み、チオレドキシンの作用機構、調節代謝にもとづくアッセイ系ハイスループト基盤と、医薬品・医薬部外品・食品の開発における各々の領域について、基本的な所期の成果を上げた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Hirabayashi Y., Tsuboi I., Kitada K., Igarashi K., Kodama Y., Kanno J., Yoshida K., Dainiak N., Inoue T. 2009. Comparison of murine gene expression profiles between spontaneous and radiation-induced myelogenous leukemias: Stochastic and probabilistic expression variances in the former vs radiation-specific expression commonalities in the latter. *Exp Hematol* 37:195-205.
- (2) Sato A., Hoshino Y., Hara T., Muro S., Nakamura H., Mishima M., Yodoi J. 2008. Thioredoxin-1 ameliorates cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 325:380-388.
- (3) Son A., Nakamura H., Okuyama H., Oka S.,

Yoshihara E., Liu W., Matsuo Y., Kondo N., Masutani H., Ishii Y., Iyoda T., Inaba K., Yodoi J. 2008. Dendritic cells derived from TBP-2-deficient mice are defective in inducing T cell responses. *Eur J Immunol* 38:1358-1367.

- (4) Hirabayashi Y., Yoon B. I., Tsuboi I., Huo Y., Kodama Y., Kanno J., Ott T., Trosko J. E., Inoue T. 2007. Protective role of connexin 32 in steady-state hematopoiesis, regeneration state, and leukemogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 232:700-712.
- (5) Tan A., Nakamura H., Kondo N., Tanito M., Kwon Y. W., Ahsan M. K., Matsui H., Narita M., Yodoi J. 2007. Thioredoxin-1 attenuates indomethacin-induced gastric mucosal injury in mice. *Free Radic Res* 41:861-869.
- (6) Li G. X., Hirabayashi Y., Yoon B. I., Kawasaki Y., Tsuboi I., Kodama Y., Kurokawa Y., Yodoi J., Kanno J., Inoue T. 2006. Thioredoxin overexpression in mice, model of attenuation of oxidative stress, prevents benzene-induced hemato-lymphoid toxicity and thymic lymphoma. *Exp Hematol* 34:1687-1697.
- (7) Yoshida K., Hirabayashi Y., Watanabe F., Sado T., Inoue T. 2006. Caloric restriction prevents radiation-induced myeloid leukemia in C3H/HeMs mice and inversely increases incidence of tumor-free death: implications in changes in number of hemopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 34:274-283.

2. 学会発表

- (1) Inoue T, Attenuation of oxidative stress in the Trx-overexpression mice: Study on benzene induced hemopoietic malignancies. The 4th Meeting of International REDOX Network (2007.11.2) [Jeju Island, Korea]
- (2) Yodoi J, Oxygen and Redox Signaling, 19th Annual Conference for the Oxygen Club of Greater Washington, D.C. (2006.10.12-13) [Bethesda, USA]

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

国際特許出願番号 ; PCT/JP2007/060557
国際特許出願日 ; 2007年5月23日
出願人 ; レドックスバイオサイエンス株式会社
発明者・出願人 ; 淀井 淳司、近藤 則彦、孫 安生、加藤 紀子

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

チオレドキシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子 の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
研究者 井上 達

研究要旨 チオレドキシン (TRX) など抗酸化反応性活性酸素種消去分子の高発現性食品や医薬候補物質の探索に資する分子レベル (関連微量金属の HPLC/HR-ICP-MS 解析)、細胞生物学的レベル (植物抽出物のスクリーニングのための培養系の開発)、及び個体レベルでの、酸化ストレスと TRX ならびにモデル物質としてのスルフォラファンとをめぐる生体異物応答を検討し、もってスクリーニングのアッセイ系となる実験系を探索した。別途推進した一部のニュートリジノミクス情報も各々の研究に適宜取り込んだ。これと平行して、酸化ストレスの関与が知られる脳虚血障害、糖尿病などの疾患や老化に対する抗酸化作用を基軸として、TRX のさらなる作用機作に関する基盤研究と、TRX 誘導物質のスクリーニング系、測定系ならびに有効性にかかる医薬品、医薬部外品、食品等の開発研究との両面から探索を推進した。このうち基盤研究では、TRX のポリエチレングリコール修飾による血中濃度の持続時間の延長と、TRX の MIF との結合による TRX の MIF 由来の炎症の制御機構を見出し、開発研究としては、診断薬としての有用性の期待される電気化学発光免疫測定法による TRX 測定系および抗酸化分子の機能性評価法の開発に成功し、あわせて、新規機能食品の開発に向けた応用研究にも一定の前進をみた。

分担研究者

- (1) 京都大学ウイルス研究所 淀井淳司
- (2) レドックスバイオサイエンス株式会社
茨木 裕
- (3) 三光純薬株式会社 研究開発部 浅井智英
- (4) 日本トリム 樺山 繁
- (5) 常盤薬品工業株式会社 開発研究所
森岡恒男

A. 研究目的

高齢化社会への移行のなかで、虚血性の心筋症や脳障害、あるいは高血圧、糖尿病などを包括した、adiponectin (AN) 欠乏症 (いわゆる生活習慣病) が注目されており、ここに関与する酸化ストレスに対して内因性の抗酸化物質の誘導による AN 欠乏症や老化の進行を抑制する戦略に期待が寄せられている。当分担研究では、これに対して、抗がん性、抗老化作用で知られる酸化ストレス応答性活性酸素種消去分子、チオレドキシン (TRX) 類の、高発現を促す食品類や医薬候補物質の探索のための標的となる生体異物相互作用を検索することを目的としてきた。対応する生体の応答遺伝子解析を進めるニュートリジノミクスの一部の成果も、この目的の為に導入した。

具体的な研究課題としては、I. 創薬課題基盤研究のうち I. 1. 国立医薬品食品衛生研究所受託部分としては、TRX など抗酸化活性酸素種消去分子の作用過程における生体異物相互作用について、1-1) 個々の分子レベルの研究 (特に微量金属の挙動解析)、1-2) 細胞生物反応レベルでの研究 (特にマクロファージなどを対照とした解析)、及び 1-3) 個体レベルでの研究 (特に活性酸素種消去関連遺伝子改変動物における反応性研究) の3点を目的とした。また、補助金型によるモデル化学物質に対する生体反応としての発現遺伝子のグローバルプロファイリングの採取 (ニュートリジノミクス) を行う計画とした (I. 3.)。これと平行して、京大補助金型部分の基盤研究 (I. 2.) として、酸化ストレスの関与が知られる脳虚血障害、糖尿病などの疾患や老化に対する抗酸化作用を基軸とした、TRX のさらなる作用機作に関する基盤研究と、II. 個別研究としての、TRX 誘導物質のスクリーニング系、測定系ならびに有効性にかかる医薬品、医薬部外品、食品等の開発研究との両面から課題の探索を進めることを目的とした。

具体的には、I. 1-1) の分子レベルの研究では、HPLC/HR-ICP-MS法を用いて、金属酵素について、結合金属の側から解析すること、及び、微量元素の存在状態が TRX 発現に及ぼす変動の有

無について、酸化ストレスを与えないコントロール状態の野生型 (WT)、TRX過剰発現 (TG) マウス、TRXノックアウト (KO) マウス間での比較検討を行うこと、さらに、抗酸化ストレスに関連するS (硫黄) 含有化合物をすることを目的とした。

I. 1-2) の細胞レベルでの研究では、皮膚炎に有効な物質の検索を目的として、酸化ストレスに対する生体影響防御活性を指標としてスクリーニングを行った。今最終年度は18年度の検討の結果開発された、ラット好塩基球白血病細胞 (RBL-2H3細胞) を用い、酸化ストレスによって誘導された β -hexosaminidase放出量に対する抑制効果を指標とする方法により、協力研究者から提供された植物抽出物の活性試験を行った。更に、3次元培養ヒト皮膚モデルにヒト表皮に存在する過酸化脂質のスクワレンモノヒドロペルオキシド(SQOOH) 及び植物抽出物を添加し、細胞毒性への影響を検討した。

I. 1-3) の個体レベルでの解析では、TRXの発現を低下させることにより、TRXがどのような生命現象や遺伝子発現の制御に関わっているかの分子機構を明らかにするために、TRX-TGマウス、更にTRX-KOマウスを用いて細胞周期や細胞死に対する影響を観察し、その機構の解析を目的とした。

I. 2. の京大における補助金型課題としては、レドックスの調節が、細胞死、蛋白合成などの基本的な生命機能の調節に関与すること、TRXの発現がPC12細胞において、神経成長因子NGFによって誘導され、その調節に、cyclic AMP応答配列および転写因子CREBが重要であることが明らかになったこと、TRXのヘミンや親電子化学物質による活性化機構には、抗酸化物質応答配列 (ARE) を介したNrf2による調整が重要であること、TRXは、グルタチオン系酵素群第二相薬物代謝遺伝子や、ヘムオキシゲナーゼ1と共通の転写制御機構をもち、TRXとこれらの遺伝子がある種の酸化的ストレスに対して協調して働いているものと考えられることに鑑みて、I. 2-1) TRX誘導物質の開発の検討、I. 2-2) TRXの様々な病態における防護作用の検討、I. 2-3) TRXの作用の分子機構の基盤研究を行うことを目的とすることとした。

以上の他、II. 個別研究として、II. 1ライブラリー・スクリーニングでは、化合物や天然物質抽出物のソースから、TRX発現誘導活性を指標にした *in vitro* スクリーニング系によるTRX誘導物質の探索と、発現バイオマーカーの抽出を進めてきた。スクリーニングされたTRX誘導物質候補は、培養細胞、実験動物への投与実験によってその有効性評価を検討するとともに、

様々な病態におけるTRX高発現の意義についても検討してきた。具体的な研究課題としては、スクリーニング系および評価系を共有している京都大学ウイルス研究所と共同し、本年度は、II. 1-1) ライブラリー・スクリーニング及びTRXやその修飾体の個体投与における薬物動態の解析、並びにII. 1-2) TRXによるMIFを標的とした炎症制御機構の解明に関する研究を行った。また、

II. 2 では、TRX類の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発に関連して、同定されたバイオマーカーに対するハイスループットな測定系を開発することを目的とし、

II. 3 では、抗酸化分子の機能を評価する方法を確立し、新しい健康増進医薬、食品、化粧品等の開発に貢献することを目的とした。

尚、新規機能食品の開発を目標として、II. 4では、TRX誘導物質や抗酸化物質を配合した食品の開発と、抗酸化スキンケア化粧品の開発を目指すこととした。

B. 研究方法

各研究課題の研究遂行方法としては、創薬課題基盤研究として、TRXなど抗酸化活性酸素種消去分子の作用過程における関連微量元素の挙動解析及び関連分子高発現性食品や化学物質の探索と応用 (衛研受託研究)、TRX誘導物質の解析 (誘導機構研究)、及びニュートリジノミクスの3課題を設定し、個別課題開発研究としては、TRX誘導物質のスクリーニング (ライブラリー・スクリーニング)、抗酸化分子関連の新規バイオマーカーに対する測定系の開発 (バイオマーカーと測定系開発)、抗酸化分子高発現を促す新しい健康増進食品の開発 (有効性研究)、抗酸化分子の機能性評価法の開発 (評価法開発) の4課題を設定し、それぞれ分担協力の下に、以下の要領で研究を行った。

I. 創薬課題基盤研究

I. 1. 衛研受託研究

当研究課題としては、TRXなど抗酸化活性酸素種消去分子の作用過程における関連微量元素の挙動解析及び関連分子高発現性食品や化学物質の探索と応用とから構成されている。

I. 1-1) 分子レベル研究としては、HPLC/HR-ICP-MS法を採用して、HPLCにより分離したたんぱく質に結合した微量元素を、オンラインでHR-ICP-MSにより検出した。試料としては、酸化ストレスに対して感受性が高いとされる骨髄細胞及び肝臓を用いた。

装置、HPLC/HR-ICP-MSの条件設定、資料の調節条件、の詳細については、国立医薬品食品

衛生研究所の分担研究報告書を参照。

I. 1-2) 細胞レベル研究では、RBL-2H3細胞(5×10⁴ cells/mL)を96穴マイクロプレートに0.1 mLずつ播種し、3日間培養後、協力研究者の琉球大学農学部和田教授、高良助教より提供を受けた以下の黒糖抽出物分画(1-5)を対象として検討した。

1. 3,4-dimethoxyphenyl-o-β-D-glucoside,
2. 3,4,5-trimethoxyphenyl-o-β-D-glucoside,
3. 2,4,6-trimethoxyphenyl-o-β-D-glucoside
4. 4-hydroxy-3-methoxyphenyl-o-β-D-glucoside
5. 3,4-dimethoxy-5-hydroxyphenyl-o-β-D-glucoside

方法の詳細については、国立医薬品食品衛生研究所の分担研究報告書を参照。

I. 1-3) 個体レベル研究では、酸化的ストレスの生体異物応答の個体レベルでのアッセイ系を明らかにすることを目的として、TRXの過剰発現(Tg)やノックアウト(KO)などのマウスも導入して研究を進めた。尚、実験動物は、いずれも淀井教授の下で作成され、衛研に供与されたものであり、C57BL/6背景で作成され、当所にて20代以上にわたって系統維持をしているヒトTRX-Tgマウス、及びI29系統で作成された後、当所にて20代以上にわたってC57BL/6背景に戻し交配して系統維持しているTRX-KOマウス(ヘテロ欠失:ホモ欠失マウスは胎生致死)を用いた。

I. 2. 誘導機構研究

I. 2-1) TRX 誘導物質医薬品の開発: 漢方薬や植物などの抽出成分について TRX 誘導物質の誘導機構の解析を行った。また、その有効性を検討した。植物に含有される成分について TRX の遺伝子発現誘導活性を指標に K562 細胞などを利用したスクリーニングを行い、誘導成分を同定した。さらに類縁の誘導物質を明らかにする。得られた候補物質についてその作用の分子機構の解析を行った。

I. 2-2) TRX の分子機構の解析: TRX のノックダウンにより、細胞の生存における TRX による調節機構を検討した。TRX の発現を低下させることにより、TRX がどのような生命現象や遺伝子発現の制御に関わっているかの分子機構を明らかにするために、TRX を過剰発現させた細胞や RNAi 法によりノックダウンした細胞を用いて、細胞周期や細胞死に対する影響を観察した。さらにその分子機構の解析を行った。

I. 2-3) TRX 関連分子 TBP-2 ノックアウトマウスでの遺伝子発現形質の解析: TRX の negative regulator として報告を行っている thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)について、TBP-2 ノックアウトマウスを用いて、高脂血症や糖代謝異常の解析を行った。

I. 3. ニュートリジノミクス研究

TRXなど抗酸化活性酸素種消去分子の高発現

性食品や医薬候補物質の探索の一環として、ニュートリジノミクスの探索を計画した。予算の関係で、各異なった遺伝子型のマウスにおける無処置状態のグローバル遺伝子発現のプロファイリングのみ採取し、参照例データベースとして、これまでに採取されていた2ヶ月齢の若齢マウスと21ヶ月齢の加齢マウス、それぞれの発現プロファイリングも比較検討に供した。

II. 個別課題開発研究

個別課題開発研究としては、TRX誘導物質のスクリーニング(ライブラリー・スクリーニング)、抗酸化分子高発現を促す新しい健康増進食品の開発(有効性研究)、抗酸化分子関連の新規バイオマーカーに対する測定系の開発(バイオマーカーと測定系開発)、抗酸化分子の機能性評価法の開発(評価法開発)の4課題を設定した。即ち、

II. 1 ライブラリー・スクリーニング

II. 1-1) TRXやその修飾体の個体投与における薬物動態の解析: TRX分子中のシステイン残基を標的にポリエチレングリコールにより修飾を行い、ポリエチレングリコール修飾TRX(以下PEG-TRXと略す)を作成する。これを用い、ラットにおける血中濃度の経時変化を非修飾TRXと比較検討した。

II. 1-2) TRXによるMIFを標的とした炎症制御機構の解明に関する研究: ATL-2細胞を用いて細胞内、細胞外でTRXとMIFが結合することを、免疫沈降法を用いて確認した。更に、ピアコアによりTRXとMIFが直接結合しているか解析した。また、LPS, MIF刺激により産生されるサイトカインがTRXで抑制されるか測定した。

II. 2. バイオマーカーと測定系開発

電気化学発光免疫測定法(electro chemiluminescence immuno assay; ECLIA)を原理とするピコルミシリーズを用いて、高感度(分析感度:0.04 ng/mL)、ワイドレンジ(0.04~140 ng/mL)、ハイスルーブット(100検体/90分、200検体/バッチ)の可能なヒトTRX-1測定系の開発を計画した。

II. 3. 有効性研究

本研究グループの京都大学ウイルス研究所およびレドックスバイオサイエンス株式会社から、ヨモギ抽出物の優れたTRX誘導能が報告された。また、共同研究者の国立医薬品食品衛生研究所および琉球大学から、黒糖(サトウキビ)の特定の非ショ糖成分について高水準の抗アレルギー作用が報告された。最終年度は、スキンケア医薬部外品の新規成分として黒糖のLC/MSによる活性成分の分画・分析研究を継続し、さら

に新規健康食品としてヨモギ抽出物と黒糖を含有する食品の製品化を検討した。

II. 4. 評価法開発

酸化ストレスと関係する疾患に慢性腎臓病を選択し、慢性腎臓病患者58名に協力頂き、患者背景因子が偏らないように、その糸球体濾過量のレベルを基準とした進行ステージに分けた。酸化ストレスの指標として血中TRX、糖分解代謝物でカルボニルストレスの原因とされ、酸化能をしめす指標として血中メチルグリオキサールおよび3-デオキシグルコゾン、また抗酸化能の指標としてBAP(Biological anti-oxidant potential)を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、野生型並びに人為的に遺伝子改変を施した動物を使用することによって、酸化的ストレスに対する生体影響を的確かつ他では得られない方法を駆使することで研究の目的を達成することを計画している。従ってここで用いられる実験動物の取り扱いについては、世界保健機関で動物を用いる生物医学研究のための国際指針を設け、これらに配慮するに至った動物愛護の問題に端を発して、動物の福祉の観点から必要な動物の不安や苦痛の排除もしくは低減など、格段の配慮に努めることを要請されるに至った世界的背景に鑑みて、これを当申請者グループの研究にも全面的に取り入れて研究を推進することが求められている。この研究は、京都大学ウイルス研究所及び国立医薬品食品衛生研究所の動物委員会の規定にもとづいた実験計画について審査の上、承認されたものである。また、遺伝子組み換え実験についても京都大学及び国立医薬品食品衛生研究所の規定にもとづき作成された実験計画につき、承認されたものである。本研究は、動物実験や遺伝子組み換え実験に関する倫理面への配慮に努める方針である。

C. 研究結果

各研究課題について、それぞれ研究者の有機的な分担協力の下に研究を進め、以下の結果を得た。

I. 創薬課題基盤研究

I. 1. 衛研受託研究 以下の3課題について検討し、得られた結果は、次の通り。

I. 1-1) 分子レベル研究については、まず骨髄細胞における微量元素の存在状態を解析するために、WTマウスの骨髄細胞をホモジナイズし、遠心上清をHPLC/ICP-MSで解析した。まず、UVでたんぱく質をモニターした時には、多くのピークが認

められた。次にSレベルでモニターしたところ、14.3 minに大きなピークが見られ、分子量マーカーを用いた検討から、分子量はおよそ3000以下であることがわかった。Znレベルでモニターしたところ、分子量が2万~6万に3本のピークが認められた。そのうちの1本は、Cuのピークとほぼ同じ保持時間に検出されたこと、ZnとCuの存在比が1:1であることから、Cu/Zn-SODと考えられた。

S含有化合物を分析する方法について検討し、GSHとGSSGを分離できたAscentis RP-Amide columnとHydrosphere C18 columnを用いて、骨髄細胞上清、肝臓上清を解析した。

Ascentis RP-Amide columnを用いた場合には、骨髄細胞においては低分子量のS化合物の割合が他の臓器に比べて大きい、肝臓と比べて、新規のS化合物を見出すには至らなかった。

一方、Hydrosphere C18 columnを用い場合には、GSHやGSSG以外のSピークとして、骨髄細胞では8.4、9.7、10.7 minに3本のピークが見られ、肝臓では9.5、10.8 minに2本のピークが見られた。骨髄細胞の9.7、10.7 minのピークはそれぞれ肝臓の9.5、10.8 minのピークとほぼ同じであることから同一の成分と考えられた。保持時間の差は、肝臓でのS強度は骨髄細胞のS強度と約5倍大きいことが影響したと考えた。骨髄細胞で見られた8.4 minのピークは肝臓では全く見られないピークであった。以上のように、Hydrosphere C18 columnを用いた場合には、骨髄細胞においては肝臓と比べて、新規のS化合物を見出した。

次に、WT、TG、KOマウスの骨髄細胞について、HPLC/HR-ICP-MSで解析して比較した。Znについて、保持時間13.0 minのピークがKOで若干大きい傾向が見られた。Seについても分析したが、各群で明瞭なピークは検出できなかった。**I. 1-2) 細胞レベル研究**については、まずRBL-2H3細胞に対する黒糖抽出物分画の細胞毒性を検討した結果、2回の試験のIC50の平均値は**1**が464 μM 、**2**が124 μM 、**3**が502 μM 、**4**が5.5 μM 、**5**が5.4 μM と、**4,5**が非常に強い細胞毒性を示した。細胞毒性の見られない濃度において活性試験を行ったところ、**1**では10及び50 μM 添加時にdi-TBHQにより誘導された β -hexosaminidase放出量増加が濃度依存的に有意に抑制された。**2-5**において同様に活性試験を行ったところ3回の試験のEC50の平均値は細胞毒性の弱い**1,3**が9.5 μM と他よりも弱い活性を示し、**2**が0.38 μM 、**4**が0.1 μM 、**5**が0.35 μM と強い細胞毒性を示した**4**が最も強い β -hexosaminidase放出量抑制効果を示した。Vitro-life Skinに対する黒糖抽出物分画**4**の細胞毒性を検討した結果、50 μM までは細胞毒性を示さず、100 μM で生存率88%と、有意な生存率の減少が観察された。一方、20%エタノールで可溶化した

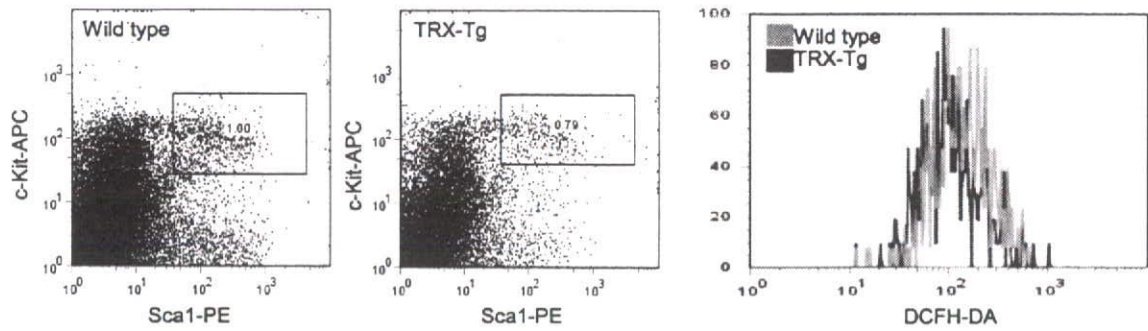


図1:LKS分画のDCFH-DA染色の例

SQOOHを添加したところ、有意な生存率の減少が観察されたが、20%エタノール単独でも生存率が約18%と顕著な生存率の減少が観察された。

I. 1-3) 個体レベル研究では、個体レベルでのTRXなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子をめぐる生体異物応答のアッセイ系として、TRX遺伝子の遺伝型に応じたマウス個体レベルでの探索とともに、同活性酸素種応答の生体内でもっとも鋭敏かつ知見の集積しつつある造血幹細胞系と、このもののROSからの隔離に働く造血幹細胞ニッチ(niche)をめぐる諸分子を対象として、個体レベルのみならず、in vitro (ex vivo) のアッセイ系研究開発・検討を行った。

(1) 各TRX遺伝子型の異なるマウスでのROSとの相互作用を指標とする個体レベルでのアッセイ系(省略:平成18年度報告等参照)

(2) 造血前駆細胞のクローナルアッセイ系の応用:非コロニー性前駆細胞、培養性コロニー前駆細胞などの定量的アッセイ系の適用(省略:平成18年度報告等参照)

(3) 造血前駆細胞の細胞内ROSの蛍光定量法:セルソーターを使用したDCFH-DAによる検討(図1)

(4) 造血前駆細胞、side population (SP) 細胞の色素排出能試験:SP分画細胞のRhodamine123やHoechst33342等のATP binding cassette transporterなどによる色素排出能アッセイ系の検討。尚、非SP分画の数量的変化を指標とした細胞周期内造血幹細胞の消失(分化型細胞への排出)とN-acetyl cystein (NAC)による抑制試験。

(5) 造血幹細胞におけるROSによるForkhead Box O (Foxo) familyのFoxo3の発現を指標とする分子指標アッセイ系の検討。尚、Fox欠失細胞系におけるROSとの相互作用後のLKS分画と骨髄系分画における分化比を、細胞数、並びに骨髄ペルオキシダーゼ活性により定量する系(in vivo)もしくはin vitroによるNAC投与の対照実験も行われる。

(6) 造血幹細胞におけるROSに対するhypoxia inducible factor (Hif) 1 α 発現試験とTRXの影響に

関するアッセイ系:通常のNicheに局在する造血幹細胞においてはHif1 α などの発現が認められないことが知られている。TRX-Tgマウスにおいては、諸報告を参照すると、このHif1 α の発現が認められる可能性が高いものと判断される。そうした系を念頭においてROSに対する異物応答により造血幹細胞に発現するHif1 α の発現定量試験が成立し、in vitro (ex vivo) における試験系として役割を果たすことが考えられ、優れたスクリーニング系となるものと判断される。

(7) CD34陽性造血幹細胞における抗酸化系代謝試験:CD34陽性細胞におけるmicrosomal glutathione-S-transferase (MGST1)及びBCL2-interacting killer (BIK)などのin vivo ROS曝露に対する応答をRT-PCRにて定量するアッセイ系。

(8) Nucleophosmin (NPM)のknock down細胞系による造血幹細胞のDNA障害、酸化的ストレス、ならびに造血障害の鋭敏アッセイ系における試験

I. 2. 誘導機構研究

I. 2-1) TRX誘導物質医薬品の開発:ヨモギおよび青じそからの抽出物に強いTRXの遺伝子発現誘導活性を認め、青じその抽出物のTRX誘導物質として香り成分ペリルアルデヒドを同定した。ペリルアルデヒドによるTRX遺伝子発現誘導の分子機構を明らかにした。

I. 2-2) TRXの分子機構の解析:TRXは細胞周期制御蛋白の発現調節を行うことにより細胞生存調節を行っていることを明らかにした。さらに、TRXはMAPキナーゼシグナル伝達に重要な役割を果たすことを明らかにした。

I. 2-3) TBP-2ノックアウトマウスの解析:TBP-2はインシュリン分泌制御と糖脂質代謝に重要な転写因子peroxisome proliferator activator receptor (PPAR) α のシグナル制御を行う糖・脂質代謝統合制御因子であることを明らかにした。

I. 3. ニュートリジノミクス

ニュートリジノミクスの探索に先立って、個体差や週齢差などに起因するグローバル遺伝子発

現プロファイリングや、種々の遺伝子用量のTRX遺伝子改変動物を用いた定常状態におけるグローバル遺伝子発現のプロファイリングの整備を進めた。また、背景データとして、経口投与した抗酸化剤による個体レベルでの酸化ストレス緩和モデル実験を行った。即ち、抗酸化剤としてTRX誘導能の知られるスルフォラファンを用い、TRX過剰発現マウスで障害性が緩和されることを示してきたベンゼンによる造血障害が、スルフォラファンの投与によっても緩和されるのか解析し、末梢血白血球や、培養性造血前駆細胞数のベンゼンによる減少がスルフォラファンの前処置によって全くみられなくなることを明らかにした(図2)。

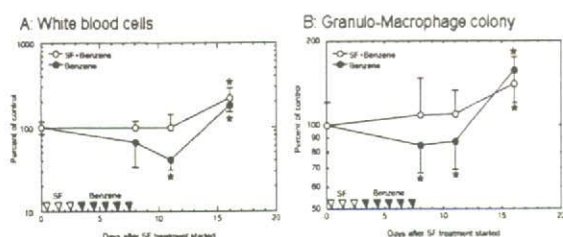


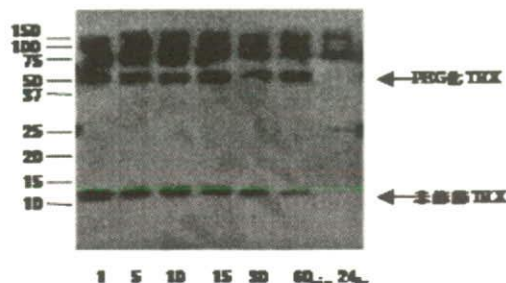
図2:スルフォラファン前処置によるベンゼン毒性の消失
SF: Sulforaphan (LTK Laboratories Inc. St. Paul MN) 20mg/ bwKg, 1回/日、経口投与; Benzene (Wako Fine Chemicals, Tokyo Japan) 150mg/bwKg, 1回/日、経口投与
*: 非投与対照群とのT検定でp<0.05

II. 個別課題開発研究

II.1 ライブラリー・スクリーニング

II.1-1) TRXやその修飾体の個体投与における薬物動態の解析: PEG-TRXを作成した。即ち、遺伝子組換えTRXをPBS(pH7.5)に濃度1mMに溶解し、分子量約2万のポリエチレングリコールマレイミド誘導体 (SUNBRIGHT®ME-200MA 日油株式会社)の濃度を室温にて30分間反応させ、TRX分子中システイン残基のポリエチレングリコール修飾をおこなった。これを用いてラットにおける血中動態を非修飾TRXと比較検討した。非修飾TRXまたはPEG-TRX蛋白2mg/kgをラットに尾静脈より静脈内投与し、頸静脈より経時的にヘパリン採血し血漿を得た。血漿中TRXおよびPEG-TRX量に関する分析をSDS-PAGE/ウェスタンブロット法により行った(図3)。同時に、非修飾TRXを投与した際の血中動態はELISA法によっても測定した。その結果、非修飾TRXの血中濃度は投与後1時間で約1/24に低下した。また、ウェスタンブロット法によってもTRXに対応する分子量約1万2千のバンドの大幅な減少が観察された。一方、PEG-TRXでは、分子量約6万のバンドは投与1時間後でもほとんど減少しなかった。

しかし、サンプル中に約15%不純物として含まれる非修飾TRXに対応する分子量約1万2千のバンドは投与1時間後には大幅に減少した。以上の結果より、PEG-TRXは血中濃度の持続時間が非修飾



TRXより長い事が明らかとなった。

図3ラットに対するPEG化TRX(2mg/kg)静脈内投与後の血中PEG-TRXのウェスタンブロット法による分析

II.1-2) TRXによるMIFを標的とした炎症制御機構の解明に関する研究: ATL-2細胞の細胞内、細胞外においてTRXとMIFが結合していることが分かった。さらにBIAcore解析の結果、TRXとMIFはタンパク同士が直接結合していることが分かった。また、LPS, MIFの刺激によって産生されるサイトカイン(TNF- α)はTRX存在下では抑制された。

II.2. バイオマーカーと測定系開発

リコンビナントADFを過酸化水素およびTCEPを用いて、それぞれ酸化、還元処理を行い、HPLC(カラム: Superdex75 10/300GL)を用いてゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行い、溶出液を時間分取した。過酸化水素処理時間を調整し、1量体および2量体の両者が存在する条件を設定し、HPLCからの溶出直後のフラクションを測定した結果、r-ADF2量体は1量体に比べて、約4倍の定量値を示した。その後、それぞれのピークをリクロマトグラフィーにて溶出fractionを測定した結果、2量体は、より高分子側にも測定値が認められ、1量体は、より低分子側にも定量値が認められた。また、各種疾患検体を測定した結果、慢性肝炎は健康人とほぼ同等であり、アルコール性肝炎、肝がんおよびNASHの測定値の分布は、健康人に比べて、高い値を示した。

II.3. 有効性研究

黒糖抽出物(黒糖の0.3~0.5%)について、抗酸化および抗アレルギー活性成分の特定のため、LC/MSによる成分分析を検討した。主な活性成分として、メトキシフェニルグルコシド類1~5が認められた。黒糖抽出物を水/メタノールの比率を変えて分画し、各分画物中に含まれるメトキシフェニルグルコシド類を同定した。共同

研究者による抗アレルギー活性のスクリーニング結果を合わせることで、スキンケア化粧品および医薬部外品の候補原料として基礎的な原料開発に成功した。また、TRX誘導能を有するヨモギ抽出物、黒糖を配合した抗酸化ストレス飴製剤を開発に成功し、初期的な製造性、安定性を確認した。

II. 4. 評価系開発

慢性腎臓病における腎機能ステージを、糸球体濾過量を基準にステージ3 (30~60ml/min)、ステージ4 (15~30ml/min)、ステージ5 (15ml/min未満)に分けた。測定の結果、血中メチルグリオキサール濃度は腎機能の低下に従い有意に上昇した。血中TRX濃度も腎機能の低下に従い有意に上昇した。また血中メチルグリオキサール濃度と血中TRX濃度との間には正の相関が認められた ($P<0.001$, $R=0.6589$)。一方、糖尿病と関係の深いカルボニルストレスの原因物質である3-デオキシグルコゾンと腎機能、血中TRX濃度との間には特に関連が認められなかった。また、BAPは特に腎機能レベルによる違いは認められなかった。

D. 考察

I. 創薬課題基盤研究

I. 1. 衛研受託研究

I. 1-1) 分子レベルでの研究：TRXのWT、TG、KOマウスの骨髓細胞中の微量元素の存在状態については、KOで若干Znのピークが大きかったことを除くと、定常状態では大きな違いが認められなかったが、酸化ストレスの状態を変えた場合の、微量元素の変化の有無やTRXによる修飾に興味をもたれた。

なお、TRXに関連してSeについても分析したが、明瞭なピークが検出されなかった。このことから、骨髓細胞中のチオレドキシシン・レダクターゼなどのSe含有酵素の量は、分析機器的に検出できないくらいの低濃度と予想された。

骨髓細胞においては、血清や他の組織と比べて、低分子量のS含有化合物の割合が非常に高いことを見出したことから、この低分子量画分に着目し、まず低分子量用のゲルろ過カラムを用いて、S化合物を分析する方法について検討し、Hydrosphere C18 (YMC)によって、骨髓細胞における新規のS化合物が見出された。

I. 1-2) 細胞レベルでの研究：19年度の報告で黒糖抽出物分画1-5 にt-BuOOHによって誘導されたβ-hexosaminidase放出量抑制効果があることが示唆されたが、試験を繰り返した結果、t-BuOOHによる誘導に十分な再現性が得られなかったため、

評価指標物質をβ-hexosaminidase 放出誘導のポジティブコントロールとして用いられているdi-TBHQに変更して活性試験を行った。その結果、良好な再現性が得られ、4-hydroxy-3-methoxy-phenyl-o-β-D-gluco-side 4が最も強い活性を示し、次いで同様にフェノール構造を持つ5が強い活性を示して主要な活性成分の一つである可能性が示唆された。4,5はフェノール性水酸基を持っており、その構造から1-3よりも強い還元性を持つと推定されることから、4,5が1-3よりも強いβ-hexosaminidase放出量抑制活性を示したのはフェノール性水酸基による強い還元性のためである可能性が示唆された。また、2が1,3よりも強い活性を示したのも同様に還元性の違いによる可能性があるが、酸化還元電位の測定等、更に検討する必要があると思われる。3次元培養細胞を用いた検討ではSQOOHの可溶化に用いたエタノールの濃度が高すぎたため、そのものの細胞毒性が見られたと思われ、今後エタノールの濃度を下げて検討し直す必要がある。一方、黒糖抽出物分画4そのものはRBL-2H3細胞の場合より高い50 μMまでは細胞毒性を示さなかった。角層のバリア機能によるものと思われる。

I. 1-3) 個体レベルでの研究：個体レベルでのTRXなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子をめぐる生体異物応答のアッセイ系として用いたTRX遺伝子の遺伝型に応じたマウス個体レベルでの探索では、当研究者等の従前行った放射線やパラコートに対する反応性を参考として、造血前駆細胞のクローナルアッセイ系や、造血前駆細胞の細胞内ROSの蛍光定量法などが、効果的な役割を果たすものと想定された。

次に、in vivoのアッセイ系に要する時間的、経費的負担を軽減するために検討したin vitro/ex vivo系のアッセイ系については、ROSに対する生体内でもっとも鋭敏と考えられる造血幹/前駆細胞を標的とする様々なシグナル分子をアッセイモデルとしてとりあげた。これらのハイスループット性を生かし、当該分子高発現性食品や医薬候補物質の探索に効果的な役割が期待される。

尚、残された課題として代表的モデル物質スルフォラファンや当研究で開発された諸候補物質も、これらのアッセイ系に対する試験的適応などが、主要課題となるものと考えられる。

I. 2. 誘導機構研究

I. 2-1) TRX 誘導物質医薬品の開発：青じその抽出物由来ペリルアルデヒドなど様々な alpha, beta-不飽和結合をもつ香り成分アルデヒドが TRX 誘導活性を持つことを明らかにした。これらの物質はNrf2-ARE システムの活性化を起こすことから、TRX 系およびグルタチオン系の様々なレドック

ス制御酵素を誘導し、抗酸化に働くと考えられる。一方、脂質過酸化によって生じるアクロレイン、ヒドロキシノネナールなどは細胞障害を起こすことが知られており、これらの物質も過剰であれば細胞に酸化ストレスを引き起すと考えられる。また、肺の非小細胞癌では Keap1 の変異により Nrf2 の恒常的活性化が起っていることが明らかになっている。このように Nrf2-ARE システムを活性化する物質は一方では細胞の抗酸化蛋白質の発現を誘導して抗酸化につながるが、一方では酸化ストレスをかえって増強するなど諸刃の剣のように振る舞うと考察される。従って、安全な TRX 誘導医薬品の開発のために、TRX 誘導の分子機構の検討を進めることは重要であると考えられる。また、ヨモギ由来の TRX 誘導活性成分については新規のものであるという知見を得ており、その検証や誘導活性化機構についてさらに解析を進めていく必要がある。

I. 2-2) TRXの分子機構の解析: TRXのノックダウンにより蛋白質およびRNA レベルでcyclin D1の発現抑制が起こり、G0/G1期での細胞周期停止が起こった。このことより、TRXは細胞周期制御に重要である。さらにcyclin D1 promoterにおける検討を行い、TRXのノックダウンはcyclin D1遺伝子の転写制御にかかわるAP-1の活性化やMAPキナーゼのリン酸化の抑制を引き起こすことを明らかにした。したがって、TRXは細胞増殖や細胞の生存のシグナル調節に重要な役割を果たすことが明らかになった。今後、TRXのシグナル制御の作用点とその詳細な分子機構を明らかにすることにより、細胞内のレドックス調節を制御できる可能性があると思われる。また、抗癌剤であるシスプラチンを用いて細胞死を誘導したところ、コントロール細胞に比べてTRXノックダウン細胞では細胞死が増加した。これらの結果はTRX発現量が抗癌剤耐性に影響を与えることを示唆している。TRXはApoptosis kinase 1 (ASK1)などとの相互作用によるアポトーシス制御の機構が報告されている。TRXチオレドキシンと相互作用する分子のリアルタイム解析によりTRXによるアポトーシス生理的制御機構を明らかにする必要がある、現在そのシステムの構築をすすめている。これらの進展により、TRXの制御による増殖・分化の制御を行い、異常な炎症応答や癌細胞増殖抑制に応用できる可能性があると考えられる。

I. 2-3) TRX関連分子TBP-2のノックアウトマウスの解析: TRXのnegative regulatorとして報告を行っているTBP-2について、TBP-2ノックアウトマウスは絶食時に高脂血症、低血糖を示す。このマウスでは糖負荷によるインシュリンの過分泌が観察された。さらに、TBP-2はPPAR α のシグ

ナル制御を行うことを示した。これらのことより、TBP-2はインシュリン分泌制御と糖脂質代謝に重要な転写因子peroxisome proliferator activator receptor (PPAR) α のシグナル制御を行う糖・脂質代謝統合制御因子である。従って、TBP-2による脂質代謝制御機構の解明により、高脂血症に対する新たなアプローチの開発につながる可能性がある。また、TBP-2はインシュリン分泌を抑制する作用があることから、TBP-2のインシュリン分泌抑制機構の解明やTBP-2阻害物質の開発により、糖尿病治療のための新たなアプローチを開発できる可能性がある。これらのTBP-2の糖・脂質代謝制御にTRXがどのように関与しているかについてもさらに検討を加えて明らかにする必要がある。

I. 3. ニュートリジノミクス

ニュートリジノミクスは、摂取される食品が消化吸収され、生体に取り込まれる過程での生体異物相互作用を、transcriptomicsを手法として、遺伝子の発現プロファイリングをもって理解しようとする新しい生体異物応答学の手法である。これによって、2000年前後から例えば従来生体に好ましい影響が（特に東洋人の間で）信じられてきた大豆イソフラボンの作用に（高用量に限られる影響の様ではあるが）様々の生体障害作用があることが見出されてきた。こうした、いわゆる vegetarian mother症候群と呼ばれる小児の性器奇形やひいては精巣がんにつながるリスクはほとんど知られていなかったものであり、ここにこの手法に期待されるものがある (Wetherrill et al. 2005, Strom et al. 1999)。本研究課題でニュートリジノミクスを取り上げた重要な視点は、TRXの欠失状態や過剰発現状態の動物の反応性を野生型における応答と比較しながら、対象食品との生体応答に注目することにある。

II. 個別課題開発研究

II. 1. ライブラリー・スクリーニング

II. 1-1) TRXやその修飾体の個体投与における薬物動態の解析: 以上の結果より、PEG-TRXは血中濃度の持続時間が非修飾TRXより長い事が明らかとなり、より少ない投与量および投与回数で同等の薬物血中濃度が得られることが期待された。今後、生物活性の面からも比較検討を行い、PEG-TRXの薬効面での優位性も合わせて検討する必要があるものと考えられた。

さらに、医薬品として開発を進めるに当たり、医薬品として要求される物性を満たすため、先ず、修飾されるシステイン残基の位置および残基数を限定して高収率で作成できる作成法も合わせて検討する必要があると考えられた。

II. 1-2) TRX による MIF を標的とした炎症制御機構の解明に関する研究：細胞内外で TRX と MIF が結合することが明らかになった。TRX が MIF により産生される炎症性サイトカインを抑制することから、TRX と MIF の結合が抗炎症作用において重要であると考えられる。組み換えタンパクを用いたピアコア解析の結果からも TRX と MIF が直接結合することが証明され、今後 TRX と MIF の結合様式や構造解析などが必要である。

II. 2. バイオマーカーと測定系開発

リコンビナント ADF を用いた検討では、これまでの ELISA での検討結果と ECLIA を用いた結果で若干異なる結果も得られた。今回の結果が、迅速に測定できた結果に起因するかは、今後、さらに検討を進める必要がある。各種疾患検体の測定については、診断が難しく、肝生検を伴う NASH が高い値を示したことは、患者様の負担を少なくする上で重要である。今後は、本測定の高感度、迅速性を活かし、TRX 周辺の新規バイオマーカーの測定にも活用したい。

II. 3. 有効性研究

ヨモギ、黒糖は日本で古くから親しまれている食品である。長寿地域の沖縄を中心とした南西諸島において、特産のサトウキビから作られる黒糖はもちろん、沖縄薬草としてヨモギはウコンとともに長く親しまれている。ヨモギは薬草として咳止めや血止めに利用され、炎症に良いとされてきた。ヨモギは生薬「艾葉（がいよう）」として医薬品に利用されている。最近、本研究グループの京都大学ウイルス研究所において、ヨモギ中の成分に抗酸化・抗炎症作用を有する TRX の誘導作用が発見された。一方、黒糖も甘味剤・矯味剤として医薬品添加物に利用されている。化粧品としての利用にも歴史があり、黒砂糖石鹼は公正競争規約により黒砂糖の基準使用量が全重量の5%以上と定義されたものである。サトウキビ由来の成分を残す黒糖は、琉球大学の共同研究者により、抗酸化能を有するポリフェノール類など多くの生理活性成分を含むことが明らかにされている。今回、風味のよい沖縄県波照間島産の黒糖を使用しヨモギ特有の風味を無香料でマスキングし、使用試験に耐える試作品の開発に成功した。今後は、TRX 誘導・抗酸化作用を有するヨモギ含有黒糖のど飴について、その有効性と安全性の使用試験による確認が課題である。

II. 4. 評価法開発

腎臓病ステージが上がるにつれ、酸化物質のメチルグリオキサールの上昇が確認され、それ

に伴い抗酸化系物質の TRX 濃度が上昇しており、その両者に正の相関関係が見出されたことは、腎機能が低下することにより伴う酸化ストレスの増加に対抗するために抗酸化物質である TRX 濃度が上昇しているものと考えられた。血中 TRX 濃度と血中メチルグリオキサール濃度を測定することは、腎機能低下のメカニズム解明と病態理解と腎機能低下抑制のための手段開発のために有用な手段と考えられる。

E. 結論

創薬課題基盤研究として、TRX など抗酸化的活性酸素種消去分子の作用過程における関連微量元素の挙動解析及び関連分子高発現性食品や化学物質の探索と応用（衛研受託研究）、TRX 誘導物質の解析（誘導機構研究）、並びに、ニュートリジノミクスの3点を設定し、個別課題開発研究としては、TRX 誘導物質のスクリーニング（ライブラリー・スクリーニング）、抗酸化分子高発現を促す新しい健康増進食品の開発（有効性研究）、抗酸化分子関連の新規バイオマーカーに対する測定系の開発（バイオマーカーと測定系開発）、抗酸化分子の機能性評価法の開発（評価法開発）の4課題を設定し、それぞれ分担協力の下に研究を行った。

本研究では、その酸化的ストレスの消去に対して中心的な役割を果たすチオレドキシンと、その活性維持に役割を果たす調節酵素に注目し、それらのさらなる作用機構の個体、細胞、分子レベルの基盤を明らかにすると同時に、これを直接的に応用した健康増進に役割を果たす医薬品・医薬部外品並びに食品の開発に向けて班員が協力・分担して取り組み、チオレドキシンの作用機構、調節代謝にもとづくアッセイ系ハイスループット基盤と、医薬品・医薬部外品・食品の開発における各々の領域について、基本的な所期の成果を上げた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Hirabayashi Y, Tsuboi I, Kitada K, Igarashi K, Kodama Y, Kanno J, Yoshida K, Dainiak N, Inoue T. Comparison of murine gene expression profiles between spontaneous and radiation-induced myelogenous leukemias: Stochastic and probabilistic expression variances in the former vs. radiation-specific expression commonalities in the latter. *Exp Hematol* 37: 195-205, 2009.
- (2) Hirabayashi Y, Inoue T. Aryl hydrocarbon receptor biology, xenobiotic responses in hematopoietic progenitor cells. *Biochem Pharmacol*

77:521-535.

- (3) Suzuki H, Inoue T, Matsushita T, Kobayashi K, Horii I, Hirabayashi Y, Inoue T. In vitro gene expression analysis of nephrotoxic drugs in rat primary renal cortical tubular cells. *J Appl Toxicol* 28:237-248, 2008.
- (4) Suzuki H, Inoue T, Matsushita T, Kobayashi K, Horii I, Hirabayashi Y, Inoue T. In vitro gene expression analysis of hepatotoxic drugs in rat primary hepatocytes. *J Appl Toxicol* 28:227-236, 2008.
- (5) Hirabayashi Y, Inoue T. Principles of data-mining in toxicogenomics. In: Sahu SC, ed. *Toxicogenomics: A Powerful Tool for Toxicity Assessment*. Hoboken, NJ John Wiley & Sons, Ltd.: 57-84, 2008.
- (6) Oka SI, Yoshihara E, Bizen-Abe A, Liu W, Watanabe M, Yodoi J, Masutani H. Thioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2)/Txnip is a Critical Regulator of Insulin Secretion and PPAR Function. *Endocrinology*. 2008 Oct 30. [Epub ahead of print]
- (7) Okuyama H, Son A, Ahsan MK, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J. Thioredoxin and thioredoxin binding protein 2 in the liver. *IUBMB Life*. 60(10):656-660, 2008.
- (8) Inomata Y, Tanihara H, Tanito M, Okuyama H, Hoshino Y, Kinumi T, Kawaji T, Kondo N, Yodoi J, Nakamura H. Suppression of choroidal neovascularization by thioredoxin-1 via interaction with complement factor H. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49(11):5118-5125., 2008.
- (9) Son A, Nakamura H, Okuyama H, Oka S, Yoshihara E, Liu W, Matsuo Y, Kondo N, Masutani H, Ishii Y, Iyoda T, Inaba K, Yodoi J. Dendritic cells derived from TBP-2-deficient mice are defective in inducing T cell responses. *Eur J Immunol*. 38(5):1358-1367, 2008.
- (10) Sato A, Hoshino Y, Hara T, Muro S, Nakamura H, Mishima M, Yodoi J. Thioredoxin-1 ameliorates cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 325(2):380-388, 2008.

2. 学会発表

- (1) Inoue T, Hirabayashi Y: Gompertzian expression of the life span: Toxicological ultimate risk for xenobiotic responses. The 45th Congress of the European societies of Toxicology (2008.10.6)
- (2) Hirabayashi Y, Yoon BI, LiGX, Kaneko T, Kanno J, Fujii- Kuriyama Y, Inoue T. AhR-mediated benzene-induced hematopoietic toxicities: differential toxicities between one from AhR in the hematopoietic stem cells for the bone marrow and the other from possible hepatic-AhR for the peripheral blood. *Dioxin* 2008 (2008.8.19)
- (3) 内野正、竹澤俊明、五十嵐良明、関秦三、森岡恒男、奥村秀信、高良健作、和田浩二、徳永裕司：酸化ストレスに対するβ-hexosaminidase 放出

量抑制効果を指標とした黒糖抽出物の活性物質の探索 日本香粧品学会第33回学術大会 (2008.6.6)

- (4) Yodoi J, Masutani H, Son A, Chen Z; TRX/TBP-2 in metabolic stress and inflammation responses, The XIV Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International(14th SFRR), Beijing, China, October 19, 2008
- (5) 淀井淳司、孫安生、松尾禎之 チオレドキシソ創薬とレドックス制御薬 フォーラム富山「創薬」第25回研究会 平成20年5月27日 富山市
- (6) 淀井淳司、孫安生、加藤紀子、増谷弘 アレルギー疾患のレドックス制御第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 平成20年6月12日
- (7) 淀井淳司 チオレドキシソ研究とその事業化の最前線国際バイオフィォーラム 平成20年7月2日
- (8) Yodoi J, Son A, Hoshino Y Redox Regulation of Immune and Inflammatory Responses; Application of Thioredoxin to Therapeutic. *生物医学レドックスナビ国際会議：EPR2008* 平成20年9月29日
- (9) Yoshiyuki Matsuo Y, Suzuki K, Son A, Okuyama H, Nakamura H, Masutani H, Yodoi Y Transmembrane thioredoxin-related protein in the endoplasmic reticulum: substrate recognition by TMX and its role in the inflammatory response. *BMB2008*; 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 平成20年12月11日
- (10) Yodoi J, Son A, Anti-inflammatory function of thioredoxin through inhibiting MIF activity. *BMB2008*; 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 平成20年12月11日
- (11) 吉原栄治、藤本新平、稲垣暢也、淀井淳司、増谷弘 TBP-2欠損の肥満・糖尿病モデルマウスは肥満になるが、高血糖にはならない *BMB2008*; 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 平成20年12月12日

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

臍帯血DLIの実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレーショナルリサーチ

所属 国立成育医療センター研究所 母児感染研究部
研究者 藤原成悦

研究要旨 臍帯血 DLI の臨床試験実施に向けて、活性化臍帯血 T 細胞調製法の改良、遺伝子発現の網羅的解析による活性化臍帯血 T 細胞の特性の検討、臍帯血 DLI 前臨床試験の場としての EBV 感染モデルマウスにおける抗ウイルス免疫応答の解析、活性化臍帯血 T 細胞製剤の安全管理法としてのマイコプラズマ検出法の確立と迅速真菌検査法の開発を行った。また、厚生労働科学研究（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班との共同作業を開始し、アンケート調査などを通じて臨床試験の実施体制を整えた。平成 21 年度に 5～10 例を目標として、安全性の確認を主目標とする第 I 相試験を実施する予定である。

分担研究者

- (1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 清水 則夫
- (2) 東京医科歯科大学医学部 森尾友宏
- (3) 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部 清河信敬
- (4) 日本大学医学部 麦島秀雄
- (5) 株式会社リンフォテック 関根暉彬
- (6) 東京医科歯科大学医学部 寺嶋一夫
- (7) 先端医療センター血液再生研究グループ 伊藤仁也

A. 研究目的

臍帯血移植は近年急速に普及しているが、1 人のドナーから得られる細胞数が少ないため、移植後の感染症や原疾患再発に対してドナーリンパ球輸注療法（DLI）を実施できないことが欠点である。我々はこれに対して、移植に用いた臍帯血細胞の一部を凍結保存し、必要に応じて活性化・増幅したのちレシピエントに輸注する治療法（臍帯血 DLI）を考案し、その基礎および臨床パイロット研究を進めてきた。平成 16～18 年度政策創薬総合研究事業 KH51039「臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化」では、新鮮臍

帯血からの活性化 T 細胞培養法の確立、活性化臍帯血 T 細胞の性状解析、臍帯血 DLI の動物モデルの作製を行った。本研究はこれに引き続き、実際に治療に用いる凍結臍帯血からの活性化 T 細胞調整法を確立し、臍帯血 DLI 動物モデルを用いた前臨床試験を実施、さらに、安全性の確認を主目的とする第 I 相臨床試験を実施することを目的とする。また、培養加工細胞製剤を安全かつ一定の規格に均一化し GMP に基づいた製品に仕上げるための基盤整備を行なう。

臍帯血 DLI が臍帯血移植後の原疾患再発や難治性感染症に対する治療法として実用化されれば、これら疾患の治療成績が向上し、ひいては臍帯血移植成功率の向上が期待される。また、細胞治療製剤を GMP に準拠して管理することにより、製剤の効果および安全性の管理を徹底させることが可能となり、さらに、米国・ヨーロッパ・アジアとのあいだで共通の基準をもって情報交換が可能となり、国際的な協力関係の構築が促進される。

本年度は、実際の臨床試験での使用を念頭に置き、クリニカルグレードでの培養法の検討、細胞製剤の安全管理法としてマイコプラズマ検出試験の確立と迅速真菌検出法の開発、

活性化臍帯血 T 細胞の遺伝子発現解析、EBV 感染モデルマウスにおける免疫応答解析、臍帯血造血幹細胞の分化・増殖メカニズムの解析、臨床試験実施体制の整備などを行った。

B. 研究方法

1. 臍帯血の取得

東京および兵庫臍帯血バンクに提供された臍帯血のうち、血液量不足のため移植に使用できなかったものを利用した。

2. 臍帯血 T 細胞活性化培養法の検討

(1) 基本培地の比較検討

RPMI + 7(日研生物医学研究所: +7 と略す) 及び ALyS 505N-0(細胞科学研究所: ALyS と略す)に 10 % ヒト血清および 700 IU / mL IL-2 を添加したものを基礎培地とした。通常のフラスコで 1 日慣らし培養をおこなった後、細胞浮遊液を OKT-3 抗体で固相化したフラスコに移し活性化を開始した。IL-2 濃度は 700 IU / mL で培養開始後、適宜培養液を添加することにより、14 日目までに 175 IU / mL まで漸減させた。OKT-3 抗体による刺激は培養 7 日目に終了した。

(2) T 細胞活性化法の検討

抗 CD3 抗体および抗 CD3/CD28 抗体は、安全性を考慮しクリニカルグレードのものを使用し、培養液は米国 FDA(Food and Drug Administration)の認可を受けた AIM-V にガンマ線照射済ヒト血清(10%)、IL-2(350IU/mL)を添加したものを使用した。培養液 5mL に細胞 5.0×10^6 cells を浮遊させ、抗 CD3 抗体を固相化したフラスコあるいは抗 CD3/CD28 抗体ビーズを添加したフラスコで培養した。

2. 活性化臍帯血 T 細胞の遺伝子発現解析

臍帯血および健常人末梢血よりファイコール比重遠心法により単核球を分離し、固相化抗 CD3 抗体と IL-2 (700 IU/ml) 添加 (リンフォテック社、TLY CULTURE™キット 25 を使用) により 2 週間培養して、T 細胞を活性化・増幅した後、マグネットビーズ法により CD4 陽性細胞のみを分離した。

それぞれの増幅 CD4 陽性細胞から total RNA を RNeasy kit + DNase 処理で抽出し、マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行った。得られたデータは解析ソフト GeneSpring を用いて解析した。

上記 RNA の一部から、cDNA 合成キットを用いて single strand cDNA を合成し、各標的遺伝子に特異的なオリゴプライマーセットを用いて、CYBRGreen による定量的 PCR を行った。また、培養後の活性化 T 細胞に対して、1) 抗ヒト CD3, CD4, CD8, FOX-P3、2) 抗ヒト CD3, CD4, CD8, IL-17、3) 抗ヒト CD4, CD8, CD152, ICOS、の抗体の組み合わせにより細胞を染色し、フローサイトメーターを用いて解析した。なお、FOX-P3 あるいは IL-17 の染色に際しては、IntraPrep により細胞膜透過処理を行ってから染色した。

3. 細胞製剤の安全管理法

(1) マイコプラズマ検出試験

製品評価技術基盤機構より入手した代表的マイコプラズマ株、M. orale (NBRC14477), M. hyorhinis (NBRC14858), M. pneumoniae (NBRC14401), M. laidlawii (NBRC1440) をスタンダードとして、PCR 法と培養法の二法を用いて検出試験を行った。PCR 法は、第十五改正日本薬局方 (日局 15) に定められた Nested PCR 法を用いた。プライマー配列を (表 1) に示す。培養法は日局 15 に定められた方法に

表 1. マイコプラズマ PCR プライマー

プライマー		配列
1 st PCR プライマ	F1	5'-acaccatgggag(c/t)tggtaat-3'
-	R1	5'-ctcctagtgccaaag(c/g)cat(c/t)c-3'
2 nd PCR プライマ	F2	5'-gtg(c/g)gg(a/c)tggatcacctcct-3'
-	R2	5'-gcatccacca(a/t)a(a/t)ac(c/t)ctt-3'

従った。培養には MB- I、II 培地及び寒天平板培地 MA の 3 種類を用いた。また、臍帯血 T 細胞培養液にマイコプラズマ陽性菌 2 種 (M. orale, M. pneumoniae) を 100CFU 添加し、培養法によるマイコプラズマ検出試験を実施した。

(2) 迅速真菌検査法の開発

(a) マルチプレックス検出系

マルチプレックス PCR 用のプライマー・プローブとしては以下のものを使用した。

Primer F-ttggtggagtgtctgtctgt

Primer R-tctaagggcacacagacctg

Probe

Aspergillus-FAM-tcggcccttaaatagcccggctccgc-iowaBK

Candid1-FAM-ttaacctactaaatagtgStgctagc-iowaBK
Candid2-FAM-ttaacctgctaaataggctgcgagc-iowaBK
Carinii-FAM-taacctgctaaatagccagattagct-iowaBK

(b) 網羅的 PCR

結果の項を参照。

4. EBV ウイルス感染モデルマウスの T 細胞を用いた Transformation regression assay

EBV 未感染ヒト化 NOG マウスの脾臓より分離した B リンパ球に EBV を感染させ、マイクロプレートに分注した。これらの細胞を 2 群に分け、1 群には EBV 感染マウス脾臓より分離した CD8 陽性 T 細胞を、他群には未感染ヒト化マウスの脾臓から分離した CD8 陽性 T 細胞を混合した。8 週間培養したのち増殖を示した well の数を両群の間で比較した。すべての実験を同一の造血幹細胞サンプルによりヒト化したマウスを用いて行った。

5. 臍帯血造血幹細胞の分化・増殖メカニズムに関する研究

Notch リガンドである、hJagged-1 または hDII-1 を HESS-5 細胞に強制発現させ、ストローマ細胞上で CD133 陽性細胞と 7 日間共培養した。その後、細胞数測定、FACS 解析および RT-PCR を行い、CD133+細胞の未分化維持及び増殖分化能を検討した。またヌードマウス下肢虚血モデルに Jagged-1 刺激細胞または DII-1 刺激細胞を移植し、虚血改善効果や移植部位の血管密度を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、ヒト臍帯血細胞を利用するため、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量不足などの理由により移植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化を行い、個人情報保護を徹底した。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療センターおよび東京臍帯血バ

ンク倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 臍帯血 T 細胞活性化培養法の検討

(1) 基本培地の検討

臨床試験での使用を念頭に置き、クリニカルグレードでの培養が可能かどうかを検討するため、もっとも基本的な培地である +7 と ALyS の比較を行った。

(a) T 細胞増幅効率の検討

培養開始時の細胞生存率は、臍帯血サンプルによりばらつきが見られ、平均 $79.35 \pm 7.77\%$ (mean \pm SD : n = 6) であった。しかし、培養開始 4 日後では +7 で平均 $92.92 \pm 1.33\%$ 、ALyS で平均 $94.59 \pm 4.21\%$ といずれの培地においても高い生存率を示した。細胞増幅を比較すると、ALyS 培地の方が良好な増幅が得られた (+7 : 67.95 ± 22.46 倍、ALyS : 771.87 ± 279.99 倍、p 値 = 0.00011)。CD3 陽性細胞の比率は、培養開始時には臍帯血によりばらつきが見られた (平均 $59.17 \pm 27.14\%$) が、活性化培養開始の 14 日後には、+7 で平均 $91.98 \pm 5.81\%$ 、ALyS で平均 $98.67 \pm 0.33\%$ となり、いずれの培地でも CD3 陽性細胞を選択的に増幅することができた。CD3 陽性細胞の増幅率は、+7 で平均 114.38 ± 33.84 倍、ALyS で平均 $1,385.98 \pm 325.50$ 倍であった (p 値 = 2.49×10^{-6})。以上の結果より、CD3 陽性細胞増幅においても ALyS 培地の方が優れていた。

(b) 増幅された T 細胞のマーカー発現

培養細胞の活性化の指標として高親和性 IL-2 レセプターである CD25、HLA-DR、CD69 の発現について検討した (図 1)。また、通常 T 細胞に発現しているとされる低親和性 IL-2 レセプター (CD122) についても解析した。+7、ALyS の両者において、これら全ての表面抗原の陽性率が解凍時と比較して有意に上昇していたことから、いずれの培地を用いても臍帯血リンパ球は活性化されると考えられた。

(c) T 細胞メモリー分画の解析 (図 2)

培養開始時では Effector T 細胞が最も多く ($87.42 \pm 10.86\%$)、Naive T 細胞 (Naive) は $7.82 \pm 9.51\%$ 、記憶細胞である Effector Memory 細胞 (TEM) 及び Central Memory 細胞 (TCM) は 5.0% 以下であった (TEM : $4.37 \pm 2.08\%$ 、TCM :

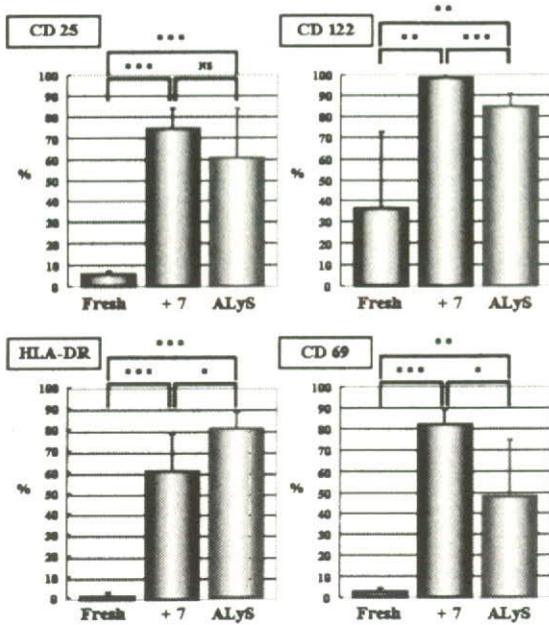


図 1. 活性化 T 細胞マーカー発現の解析. 培養前 (Fresh) および、+7 あるいは ALyS 培地による活性化培養後の結果を示す。

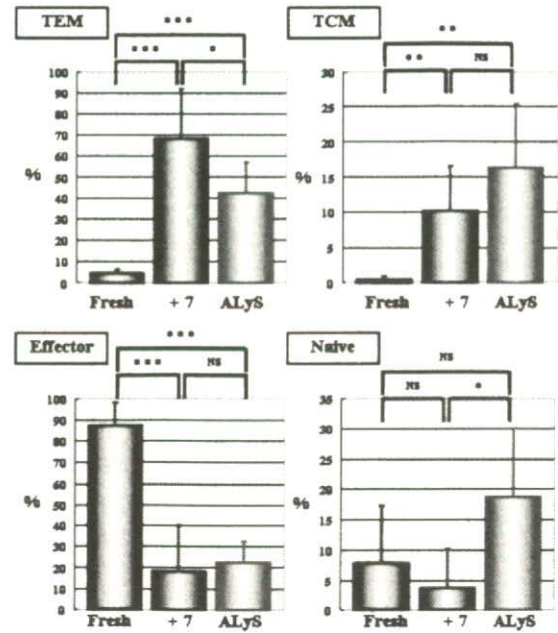


図 2. メモリー T 細胞分画の解析. 培養前 (Fresh) および、+7 あるいは ALyS 培地による活性化培養後の結果を示す。

0.39±0.44 %)。培養開始 14 日後では+7、ALyS 共に Effector が減少し、メモリー系の細胞の陽性率が上昇する傾向にあった。Effector は+7 で 18.20±21.93 %、ALyS で 22.63±9.90 % の陽性率であり、解凍時と比較して有意に減少した。TEM は両培地共に解凍時と比較して有意に陽性率が上昇し、+7 と ALyS を比較すると+7 が有意差をもって陽性率が高かった (+7: 67.90±23.98 %、ALyS: 42.25±14.45 %)。TCM では TEM と同様に、解凍時と比較すると有意に陽性率が上昇していたが、+7 と ALyS を比較すると有意差は得られなかったものの ALyS で陽性率が高い傾向が窺えた (+7: 10.20±6.29 %、ALyS: 16.33±9.05 %)。また、ALyS のみで活性化培養により Naive 陽性率の上昇が認められた(+7: 3.70±6.41 %、ALyS: 18.80±11.24 %)。

(2) T 細胞活性化法の検討

臍帯血 T 細胞はほとんどが Naive な細胞であり、このために、これまでの抗 CD3 抗体と IL-2 による活性化培養では、末梢血 T 細胞と比較し初期の増殖速度が遅くなると考えられた。本年度は、T 細胞増殖の副シグナルとして知られる CD28 への刺激を加えることにより、細胞増殖能の改善が認められるかを検討

した。

抗 CD3 抗体+IL-2 あるいは抗 CD3/CD28 抗体+IL-2 での細胞刺激を 7 日間行ったところ、5 日目で差が認められ、培養液の色、また顕微鏡観察による細胞の状態は抗 CD3/CD28 抗体で刺激した群の方が良好であった。また、抗 CD3 抗体単独刺激群では徐々に細胞増殖能が低下したが、抗 CD3/CD28 抗体刺激群では良好な増殖が継続した (図 3)。

2. 活性化臍帯血 T 細胞の遺伝子発現解析

マイクロアレイ解析により、臍帯血 CD4 (+) T 細胞で発現が高い傾向を認める遺伝子として、アポトーシス制御に関連する BCL2, MCL1, BCL6, BCLX 等や、T 細胞の機能制御に関わる CD11c, CD26, CD28, CD38, CD40L, CD44, CD66, CD73, CD82, CD96, CTLA4(CD152), CD200, ICOS 等が見いだされた。逆に、末梢血 CD4 (+) T 細胞に発現の高い遺伝子として、CD29, CD86 が見いだされた (図 4)。

定量 PCR 解析では、IL-17F, ROR- γ t の発現は末梢血 CD4 (+) T 細胞で高い傾向が認められたが、STAT3, IL-23, IL-23R については一定の傾向を認めなかった (図 2)。Foxp3 については、昨年のマイクロアレイの結果に一致し

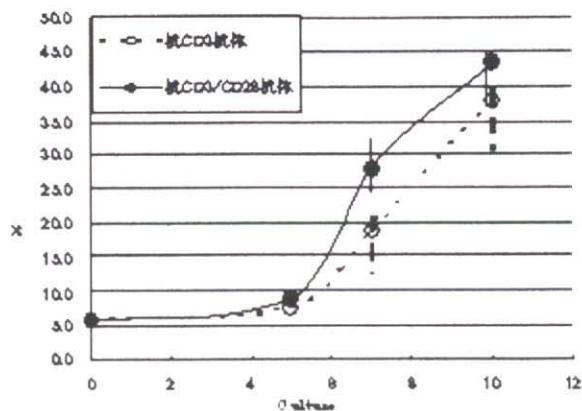


図3. CD3抗体単独およびCD3+CD28抗体による活性化培養における増殖曲線の比較。

て、定量PCRにおいても臍帯血CD4細胞で発現が高かった(図5)。

フローサイトメトリーでは、培養開始1~2週間経った状態で、Foxp3が活性化臍帯血CD4細胞の一部に発現していることが確認されたが、IL-17の発現は認めなかった。

3. 臍帯血DLIの安全管理法の確立

(1) マイコプラズマ検出試験

(a) PCR法

それぞれの量のマイコプラズマを3検体ずつ用意し測定したところ、*M. orale*は100CFUで、*M. hyorhinis*は50CFUで3検体が陽性であった。*M. pneumoniae*は1000CFUで3検体が陽性となった(表2)。これらの結果に対する作業員及び作業日による影響は認められなかった。また、試験液に*M. hyorhinis*を50CFU添加し、Nested PCRを20回実施し検出感度の再現性を確認したところ、全回で検出可能であった。

表2. PCR法によるマイコプラズマ検出

	CFU	1000CFU	100CFU	50CFU
<i>M. orale</i>		3/3	3/3	2/3
<i>M. hyorhinis</i>		3/3	3/3	3/3
<i>M. pneumoniae</i>		3/3	0/3	0/3

(b) 培養法

14日間培養を行った群では陽性コントロール全てでコロニーが確認され、また試験液のマイコプラズマ発育阻害は認められなかつ

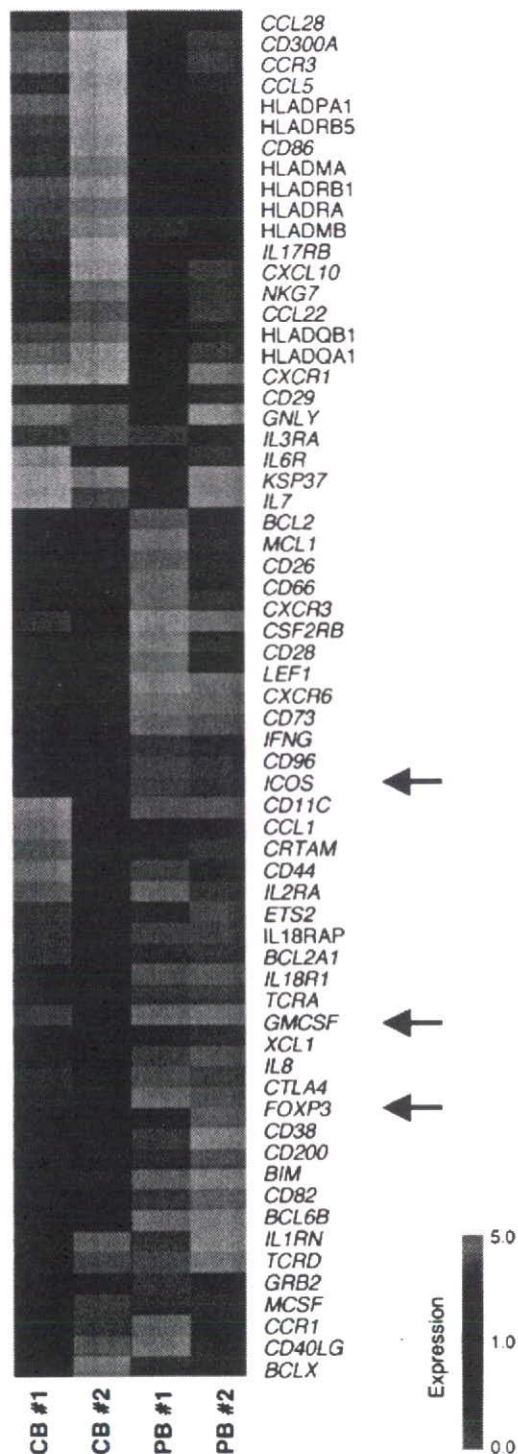


図4. 臍帯血(CB)および末梢血(PB)由来の活性化CD4陽性T細胞の網羅的遺伝子発現解析。

た。また、PCR法及び培養法により、臍帯血T細胞の培養開始14日後の培養液を試験したところ、マイコプラズマは検出されなかった。

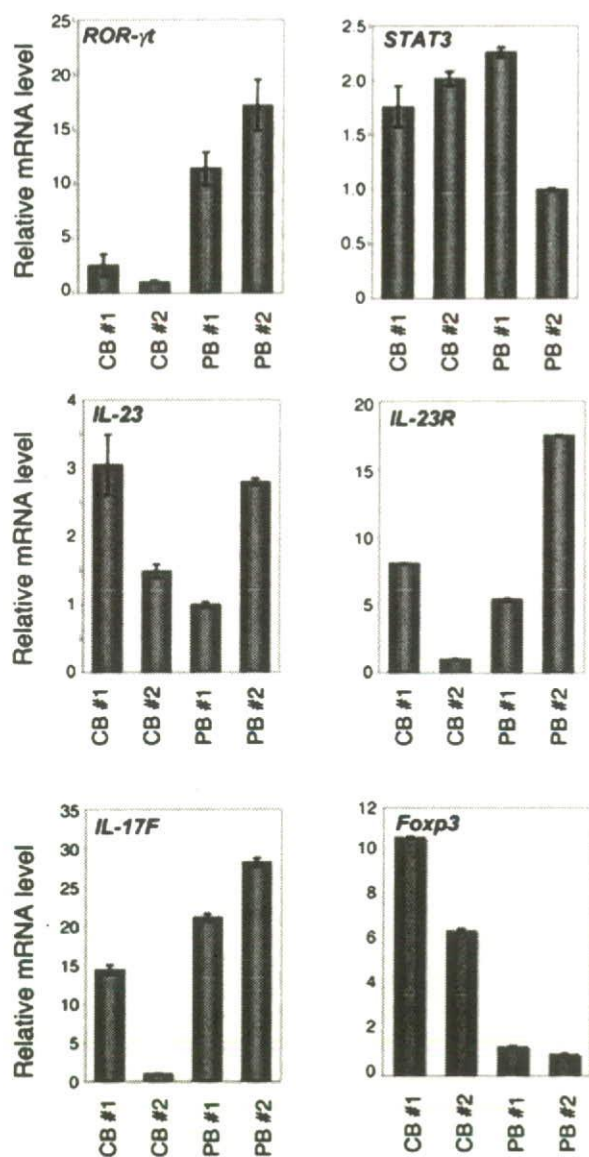


図 5. 臍帯血 (CB) と末梢血 (PB) 由来活性化 CD4 陽性 T 細胞の定量的 PCR による遺伝子発現解析。

(2) 真菌検査法

(a) マルチプレックス検査系

Aspergillus sp, *Candida* sp, *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon asahii*, *Acantamoeba* sp, *Propionibacterium acnes* を 10 コピー/Tube 以上の感度で検出可能だった。また、 $1 \times 10^9 \sim 10$ コピーの範囲で定量可能だった (図 6)。

また、各種真菌による感染症が疑われた症例から得た検体を検査したところ、*Aspergillus* sp による感染症が疑われた 47 検体中 5 検体 (11%: $1 \times 10^1 \sim 2 \times 10^3$ Copy/ml)、*Candida* sp による感染症が疑われた 46 検体中

3 検体 (7%: $1 \times 10^1 \sim 6 \times 10^4$ Copy/ml)、*Acantamoeba* sp による感染症が疑われた 2 検体中 1 検体 (50%) が陽性と判定され、培養検査の結果と一致していた。

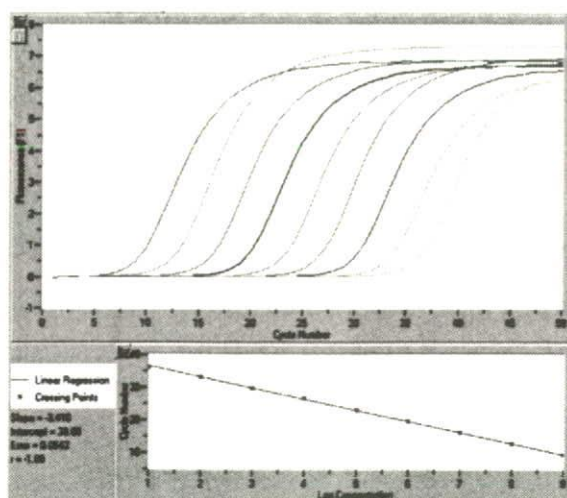


図 6. 真菌 18S rRNA 遺伝子定量 PCR の検量線。

(b) 真菌 DNA 共通配列を利用した網羅的検査法

真菌の 18S リボソーム RNA 遺伝子には多くの真菌種に共通な領域が存在する。この領域にプライマー・プローブを設定して真菌のブロードレンジ定量 PCR 系の構築を試みた。代表的な真菌の 18S rRNA 遺伝子領域をアライメントし、共通領域に下記に示すようなプライマー・プローブを設定した。

Primer F-gcaaggctgaaacttaagRaattg

Primer R-ccccgtgttgagtcaaattaagc

Probe FAM-cggAagGgcAcca-TAMRA

真菌 DNA 塩基配列のデータベースを検索したところ、90%の真菌種で上記配列と完全に一致していた。現在実際に PCR を行い、最適プライマー配列を決定している。

4. EBV 感染モデルマウスの作製と解析

昨年度までの研究により、EBV 感染マウスには、autologous な EBV 感染リンパ芽球様細胞株で刺激すると IFN- γ を産生するヒト MHC クラス I 拘束性の EBV 特異的 T 細胞が誘導されることが示された。臍帯血 DLI の作用メカニズムの一つとして、抗原特異的 T 細胞による細胞傷害性作用も重要な役割を担うことが強く示唆されているので、この EBV 感染モデルマウスにおいて EBV 感染細胞の増殖を阻