

method		NeuAc	NeuGc
DMB	*11	104 ± 4	109 ± 4
	*12	105 ± 9	106 ± 2
	*13	105 ± 3	94 ± 2
	*14	84 ± 0.3	88 ± 0.1
PAD	*15	108 ± 2	110 ± 2
	*16	100 ± 3	102 ± 1

Table 3. Removal of B19 in antithrombin preparation using 15nm virus removal filter by two types of NAT and infectivity assay.

	Q-PCR (IU/ml)	PCR ELISA (NDP)	Infectivity (NDP)
Before filtration	9.8/9.8	8.7/9.0	5.0/6.0
After filtration	5.0/5.3	1.7/1.7	<1.0/<1.0
LRF	4.8/4.5	7.0/7.3	≥4.0/≥5.0

Q-PCR: quantitative PCR, NDP: non-detectable end-point, LRF: Log reduction factor.
Planova-15N (15nm±2nm) were used

Table 4. The distribution of B19 DNA size in samples before and after 15nm filtration in antithrombin preparation.

B19 DNA size (Kb)		<0.5	0.5 ~ 1.0	1.0 ~ 2.0	2.0 ~4.0	≥4.0
Q-PCR (%)	Before filtration	0.3/0.2	0.5/0.3	0.5/0.4	5.7/5.9	93.0/93.2
	After filtration	84.8/93.3	8.3/3.1	3.2/2.0	1.7/1.1	2.0/0.5
PCR ELISA (NDP)	Before filtration	0/0	0/0	0/0	2/1	3/2
	After filtration	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0

Q-PCR: quantitative PCR, NDP: non-detectable end-point.

Table 5 各種 PEI 結合カラムのウイルス除去能

	X-MuLV Total copies	LRF
Sample	4509565.0	-
Column A (直鎖 PEI-Sepharose 6MB)	2070.0	3.34
Column B (分岐鎖 PEI-Sepharose 6MB)	138181.5	1.51
Column C (分岐鎖 PEI-Toyopearl AF-Carboxy- 650M)	n.d.	>6.65
Column D (分岐鎖 PEI-POROS AL)	n.d.	>6.65

n.d.: not detected

Table 6. UV 照射処理のウイルス不活化効果

	ウイルス濃度 TCID50	LRF
ウイルス液 (UV 照射処理前)	10.1	-
UV 照射処理 200J/m ²	5.9	4.2
UV 照射処理 500J/m ²	5.9	4.2

Table 7 NAT 試験用不活化 B19 での検出方法と検出数

試料中のウイルス濃度 (copy/mL)	検出方法	
	直接核酸抽出	遠心分離後核酸抽出
1000	6/6	6/6
300	3/6	6/6
100	0/6	6/6
30	0/6	4/6
0	0/6	0/6

表内は検出数/試験数で表した。また、ウイルス濃度は NAT 試験用不活化 B19 の表示値である。

抗フリーラジカル剤開発に向けた病態解析と科学的 評価法の確立

所属 国立成育医療センター 母児感染研究部
研究者 網脇 祥子
研究機関 平成19年4月～平成22年3月

研究要旨 TNF- α が血管内皮細胞の Nox4A を活性化して ICAM-1 を発現させる可能性がある。神経ペプチド(PACAP)が抗酸化物質を発現させ、脳虚血および加齢に伴う記憶障害を抑制した。核酸・核タンパク食が抗酸化作用を有し、リウマチ様関節炎および肝障害を抑制した。

分担研究者

- (1) 日生バイオ株式会社 松永政司
(2) 昭和大学医学部 塩田清二

A. 研究目的

好中球のO₂生成酵素(Nox2型NADPH oxidase)は、生体組織中最大の酸素ラジカル発生源であり、殺菌に用いられる。最近、プロトタイプであるNox2のホモログ遺伝子が様々な組織に発見され、Nox family NADPH oxidases(Nox1～Nox5)を形成し、多くの生理機能を担うことが報告されている。しかし、活性酸素は諸刃の剣であり、過剰あるいは不適切な生成は組織傷害を引き起こし、多くの疾患の病態形成に関与する可能性がある。本研究では、川崎病、神経疾患、リウマチ、肝傷害の各病態形成に於けるフリーラジカルの関与を明らかにするとともに、組織傷害をモニターできる科学的方法論を構築して抗フリーラジカル療法を目指す。

B. 研究方法

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

ヒト冠動脈血管内皮細胞(HCAEC)のH₂O₂生成はスコポレチン法で定量した。HCAECの核および膜画分はKurodaらの方法(Genes to Cells 2005)に従って調整した。LCWE(*L. casei* cell wall extract)は、Lehmanらの方法(Arthritis Rheum 1983)に準じて、*L. casei*の細胞膜をSDSで破壊した後、DNaseおよびRNaseによる核酸分解、トリプシンによる蛋白質分解を行い、超音波破碎により細胞壁を破碎し、遠心分離法により調整した。川崎病モデルマウスは、LCWEを野生型マウス腹腔に投与して作成し、Nox2-KOマウスに適用した。LCWE投与後、心臓および脾臓を

摘出した。一部の実験ではTNF- α を直接腹腔投与した。マウス好中球は、両マウスにカゼインを腹腔投与し、浸潤した細胞を分離後、マウス血管内皮腫様細胞株(UV Ω 2)に添加した。マウス脾臓でのTNF- α mRNA および心臓とUV Ω 2細胞でのICAM-1 mRNA 発現はreal-time RT-PCRで解析した。

GFP-Nox4Aの発現プラスミドは、HCAEC Nox4A cDNA領域を、XhoIとKpnI部位を認識する制限酵素を用いて、N末端側にGFPを融合させたpAcGFP1-C1ベクターに組み込んで構築した。GFP-Nox4Bは、GFP-Nox4Aをテンプレートとして構築した。Nox4AおよびNox4BのmRNA発現は、構築した各種プラスミド(pAcGFP1-C1、GFP-Nox4A、GFP-Nox4B)をHEK293T細胞に添加し、total RNA抽出後RT-PCR法で解析した。GFP融合型Nox4AとNox4B蛋白質の発現および細胞内局在性は、蛍光顕微鏡およびイムノブロット法で解析した。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

頭部外傷モデルは、野生型およびNox2-KOマウスの大脳皮質表面に、プローブによる衝撃を瞬間的に加えて作成した。加齢性神経傷害では、野生型およびPACAP-KOマウスの老齢個体(180日齢以上)と若年齢個体(10週齢)を比較した。脳虚血モデルは中大脳動脈を閉塞して作成した。血中酸化ストレス度はFREE法を用い、活性酸素代謝物(ROM: reactive oxygen metabolite)および生物学的抗酸化ポテンシャル(BAP: biological antioxidant potential)として測定した。

脳内のO₂検出はヒドロキシエチジウム(HEt)投与、神経細胞死の評価はTUNEL染色で行なった。脳組織傷害は、酸化タンパク質を認識する抗

3-nitrotyrosine (NT) 抗体、細胞同定および細胞内局在性は各種標識マーカーを用いた多重染色、微細構造変化は電子顕微鏡で解析した。PTS-6 アンチセンスは脳虚血作成の24時間前に静脈投与した。イムノブロットは、ホモジェナイズした大脳をSDS-PAGE 後 PDVF 膜に転写し、Nox2 および抗酸化物質である Mn superoxide dismutase (SOD)、Heme oxygenase (HO)-1、-2 に対する一次抗体、続いて HRP 標識二次抗体を反応させ、化学発光法で検出した。

PCR アレイ解析は、360日齢マウス大脳半球での抗酸化に関与する84因子の mRNA 発現量を、RT2 profiler PCR array PAMM-065 を用いてリアルタイム PCR システムで行った。

マウスの学習・記憶障害は、受動的回避反応試験、Y字迷路試験、オープンフィールド試験、新規物認知試験、能動回避試験で判定した。

3. 核酸・核タンパク食の抗フリーラジカル効果

リウマチ様関節炎を自然発症する HTLV-I Tg マウスに、サケ白子由来の核酸・核タンパク含有餌 (NP) および無含有餌 (NF) を6週齢から18週齢まで自由摂取させ、1週間おきに体重、関節厚を計測した。餌負荷終了時に関節を摘出すると共に血清を分離した。関節厚は4段階に、関節の組織学的変化は5段階にスコア化すると共に関節の IgG 沈着を調べた。関節に於ける酸化ストレスは3-NT、血中酸化ストレスは ROM として求めた。NP 原抹および主成分である DNA-Na とプロタミンの抗酸化能は BAP を測定し、消去するラジカル種は電子スピン共鳴 (ESR) 法で特定した。

肝傷害モデルマウスは、NF 餌および NP 餌を14日間自由摂取させたマウスに LPS (30 mg/kg) を腹腔内投与して作成した。LPS 投与6時間後、肝臓を摘出して直ちに ESR 法で NO ラジカルを測定した。更に、LPS 投与24時間後に血清を分離し、肝傷害マーカーである ALT を測定した。肝組織中の3-NT とクッパー細胞 (iba-1 抗体) の同定は、パラフィン切片を一次抗体およびビオチン標識二次抗体と反応させた後、ABC、DAB 法で検出した。NO 合成酵素である iNOS とクッパー細胞 (抗 F4/80 抗体) の同定は、凍結切片を一次抗体と反応させた後、それぞれ Alexa546 標識および Alexa488 標識二次抗体を用いた蛍光二重免疫染色法で行った。iNOS の発現はイムノブロット法でも解析した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、当該研究機関の遺伝子組み

換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認の下に行った。

C. 研究結果

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

瘤の発生頻度が最も高い HCAEC は自発的に H₂O₂ を生成し、TNF- α がその生成活性を亢進した。HCAEC の H₂O₂ 生成を担う責任酵素として Nox4 が最も多く発現し、5種類の splicing variants (A~E) 中 Nox4A と Nox4B のみが発現していた。興味深いことに、Nox4A は p22 サブユニットと共に膜画分に、Nox4B は単独で核画分に局在していた。

TNF- α が川崎病発症の鍵を握ることが報告されている。そこで、LCWE 投与後マウスから脾臓を摘出して real-time PCR で解析した。野生型マウスでは4時間後に一過性の TNF- α mRNA の発現上昇が確認されたが、Nox2-KO マウスでは認められなかった。

次に、血管内皮細胞での ICAM-1 発現に好中球由来の活性酸素が関与するか検討した。LCWE 投与4時間および24時間後、心臓を摘出して ICAM-1 mRNA の発現量を解析した。野生型マウス心臓での ICAM-1 発現は、LCWE 投与4時間後より増加し、24時間後まで上昇したが、Nox2-KO マウスでは僅かであった。しかし、TNF- α を直接投与した場合、両マウス間に違いはなかった。次に、UV γ 2 細胞を用いて in vitro 解析を行った。ICAM-1 mRNA の発現は、TNF- α 添加2~3時間後に最大値を示した。野生型マウス好中球は、単独でも25 ng/ml の TNF- α に匹敵する ICAM-1 mRNA の発現を促し、Nox2-KO マウス好中球も同様の活性を示した。これらの好中球と一緒に TNF- α を添加すると、TNF- α の用量に依存した更なる ICAM-1 mRNA の発現上昇が認められた。

以上、血管内皮細胞の ICAM-1 産生には好中球由来の活性酸素は関与せず、TNF- α が直接作用することが示された。HCAEC には Nox4A と Nox4B が優位に発現し、Nox4A が膜画分に Nox4B が核画分に局在することを細胞分画後イムノブロット法で明らかにした。しかし、この実験に用いた抗 Nox4 抗体は Nox4C を除く全ての variant form を認識するため、細胞内での発現を区別することができない。そこで、細胞レベルの解析を試みるため、GFP を融合させた発現プラスミド (GFP-Nox4A および GFP-Nox4B) を構築した。HEK293T 細胞に添加36時間後、GFP 融合蛋白質としての Nox4A と Nox4B の発現を蛍光顕微鏡下で確認できた。更に、イムノブロットによる解析では、膜画分に抗 GFP 抗体と反応する Nox4A および Nox4B のバンド (~80 kDa) が検出され、アミノ酸配列から推定される分子量の違いも識別できた。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

頭部外傷 2 日後の損傷領域は、野生型マウスに比べ Nox2-KO マウスでは有意に減少していた。頭部外傷後に生じる二次的な細胞死は、野生型マウスでは深部の大脳皮質層にまで TUNEL 陽性細胞が観察されたが、Nox2-KO マウスでは外傷周囲部にのみ限定され、その数も有意に減少していた。HEt 投与実験より、Nox2-KO マウスと異なり、野生型マウスでは Nox2 がマクロファージ様細胞であるマイクログリアを中心に誘導されて O₂ 生成が亢進、マイクログリア、神経細胞、アストロサイトに 3-NT 陽性反応が認められた。

次に、神経ペプチド PACAP の加齢性記憶障害に対する効果を PACAP-KO マウスを用いて解析した。野生型マウスの静脈内に PACAP を単回投与すると、血中 ROM は有意に低下した。そこで、PACAP-KO マウスの血中 ROM を調べたところ、若年齢マウスでは差がなかったが、老齢マウスでは野生型にくらべ有意に高かった。また、老齢 PACAP-KO マウスでは海馬 CA1 領域の O₂ 生成が顕著に増加していた。更に、ミトコンドリアに局在する Mn SOD と HO-1 の発現量が低下し、凝集・変形したミトコンドリアがライソソームと融合した自己食食像が観察された。

酸化傷害が認められた海馬 CA1 領域は記憶や学習に関与する領域である。そこで PACAP-KO マウスの記憶・学習行動に異常がみられるか、受動的回避反応試験を行なった。180 日齢までは、野生型および PACAP-KO マウスに有意差は認められなかった。しかし、180 日齢以上の老齢個体では PACAP-KO マウスの学習能力に有意な低下が認められ、360 日齢以上では、刺激 24 時間後の記憶力も低下していた。次に、学習・記憶障害の認められた 360 日齢の PACAP-KO マウスを用いて、Y 字迷路試験、オープンフィールド試験、新規物認知試験、および能動回避試験を行なった。PACAP-KO マウスでは、短期記憶の指標である Y 字迷路に於ける自発的交替行動および視覚認知能の指標である新規物認知試験の成績は野生型と同程度であった。しかし、能動的回避試験では、3 日目でも成功率が上がらず、野生型に比べ記憶能の低下が認められた。PCR アレイ法を用いて、360 日齢の PACAP-KO マウス大脳半球に於ける抗酸化関連遺伝子の発現を解析したところ、5 遺伝子の発現低下が認められた。

最後に、脳虚血に対する PACAP の効果を検討した。脳内で産生される PACAP は、特異輸送体 (PTS-6) により血中へ排出後、分解される。そこで、PTS-6 アンチセンス投与により PTS-6 を阻害し、脳虚

血に対する保護効果を検討したところ、神経症状が改善し、脳梗塞体積が減少した。

3. 核酸・核タンパク食の抗フリーラジカル効果

HTLV-1 Tg マウスを用い、核酸・核タンパク含有餌 (NP) および無含有餌 (NF) による関節炎の改善効果を検討した。NF 群の体重は 12 週齢以降減少したが、NP 群は加齢に伴い増加した。前後肢関節厚を計測したところ、NF 群は 8 週齢よりスコアが増加したが、NP 群では抑制された。次に、餌負荷終了時の関節を組織学的に検討した。NF 群は前肢、後肢ともに重篤な炎症所見であるリンパ小節の出現や骨・軟骨の破壊が明瞭に認められたが、NP 群ではこれらの所見が減少し、前・後肢ともに約 3 割のマウスに病理所見を認めなかった。更に、NF 群の関節は滑膜細胞を中心に強い IgG 陽性反応を示したが、NP 群では改善された。関節組織の 3-NT 陽性反応は、野生型マウスでは殆ど認められないが、NF 群では軟骨細胞に強い陽性反応が認められ、NP 群では改善された。餌摂取終了後、NF 群の血中 ROM 値は高値を示したが、NP 群では低下した。

NP 原抹と、その主成分である DNA-Na およびプロタミンの BAP を測定した。コントロールである超純水の BAP 値は 988 μM であった。NP 原抹の BAP 値は 50 μg/ml で超純水に対して有意差が認められた。プロタミンの BAP 値は、750 μg/ml の高濃度で 1,401 μM と有意差が認められた。DNA-Na は NP 原抹よりも低濃度で有意差が認められ、750 μg/ml で 8,841 μM と高い抗酸化能が認められた。NP 原抹の O₂ ラジカル消去率は 2 mg/ml で 5.4% と低かったが、NO ラジカルの消去率は 1.5 mg/ml で 23.5% と増加した。更に、一重項酸素 (¹O₂) の消去率は 0.05 mg/ml で 96.7% と極めて高かった。

次に、LPS 誘導性肝傷害に対する NP 餌の効果を検討した。NF 群マウスの生存率は、LPS 投与 24 時間後 45.5%、28 時間後 0% まで減少した。一方、NP 群の生存率は、24 時間後 90%、28 時間後 45.5% で延命効果が認められた。LPS 投与 24 時間後、血中 ALT 値は NF 群の 121.6 IU/L に対し NP 群は 92.5 IU/L と低下し、改善された。

LPS 投与 24 時間後、肝臓の 3-NT 陽性反応は、NF 群では中心静脈周囲に認められたが、NP 群では殆ど認められなかった。肝臓組織中の NO ラジカル強度は、NF 群では 1.1、NP 群では 0.9 と低下した。NF 群では iba-1 陽性細胞 (クッパー細胞) が肥大化した。NP 群では殆ど認められなかった。更に、iNOS 陽性反応は、F4/80 陽性反応 (クッパー細胞) と重なった。LPS 投与 24 時間後の iNOS 発現量は、NP 群

では NF 群に対し有意に低下していた。

D. 考察

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

LCWE を投与した川崎病モデルマウスを用いて、TNF- α が冠動脈瘤の形成に決定的な役割を果たすことが証明され、実際、TNF- α の中和抗体 (infliximab) が川崎病患者児に投与されている。TNF- α は好中球や血管内皮細胞の活性酸素生成を亢進させる。更に、冠動脈瘤の破裂は、好中球によるエラスチン切断が決定的である。従って、血管内皮細胞の活性酸素生成系および好中球の血管外遊出に対する活性酸素の影響を解析することは、川崎病の発症機序を理解する上で重要である。

まず、瘤の発生頻度が最も高い HCAEC の Nox 系を解析した。そして、HCAEC が自発的に H₂O₂ を生成し、TNF- α がその生成活性を亢進することを報告した。H₂O₂ 生成の責任酵素として、酸化還元中心である Nox4A と Nox4B が最大発現していた。更に、Nox4A は p22 と共に膜画分に、Nox4B は単独で核画分に存在していた。この知見は、同一細胞内の Nox4 isoform が異なる特性を持つことを示した初めての報告であり、p22 と複合体を形成している Nox4A が H₂O₂ 生成活性を担っているかも知れない。

好中球の血管外遊出には、CD11b/CD18 (好中球) と ICAM-1 (血管内皮細胞) の接着が必須である。最近、TNF- α による ICAM-1 発現に好中球 (Nox2) 由来の活性酸素が重要であると報告されている。しかし、Nox に対する阻害剤や還元剤を用いた間接実験で決定的な証拠はなかった。そこで、LCWE を投与した川崎病モデルマウスを作成し、Nox2-KO マウスに適用して解析した。LCWE 投与後、野生型マウスでは脾臓での TNF- α 発現が上昇したが、Nox2-KO マウスでは僅かであった。心臓での ICAM-1 発現も野生型では上昇したが、Nox2-KO では抑制されていた。しかし、TNF- α を直接投与した場合、両マウスに違いはなかった。同様の結果が *in vitro* 実験でも得られた。つまり、TNF- α は単独で UV γ 2 細胞の ICAM-1 発現を促進し、Nox2-KO と野生型マウスの好中球は同程度に ICAM-1 発現を亢進させた。従って、好中球由来の活性酸素は血管内皮細胞の ICAM-1 産生には無関係であり、マクロファージからの TNF- α 産生に Nox2 由来の活性酸素が関与する可能性が示された。

以上の結果より、血管内皮細胞の Nox4A あるいは Nox4B 由来の活性酸素が ICAM-1 発現に寄与すると考えられた。そこで、細胞レベルで解析するために、GFP-Nox4A および GFP-Nox4B プラスミドを構築

し、HEK293T 細胞にトランスフェクトして発現を確認した。今後、p22 を共発現させた後、GFP が発する蛍光を指標にして Nox4A および Nox4B の細胞内局在性を解析する。更に、Nox4A と Nox4B のどちらが活性酸素生成を担っているか、細胞レベルで可視的に解析する。また、TNF- α がどちらの Nox4 を活性化して血管内皮細胞での ICAM-1 発現に関与しているか解析する。Nox4A および Nox4B の特性および ICAM-1 発現に繋がるシグナル経路との関連が明らかになれば、川崎病の冠動脈瘤形成に於ける Nox4 の作用機序が明らかになるであろう。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

頭部外傷モデルを用い、外傷により誘導されるフリーラジカルと細胞死に対する Nox2 の関与を検討した。頭部外傷後、野生型マウスの脳内 O₂ シグナルおよび Nox2 陽性反応は、外傷側の主にマイクログリアに認められた。Nox2-KO マウスの Nox2 陽性反応は認められず、頭部外傷後の O₂ シグナルも上昇しなかった。更に、Nox2-KO マウスの頭部外傷後の欠損面積は野生型に比べて有意に少なく、3-NT 陽性反応も微弱であった。二次的な細胞死も、野生型では深部の大脳皮質層にまで観察されたが、Nox2-KO マウスでは外傷周囲部のみに限定された。これらの結果は、頭部外傷後に発現誘導されるマイクログリアの Nox2 由来 O₂ が頭部外傷後の二次損傷に大きく関与することを示している。救急医療では、重症頭部外傷患者における二次的脳損傷を抑えることが重要であり、脳低温療法が頻用されている。脳低温療法は、脳を冷やすことで代謝を一時的に低下させて活性酸素の生成を抑制することが近年報告された。従って、脳低温療法はマイクログリアに於ける Nox2 の活性を抑制していると考えられる。

次に、神経ペプチド PACAP の加齢性記憶障害に対する効果を PACAP-KO マウスを用いて解析した。PACAP は生体内の抗酸化能を上昇させ、酸化ストレス度を減少させたが、PACAP 自身に抗酸化作用はなかった。そこで、抗酸化物質の発現を野生型および PACAP-KO マウスの若齢・老齢個体で比較した。その結果、老齢 PACAP-KO マウスの海馬 CA1 領域で O₂ シグナルが顕著に増加し、ミトコンドリアに局在する Mn SOD と HO-1 の発現が顕著に減少した。更に、一部ミトコンドリアが凝集・変形し、ライソソームが融合した自己食像が観察された。これらの結果から、PACAP が欠如するとミトコンドリアでの抗酸化物質の発現が低下し、ATP 産生に伴って生成されるフリーラジカルを処理できず、ミトコンドリアの障害、変形、自己食像が起きると考えられる。海馬 CA1 領域

は記憶や学習に関与する領域である。そこで、PACAP-KO マウスの記憶・学習行動を解析したところ、老齢個体では有意に学習能力および記憶力が低下していた。

脳内で産生される PACAP は、特異輸送体 (PTS-6) により血中へ排出・分解されることが近年明らかにされた。そこで、脳虚血前に PTS-6 アンチセンスを投与すると、神経症状が改善し、脳梗塞体積が減少した。この結果から、PACAP 投与は生体内で抗酸化因子を発現させて神経保護的に作用すると考えられる。

以上、PACAP は抗酸化物質の発現を促し、脳虚血および加齢に伴う大脳辺縁系の記憶障害を抑制することが示された。フリーラジカルは中枢・末梢組織の損傷、炎症反応に伴って増加するが、生活習慣病や老化とも深く関わることが知られている。PACAP のような内因性抗酸化物質を誘導する生理活性ペプチドの機能解析は、幅広い酸化ストレスに起因する疾患の画期的な治療薬の開発に繋がる。

3. 核酸・核タンパク食の抗フリーラジカル効果

リウマチ様関節炎を自然発症する HTLV-1 Tg マウスを用い、NP 餌による関節炎の改善効果を検討した。NP 群はこれを含まない NF 群と比較して、関節肥大の抑制と関節炎の組織学的な改善が認められ、関節組織 (3-NT) や血中 (ROM) の酸化ストレス度が軽減した。これらの結果は、NP 餌摂取が血中および関節組織に於けるフリーラジカルを減少させ、リウマチ様関節炎の発症を抑制する可能性を示している。フリーラジカルの消去が NP の直接的な作用であるか、NP 原抹の BAP を測定した。その結果、NP 原抹、特に DNA-Na 成分が強い抗酸化能を示した。NP 原抹が消去するフリーラジカル種を特定した結果、一重項酸素と NO ラジカルであった。

次に、NO ラジカルが関与すると考えられる LPS 投与肝傷害モデルマウスを作成し、NP 餌摂取の効果を検討した。その結果、NP 群の生存率は NF 群に比べて有意に改善され、血中の肝障害マーカーで

ある ATL も NF 群に対して NP 群では有意に低下した。NO 由来の酸化傷害マーカーである 3-NT 陽性反応は、LPS 投与 24 時間後、NF 群の中心静脈周囲に認められたが、NP 群では殆ど認められなかった。更に、LPS 投与後、NF 群では NO 合成酵素である iNOS の発現がクッパー細胞で亢進したが、NP 群では有意に抑制されていた。

以上の結果は、強い抗酸化能を持つ NP の摂取がヒトの関節リウマチに対しても有効である可能性を示している。関節リウマチに対する治療薬は多数開発されているが、薬剤の長期使用による副作用が QOL を低下させることが問題になっている。NP による代替医療が可能になれば、関節リウマチの進行を軽減できるのみならず、本研究で示した肝傷害以外にもフリーラジカルに起因する多くの疾患の改善に貢献すると考えられる。

E. 結論

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

TNF- α が血管内皮細胞の Nox4A を活性化して ICAM-1 の発現を促す可能性が得られた。LCWE 投与によるマクロファージからの TNF- α 産生に Nox2 由来の活性酸素が関与し、川崎病の発症に関与すると考えられる。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

頭部外傷後、主にマイクログリアでの Nox2 発現が上昇し、生成された O₂ が二次的脳損傷を誘導することが示された。PACAP は抗酸化物質の発現を上昇させることにより、脳虚血および加齢に伴う大脳辺縁系の記憶障害を抑制することが示された。

3. 核酸・核タンパク食の抗フリーラジカル効果

サケ白子由来 NP の抗酸化作用は主成分である DNA-Na に存在した。更に、NP は、NO ラジカルと一重項酸素を消去することにより、リウマチ様関節炎および肝傷害を抑制することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H, Ohara K, Miyamoto K, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Matsunaga M, Shioda S. Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. *J Mol Neurosci* (in press).
- 2) Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A,

Endo K, Iso Y, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S. Cardioprotective Effect of Endogenous Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide on Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Mice. *Circ J* (in press).

- 3) Ohtaki H, Yofu S, Nakamachi T, Satoh A, Shimizu A, Mori H, Sato A, Iwakura Y, Matsunaga M, Shioda S. Nucleoprotein diet ameliorates Arthritis symptoms in mice Transgenic for Human T-Cell Leukemia

- Virus Type I (HTLV-1) *J Clin Biochem Nutr*, 46: 1-12 (2010).
- 4) Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Nakamura S, Shioda S, Aruga T. Novel free radical monitoring in patients with neurological emergency diseases. *Acta Neurochir Suppl*, 106:315-319 (2010).
 - 5) Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Mori H, Sato A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Shioda S. Endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is involved in suppression of edema in the ischemic brain. *Acta Neurochir Suppl*, 106: 43-46 (2009).
 - 6) Dogrukol-Ak D, Kumar VB, Ryerse JS, Farr SA, Verma S, Nonaka N, Nakamachi T, Ohtaki H, Niehoff ML, Edwards JC, Shioda S, Morley JE, Banks WA. Isolation of peptide transport system-6 from brain endothelial cells: therapeutic effects with antisense inhibition in Alzheimer and stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29: 411-422 (2009).
 - 7) Yoshida LS, Tsunawaki S. Expression of NADPH oxidases and enhanced H₂O₂-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor- α . *Int. Immunopharmacol*, 8: 1377-1385 (2008).
 - 8) Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Shioda S. Suppression of Ganglion Cell Death by PACAP Following Optic Nerve Transection in the Rat. *J Mol Neurosci*, 36: 57-60 (2008).
 - 9) Senga F, Yin L, Karasuno H, Ohtaki H, Nakamachi T, Satoh K, Shioda S. Minus charge stimulation prevents LPS-induced liver injury by reduction of nitric oxide. *J Clin Biochem Nutr*, 42: 222-227 (2008).
 - 10) Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S. Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci*, 36: 16-25 (2008).
 - 11) Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Hayashi D, Matsuno R, Nonaka N, Itabashi K, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) co-localizes with activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) in the mouse brains. *Regul Pept*, 145: 88-95 (2008).
 - 12) Matsuno R, Ohtaki H, Nakamachi T, Watanabe J, Yofu S, Hayashi D, Takeda T, Nonaka N, Seki M, Nakamura M, Itabashi K, Shioda S. Distribution and localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-specific receptor (PAC1R) in the rostral migratory stream of the infant mouse brain. *Regul Pept*, 145: 80-87 (2008).
 - 13) Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Hayashi D, Matsuno R, Nonaka N, Itabashi K, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) colocalize with activity - dependent neuroprotective protein (ADNP) in the mouse brain. *Regul Pept*, 145: 88-95 (2008).
 - 14) Watanabe J, Nakamachi T, Matsuno R, Hayashi D, Nakamura M, Kikuyama S, Nakajo S, Shioda S. Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. *Peptides*, 28:1713-1719 (2007).
 - 15) Ohtaki H, Takeda T, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Matsuno R, Hodoyama M, Shioda S. 2007 Oxidative damage of DNA increases in mitochondria prior to nucleus after cerebral ischemia and trigger apoptotic neuronal cell death. *Neurosci Res*, 58: 349-355 (2007).
2. 学会発表
- 1) Shioda S, Nakamachi T, Ohtaki H, Dohi K, Nonaka N, Banks WA. Neuroprotection and molecular mechanism of PACAP in brain ischemia. Neuropeptide Festival 2009, Joint Meeting of the European Neuropeptide Culb and Summer Neuropeptide Conference, Salzburg, Austria, July (2009).
 - 2) 養父佐知子、中町智哉、大滝博和、小川哲朗、松永政司、首藤典正、岩倉洋一郎、塩田清二. 核タンパクの抗酸化作用とフリーラジカル消去能の評価. 第114回日本解剖学会総会、岡山、3月28-30日、2009.
 - 3) Tsunawaki S and Yoshida LS. Expression of Nox family NADPH oxidases and enhanced ROS-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor- α . Gordon Research Conference (meeting for Nox family NADPH oxidases) New London, New Hampshire, USA, June 1-6, 2008.
- 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

抗フリーラジカル剤開発に向けた病態解析と科学的 評価法の確立

所属 国立成育医療センター 母児感染研究部
研究者 網脇 祥子

研究要旨 川崎病急性期に血中濃度が上昇する TNF- α が好中球由来活性酸素と関係なく血管内皮細胞の ICAM-1 産生を促した。神経ペプチド(PACAP)が海馬の酸化を防ぎ、老化に伴う記憶障害を抑制した。核酸・核タンパク食の主成分 DNA-Na が抗酸化作用を有し、肝傷害を抑制した。

分担研究者

- (1) 日生バイオ株式会社 松永政司
- (2) 昭和大学医学部 塩田清二

A. 研究目的

好中球の O₂ 生成酵素(Nox2型 NADPH oxidase)は、生体組織中最大の酸素ラジカル発生源であり、殺菌に用いられる。最近、プロトタイプである Nox2 のホモログ遺伝子が様々な組織に発見され Nox family NADPH oxidases(Nox1~Nox5)を形成することが明らかになった。Nox(NADPH oxidase)は、免疫系、循環器系、神経系、消化器系、呼吸器系などの組織にも発現しており、細胞増殖、血圧調整、殺菌など多くの生理機能を担っている。しかし、活性酸素は諸刃の剣であり、過剰あるいは不適切な生成は組織傷害を引き起こし、多くの疾患の病態形成および老化との関連が指摘されている。本研究では、川崎病、神経疾患、リウマチ、肝傷害の各病態形成に於ける活性酸素の関与を明らかにすると共に、組織傷害をモニターできる科学的方法論を構築して抗フリーラジカル療法を目指す。

昨年度は、1)川崎病急性期に血中濃度が上昇する TNF- α が、好中球由来の活性酸素と関係なく、直接血管内皮細胞の ICAM-1 発現を促して好中球の血管外遊出を担うこと、2)神経ペプチド(PACAP)が脳虚血に対する神経保護因子として機能すること、3)核酸・核タンパク食が抗酸化作用を有し、リウマチ様関節炎を改善することを報告した。本年度は、1)血管内皮細胞に高発現している Nox4A と Nox4B の細胞内特性を明らかにするため、GFP-Nox4A および GFP-Nox4B プラスミドを構築して HEK293T 細胞にトランスフェクトし、発現実験を行った。次に、2)老化に伴う記憶障害と脳内の酸化傷害について

PACAP-KO マウスを用いて解析した。最後に、3)リウマチ様関節炎に対して改善効果を示した核酸・核タンパク食の有効成分および消去するフリーラジカル種の同定、更に、LPS 投与肝傷害に対する効果を検討した。

B. 研究方法

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

1) ヒト冠動脈血管内皮細胞

正常ヒト冠動脈血管内皮細胞(HCAEC:3 継代目)は Cambrex 社より購入し、添加因子を含む増殖培地中で継代培養した。実験には 5 継代目の細胞を使用した。

2) GFP-Nox4A および GFP-Nox4B 発現プラスミドの構築

HCAEC から TRIzol (Invitrogen)を用いて total RNA を抽出し、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)により RT-PCR で cDNA を合成した。次に、Nox4A cDNA を含む領域を、primer set (F: 5'-GGGGCCTCGAGCATGGCTGTGT-3'; R: 5'-CGGCGGTACCTTTCAGCTGAAA-3')を用いて Expand High Fidelity PCR System (Roche)により PCR で増幅させた。XhoI (下線部)と KpnI (斜字部)を認識する制限酵素で処理した 1.8 Kb の Nox4A cDNA 断片を pAcGFP1-C1 ベクター(Clontech)に組み込み、N 末端側に GFP を融合させた発現プラスミド(GFP-Nox4A)を構築した。クローニング後、Nox4A cDNA インサート領域の塩基配列は、ダイターミネータ法による direct sequencing で確認した。Nox4B はプロトタイプである Nox4A の 407~446 アミノ酸領域を欠失した splicing variant である。そこで、GFP-Nox4A をテンプレートとして、欠失したアミノ酸領域の両端

に設計したプライマーセットを用いて PCR で増幅を行い、Ligation high (TOYOBO)によるライゲーション反応を介して GFP-Nox4B を構築した。

3) トランスフェクション

COS7 細胞および HEK293T 細胞を以下のコンテナを用い、5% FCS を含む DMEM 培地中で一晩前培養した(トランスフェクション効率の検討: 24 穴プレート; 細胞内局在性の検討: Lab-Tek chamber slide; 細胞内での蛋白質発現の解析: 10 cm ディッシュ)。トランスフェクション 2 時間前に FCS を含まない DMEM 培地に置き換え、各種プラスミド (pAcGFP1-C1、GFP-Nox4A、GFP-Nox4B) と FuGENE 6 transfection reagent (Roche) をそれぞれ混和して細胞に添加した。

4) トランスフェクション効率の検討

構築したプラスミドを COS7 細胞および HEK293T 細胞にトランスフェクトし、24 時間後 RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。逆転写により cDNA を合成し、Nox4A および Nox4B を認識する共通の primer set (F: 5'-CTTAACCGAACCAGCTCTCG-3'; R: 5'-GTGAATTGGGTCCACAAC-3') を用いて、Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa) により PCR を行った。得られたアンプリコンを 0.8% アガロースの電気泳動で分離して Nox4A (966 bp) および Nox4B (846 bp) を同定した。

5) GFP-Nox4A、GFP-Nox4B 蛋白質の発現解析

GFP 融合型 Nox4A と Nox4B の発現量および細胞内局在性は、トランスフェクション 24~48 時間後、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS) およびイムノブロット法で解析した。イムノブロット法では、トランスフェクション 24 時間後、Kuroda J らの方法 (Genes to Cells, 2005) に従って膜 (M) および核 (N) 画分を調整した。膜画分 (100 µg/ lane) および核画分 (25 µg/ lane) を SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜へ転写した。GFP-Nox4A および GFP-Nox4B 蛋白質の検出は、抗 GFP 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて行った。1 次抗体、HRP 標識 2 次抗体と反応させた後、化学発光法にて検出した。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

1) マウス

PACAP-KO および野生型マウス (C57BL/6J) は 50~60 日齢を若齢個体、180 日齢以上を老齢個体として用いた。

2) *In situ* スーパーオキシド (O_2^-) の検出

脳内の O_2^- 検出はヒドロキシエチジウム (HEt) 投与により行った。HEt は O_2^- と反応して安定な赤色蛍光色素エチジウム (Et) になる。マウスに HEt (200 µL; 1 mg/ml) を総頸静脈より投与した。1 時間後、ペントバルビタール麻酔下で灌流固定を行い、直ちに脳を取り出して 20% ショ糖溶液で置換し、凍結切片作成後、励起波長 546nm にて観察した。さらに、HEt シグナルの細胞内局在を明らかにするため、ミトコンドリアマーカーである Mn SOD の免疫染色を行なった。

3) 電子顕微鏡観察

マウスを灌流固定した後、脳組織を取り出して 1 晩浸漬固定した。30 µm の厚さに薄切後、1% 四酸化オスmium で 1 時間固定した。エタノール脱水後 Epon 樹脂に包埋して 60~70 nm の厚さに薄切した。1% 酢酸ウラニルと 0.1% クエン酸鉛で電子染色した後、超薄切片は電子顕微鏡 (日立 H-7600) で観察した。

4) 受動的回避反応試験

受動的回避反応試験は 2 日に分けて行った。実験初日、マウスを明室に移した後、スライディングドアを開放する。マウスは暗室へ移動すると直ぐに電気ショックを与えられる。電気ショックを受けてから 300 秒以上暗室へ入らなかった個体を学習個体と見なし、学習するまでに暗室へ入った回数をカウントした。実験 24 時間後、再びマウスを明室に入れ、暗室に入るまでの潜時を 600 秒を限度としてカウントした。

5) Y 字迷路試験

アームがそれぞれ 120° の角度で連結した Y 字状の装置にマウスを入れ、8 分間の行動軌跡を SMART システムにより記録した。各アームへの進入順を記録し、連続して異なる 3 本のアームを選択した回数を交替行動回数とし、交替行動回数 / (総移動回数 - 2) × 100 の計算式により自発的交替行動率を求め、短期記憶の指標とした。

6) オープンフィールド試験

Y 字迷路試験の翌日、マウスをオープンフィールド装置の中に入れ、15 分間の軌跡を SMART システムにより記録した。翌日も同様の試験を行い、15 分間の総移動距離 (cm) を活動量の指標とした。

7) 新規物認知試験

オープンフィールド試験の翌日、装置内に 2 つの青色円柱物を静置し、10 分間の軌跡を SMART シス

テムにより記録した。翌日、片方の物体を黄色立方物に置き換え、同様に10分間の軌跡を記録した。対象物に対し、5 cm 以内で匂いを嗅ぐ行動を示した回数を計測し、各々の対象物にアプローチする割合を数値化した。

8) 能動回避試験

新規物認知試験の翌日、能動回避試験測定装置を用いて学習記憶能を評価した。装置は2つの同じ部屋からなり、小さな入り口で通行可能である。マウスは装置内に入れられた後、10分間の探索時間が与えられる。その後、30秒間のインターバルでマウスの存在する部屋に10秒間ライトが点灯する。ライト消灯直後に電流(2 mA)が通電されるが、ライト点灯中に隣の部屋に移動した場合は電気ショックは生じない。その後インターバル、点灯、電気ショックのサイクルを1日100回、3日間繰り返した。ライト点灯後10秒以内に隣の部屋に移動した場合は条件付け成功と見なし、試験20回ごとの成功回数を評価した。

9) イムノブロット解析

ホモジェナイズした大脳を、SDS-PAGE 後 PDVF 膜に転写した。次に、抗酸化物質である Zn/Cu superoxide dismutase (SOD)、Mn SOD、Heme oxygenase (HO)-1、-2、に対する1次抗体、続いて HRP 標識2次抗体を反応させ、化学発光法で検出し、画像解析ソフト(UN-SCAN IT gel)によりシグナル強度を定量化した。

10) PCRアレイ解析

PCR アレイ解析は RT2 profiler PCR array PAMM-065 (Mouse Oxidative Stress and Antioxidant Defense SuperArray, SABioscience) を使用した。12ヶ月齢の野生型および PACAP-KO マウスから大脳半球を摘出、液体窒素にて急速凍結した。Trisol (invitrogen) により total RNA を粗精製し、RT2 qPCR-Grade RNA Isolation Kit にて単離した。RT2 First Strand Kit にて cDNA を合成し、RT2 SYBR Green qPCR Master Mixes にて抗酸化に関与する84因子の mRNA 発現量を ABI Prism 7900 リアルタイム PCR システムを用いて検出した。得られた Δ CT 値を基に両群の遺伝子発現量を比較し、1.5 倍以上の差が認められた遺伝子を評価した。

3. 核酸・核タンパク食の抗フリーラジカル効果

1) 核酸・核タンパク餌中の抗酸化力(BAP)測定

餌に添加した核酸・核タンパク餌および主成分である DNA-Na とプロタミンの3種類の抗酸化力は、

FREE 法を用いて生物学的抗酸化ポテンシャル(BAP)として求めた。BAP は、チオシアン酸誘導体の酸化複合体($\text{FeCl}_3\text{-AT}$:茶褐色)に対し、サンプルの還元力による退色($\text{FeCl}_2\text{-AT}$:無色)として測定した。データは vitamin C を標準とし、 Fe^{3+} から Fe^{2+} の還元量($\mu\text{mol/L}$)として示した。

2) ESR 法によるフリーラジカルの測定

核酸・核タンパク餌が消去するフリーラジカル種を同定するため、電子スピン共鳴(ESR)法を用いて以下の3種について検討した。 O_2 ラジカルは、ヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ反応を発生源とし、スピントラップ剤 DMPO (8%)、サンプルを混合し、1分後に ESR にて測定した。NO ラジカルは、NO ラジカル発生剤 NOC-7 (10 mM)、スピントラップ剤 carboxy-PTIO (200 μM)、サンプルを混合した後、マイクロウェーブ照射後 ESR 装置にて測定した。一重項酸素($^1\text{O}_2$)は、スピントラップ剤 4-OH-TEMP (100 mM)、光増感剤 Rose Bengal (200 μM) をサンプルに添加し、その後、一重項酸素を発生させるために LED 照射装置で緑色光を 1.3 J/cm^2 照射し、ESR 装置にて測定した。各フリーラジカルの信号強度は、標準マーカである MnO の ESR スペクトル(x)とそれぞれのフリーラジカルの基準となる ESR スペクトル(y)の比(y/x)から算出した。

3) 給餌スケジュール

マウスは、7週齢時に無作為に2群に分けた後、無核酸・核タンパク餌(NF)、サケ白子より調整した核酸・核タンパク(NP)を1.2%含有した餌を14日間自由摂取させた。14日後、LPS (30 mg/kg)を腹腔内投与し、6時間後に肝臓を摘出して直ちに ESR 測定に用いた。LPS 投与24時間後血清を分離し、肝傷害マーカである ALT (alanine aminotransferase) を測定した。また、一部の肝臓はイムノブロットおよび組織学実験に用いた。

4) 肝組織中の酸化ストレス評価およびクッパー細胞染色

組織タンパク質中のチロシンは、NOラジカルによりニトロ化されて 3-nitrotyrosine (3-NT) が生じる。従って、3-NT は NO ラジカルによる細胞傷害の指標になる。更に、LPS 誘導性肝傷害モデルでは、肝臓のクッパー細胞が活性化されることが知られている。そこで、LPS (30 mg/kg) 投与24時間後に肝臓を摘出し、常法に従ってパラフィンブロックを作成し、4 μm の厚さに薄切した。抗 3-NT 抗体およびクッパー細胞を認識する抗 iba-1 抗体、ビオチン標識2次抗体と反応さ

せた後、ABC、DAB 法により発色させて解析した。

5) iNOS とクッパー細胞の二重免疫染色

NO 合成酵素である iNOS を発現している細胞の同定は、蛍光抗体法による二重免疫染色で行った。LPS 投与 24 時間後に肝臓を摘出し、常法に従って凍結ブロックを作成し、クリオスタットにて 8 μm の厚さに薄切した。ウサギ抗 iNOS 抗体およびラット抗 F4/80 抗体、次に、Alexa546 標識抗ウサギ IgG 抗体および Alexa488 標識抗ラット IgG 抗体と反応させた。最後に DAPI にて核染色を行い、蛍光顕微鏡で解析した。

6) ESR 法による肝組織中の NO ラジカル測定

14 日間各餌を給餌されたマウスは、LPS 投与 6 時間後に肝臓を摘出した。摘出 30 分前に NO ラジカルトラップ剤として 200 mM MGD と 200 mM FeSO₄ の混合溶液 (3:1) をマウス腹腔 (0.4 ml/20 g) に投与した。摘出した肝臓 (50 mg) は扁平セルに挟み、マイクロウェーブ照射後 ESR 装置にて発生した NO ラジカルを測定した。

7) イムノブロット解析

LPS 投与 24 時間後、肝臓を摘出してホモジェナイズした後、SDS-PAGE を行い PDVF 膜に転写した。次に、抗 iNOS 抗体、続いて HRP 標識 2 次抗体を反応させ、化学発光法により X 線フィルム上に感光させた。画像解析ソフト (UN-SCAN IT gel) によりシグナル強度を定量化した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、当該研究機関の動物実験指針に従い、動物実験委員会の承認の下に行った (昭和大学: #09143; #09146; #09065)。動物愛護の観点に基づき無用なストレス、苦痛を動物に与えぬよう飼育環境に配慮し、麻酔薬の使用など適切に行った。更に、KO マウスの使用に関しては、当該研究機関の遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

1) COS7 細胞に於ける GFP-Nox4A および GFP-Nox4B 蛋白質の発現

我々は以前、HCAEC に Nox4A と Nox4B が優位に発現し、Nox4A が膜画分に Nox4B が核画分に局在することを細胞分画後イムノブロット法を用いて明らかにした。しかし、この実験に用いた抗 Nox4 抗体は Nox4C を除く全ての variant form に共通する “loop region” 配列を認識するため、細胞内に発現し

ている Nox4A と Nox4B を区別することができない。そこで、GFP を融合させた発現プラスミド (GFP-Nox4A および GFP-Nox4B) を構築し、COS7 細胞内で一過性に発現させて細胞内局在を検討した。トランスフェクション 24 時間後、GFP 融合蛋白質としての Nox4A と Nox4B の発現量は、pAcGFP1-C1 (空ベクター: mock) を発現させた場合に比べ蛍光を発する細胞が少なく、蛍光量も微弱であり細胞内局在は特定できなかった。トランスフェクション 48 時間後には、多くの浮遊細胞が認められ、細胞死に至ったと考えられる。また、抗 GFP 抗体を用いたイムノブロットにより蛋白質の発現を検討したが、GFP-mock 蛋白質と異なり、GFP-Nox4A および GFP-Nox4B 蛋白質のバンドは膜画分 (M)、核画分 (N) 共に検出されなかった。蛋白質の発現量が低い理由として、1) 構築した GFP-Nox4A および GFP-Nox4B プラスミドの COS7 細胞への導入効率、2) COS7 細胞内での転写効率に関する問題が考えられる。

2) COS7 細胞への導入効率

GFP-Nox4A および GFP-Nox4B プラスミドが COS7 細胞に導入されているか検討するため、トランスフェクトした細胞から 24 時間後 total RNA を抽出し、RT-PCR で逆転写した後、特異的 primer set を用いた PCR により Nox4A および Nox4B の cDNA を増幅した。その結果、GFP-Nox4A および GFP-Nox4B プラスミドをトランスフェクトした COS7 細胞では全てのクローンで、Nox4A および Nox4B の mRNA が発現していることが確認できた。以上の結果から GFP-Nox4A および GFP-Nox4B プラスミドは COS7 細胞内にトランスフェクトされ、転写されていることが明らかになった。しかし、mock に比べ蛍光強度が弱く、蛋白質の発現も確認出来なかった。従って、転写後から翻訳レベルへの過程に問題があると考えられる。

3) HEK293T 細胞を用いた解析

HEK293T 細胞を用いて COS7 細胞と同様の発現実験を行った。まず、構築プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクトした 36 時間後、GFP 融合蛋白質としての Nox4A と Nox4B の発現は空ベクター (mock) を発現させた場合に比べ蛍光を発する細胞数は少ないが、蛍光強度は同レベルであった。一方、イムノブロットによる解析では、膜画分 (M) に抗 GFP 抗体と反応する Nox4A および Nox4B のバンド (~80 kDa) が全てのクローンに於いて検出された。更に、GFP-Nox4A および GFP-Nox4B のアミノ酸配列から推定される variant form 間の微妙な分子量の違いも識別できた。空ベクターをトランスフェクトした HEK293T 細胞およ

び COS7 細胞から調整した膜画分(M)を比較すると、COS7 細胞と異なり HEK293T 細胞由来の膜画分ではバンドが白抜けするほど GFP が大量に発現していた。従って同じトランスフェクション条件では COS7 細胞に比べて HEK293T 細胞の方が GFP および GFP 融合蛋白質が効率よく発現されることが示された。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

1) PACAP-KO マウスの酸化傷害

脳内酸化ストレスの細胞内局在を明らかにするため、O₂ 発生部位を HEt を用いて光顕観察した。生後 180 日齢の老齢 PACAP-KO マウスでは、野生型に比べて海馬 CA1 領域の HEt シグナルが顕著に増加しており、Mn SOD 陽性反応(ミトコンドリアマーカー)と重なった。電子顕微鏡観察により、野生型および若齢 PACAP-KO マウスの神経細胞は正常であったが、180 日齢の老齢 PACAP-KO マウスでは、一部ミトコンドリアが凝集・変形しており、そこにライソソームが融合した自己食像が観察された。

2) PACAP-KO マウスの記憶・学習試験

酸化傷害が顕著に認められた海馬 CA1 領域は記憶や学習に強く関与する領域である。そこで PACAP-KO マウスの記憶・学習行動に異常がみられるか、受動的回避反応試験を行なった。生後 180 日齢までは、野生型および PACAP-KO マウスとも学習・記憶に有意差は認められなかった。しかし、180 日齢以上の老齢個体では PACAP-KO マウスの学習能力に有意な低下が認められ、360 日齢以上では、刺激 24 時間後に於ける記憶力も低下していた。

次に、受動回避試験で学習・記憶障害の認められた 360 日齢の PACAP-KO マウスおよび野生型マウスを用いて、Y 字迷路試験、オープンフィールド試験、新規物認知試験、および能動回避試験を行なった。Y 字迷路試験に於ける自発的代替行動の割合は、両マウス間で有意差は認められなかった。一方、オープンフィールド試験に於いて、15 分間の移動距離は、1 日目と 2 日目共に野生型に比べ PACAP-KO マウスで高活動性が認められた。新規物認知試験 1 日目、2 つの同一対象物(青色円柱状)にマウスが接する割合は、両マウス群とも約 50%で有意差は認められなかった。翌日に対象物の一つを新規物(黄色立方状)に置き換えた後の評価では、両マウス群とも新規物へのアプローチが増加したが、両群に差は認められなかった。次に、能動回避試験装置を用いて 1 日 100 回、3 日間連続で行動試験を行なった。1 日目の行動試験では両マウス群で回避成功率に差は認められなかった。しかし、2 日目から差が開き始め、3

日目には PACAP-KO マウスでの回避成功率が有意に野生型よりも低下した。

3) PACAP-KO マウスの脳内抗酸化関連因子

PACAP-KO と野生型マウスの若齢および老齢個体に於ける脳内抗酸化物質の発現量をイムノブロットにより解析した。若齢個体では、Mn-SOD および HO-1 の発現量が PACAP-KO マウスで有意に低下していた。老齢個体で比較しところ、より顕著な発現低下が認められ、加えて HO-2 の発現量も有意に減少していた。しかし Zn/Cu SOD の発現量は、若齢個体および老齢個体に於いても、野生型マウスとの有意差は認められなかった。

次に、360 日齢の野生型および PACAP-KO マウスの大脳半球に於ける抗酸化関連遺伝子の発現を PCR アレイ法により解析した。評価した 84 遺伝子中、PACAP-KO マウスで増加した遺伝子は 4 遺伝子、prostaglandin-endoperoxide synthase-2、interleukin 22、eosinophil peroxidase、hemoglobin, theta 1 であった。また、PACAP-KO マウスで発現低下が認められた遺伝子は 5 遺伝子、NADPH oxidase 1、uncoupling protein-3 (mitochondrial, proton carrier)、myoglobin、copper chaperone for superoxide dismutase、thioredoxin reductase -1 であった。

3. 核酸・核タンパク食の抗フリーラジカル効果

1) 核酸・核タンパク餌の抗酸化力

核酸・核タンパク原末と、その主成分である DNA-Na およびプロタミンの BAP を測定した。コントロールである超純水の BAP 値は 988 μM であった。それに対して、核酸・核タンパク原末は濃度依存的に BAP 値が上昇し、50 μg/ml 以上の濃度で超純水に対して有意差が認められ、2,500 μg/ml では 8,195 μM と高値を示した。プロタミンの BAP 値は、750 μg/ml の高濃度で 1,401 μM と有意差が認められた。DNA-Na は濃度依存的に BAP 値が上昇し、核酸・核タンパク原末よりも低濃度(25 μg/ml 以上)で有意差が認められ、750 μg/ml では 8,841 μM と高値を示した。

次に、スピントラップ法を用いて、核酸・核タンパク原末の O₂ ラジカル、NO ラジカル、一重項酸素 (¹O₂) 消去率を ESR 法で測定した。核酸・核タンパク原末の O₂ ラジカル消去率は 2 mg/ml で 5.4%、16 mg/ml で 16.7%と低かった。一方、NO ラジカルの消去率は、1.5 mg/ml で 23.5%、6 mg/ml で 35.3%と増加した。更に、一重項酸素を測定したところ、消去率は濃度依存的に増加し、0.05 mg/ml で 96.7%と極めて高かった。

2) LPS 投与後のマウス生存率

LPS 投与 18 時間後のマウス生存率は、NF 群、1.2%NP 群ともに 100%であった。NF 群の生存率は、投与 24 時間後は 45.5%、28 時間後は 0%まで減少した。それに対し 1.2%NP 群の生存率は、24 時間後は 90%、28 時間後は 45.5%、72 時間後は 27%で、延命効果が認められた。

3) 血清中 ALT 値の測定

LPS 投与 24 時間後の血清を回収し、肝傷害の指標の一つである血中 ALT (alanine aminotransferase) 値を測定した。その結果、NF 群の 121.6 ± 20 IU/L に対し、1.2%NP 群は 92.5 ± 8.1 IU/L と低下し、改善効果が認められた。

4) 肝臓の酸化傷害評価

LPS 誘導性肝傷害による酸化傷害領域の特定と核酸・核タンパク摂取の効果を評価するため、抗 3-NT 抗体を用いて免疫染色を行った。3-NT 陽性反応は、LPS 投与 24 時間後、NF 群の肝臓の中心静脈周囲に認められた。これに対し、1.2%NP 群では 3-NT 陽性反応は殆ど認められなかった。次に、ESR 法を用いて肝組織中の NO ラジカルを測定した。NO ラジカル強度は、NF 群では 1.1 ± 0.11 であったが、1.2%NP 群では 0.9 ± 0.19 と低値を示した。

5) 肝臓におけるクッパー細胞と iNOS 発現

抗 iba-1 抗体を用いて LPS 投与後の肝臓組織に於けるクッパー細胞を免疫染色した。iba-1 陽性反応は全ての群で肝細胞周囲の類洞で認められた。LPS 投与 24 時間後の NF 群は、iba-1 陽性細胞が肥大化した。1.2%NP 群では肥大化像は殆ど認められなかった。更に、クッパー細胞に於ける iNOS の発現を確認するため、蛍光二重免疫染色を行った。iNOS 陽性反応は、クッパー細胞マーカーである F4/80 陽性反応と重なった。次に、核酸・核タンパク摂取後の肝臓内に於ける iNOS の発現量をイムノブロットにより解析した。LPS 非投与群は、NF 群と 1.2%NP 群、共に iNOS の発現は殆ど認められなかった。一方、LPS 投与 24 時間後、iNOS の発現は、1.2%NP 群では NF 群に対し有意に低かった。

D. 考察

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

最近、川崎病モデルマウスを用いて、冠動脈瘤の形成に至る過程で TNF- α が決定的な役割を果たすことが報告された。一方、食細胞活性酸素生成系の

ホモログ遺伝子 Nox (NADPH oxidase) が血管内皮細胞にも発現しており、TNF- α がこれを活性化することが示唆されている。従って、川崎病急性期に高値 TNF- α の作用により血管内皮細胞の活性酸素生成能が亢進し、その酸化ストレスが血管内皮細胞の傷害、ひいては、血管壁全層の傷害に至り、動脈瘤を誘発する可能性が考えられる。しかし、血管内皮細胞を含む血管壁構築細胞に於ける活性酸素生成系の全体像は明らかにされていない。

我々は以前、川崎病に於ける全身性血管炎、特に、冠動脈瘤の発症病理を理解すべく、瘤の発生頻度が最も高いヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) を用いて解析した。そして、HCAEC が自発的に H₂O₂ を生成し、TNF- α がその生成活性を亢進することを報告した (Yoshida et al, Int Immunopharmacol, 2008)。HCAEC に於ける H₂O₂ 生成活性の責任酵素群として Nox (Nox1~Nox5) が考えられるが、HCAEC では Nox4 が最大発現していた。更に、Nox4 は、データベース上 5 種類の splicing variant (Nox4A~Nox4E) が登録されているが、HCAEC には Nox4A と Nox4B が発現していた。Nox4A は p22 と共に膜画分に存在しており、食細胞の Nox2 と同様に p22 とヘテロダイマーを形成して HCAEC の活性酸素生成を担い、血管内皮傷害に関与する可能性が考えられる。一方、Nox4B は核画分に単独で存在していた。この知見は、Nox4 の isoform が同一細胞に発現しながら異なる細胞内局在性を持つことを示した初めての報告であり、それぞれが個別の特性を持つ可能性を示している。

Nox4 を介した活性酸素生成は血管内皮細胞の増殖に関与し、活性酸素応答性シグナル経路を活性化する。Nox4 を細胞内に過剰発現させると Nox4 由来の活性酸素により ERK1/2 と JNK がリン酸化されて活性化されることが報告されている。HCAEC では、Nox4A と Nox4B の細胞内局在性および p22 との関係が異なるので、これら isoform 間で活性酸素生成や下流のシグナル経路に違いがあると考えられる。

本研究では、Nox4A および Nox4B の細胞内局在性と p22 との関係を生化学的方法ではなく、細胞レベルでより直接的に解析し、これら isoform の特性を明らかにすることを目的とした。そこで、GFP-Nox4A および GFP-Nox4B プラスミドを構築し、COS7 細胞内に導入した。空ベクター (mock) の GFP は十分に発現していたが、GFP 融合蛋白質としての Nox4A と Nox4B の発現量は微弱であり、蛍光顕微鏡下で解析できず、イムノブロットでも特定できなかった。トランスフェクトした COS7 細胞での Nox4A および Nox4B を RT-PCR 法で解析したところ、両分子

の mRNA 発現は確認された。従って、COS7 細胞へのトランスフェクション、それに続く転写には問題はなく、翻訳レベルに至る過程に問題があることが示唆された。

次に、HEK293T 細胞を用いて同様のトランスフェクション実験を行った。その結果、GFP 融合蛋白質としての Nox4A と Nox4B の発現は改善され、COS7 細胞と異なり mock を発現させた場合と同レベルであり、蛍光顕微鏡下で観察された。更に、抗 GFP 抗体を用いたイムノブロット解析の結果から、~80 kDa 付近に単一バンドが検出され、GFP-Nox4A および GFP-Nox4B のアミノ酸配列から推定される isoform 間の微妙な分子量の違いも識別できた。空ベクターの発現効率を比較すると、同じトランスフェクション条件下、HEK293T 細胞では COS7 細胞に比べて数段高い GFP 蛋白質 (27 kDa) の発現が見られた。

以上、HEK293T 細胞を用いて GFP-Nox4A および GFP-Nox4B の発現を構築した。今後、p22 を共発現させた後、GFP が発する蛍光を指標にして Nox4A および Nox4B の細胞内局在性を解析する。そして、HCAEC に於ける生化学的解析と同様に、Nox4A が p22 と共に細胞膜、Nox4B が単独で核に存在するか細胞レベルで解析する。更に、Nox4A と Nox4B のどちらが実際に血管内皮細胞からの活性酸素生成を担っているか、細胞レベルで可視的に解析する。TNF- α は HCAEC の活性酸素生成能を亢進するが、どちらの Nox4 がこの活性酸素生成を実際に促進しているか、更に、好中球の血管外遊出に必須である血管内皮細胞での ICAM-1 の発現に関与しているか解析する。Nox4A および Nox4B に特異的な性質および ICAM-1 発現に繋がるシグナル経路との関連性が明らかになれば、川崎病の冠動脈瘤形成に於ける Nox4 の作用機序の解明に繋がると考える。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

PACAP は生体内の抗酸化能を上昇させ、酸化ストレス度を減少させる。しかし、PACAP 自身に抗酸化作用はなく、間接的に抗酸化物質の発現を促して体内の酸化ストレス度を低減させることが推察された。

一方、老齢 PACAP-KO マウスの海馬 CA1 領域では野生型に比べて O₂⁻ (HEt) シグナルが顕著に増加し、強い酸化傷害が認められた。更に、海馬神経細胞の微細構造を電子顕微鏡で観察したところ、老齢 PACAP-KO マウスでは神経細胞内のミトコンドリアに形態異常が認められ、そこにリソソームが融合して自己食食を起こしている像が多数認められた。これらの観察から、PACAP の欠如が加齢に伴う神経組織内の酸化傷害を誘導し、ミトコンドリアの傷害、変形、

自己食食が起きたのではないかと推察される。

海馬が記憶・学習に関わる領域であることから、野生型と PACAP-KO マウスの記憶・学習行動に違いがあるか受動的回避反応試験により解析した。180 日齢までのマウスに関しては、学習・記憶とも有意差は認められなかった。しかし、180 日齢以上の老齢個体では、PACAP-KO マウスに有意な学習能力の低下が認められ、360 日齢以上の個体では刺激 24 時間後の記憶力も低下した。

360 日齢の老齢個体を用いて複数の行動試験を行なった。PACAP-KO マウスでは自発運動量の増加傾向が認められた。また、短期記憶の指標である Y 字迷路における自発的交替行動、視覚認知能の指標である新規物認知試験の成績は野生型と同程度であった。しかし、能動的回避試験に於いて、1 日目の成績は野生型と同程度であったが、3 日目でも成功率が上昇せず、記憶能の低下が認められた。Y 字試験および能動回避試験 1 日目の成績が PACAP-KO マウスと野生型で差がないことから、PACAP-KO マウスの短期記憶は正常であることが示された。また、新規物認知試験は正常であり、PACAP-KO マウスは物体の色や形などの視覚を介した識別能も正常であると考えられる。一方、受動および能動回避試験での記憶能が低下していた。受動回避試験は文脈に対する回避条件付けに位置づけられ、海馬依存性の高い学習記憶行動試験である。また、能動回避試験は光刺激に対する回避条件付けに位置づけられ、記憶成立には扁桃体依存性が高いことが知られている。よって老齢 PACAP-KO マウスでは辺縁系の機能障害が生じている可能性が考えられる。この考察は、脳組織内で海馬領域に HEt シグナルが強く認められた結果と一致する。

抗酸化物質の発現を野生型および PACAP-KO マウスの若齢個体および老齢個体で比較した。その結果、ミトコンドリアに局在する Mn SOD と HO-1 の発現が PACAP-KO マウスで低下し、老齢個体では顕著に減少していた。細胞質に発現する Zn/Cu SOD が野生型と PACAP-KO マウスで差がなかったことから、PACAP がミトコンドリアに存在する抗酸化物質の発現を促進する可能性が得られた。

抗酸化関連遺伝子の PCR アレイ解析の結果、360 日齢の PACAP-KO マウスでは野生型マウスと比較して 4 遺伝子の発現上昇と 5 遺伝子の発現低下が認められた。上昇した遺伝子中、prostaglandin-endoperoxide synthase 2 はシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) と呼ばれ、炎症に伴い発現上昇してプロスタグランジン E2 を合成し、発熱を誘導する。Interleukin 22 は炎症部位に移動したヘルパー

T 細胞(Th17)から分泌されるサイトカインであり、eosinophil peroxidase は好酸球が発現するペルオキシダーゼである。これらの結果は、PACAP-KO マウス脳内に於いて炎症反応を伴う酸化傷害が誘導されていることを示している。一方、低下した遺伝子中、uncoupling protein 3 はミトコンドリアに発現している脱共役タンパク質であり、熱代謝に関与すると共に、ミトコンドリアの酸化傷害を抑制する。Myoglobin は骨格筋などで発現する酸素結合能を有するタンパク質であるが、同時に抗酸化能を有している。Copper chaperone for superoxide dismutase は Zn/Cu SOD への銅イオン供給タンパク質であり、Zn/Cu SOD の活性を制御している。Thioredoxin reductase 1 は NADPH のエネルギーを使用して酸化型チオレドキシンを還元型にする酵素であり、細胞の抗酸化能維持に貢献している。理由は不明であるが NADPH oxidase 1 は O₂ 生成酵素である。以上、PACAP-KO マウスの脳内では全般的に抗酸化物質およびそれに関わる遺伝子の発現が低下しており、uncoupling protein 3 のようなミトコンドリア機能に関連した因子の発現低下も認められた。

以上、PACAP は抗酸化物質の発現を上昇させることにより酸化傷害を抑制すると考えられる。特に、加齢に伴う大脳辺縁系の酸化傷害と記憶障害を抑制することが示された。フリーラジカルは中枢・末梢組織の損傷、炎症反応に伴なって増加するが、生活習慣病や老化とも深く関わることが知られている。PACAP のような内因性抗酸化物質誘導能を持つ生理活性ペプチドの機能解析は、幅広い酸化ストレスに起因する疾患の画期的な治療薬の開発に繋がることを確信する。

3. 核酸・核タンパク食の抗フリーラジカル効果

昨年度までに、リウマチ様関節炎を自然発症する HTLV-1 Tg マウスに、NF 餌および NP-0.6%、NP-1.2% を添加した餌を 6 週齢から 18 週齢まで長期負荷を行い、体重、関節厚の経時変化を調べた。餌負荷終了時、関節の病理組織学的変化、酸化ストレスマーカーである 3-NT 染色、更に、血中の活性酸素代謝物(ROM)を 3 群のマウスで比較した。その結果、サケ白子由来 NP-1.2% 含有餌摂取により体内の酸化ストレスが軽減され、リウマチ様関節炎に対して改善効果があることが判明した。

本年度は、餌に添加した核酸・核タンパク原末の生物学的抗酸化ポテンシャル(BAP)を測定し、抗酸化能があることが判明した。そこで、核酸・核タンパクの主成分である DNA-Na とプロタミンの BAP を測定し、どちらが抗酸化能を有しているか検討した。その

結果、核酸・核タンパクの抗酸化能は主に DNA-Na によることが分かった。しかし、核酸・核タンパクが消去するフリーラジカル種は不明であった。そこで、O₂ ラジカル、NO ラジカル、一重項酸素(¹O₂)の 3 種のフリーラジカルに対する影響を ESR スピントラップ法を用いて検討した。その結果、核酸・核タンパクは O₂ ラジカルを殆ど消去せず、僅かに NO ラジカルを消去し、大部分は一重項酸素を消去することにより抗酸化能を発揮することが明らかになった。

次に、NO ラジカルが関与すると考えられている LPS 投与肝傷害モデルマウスを作成し、核酸・核タンパク摂取のフリーラジカル抑制効果と肝傷害への影響について検討した。NF 群のマウス生存率は、24 時間後は 45.5%、28 時間後は 0%にまで減少した。それに対し 1.2%NP 群の 24 時間後の生存率は 90%であった。更に、LPS 投与 24 時間後の血清を回収し、肝傷害マーカーである ALT を測定したところ、NF 群に対し 1.2%NP 群は低下した。以上の結果より、核酸・核タンパクの摂取は肝機能低下を抑制し、マウスの生存率を改善すると考えられる。

肝臓の酸化傷害に対する核酸・核タンパク摂取の効果を検討した。NO 由来の酸化傷害マーカーである 3-NT の陽性反応は、LPS 投与 24 時間後、NF 群の肝臓の中心静脈周囲に認められた。しかし、1.2%NP 群では殆ど認められなかった。また、ESR 法を用いて肝組織中の NO ラジカルを測定したところ、NO ラジカル強度は、NF 群に対し、1.2%NP 群は低値を示した。これらの結果より、核酸・核タンパク摂取は肝組織中の NO ラジカルを消去することにより、肝傷害を抑制すると考えられる。

肝傷害時、クッパー細胞が活性化されて NO 合成酵素である iNOS の発現が亢進し NO が過剰産生されることが報告されている。そこで、核酸・核タンパク摂取の肝傷害抑制機構を解明するために、クッパー細胞の活性化と iNOS 発現に対する影響を検討した。LPS 投与 24 時間後、NF 群では、iba-1(クッパー細胞マーカー)抗体陽性細胞が肥大化していたが、1.2%NP 群では肥大化像は殆ど認められなかった。更に、LPS 投与後の肝組織では F4/80(クッパー細胞マーカー)陽性反応と iNOS 陽性反応が重なり、クッパー細胞が iNOS を発現していることが確認された。肝臓に於ける iNOS の発現量をイムノブロットで解析したところ、LPS 投与 24 時間後、1.2%NP 群では iNOS タンパク質量が NF 群に対し有意に減少していた。従って、核酸・核タンパク摂取は、過剰産生された NO を直接消去するだけでなくクッパー細胞の活性化抑制や、それに伴う iNOS タンパク質の発現を抑制することが明らかになった。

以上、核酸・核タンパクの DNA-Na 成分が強い酸化能を有することが判明した。更に、核酸・核タンパク摂取が関節リウマチおよび肝傷害組織の NO ラジカルによる酸化傷害を抑制することが明らかになった。現在、多くの疾患にフリーラジカルが関与すると考えられている。今後は、核酸・核タンパクの抗フリーラジカル作用を詳細に解析することで、関節リウマチや肝傷害のみならずフリーラジカルが原因となっている多くの疾患に対する代替医療が可能になるであろう。

E. 結論

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

Nox4 の splicing variant である Nox4A および Nox4B の細胞内局在性および特性を明らかにするため、GFP 融合蛋白質として発現する GFP-Nox4A および GFP-Nox4B を構築し、HEK293T で発現を確認できた。今後、Nox4A および Nox4B と活性酸素生

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H, Ohara K, Miyamoto K, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Matsunaga M, Shioda S. Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. *J Mol Neurosci* (in press).
- 2) Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A, Endo K, Iso Y, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S. Cardioprotective Effect of Endogenous Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide on Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Mice. *Circ J* (in press).
- 3) Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Nakamura S, Shioda S, Aruga T. Novel free radical monitoring in patients with neurological emergency diseases. *Acta Neurochir Suppl*, 106:315-319 (2010).
- 4) Ohtaki H, Yofu S, Nakamachi T, Satoh A, Shimizu A, Mori H, Sato A, Iwakura Y, Matsunaga M, Shioda S. Nucleoprotein diet ameliorates Arthritis symptoms in mice Transgenic for Human T-Cell Leukemia Virus Type I (HTLV-1) *J Clin Biochem Nutr*, 46: 1-12 (2010).
- 5) Watanabe J, Nakamachi T, Ogawa T, Naganuma A, Nakamura M, Shioda S, Nakajo S. Characterization of antioxidant protection of cultured neural

成および ICAM-1 発現に繋がるシグナル経路との関連を明らかにし、川崎病の冠動脈瘤形成に於ける Nox4 の関与を明らかにする。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

PACAP-KO マウスでは海馬神経細胞における酸化傷害が増加し、学習記憶能の低下と脳内酸化物質の発現低下が認められた。PACAP は内因性酸化物質の調節因子として機能し、老化に伴う酸化傷害と記憶障害を抑制すると考えられる。

3. 核酸・核タンパク食の抗フリーラジカル効果

核酸・核タンパクの酸化作用は主成分である DNA-Na に存在した。更に、核酸・核タンパクは、活性酸素である NO ラジカルと一重項酸素を消去することにより、リウマチ様関節炎および肝傷害を抑制する可能性が示された。

progenitor cells (NPC) against methylmercury (MeHg) toxicity. *J Toxicol Sci*, 34: 315-325 (2009).

- 6) Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Mori H, Sato A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Shioda S. Endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is involved in suppression of edema in the ischemic brain. *Acta Neurochir Suppl*, 106: 43-46 (2009).
- 7) Dogrukol-Ak D, Kumar VB, Ryerse JS, Farr SA, Verma S, Nonaka N, Nakamachi T, Ohtaki H, Niehoff ML, Edwards JC, Shioda S, Morley JE, Banks WA. Isolation of peptide transport system-6 from brain endothelial cells: therapeutic effects with antisense inhibition in Alzheimer and stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29: 411-422 (2009).

2. 学会発表

- 1) 綱脇祥子、内田友祐、吉田ルシア幸子、守屋美恵. Dynamic analysis of the Nox family NADPH oxidases in the pathogenesis of Kawasaki disease. 第82回日本生化学会大会、神戸、10月21-24日、2009.
- 2) 守屋美恵、吉田ルシア幸子、綱脇祥子 Is the neutrophil NADPH oxidase (Nox2) involved in the pathogenesis of Kawasaki disease? 第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月9-12日、2009.
- 3) Shioda S, Nakamachi T, Ohtaki H, Dohi K, Nonaka N, Banks WA: Neuroprotection and molecular mechanism of PACAP in brain ischemia. Neuropeptide Festival 2009, Joint Meeting of the

- European Neuropeptide Culb and Summer Neuropeptide Conference. (2009.7), Salzburg, Austria
- 4) Shioda S, Takenoya F, Shiba K, Kageyama H: Feeding regulation and energy metabolism in brain -Novel GPCR ligands-. Malaysian Association for the Study of Obesity (MASO) 2009, Scientific conference on obesity. (2009. 8), Kuala Lumpur, Malaysia
 - 5) Mihara Y, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Kageyama H, Shioda S, Aruga T: The expression and the localization of orexin-1 receptor (OX1R) after traumatic brain injury in mice. Yakushima 2009 (Satellite Symposium of The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides) Phylogenetic Aspects of Neuropeptides - from Invertebrates to Humans. (2009.10), Yakushima, Kagoshima,
 - 6) Watanabe J, Nakamachi T, Nakamura M, Nakajo S, Shioda S: PACAP induces neural progenitor cell differentiation toward glial lineage in vivo. Yakushima 2009 (Satellite Symposium of The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides) Phylogenetic Aspects of Neuropeptides - from Invertebrates to Humans. (2009.10), Yakushima, Kagoshima
 - 7) Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Hasegawa F, Yofu S, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S: Endogenous PACAP as a cardioprotectant in Doxorubicin-induced cardiomyopathy model in mice. Yakushima 2009 (Satellite Symposium of The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides) Phylogenetic Aspects of Neuropeptides - from Invertebrates to Humans. (2009.10), Yakushima, Kagoshima
 - 8) Nakamachi T, Ohtaki H, Nonaka N, Banks WA, Shioda S: Neuroprotective effect of endogenous PACAP against focal cerebral ischemia in mice. Yakushima 2009 (Satellite Symposium of The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides) Phylogenetic Aspects of Neuropeptides - from Invertebrates to Humans. (2009. 10), Yakushima, Kagoshima
 - 9) Ito H, Seki T, Nakamachi T, Endo K, Shioda S: Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on the survival of ganglion cells in the rat retina after intraocular hypertension. Yakushima 2009 (Satellite Symposium of The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides) Phylogenetic Aspects of Neuropeptides - from Invertebrates to Humans. (2009.10), Yakushima, Kagoshima
 - 10) Nakamachi T, Aizawa Y, Ohtaki H, Yofu S, Seki T, Endo K, Naamura K, Nobuyuki K, Arata S, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S: Effect of PACAP on tear secretion in mouse. The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. (2009.10), Kagoshima
 - 11) Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Hasegawa F, Yofu S, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S: Endogenous PACAP attenuated doxorubicin-induced myocardial damage. The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. (2009.10), Kagoshima
 - 12) Sato A, Ohtaki H, Dohi K, Nakamachi T, Yofu S, Ohara K, Hashimoto H, Murakami T, Ando M, Shintani N, Baba A, Shioda S: Suppression of oxidative stress by PACAP. The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. (2009.10), Kagoshima
 - 13) 養父佐知子、中町智哉、大滝博和、小川哲朗、松永政司、首藤典正、岩倉洋一郎、塩田清二. 核タンパクの抗酸化作用とフリーラジカル消去能の評価. 第114回日本解剖学会総会、岡山、3月28-30日、2009.
 - 14) 大谷りら、宇住晃治、松永政司、加藤久典. サケ白子抽出物摂取に応答する遺伝子の網羅的解析. 第4回核酸・核タンパク機能性研究会、北海道、7月31日、2009.
 - 15) 核タンパク摂取によるLPS誘発肝傷害モデルマウスに対する効果. 養父佐知子、小川哲郎、中町智哉、佐藤和恵、清水藍、松永政司、宇住晃治、塩田清二. 第4回核酸・核タンパク機能性研究会、北海道、7月31日、2009.
3. 図書
- 1) Arata T, Hosono T, Taketomi Y, Kageyama H, Nakamachi T, Shioda S. Increased behavioral activity with regular circadian rhythm in PACAP specific receptor (PAC1) transgenic mice. Transmitters and Modulators in Health and Disease -New Frontiers in Neuroscience-, Springer-Verlag, (Tokyo), 199-205 (2009).
 - 2) Morikawa K, Dohi K, Yofu S, Mihara Y, Nakamachi T, Ohtaki H, Shioda S, Aruga T. Expression and

localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) specific receptor (PAC1R) after traumatic brain injury in mice. *Transmitters and Modulators in Health and Disease -New Frontiers in Neuroscience-*, Springer-Verlag, (Tokyo), 207-210 (2009).

- 3) Ogawa T, Kuwagata M, Shioda S. The search for a fetal origin for autism: evidence of aberrant brain development in a rat model of autism produced by prenatal exposure to valproate. *Transmitters and Modulators in Health and Disease -New Frontiers in Neuroscience-*, Springer-Verlag, (Tokyo), (*in press*)
- 4) 塩田清二: 食べ物で体の中から若返る! -注目の成分 核酸・核タンパク-Part 5, 医療への可能性. *主婦の友SSC(東京)*, 58-59(2009).

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

ノロウイルスおよびサポウイルス増殖阻害剤の評価 システムの構築

所 属 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究者 片山 和彦

研究要旨；ノロウイルスの全長ゲノム配列解析を継続し、ポリメラーゼ、プロテアーゼの配列蓄積を行った。リバーシジェネティクスに利用可能な全長ゲノムクローンを構築した。FCV プロテアーゼ基質認識機構の *in silico* 解析、および *in vitro* 切断評価を行い、薬剤評価システムを構築した。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所ウイルス第2部 岡智一郎、
- (2) 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター 本村 和嗣
- (3) 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター 横山 勝
- (4) 株式会社 中部衛生検査センター 小澤 一弘

A. 研究目的

本研究の目標は、分子疫学調査、コンピュータ構造シミュレーション、分子生物学の融合により、ノロウイルス (NoV) を含むヒトカリシウイルスのウイルスプロテアーゼ、ポリメラーゼ (RdRp) の活性を阻害する抗ウイルス薬のデザイン基盤の提供と、それらを実証するための評価システムの構築である。

具体的には、先ず分子疫学調査から得たヒトカリシウイルス (NoV を含む) 流行株の遺伝子配列を使用し、コンピュータシミュレーションで、ウイルスプロテアーゼ、RdRp 分子構造および活性発揮に重要な構造を予測する。次に、これらの情報公開を行い、阻害する抗ウイルス薬のデザイン基盤の提供すると同時に、既存の薬剤を評価するため、我々がサポウイルス (SaV) のプロテアーゼ活性発揮メカニズムを解析する

ために用いた *in vitro* 転写システムを利用した活性測定システムを構築する。このシステムに Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) を利用したシステムを導入する。BRET は、パーキンエルマ社によって提供されるレポーターシステムである。Green Fluorescence Protein (GFP) と Renilla luciferase (rLuc) 間にウイルスプロテアーゼの切断モチーフ配列を挿入した融合蛋白質をデザインする。これが、ウイルスプロテアーゼによって切断されない状態では、GFP と rLuc の融合蛋白質として発現し、rLuc の基質 (セレントラジン) を添加すると、rLuc の発光と BRET 現象により近接する GFP の蛍光が観察される。しかし、GFP と rLuc 間がウイルスプロテアーゼによって切断されると両者が離れるため、rLuc の発光 (410nm) のみが検出される。このような BRET 現象の有無を利用してカリシウイルスプロテアーゼの活性を検出するシステムを構築できれば、ハイスループットな *in vitro* 薬剤評価システムを構築できる。

しかし、薬剤の細胞に与える影響、薬剤投与時のウイルス複製の細胞内動態を評価するためには、BRET を、我々が本年新たに開発した NoV のリバーシジェネティクスシステムに応用し、哺乳類細胞内でのウイルス複製阻害効果を検証しながら進める必要がある。特にポリメラーゼは、ウイルス