

学術集会、2009年10月、東京.

山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、小西英二：インドネシアのデング熱・デング出血熱患者における補体活性と重症化の関係。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

宮川優子、小西英二：デングワクチンがマウスに誘導する中和及び感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

小西麻由、小西英二：日本脳炎ウイルス抗体をデングウイルス抗体から識別するブロッキングELISA法の確立。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

瀧澤山人、小西英二：デング2型ウイルスによる前免疫がデング4価DNAワクチンの免疫原性に及ぼす影響。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

田淵裕子、山中敦史、小西英二：デング流行地のヒトが保有するデングウイルス感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

特願 2007-290169: ウエストナイルウイルスワクチンおよびその製造方法 (発明者: 小島朝人、高橋秀宗、石川豊数)。

特願 2007-330151: フラビウイルス感染症ワクチンおよびフラビウイルス感染症ワクチン用アジュバント (発明者: 森康子、小島朝人、明石満、石川豊数、他)。

国際特許出願: PCT/JP2008/70354 (発明者: 小島朝人、高橋秀宗、石川豊数)

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

ワクチン創生の新テクノロジーによる新規ワクチンの開発

所属 国立感染症研究所 感染病理部
研究者 小島 朝人

研究要旨 温暖化で再燃が危惧される日本脳炎ウイルス(JEV)も、侵入の警戒が必要なウエストナイルウイルス(WNV)も、中間増幅動物を吸血した感染蚊が媒介する同一 JE 血清型群の極めて近縁なウイルスである。そこで、小島ら・小西らが各々開発してきた「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、感染性ウイルス大量培養工程もその封じ込め施設も不要な、それ故安全/安価な理想の JEV, WNV ワクチンを、実用化の決め手となるヒト用医薬品製造に国際認可された細胞を用いて、次世代 VLP/EP 新規ワクチンに開発すべく研究を初年度から推進してきた。本年度には、(1)小島・東らは連携・分担し、ヒト用医薬品製造に承認された CHO 細胞を用いて樹立し無血清培地に馴化させた CHO-WN12S 細胞が、成熟ビリオン型と未成熟 SHA 型の大小 2 種の VLP を産生することを本研究で初めて見出した。前者の VLP は中和抗体及び WNV 感染に特徴的な IgG2a 抗体応答の誘導、感染防御効果に優れていることをマウス免疫/感染実験で示し、有効性の高いワクチン抗原になり得ることを示唆した。(2)小西らは、ヒト用ワクチン製造用に認可された expresSF+昆虫由来細胞を用いて、CHO 細胞を凌ぐ大量の JE-EP を産生する exJE 細胞の樹立に成功した。この JE-EP 抗原が JEV と同等のエピトープを有すること、マウスに中和抗体誘導することから、ヒト用ワクチンとして有用であることを示唆した。

研究分担者

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

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス(JEV)もウエストナイルウイルス(WNV)も共に中間増幅動物を吸血した感染蚊が媒介する同一 JE 血清型群の極近縁なフラビウイルスで、重篤な疾病を引起す。東アジアでの JE 対策成功経験から、両ウイルス感染症はワクチンで予防・制圧が可能であることが示されている。しかし、JE 流行制圧に成功した我国も温暖化でこの脅威に再度曝される危険が増している。

疫学研究では、蚊が JEV 流行地より頻繁に飛来し、国内で越冬することが示されている。東アジアの JE 制圧に貢献してきた世界で唯一認可された我国発マウス脳由来不活化ワクチンは積極的接種勧奨が差控えられ、基礎免疫の無い小児世代が拡大した。しかし、細胞培養不活化新ワクチンの認可・販売開始で再流行阻止に展望が開けた。そ

こで、感染性 JEV 大量培養工程/特殊封じ込め施設不要で、安全/安価な次世代ワクチン開発を本研究の課題として取り組んできた。

一方、WNV は 1999 年突如米国に侵入し、短期間で全土に定着し、北米大陸・カリブ海全域に拡大し、未だに流行が続いている。我国では、2005 年に米国渡航者の初症例が報告され、ウラジオストックの野鳥から WNV の分離報告等も考慮すると、強い警戒が必要である。しかし、ヒト用 WN ワクチンは未だ無い。

既に小西ら、小島らのグループは各々、表面はウイルス粒子と同等で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性の抗原粒子(ウイルス様粒子:VLP, virus-like particle、細胞外粒子:EP, extracellular particle)の発現技術開発に成功し、製造工程も安全/特殊な封じ込め施設不要で安価な、理想の VLP/EP ワクチン開発に路を拓いてきた。

本課題の目指す次世代新ワクチン開発では、prM-E 遺伝子を恒常的に発現し、E 蛋白 prM/M 蛋白からなる VLP/EP を大量産生する、安定な持続培養細胞株を樹立することを基本戦略としている。しかし実用化は、用いる細胞がヒト用ワクチンの製

造に認可され、国際基準に合致していることが左右する。

そこで、ウイルス生活環の中間宿主(哺乳類)・吸血蚊(昆虫類)を考慮して、(1)小島/東らは連携/分担してヒト医薬品製造に承認された CHO 哺乳動物細胞を用いた JE-/WN-VLP を、(2)小西らはヒト用ワクチン製造に認可された expresSF+昆虫細胞を用いた JE-EP を、次世代ワクチンに開発する取組を初年度から進めてきた。

本年度は、(1)無血清培地馴化 CHO-WN12S 樹立細胞が大小2種の WN-VLP を産生することを新たに見出し、大型 VLP は抗原性が高く有効性に優れたワクチンになり得ること、(2) expresSF+昆虫細胞から CHO 細胞を凌ぐ大量の JE-EP を産生する exJE 株の樹立に成功し、この JE-EP 抗原が JEV と同等のエピトープを有することからヒト用ワクチンに有用であること、を示唆した。

B. 研究方法

(1) VLP 形成技術による WN ワクチンの開発

WN-VLP 持続発現細胞株: ATCC の CHO-K1 (CCL-61) 細胞に WNV prM-E cDNA 発現ベクター WN12 を導入して WN-VLP を持続発現する CHO-WN12 接着性細胞株 (#22.6, #22.6.6) は既に樹立が完了し、10% FBS を含む F12-K 培地 (Gibco) で継代した。これらの接着性細胞株を CHO-S-SFM II 無血清培地 (Gibco) に馴化させて浮遊細胞化した CHO-WN12.6 S 細胞株 (#22.6S, #22.6.6S) も昨年度樹立した株を用いた。WNV 抗原の性状解析: WNV 抗原発現量は、WNV-E 特異的中和単クローン抗体 WNV-11 を用いたサンドウィッチ ELISA により、精製不活化 WNV (100 ELISA 単位: 蛋白含量 102 µg/ml) を標準抗原として (以上、阪大微研会提供) で測定した。抗原蛋白は WNV E 及び M 蛋白特異抗体、フラビウイルス交叉性ポリクローナル抗体等を用いたウエスタンブロット法で解析した。WNV 抗原の糖鎖修飾は、2% SDS で変性後 N-グリコシダーゼ F 及びエンドグリコシダーゼ Hf 処理した抗原をウエスタンブロット法で解析した。蛋白量測定には市販の Lowry 法による定量キットを用いた。抗原形態は、濃縮試料をネガティブ染色し電子顕微鏡で観察した。蔗糖密度勾配遠心法による WN-VLP 抗原の解析及び調製: 樹立細胞株培養上清中の WNV 抗原の平衡蔗糖密度勾配法による解析には 10-50% (w/w) グラディエントで 160,000 x g, 15 時間の遠心を、沈降速度法による解析には 5-20% グラディエントで 160,000 x g, 2 時間の遠心を行った。VLP 抗原の調整には培養上清を限外膜濾過法又はポリエチレングリコール沈殿法で濃縮して部分精製用材料とした。これを

0/13/20% 不連続蔗糖密度勾配遠心法で分画し、WNV 抗原のピーク画分を Sephacryl S-300 カラムクロマトグラフィーで粗精製した。マウス免疫実験: 粗精製 WNV 抗原をリン酸緩衝液に置換し、4 週齢の雌 C3H/HeN マウス腹腔内に 1 週間間隔で 2 回投与した。2 回目免疫の 1 週間後に麻酔条件下で全採血し、血清を分離後非動化した。この血清の段階希釈系列を調整し、WNV-NY99 株の Vero 細胞を用いたプラーク法で中和抗体価 (PRNT₅₀) を測定した。また、各マウス血清中の IgG 抗体価は、精製不活化 WNV でコートした ELISA プレートに結合した IgG を標識抗-マウス IgG 抗体を用いて測定した。IgG1 及び IgG2a 抗体価についても同様に、標識抗-マウス IgG1, IgG2a 抗体を用いて測定した。マウス感染防御試験: 上記マウス免疫実験と同様に VLP 抗原で免疫したマウスの腹腔内に、1,000 pfu の WNV-NY99 株を攻撃接種した。接種後 14 日間臨床症状を観察し、マウスの生存率で VLP 抗原の感染防御効果を判定した (30% の体重減少は死亡と判定し安楽死の処置を行った)。

(2) 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

細胞: 昆虫細胞として、expresSF+細胞 (Protein Sciences 社) を用いた。この細胞は、カイコ (*Spodoptera flugiperda*) 由来の Sf9 細胞から得られたクローンであり、ヒト用ワクチン製造に使用できるようにするために米国 FDA が開発に関与した。培養液は、EX-CELL420 (SAFC Biosciences 社)、BacVector (Novagen 社)、KBM (Kohjin Bio 社)、NIM (日本農産社)、SF900III (Invitrogen 社)、サプリメント不含グレース培地 (Invitrogen 社) を用い、28°C で培養した。JEV 抗原を連続発現する expresSF+細胞は、10 µg/ml のプラスチジンを添加した BacVecor を用いた。対照として JEV の prM/E 遺伝子を安定的に発現する CHO 細胞として、すでに構築した F 細胞 (Konishi et al., *Journal of Virology* 75, 2204-12, 2001) を用いた。F 細胞は、10% FBS 添加イーグル MEM 培地を用いて 37°C で培養した。ウイルス: JEV 中山株を感染させた C6/36 細胞培養液を、生化学的解析また中和試験の抗原として用いた。プラスミド: expresSF+細胞における発現に使用したプラスミドは、平成 20 年度に報告した pIBJEEP である。これは、平成 19 年度に報告した昆虫細胞発現用プラスミド pIB/V5-His ベクター (Invitrogen 社) に、JEV の prM と E 遺伝子を挿入したものである。ただし、prM の開裂に伴う E の配置転換による融合活性の獲得が安定発現細胞株の樹立に障害をもた

らすため、細胞内酵素フリンによる prM 上の割断部分に存在するアミノ酸モチーフ RSRR を TSRR に改変し、開裂を抑制するようにしている。JEV 抗原を安定発現する細胞 (exJE 細胞) の樹立: pIBJEEP を expresSF+細胞に FuGENE (Roche 社) を用いて導入し、24 時間後にプラスチジン[®]を 10 μ g/ml 添加した。導入 72 時間後に直径 100 mm の培養シャーレに 5×10^5 細胞を移し、コロニーが目視できるまで培養を行った。形成されたコロニーを 96 穴培養プレートに継代し、順次培養面積を増やし、25 cm^2 フラスコまで増殖させた後、継代毎に培養上清中の E 抗原量を測定した。なお、導入 24 時間以後は常にプラスチジン 10 μ g/ml 添加培地を用いた。密度勾配遠心: 10–40% の蔗糖密度勾配液上に重層して超遠心後、20 分画を得た。EP の精製: exJE 細胞を 2×10^5 /ml となるように 75 cm^2 フラスコに播種し、3 日後にほぼ 100% コンフルエントとなったことを確認し、培養液を BacVector から正常マウス血清を 1% 添加したサプリメント不含グレース培地へ置き換えた。培地交換から 2 日後の培養上清を、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により EP を精製した。すなわち、培養液に 10% PEG、1.9% NaCl を添加し、4°C で 2 時間保温して沈澱させた。この沈澱を TN 緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]、100 mM NaCl) に溶解し、10–40% ショ糖密度勾配により分画した。抗原量測定のサンドイッチ ELISA: JEV に対するウサギポリクローナル血清を感作したマイクロプレートに、抗原検体、JEV の E 特異的 JE-10B4 抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG、パラニトロフェニルリン酸を順に反応させた。E 抗原スタンダードから、未知試料の抗原量を計算した。E 抗原スタンダードの蛋白量は、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準蛋白として、電気泳動後の銀染色により E 蛋白バンドの色調と比較することにより求めた。モノクローナル抗体に対する反応性の比較: 比較対象の抗原を精製した後、96 穴マイクロプレート (Maxisorp; Nunc) に感作した。1:1000 に希釈した E 特異的モノクローナル抗体のパネル (J3-11B9、J3-10E1、J3-11H7、J3-12H11、JE-10B4) と反応させた後、AP 標識抗マウス IgG 抗体、基質としてパラニトロフェニルリン酸と順次反応させ、415 nm における吸光度を測定した。精製抗原に含まれる夾雑物の検出: exJE 細胞の培養上清から、PEG 沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により精製した蛋白を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 後、銀染色またはクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色により検出した。ウエスタ

ンブロット: exJE 細胞の培養上清から、PEG 沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により精製したウイルス蛋白を SDS-PAGE の後、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜に転写した。転写された蛋白を exJE 細胞由来抗原を免疫したマウス血清、抗 E 抗体 (JE-10B4、J3-11B9 抗体)、抗 M 抗体 (J2-2F1) または JEV 過剰免疫マウス腹水 (HMAF) で染色した。マウス実験: 精製 EP (1–10 μ g) を単独、あるいはアジュバントである CpG モチーフを含む pcDNA3 (100 μ g) またはアラム (Alu-Gel-S; SERVA 社) と混合し、液量を 50 μ l に調整し、4 週令の雄 C3H/He マウス (各群 5 匹) に 3 週間隔で 2 回、右大腿部に筋肉内投与した。アラムアジュバントは EP の 1 μ g に対し 1 μ l の比率で混合し、室温で 1 時間攪拌し吸着させた。初回投与後 5 週後に眼窩静脈叢から採血し、プール血清を用いて中和抗体価を測定した。中和試験: Vero 細胞を用い、70% フォーカス減少法で抗体価を求めた。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号、平成 18 年 6 月 1 日)に基づき、実験実施機関において動物愛護倫理規程に則り申請・承認を受けて実施した。

C. 研究結果

(1) VLP 形成技術による WNV ワクチンの開発

CHO-WN12S 株の WNV 抗原発現量: 無血清培地に馴化した CHO-WN12S 浮遊系細胞の維持継代中に産生する抗原量を、10% FBS 添加培地で継代されている CHO-WN12 接着系親細胞と比較した。無血清培地馴化により血清添加培地継代親細胞に比べ培地中の抗原量は低下していたものの、樹立後 30–60 代という長期間継代でも $\sim 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の WNV 蛋白相当の抗原量を低下することなく安定に産生していた。また、細胞増殖にも変化は認められなかった。

CHO-WN12S 細胞株が産生する WNV 抗原の解析: CHO-WN12S 細胞が産生する WNV 抗原を CHO-WN12 親細胞の産生抗原と比較検討した。両細胞株とも細胞内に E 及び prM 構造蛋白を産生していた。一方、細胞外の培養上清中に放出された抗原は、E 蛋白と、prM 蛋白切断で生成される成熟 M 蛋白で構成され、prM 蛋白はマイナーであった。この点は、WNV 感染による Vero 細胞内のウイルス蛋白とも、細胞外ビリオンの蛋白構成とも同一のパターンであった。

WNV の E、prM 蛋白は糖修飾を受けている。そこで、CHO-WN12S 細胞が発現する E 及び prM 蛋白の糖鎖付加状態について、すべての N-結合型糖鎖を

切断する PNGase F と、未成熟な高マンノース型糖鎖を切断する Endo Hf 酵素処理により検討した。その結果、CHO-WN12S 細胞が産生する E, prM 蛋白は、細胞内では未成熟型の糖鎖修飾状態にあり、細胞外に放出されると成熟型糖鎖修飾に転換されていた。即ち、糖修飾においてもウイルスと同様であることが示された。

産生 WNV 抗原の蔗糖密度勾配遠心法による解析と電子顕微鏡観察：CHO-WN12S 細胞の培養上清から濃縮・粗精製した WNV 抗原を電子顕微鏡観察したところ、直径 40~50 nm のウイルスサイズの球形粒子と 20~30 nm の SHA サイズの小型球形粒子が観察された。また、遺伝子導入されていない対照の CHO-S 細胞にも認められる不定形な小型小胞ないしは細胞膜小胞構造も多数認められた。この WNV 抗原を平衡蔗糖密度勾配遠心法で分画し、~30%蔗糖 (d=1.15) 画分に単一ピークを形成した抗原を観察したところ、WNV 抗原に直接 30%蔗糖を添加したとき形成される小型凝集構造と同一の凝集構造に粒子形態が変化していた。

沈降速度法で分画される大小 2 種の WN-VLP：上記のように平衡蔗糖密度勾配遠心法では球形 VLP 抗原が凝集構造に変化してしまうため、5-20%低濃度蔗糖密度勾配を用いた沈降速度法で VLP 抗原の分画を試みた。その結果、VLP 抗原は 18%蔗糖画分 (d=1.07) に速やかに (Fast) 沈降する VLP と、10%蔗糖画分 (d=1.07) に緩やかに (Slow) 沈降する VLP の 2 つのピークを形成することが見出された。

そこで、濃縮 VLP 抗原を 0/13/20%不連続蔗糖密度勾配遠心法で分画した。その結果、連続密度勾配沈降速度法と同様に、該当する蔗糖濃度画分に Fast と Slow の VLP が別々のピークとして回収された。これら Fast/Slow ピーク画分を電子顕微鏡で観察したところ、前者はビリオンサイズ (40~50 nm) の大型 VLP で、後者は SHA サイズ (20~30 nm) の小型 VLP であった。なお、不定形な小型小胞構造は Slow 画分に共存していた。この F-VLP と S-VLP の構成蛋白をウエスタンブロットで解析したところ、F-VLP は E と成熟 M 蛋白からなる成熟ビリオン型で、S-VLP は E と未成熟 prM からなる SHA 型であった。S-VLP 画分には CHO-S 細胞由来蛋白も混入していた。

F-VLP と S-VLP の免疫原性：本研究で新たに見出された上記 2 種 VLP (F-VLP, S-VLP) の免疫原性についてマウスを用いて検討した。F-VLP 免疫マウスでは 30, 90, 270 ng と投与量が増加するに伴い誘導されるウイルス中和抗体価が上昇した。これに対して、S-VLP 免疫では 30 ng から 90 ng に投与抗原量を増加させると逆に中和抗体価は低下

し、270 ng の抗原量でも抗体価の上昇を惹起できなかった。

同様の傾向は ELISA で測定された IgG 抗体価においても認められた。S-VLP の抗体誘導能は F-VLP よりも低く、270 ng の高抗原量でも抗体価の上昇は認められなかった。さらに興味深い点は、ウイルス感染や不活化精製 WNV の免疫で IgG2a 抗体応答が IgG1 より顕著に高く誘導されたが、このような IgG2a アイソタイプ優位な抗体応答が F-VLP では誘導されたのに対して、S-VLP 免疫では認められなかった。

F-VLP と S-VLP の感染防御効果：中和抗体誘導や IgG2a 優位抗体応答誘導で違いの認められた F-VLP と S-VLP 抗原の感染防御効果を比較した。

フラビウイルスのマウス感染系では攻撃ウイルス量と致死率の相関関係が成り立たないマウス系統も存在するため、幾つかの系統を調査し C3H/He を選択した。6 週齢 C3H/He マウス腹腔に $10^0 \sim 10^3$ pfu の WNV を接種し、2 週間観察したところ、 10^2 と 10^3 接種マウスは 10 日以内に全匹死亡した。他方、 10^1 pfu では 20%の生存率であり、1 pfu を接種したマウスは何ら臨床症状を示さず全匹生存した。

そこで、90 ng の VLP 抗原で免疫した C3H/He マウスに 10^3 pfu (~ 200 LD₅₀) の WNV を感染させたが、F-VLP 免疫群も S-VLP 免疫群も全匹生存した。しかし、免疫抗原量を 3 ng に低下させた場合には、F-VLP 免疫群の生存率は 83% (6 匹中 1 匹死亡) であったのに対して、S-VLP 免疫群では 17% (6 匹中 5 匹死亡) であった。

(2) 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

細胞の発現安定性：コロニーから増殖させた細胞が安定的に E 抗原を発現し続けるかを、20 継代まで調べた。10 μ g/ml のプラスチジン添加により、10~20 代目にはワクチン当量として 40~60 μ g/ml 前後の E 抗原が安定して得られた。以後この細胞を exJE 細胞と称する。

exJE 細胞により発現された E 抗原のエピトープ解析：モノクローナル抗体のパネルを用いて哺乳類細胞由来の E 抗原と反応性を比較した結果、OD 値の比率はほぼ同等であり、両細胞由来の E 抗原が同様のエピトープを有していることが示された。

夾雑物の検出：exJE 細胞の培養上清 (BacVector 培地) から、PEG 沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により精製した抗原に含有される蛋白を、SDS-PAGE 後に銀染色を行い検出した。その結果、JEV 蛋白以外に主として 3 種のバンドが検出され、その総量

はE抗原のおよそ3倍であった。さらに同抗原(2.5-20 µg)をマウス腹腔内に投与し、投与3週後の血清中に含まれる抗体をウェスタンブロットにより解析した。誘導された抗体の多くはE蛋白ではなく、精製過程で除去できなかった夾雑物に対するものであることが示された。また、夾雑蛋白はマウスにおいて免疫原性を有し、immune interferenceによりE抗原に対する抗体の誘導を阻害する可能性があり、exJE細胞由来E抗原のマウスモデルにおける評価に影響することが示唆された。

夾雑物除去法の検討：夾雑蛋白は培養液に由来することが想定される。それを確認するために、昆虫細胞用培養液を限外濾過法によって100倍濃縮し、含有蛋白を銀染色により検出した。その結果、全ての培養液に、精製抗原に認められた夾雑蛋白に対応する蛋白が検出された。夾雑蛋白を除去するためには、基本的なPEG沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法他に異なる精製過程を加えることが考えられるが、単に夾雑物を含まない細胞培養液を原材料として用いることも有用な手段である。そこで、無血清・無蛋白培地である、サプリメント不含グレース培地(グレース)に安定剤として正常マウス血清を1%添加した培養液を使用し、PEG沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により抗原を精製した。精製後の抗原を2倍階段希釈し、CBB染色により半定量を行った結果、E抗原が主要な蛋白であることが示された。また、E蛋白以外にバンドが認められるが、マウス血清由来の蛋白であるので、精製E抗原のマウスにおける免疫原性の評価には影響しないと考えられる。さらに、抗E抗体、抗M抗体及びHMAFを用いたウェスタンブロットにより、グレース培地中においても抗原が壊変していないことを確認した。

マウスにおける免疫原性：グレース培地を用いて得た精製EPの免疫原性、及びアジュバントの有用性を、マウスを用いて評価した。アジュバントとしてpcDNA3プラスミド(遺伝子アジュバントであるCpGモチーフを含む)またはアラムを用い、3週間隔で2回投与した。初回免疫後5週目の中和抗体価について検討した。その結果、蛋白単独では10 µg投与群においても中和抗体が検出されなかったが、アジュバントとしてpcDNA3を添加した群では1:20、アラムを添加した群では1:160の中和抗体価が認められた。

D. 考察

(1) VLP形成技術によるWNVワクチンの開発

JEワクチンは平成21年にVero細胞培養不活化

新ワクチンが認可され販売が開始された。これによりJEVに対する基礎免疫を持たない小児人口の拡大が抑えられ、JE再流行の懸念は一先ず回避されよう。JEVと極めて近縁なWNVについても新JEVワクチンと同様の工程で不活化WNワクチン開発が委託企業の微研会で進められており、有効性に関する成績が蓄積されつつある。

しかし、Vero細胞由来不活化ワクチンの製造には感染性ウイルスの大量培養が必須であるため、製造工程には危険性が伴う。また、安全性を保証する特殊な封じ込め施設・設備が必要であり、コストへの圧力要因となる。本課題ではBSL-2レベルのJEV、BSL-3レベルのWNVについて、「感染性ウイルスを用いない/特殊な封じ込め施設が不要な」安全/安価な製造を担保するワクチン開発研究を受託し/分担した。

従って、本課題の基本戦略は「表面はウイルス粒子と同等で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性VLP」を我々の新技術でワクチン抗原に開発することである。そのためには、①ウイルスのprM-E遺伝子を恒常的に発現し、②E、prM/M蛋白からなるVLPを大量に産生する、③安定な持続細胞株を、「④バイオ医薬品製造国際基準に合致した細胞株から」、樹立する必要がある。なぜなら、ヒト用ワクチンに認められる細胞を用いない限り、どれほど優れたVLP抗原を開発しても、研究段階に止まったまま実用化できないからである。

Vero細胞は当然承認細胞株であるが、JE-/WN-VLPはVero細胞にアポトーシスを誘導するため、VLP発現Vero細胞は死滅する。即ち、持続発現する安定なVero細胞株の樹立はウイルス学的・論理的に矛盾であることを、我々も研究分担者の小西らも既に論文で報告している。そこで本研究では、ヒト用医薬品製造に認められたCHO細胞を基にしたJE-/WN-VLP開発に初年度から取り組んできた。

本年度報告の結果は、持続発現細胞より産生されたWN-VLP、JE-VLPが有望な次世代ワクチン抗原になり得ることを示しているだけでなく、中和抗体が感染防御の主体となるウイルスワクチン開発一般に波及しうる新たな概念を示唆している。即ち、中和抗体の標的はウイルス表面のアミノ酸1次配列でなく、立体的3次構造エピトープであることを最近の構造生物学は提唱している。従って、E蛋白よりはVLP、そのVLPもウイルスに近似した形態の成熟VLPであればあるほど、高いワクチン有効性が期待できよう。

結果の項に示したように、本研究で初めて見出された大小2種のWN-VLPのうち、F-VLPはプロセスされた成熟型MとEから構成されるウイルスサ

イズ粒子であり、中和抗体誘導に優れ、高い感染防御能を示した。加えて、WNV 感染では IgG2a 優位の抗体応答が誘導されることも示し、F-VLP が誘導する抗体は不活化ワクチン同様 IgG2a 優位であることから、エピトープ構造もビリオン型の粒子抗原であることを示唆した(投稿中)。他方、JE-VLP においても同様な VLPs の存在が示唆されており、有効性の高い VLP 精製法開発が今後一層の重要性を増してこよう。

(2) 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に、近年注目されている。昆虫細胞は哺乳類細胞に比べ生物学的分類上大きく異なるため、ヒトに対して病原性を有する微生物等が混入する可能性が極めて低いこと、高密度培養が一般的に容易であり、蛋白の大量製造が可能であることが挙げられる。こうした理由から、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。

本事業では、JEV に対するワクチン製造への昆虫細胞の利用について検討を行ってきた。3 年目となる本年度は実用化に向け、抗原産生量の高い細胞株の樹立、EP の抗原性のさらなる解析、抗原の精製法、免疫原性、およびアジュバントの効果について検討を行った。

抗原産生量の高い細胞株の樹立と抗原性の解析：薬剤選択により安定的に E 抗原を発現する細胞を得ることができたが、さらに高い産生量を得るために改良を行った。細胞株を樹立する際に一般的に用いられる限界希釈法が expresSF+ 細胞には適さなかったため、コロニー選択により exJE 細胞を得た。exJE 細胞からはワクチン当量で 40~60 µg/ml の E 抗原が安定して得られた。これは平成 20 年度に報告した安定発現細胞よりも約 5 倍高い値であり、高密度培養を行った場合、実用化に十分な抗原が得られると考えられる。さらに、パネル抗体を用いた抗原性の解析により、exJE 細胞から得られた E 抗原が、哺乳類細胞を用いて樹立した安定発現細胞から得られた E 抗原と同様のエピトープを有していることが示された。

昆虫細胞由来 EP の精製法の検討：昆虫細胞培養液には種々市販品があり、無血清培地ではあるが蛋白は含まれており、その成分は公表されていない。通常の PEG 沈殿法による濃縮後、蔗糖密度勾配遠心法を用いる精製法では、最終産物にかなりの夾雑蛋白が含まれた。EP の免疫原性に与える影響や副反応を起こす可能性も考えられるため、電気

泳動による蛋白検出に基づき、精製法を検討した。その結果、グレースの培養液(無血清、無蛋白)に、安定剤として正常マウス血清を 1% 添加した培養液を用いることで、問題となる夾雑蛋白を除去することが可能であった。

昆虫細胞由来 EP の免疫原性とアジュバントの効果：exJE 細胞由来 EP は、蛋白単独ではマウスに中和抗体を誘導することができなかった。これは平成 19 年度に報告した、Sf9 細胞由来 EP よりも抗原性が低いことを示唆する。しかし、最近の市販マウスの JEV に対する感受性は低下する傾向にあり、この点は今後の検討を必要とする。一方、アジュバントを使用したマウスにおいては高いレベルの中和抗体誘導が認められ、ワクチン蛋白として有用であることが示された。アジュバントを比較すると、アラムが遺伝子アジュバントよりも高い効果を示し、3 µg の E 抗原投与でも 1:40 の中和抗体を誘導した。アラムはヒト用ワクチンへの使用が認められている唯一のアジュバントであり、多くのワクチン製造に用いられている。昆虫細胞由来 EP は、アラムの使用により低ドーズでも中和抗体を誘導できたことから、安全なワクチン製造に使用できる可能性が示された。

E. 結論

(1) 小島・東らは連携・分担し、ヒト用医薬品製造に承認された CHO 細胞を用いて樹立・無血清培地に馴化させた CHO-WN12S 細胞が、成熟ビリオン型と未成熟 SHA 型の大小 2 種の VLP を産生することを本研究で初めて見出した。前者の VLP は中和抗体及び WNV 感染に特徴的な IgG2a 抗体応答の誘導、感染防御効果に優れていることをマウス免疫/感染実験で示し、有効性の高いワクチン抗原になり得ることを示唆した。

(2) 小西らは、ヒト用ワクチン製造用に認可された昆虫由来 expresSF+ 細胞を用いて、CHO 細胞を凌ぐ大量の JE-EP を産生する細胞の樹立に成功した。この JE-EP 抗原が JEV と同等のエピトープを有すること、マウスに中和抗体誘導することから、ヒト用ワクチンとして有用であることを示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi, H., Ohtaki, N., Maeda-Sato, M., Tanaka, M., Tanaka, K., Sawa, H., Ishikawa, T., Takamizawa, A., Takasaki, T., Hasegawa, H., Sata, T., Hall, W., Kurata, T. and Kojima, A.: Effects of the number of amino acid residues in the signal segment upstream or downstream of

the NS2B-3 cleavage site on production and secretion of prM/M-E virus-like particles of West Nile virus. *Microbes Infect.* 11: 1019-1028, 2009.

Konishi E, Sakai Y, Kitai Y, Yamanaka A: Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, with a small pig population. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:856-61.

Yamanaka A, Konishi E: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. *Vaccine.* 2009;27:3735-43.

Konishi E, Kitai Y: Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans. *Vaccine.* 2009;27:7053-8.

Konishi E: Status of natural infection with Japanese encephalitis virus in Japan: prevalence of antibodies to the nonstructural 1 protein among humans and horses. *Vaccine.* 2009;27:7129-30.

Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A: A simple assay system for infection-enhancing and -neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods.* 2010;163:360-7.

Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Utsumi T, Amin M, Lusida MI, Soegijanto S, Konishi E: Prevalence of Antibodies to Japanese Encephalitis Virus among Pigs in Bali and East Java, Indonesia, 2008. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2010;63:58-60.

Konishi E, Kitai Y, Tabei Y, Nishimura K, Harada S: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination program. *Vaccine.* 2010;28:2664-70.

2. 学会発表

Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi and Eiji Konishi: A method to measure both infection-enhancing and neutralizing antibodies against dengue type 2 virus using K562 cell layers. Forty-third Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan

Cooperative Medical Science Program, Philadelphia, 2009年7月

Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Development of a method to measure both infection-enhancing and neutralizing antibodies against dengue virus, and its application to clinical samples. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, 2009年9月

Atsushi Yamanaka, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Relationship between complement activity and disease severity in dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Indonesia. The International Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, 2009年9月

菊川明子、藤田武、五味康行、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信、東雍、大滝尚広、高橋秀宗、佐多徹太郎、小島朝人：ウエストナイルウイルス様粒子 (WN-VLP) の性状解析. 第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月、千歳.

山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、小西英二：インドネシアのデング熱・デング出血熱患者における血清中の総補体価CH50の測定. 第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月、千歳.

北井陽子、原田誠也、西村浩一、田部井由紀子、小西英二：NS1抗体測定による近年の日本脳炎ウイルス自然感染率の調査. 第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月、千歳.

桑原三和、小西英二：昆虫細胞由来フラビウイルス蛋白の診断およびワクチン抗原への適用. 第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月、千歳.

大滝尚広、高橋秀宗、石川豊数、東雍、佐多徹太郎、小島朝人：ウエストナイルウイルス様粒子抗原の形態が免疫原性に与える影響. 第13回日本ワクチン学会学術集会、2009年9月、札幌.

山中敦史、Kris Cahyo Mulyatno、Helen Susilowati、Eryk Hendrianto、Takako Utsumi、Mochamad Amin、Maria Inge Lusida、Soegeng Soegijanto、小西英二：2008年インドネシアのバリ及び東ジャワ州の飼育ブタを対象とした日本脳炎抗体保有状況調査. 第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月、東京.

田淵裕子、山中敦史、小西英二：準接着系K562細胞を用いたデング2型ウイルスに対する感染増

強活性及び中和活性の同時測定法。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月、東京。

大滝尚広、高橋秀宗、金子(田中)恵子、石川豊数、東 雍、佐多徹太郎、小島朝人：ウエストナイルウイルス様粒子ワクチンの開発：粒子形態が免疫原性に与える影響。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月、東京。

山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、小西英二：インドネシアのデング熱・デング出血熱患者における補体活性と重症化の関係。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月、東京。

宮川優子、小西英二：デングワクチンがマウスに誘導する中和及び感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月、東京。

小西麻由、小西英二：日本脳炎ウイルス抗体をデングウイルス抗体から識別するブロッキングELISA法の確立。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月、東京。

瀧澤山人、小西英二：デング2型ウイルスによる前免疫がデング4価DNAワクチンの免疫原性に及ぼす影響。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月、東京。

田淵裕子、山中敦史、小西英二：デング流行地のヒトが保有するデングウイルス感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月、東京。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

該当事項なし。

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

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

研究期間 平成 19 年 4 月～平成 22 年 3 月

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。HDL 生産に最重要の肝 ABCA1 の肝特異的転写制御をはじめて見だし、血管壁の酸化傷害と動脈硬化進展のプロセス、炎症性急性期タンパク SAA のアミロイドーシス誘発への ABCA1 と HDL の関与、胆汁酸吸着樹脂のコレステロール・糖代謝改善作用、胆汁酸を生理リガンドとする FXR とエネルギー消費刺激の GPCR/TGR5 リガンド構造活性に重要な知見を得た。

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

今日の日本において、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の重点的対策は国民的課題である。本研究では、薬が実用化されていない危険因子「低 HDL 血症」を中心に、血管壁の「炎症・食食反応」「脂質沈着」「石灰化」メタボリックシンドロームの最主要危険因子「肥満」について、複数のリスクを同時にコントロールする新たな予防治療薬への貢献をめざし、コレステロールとその代謝産物である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。

HDL コレステロール低下は動脈硬化の危険因子であり、メタボリックシンドロームの他因子によりリスクは相乗的に高まる。心筋梗塞患者の 1/3 では LDL コレステロールは正常で、HDL 低下が大きく注目される。低 HDL 血症は日本人の 10～20%に認められるが、

HDL を直接上昇する薬は開発されていない。本研究では有望標的である HDL 欠損症の原因遺伝子 ABCA1 について、①血中 HDL の8割を生産する肝の ABCA1 の特異的な遺伝子転写制御、②核内受容体の発現制御解明とリガンド設計により、HDL 上昇手段を探る。

HDL は全身性炎症時に肝が生産する serum amyloid A (SAA) をアポ A-I の代わりに取り込み血中を運ぶ特異な役割も持つ。本研究では SAA-HDL の形成と、(SAA が遠隔臓器に沈着して誘発する)アミロイドーシス発症における ABCA1 の役割を解明する。また、酸化 LDL の血管壁への沈着と動脈硬化進展との関係、血管石灰化の新たな制御を明らかにする。

HDL は末梢の血管壁細胞からコレステロールを引き抜き、肝臓に運んで胆汁酸への分解と体外排出を促し動脈硬化を防ぐ。胆汁酸吸着樹脂は経口投与するとコレステロールの胆汁酸への分解を促進するとともに、肥満抑制と血糖を改善する。本研究ではメカニズム解明をめざし、胆汁酸センサーである核内受容体 FXR の腸管と肝での機能に着目して解析する。また胆汁酸をリガンドとしてエネルギー消費を刺激する G 蛋白共役受容体(GPCR)/TGR5、および FXR について胆汁酸誘導体の構造活性相関を検討し、有効なリガンド設計の基盤を創製する。

B. 研究方法

HDL 形成責任遺伝子 ABCA1 の転写制御は、ラット・マウス・ヒト各組織に発現する ABCA1 mRNA の非翻訳領域を解析し、組織特異的な mRNA とプロモー

ター領域、転写制御因子とその制御を同定した。SAA-HDL やアミロイドーシス形成、細胞食作用における ABCA1 や ABCA7 の役割は、細胞への発現と欠損マウスを用いて解析した。

核内受容体はコレステロール代謝物感受性の LXR、胆汁酸代謝物感受性の FXR、脂肪酸感受性 PPAR、甲状腺ホルモンレセプター、およびこれらとヘテロダイマーを形成する RXR について、ABCA1 発現・HDL 産生、胆汁酸合成輸送系、脂質沈着や石灰化などの血管病態での機能を解析するとともに、選択的リガンド設計・合成を行った。胆汁酸感受性 GPCR/TGR5 と FXR の構造活性相関を検討した。

血管病態は動脈硬化モデル apoE(-/-)マウス、甲状腺機能低下モデルラット、エネルギー代謝は 2 型糖尿病モデル KKAy マウスで検討した。(倫理面への配慮) 当研究においては、ヒト組織由来の材料は全て連結不可能匿名化された市販品を使用し、倫理上の問題はないと考える。動物の取り扱いには「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」等、各研究機関の指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて行った。

C.D. 研究成果および考察

1. ABCA1 発現制御による HDL 産生促進

HDL の大部分をつくる肝 ABCA1 は、コレステロールに負・正に応答する肝特異的型 (SREBP2 依存) と末梢共通型 (LXR 依存) の二つのプロモーターの働きで発現が制御されること、ラット肝コレステロール低下は肝型プロモーター活性化と HDL 上昇をもたらすことを初めて見いだした (Tamehiro, *J Biol Chem* 2007)。肝は末梢から HDL が運び出すコレステロールを胆汁酸に転換・排出する処理工場であり、肝の ABCA1 はコレステロールの少ない HDL を形成し、末梢でのコレステロール受容に送る役割をもつ。アクセルとブレーキの二重制御システムには、コレステロールの急増・急減から肝の ABCA1 を守る目的が推定される。ラットで見いだしたこの肝型二重制御はマウス・ヒトにも共通する。ヒトでは遺伝子構造の違いから、ヒト肝特異的な転写産物が存在しており、より高度で複雑な制御が予想される。

またマクロファージで ABCA1 発現を細胞選択的に促進する核内受容体 RXR リガンドを発見し (Nishimaki-Mogami, *Biochem Pharmacol* 2008)、LXR α 選択的アゴニストである Riccardin C をリード化合物として、その効率的合成法の確立と、それに基づく新規誘導体の合成を行った。また Riccardin C の立

体構造を再現する非環式誘導体の創製を行った。

細胞周期を制御する転写因子 AP2 α のリン酸化が ABCA1 転写を抑制し (Iwamoto, *Circ Res* 2007)、PKD による機能的リン酸化阻害が ABCA1 発現と HDL 産生を高めること (Iwamoto, *ATVB* 2008)、PPAR アゴニストは LXR 発現を介し ABCA1 を上昇するが、その際 LXR と PPAR に相互転写増幅ループがあることを発見した (Ogata, *Atherosclerosis* 2009)。

ABCA1 タンパクは半減期が短く、分解制御も発現量に大きく影響する。ABCA1 分解の制御機構を明らかにした (Lu, *ATVB* 2009)。また、スピロキノンとジフェノキノンがカルパインによる ABCA1 分解を阻害することを見いだし この薬物が in vivo で血漿 HDL を増加させ、コレステロール負荷家兎で動脈硬化進展を抑制することを見いだした (Arakawa, *J Lipid Res* 2009)。また、ピタバスタチンは PPAR α 活性化を介して ABCA1 安定化による発現促進を示すことを見いだした。

HDL を産生する ABCA1 と細胞コレステロール流失に必須の LCAT はコレステロールの逆転送系の二大因子である。二重欠損マウスでは HDL 代謝回転は促進されたものの、臓器へのコレステロール蓄積に変化は認められず、コレステロール逆転送には何らかの代償となるバイパスが示唆された (Hussain *BBA*, 2009)。

2. 血管病態(炎症・食食・脂質沈着・石灰化)の制御と動脈硬化

炎症タンパク SAA はアポ A-I と構造が類似し、血中では HDL に組み込まれて存在する。SAA-HDL 形成には ABCA1 が関わり、LPS で発現誘導される SAA は ABCA1(-/-)マウスでは遊離のかたちで血中に出現し、速やかに消失した (Hu, *J Lipid Res* 2008)。また、SAA-HDL は脾臓など遠隔臓器に沈着し、アミロイドーシス発症に影響することを ABCA1(-/-)マウスで示した。

一方、ABCA7 は ABCA1 に高い相同性を持ち、コレステロールで負に転写抑制される。ABCA7 は細胞の食食を制御することを欠損マウスを用いて明らかにした (投稿中)。

動脈硬化モデル apoE-KO マウスの大動脈硬化病巣は、20~40週に3%~約35%に急増する。血漿酸化 LDL は 20 週に一過的に大きく上昇した。動脈硬化病巣の進展に先立ち血漿酸化 LDL の上昇が見られたことから、酸化 LDL が動脈硬化進展の引金になりうる可能性が示唆された。また、血漿酸化 LDL の上

昇に先立ち、大動脈組織に、酸化リン脂質や脂質過酸化で生じるアクロレインの沈着が検出され、LDLの酸化変性が組織において起こる可能性が示唆された(Kato, *ATVB* 2008)。また、中性脂肪蓄積制御に関して、細胞内脂肪滴局在タンパク質 ADRP の発現に RXR と生理リガンド DHA の役割を明らかにした(Suzuki, *Biol Pharm Bull*, 2009)

生理的濃度の甲状腺ホルモンは、大動脈平滑筋細胞で甲状腺ホルモン核内受容体を介してエラスチンおよびリジロキシダーゼ、DANCE (Fibulin-5) 遺伝子 (Fbln5) 発現を促進し、不溶性エラスチン線維の合成促進により血管弾性を維持すること、甲状腺機能低下症モデルラットの動脈ではこれら遺伝子の発現低下とともに弾性が低下することを明らかにした(佐藤、生体機能と創薬シンポジウム 2009)。

3. 胆汁酸とその受容体によるコレステロール・エネルギー代謝制御

胆汁酸吸着樹脂は小腸からの胆汁酸の再吸収を抑制し、胆汁酸センサー FXR の活性を低下し、肝ではその下流の SHP 発現抑制を介して胆汁酸合成酵素 CYP7A1 の遺伝子発現を増強するとともに、解糖系の pyruvate kinase の発現を上昇し、また小腸では(肝臓に作用し CYP7A1 を抑制する) FGF15 の発現を低下させた。このように腸管のみで働く胆汁酸吸着樹脂が胆汁酸の腸肝循環や液性因子を介して肝の糖脂質代謝に影響し、血清コレステロール低下に加えて血糖を改善する作用機序が推定された。この成果は腸管を起点とする全身性の糖・脂質代謝の解明の新たな端緒となり薬剤開発に応用できるものと期待される。

胆汁酸は GPCR/TGR5 のリガンドとしてエネルギー消費を刺激することが近年報告され、FXR を抑制的に TGR5 を活性化するリガンドが、胆汁酸吸着樹脂に類似した有用な作用を発揮すると期待される。胆汁酸誘導体の構造活性相関を検討し、側鎖水酸基の立体が FXR 活性に重要であること(Iguchi, *Steroids* 2009)、7 位アルキル基導入により TGR5 に親和性が高まることを見いだした(Iguchi *J Lipid Res*, in press)。

E. 結論

HDL 生産に最重要の肝 ABCA1 の肝特異的転写制御、核内受容体制御による ABCA1 発現促進、血管壁の酸化傷害と動脈硬化進展のプロセス、炎症性急性期タンパク SAA のアミロイドーシス誘発に

ABCA1 と HDL が深く関わること、FXR と TGR5 リガンド構造活性などに重要な知見を得た。これらの知見は、メタボリックシンドローム治療薬創製に大きく貢献することが期待される。

F. 研究発表

論文発表

1. Iguchi Y, Kihira K, Nishimaki-Mogami T, Une M Structure-activity relationship of bile alcohols as human farnesoid X receptor agonist. *Steroids*. 75: 95-100 (2009)
2. Iguchi Y, Yamaguchi M, Sato H, Kihira K, Nishimaki-Mogami T, Une M. Bile alcohols function as the ligands of membrane-type bile acid-activated G protein-coupled receptor *J Lipid Res*. 2009; in press
3. Lu R, Ito J, Iwamoto N, Nishimaki-Mogami T, Yokoyama S, Fibroblast growth factor-1 induces expression of LXR α and production of 25-Hydroxycholesterol to up-regulate apolipoprotein E gene transcription in rat astrocytes. *J. Lipid Res* (2009) 50: 1156-1164
4. 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 *Atherosclerosis* (2009) 205: 413-419.
5. Arakawa R, Tsujita M, Iwamoto N, Ito-Ohsumi C, Lu R, Wu CA, Shimizu K, Aotsuka T, Kanazawa H, Abe-Dohmae S, Yokoyama S. *J Lipid Res*. (2009) 50:2299-305
6. Hossain MA, Tsujita M, Akita N, Kobayashi F, Yokoyama S. Cholesterol homeostasis in ABCA1/LCAT double-deficient mouse. *Biochim Biophys Acta*. (2009) 1791:1197-1205
7. 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) 29:33-39.
8. Suzuki, K.; Takahashi, K.; Nishimaki-Mogami, T.; Kagechika, H.; Yamamoto, M.; Itabe, H. Docosahexaenoic acid induces adipose differentiation-related protein through activation of retinoid X receptor in human choriocarcinoma BeWo cells. *Biol. Pharm. Bull*. (2009) 37:1177-82

9. Tanabe S, Sato Y, Suzuki K. Characteristics of stem cells based on expression profile of molecular markers. *Res. Adv. in Biochemistry*. (2009) 1-8.
10. 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.
11. 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.* (2008) 28: 2282-2287.
12. 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.
13. 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.
14. Itabe H.: Oxidative modification of LDL: Its pathological role in atherosclerosis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* (2008) E-pub ahead of print
15. Yokoyama S. HDL Biogenesis and Cellular Cholesterol Homeostasis. *Annals of Medicine* (2008) 40: 29-38
16. Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Takeya T, Okuhira KI, Suzuki K, Sato R, Nagao T, Nishimaki-Mogami T: Sterol responsive element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABCA1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J Biol Chem* (2007) 282: 21090-21099
17. Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Ayaori M, Tanaka N, Kusahara M, Ohsuzu F, Yokoyama S.. ATP Binding Cassette Transporter A1 Gene Transcription is Down-Regulated by Activator Protein (AP) 2 α : Doxazosin Inhibits AP2 α and Increases High-Density Lipoprotein Biogenesis being Independent of α 1-Adrenoceptor Blockade. *Circ Res* (2007) 101: 156-165
18. 最上(西巻)知子: 核内受容体FXR:胆汁酸と関連代謝物による活性 制御と創薬への可能性: 臨床化学 36, 197-204 (2007)

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 |

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。①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、ヒト肝特異的な転写産物を同定、ピタバスタチンがPPAR α を介してABCA1タンパク安定化作用を示す発現上昇機序、PPAR-LXR相互転写増幅ループによる末梢ABCA1発現促進、カルパイン分解抑制薬物のABCA1発現促進が示すHDL上昇と動脈硬化抑制などを発見、LXR選択的リガンドRiccardin Cの効率的合成法の応用により、HDL上昇薬の基盤創製に貢献した。②血管病態の制御に関して、アポA-IとA-IIのABCA7分解抑制による細胞食作用増強、細胞への脂肪蓄積の核内受容体による制御を見だし、動脈血管の弾性と石灰化に関わるFbln5遺伝子を甲状腺ホルモンの標的として同定した。③胆汁酸吸着樹脂の高脂肪食負荷KKAyマウスでのコレステロール低下と糖代謝改善作用、胆汁酸を内因性リガンドとするFXRとエネルギー消費を刺激するGPCR/TGR-5を選択的に制御するための胆汁酸の構造要因を明らかにした。

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

今日の日本において、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の重点的対策は国民的課題である。本研究では、薬が実用化されていない危険因子「低HDL血症」を中心に、血管壁の「炎症・食食反応」「脂質沈着」「石灰化」メタボリックシンドロームの最主要危険因子「肥満」について、複数のリスクを同時にコントロールする新たな予防治療薬への貢献をめざし、コレステロールとその代謝産物である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。

[I] HDLコレステロール低下は動脈硬化の危険因

子であり、メタボリックシンドロームの他因子によりリスクは相乗的に高まる。低HDL血症は日本人の10~20%に認められるが、HDLを直接上昇する薬は開発されていない。本研究では最有望標的のHDL欠損症の原因遺伝子ABCA1について、①血中HDLの8割を生産する肝のABCA1の特異的な遺伝子転写制御、②核内受容体PPARとLXRによる発現制御解明とリガンド設計により、HDL上昇手段を探る。また、③ABCA1分解制御薬物によるタンパク安定化の機構、HDL上昇と動脈硬化抑制作用について解析する。

[II] また動脈硬化の発症進展には、血管壁内膜中膜局所における細胞内脂質沈着、細胞増殖、食作用など多様な細胞の集積が重要な役割を果たす。①核内受容体RXRによる脂肪滴形成制御の解明により、脂質沈着制御手段を探る。②ABCA7のコレステロールによる抑制と食作用の促進を明らかにする。③血管弾性と石灰化に関して、甲状腺ホルモンのエラスチン繊維形成との関連を明らかにする。

[III] HDLは末梢の血管壁細胞からコレステロールを引き抜き、肝臓に運んで胆汁酸への分解と体外排出を促し動脈硬化を防ぐ。胆汁酸吸着樹脂は経口投与するとコレステロールの胆汁酸への分解を促進するとともに、肥満抑制と血糖を改善する。本研究では糖尿病モデルマウスでの効果を検証する。また胆汁酸をリガンドとしてエネルギー消費を刺激するG蛋

白共役受容体(GPCR)/TGR5、および胆汁酸の合成排出を制御する核内受容体 FXR について胆汁酸誘導体の構造活性相関を検討し、有効なりガンド設計の基盤を創製する。

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。5' RACE 解析によりヒト肝 mRNA (市販品) 中にヒト肝に特異的な ABCA1 mRNA を同定し、発現するヒト肝由来細胞を探索するとともに、プロモーターの解析を開始した。

核内受容体による ABCA1 の発現制御に関しては、①PPAR-LXR の相互反応、②HMG-CoA 阻害薬ピタバスタチンの PPAR α を介する肝 ABCA1 タンパク発現への影響を解析した。③また PPAR α アゴニストフェノフィブラート、PPAR γ アゴニストの HDL への影響を遺伝子発現から解析した。④LXR α 選択的アゴニストの合成系路確立に基づく新規誘導体の創製、立体構造を再現する非環式誘導体の合成を行った。

ABCA1 タンパクの安定化による発現上昇に関しては、カルパインによる分解の阻害剤スピロキノンおよびジフェノキノンを見だし、HDL 上昇と動脈硬化抑制作用を *in vivo* で検討した。また、コレステロール逆転送系の二大要素 ABCA1 と LCAT の二重欠損マウスを作成し、HDL 代謝と全身のステロール代謝平衡を解析した。

B-2 食作用・脂質沈着・動脈石灰化と動脈硬化

①ABCA7 の食食促進作用について、HDL アポ蛋白質である apoA-I と apoA-II の効果を、ABCA7 欠損マウスを用いた *ex vivo* と *in vivo* で研究した。②脂質沈着については、細胞内脂肪滴形成に関わる脂肪滴局在タンパク質 ADRP の発現への DHA および核内受容体 RXR の作用を検討した。③甲状腺ホルモンのエラスチン線維形成および石灰化の関連を明らかにするために、甲状腺ホルモンの血管平滑筋エラスチン含量への影響およびエラスチン関連遺伝子への直接作用の可能性を検証した。

B-3 胆汁酸による糖・脂質代謝制御

2 型糖尿病モデルの KKA y マウスを用いて、胆汁酸吸着樹脂(田辺三菱製薬(株)合成のコレステミド(2-methyl imidazole-epichlorohydrin copolymer))の

血糖低下薬の臨床の指標である HbA1c と肝の胆汁酸合成酵素活性に与える影響を検討した。

胆汁酸の合成・排出を制御する FXR と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を検討し、TGR5/FXR 選択性発揮に必要な構造要因を検討する。(倫理面への配慮) 当研究においては、ヒト組織由来の材料は全て連結不可能匿名化された市販品を使用し、倫理上の問題はないと考える。動物の取り扱い「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・愛護の精神に基づき実験を行った。

C. 研究成果

C-1 HDL 産生の促進

1) ABCA1 のヒト肝における転写制御機構 [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つ。昨年度までの研究で、ラット・マウスの肝 ABCA1 はコレステロールに負・正に応答する肝型と末梢型プロモーターにより、二重の制御を受けることを見いだした。今年度はヒトでの制御を解析し、①ヒト肝には末梢型に加えて 3 グループの肝型 ABCA1 mRNA が存在することを明らかにした。ラット・マウスの肝型類似の Type L2a および L2b に加え、ヒト肝特異的でイントロン 2 部分に転写開始点がある type L3、イントロン 1 にエクソン 1 が存在する type L4a および L4b を見いだした。ヒト組織 mRNA パネルの解析から、これら 3 種は肝に特異的に発現することがわかった。②肝ガン由来細胞を探索し、HepG2, Hep3B, および JCRB 細胞バンク提供細胞の一つが、type L3 および L2b をヒト肝と同レベルに発現することを見いだした。③Type L2a および L2b のプロモーターに相当するエクソン 2 上流領域(-2.7kb) をヒトゲノムよりクローニングしたが、SREBP-2 発現で活性化されるもののスタチンには応答しなかった。

2) PPAR-LXR 経路による ABCA1 発現制御[横山]

PPAR 各サブタイプのアゴニストにより ABCA1 と LXR α 遺伝子の転写が促進された。また PPAR サブタイプ遺伝子も *cis* および *trans* 型に転写促進が行われた。これらの反応は PPAR α 欠損により全て減弱し、LXR α 欠損により全て消失した。さらに PPAR α 欠損細胞内で PPAR アゴニストによる PPAR α レポーター遺伝子の転写活性化が確認された。この結果、少なくとも PPAR α と LXR α の間で相互転写促進による活性化の増幅作用ループの存在が確認された

(*Atherosclerosis* 205: 413, 2009)。

3) HMG-CoA 還元酵素阻害薬の HDL 代謝調節 [前島・田辺]

ピタバスタチンは肝由来 McARH7777 細胞において、LXRにより制御される末梢型 ABCA1 mRNA の発現を減弱したが、total ABCA1 mRNA の発現は増強した。この作用は類薬であるアトルバスタチンおよびシンバスタチンでも同様に認められた。また、ピタバスタチンによる ABCA1 発現増強作用はタンパクレベルでも確認された。末梢型 ABCA1 mRNA の発現が減弱しているにもかかわらず total ABCA1 mRNA の発現が増強されていることから、SREBP2 により制御される肝臓型 ABCA1 mRNA の発現増強が示唆された。また、ピタバスタチンは PPAR α 下流遺伝子である acyl CoA oxidase (ACOX)、carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) mRNA の発現を増強し、ピタバスタチンによる PPAR α の活性化が示された。siRNA により PPAR α をノックダウンすると、ピタバスタチンにより ABCA1 mRNA は発現が増強されるが、ABCA1 タンパクの発現増強作用は消失した。以上のことから、ピタバスタチンによる PPAR α の活性化は ABCA1 タンパクの安定化に関与することが示唆された。

4) フェノフィブラートの血糖低下と HDL 上昇 [青塚]

血糖低下作用を有する PPAR γ の選択的アゴニスト rosiglitazone について、マウスで脂肪酸代謝や糖代謝酵素の mRNA 発現への影響を比較し HDL 生成に対する PPAR γ の役割を検討するとともに、PPAR α の選択的アゴニスト fenofibrate との差を推察した。

Rosiglitazone は肝臓の cpt1 を低下、agpl4 を増加させた。骨格筋では ech1、acaa2 及び pdk4 を減少、cpt1 を増加、angpl4 を増加させた。脂肪組織での変化は最も大きく、ech1、angpl4 及び pdk4 を増加した。ucp2 肝で、ucp3 は脂肪組織で最も大きく増加した。一方、fenofibrate は、肝に最も影響し ech1 及び cpt1 を増加、pdk4 を著しく増加した。骨格筋での変化は小さく、angpl4 は減少、cpt1 は増加した。脂肪組織では ech1、agpl4 及び pdk4 が増加した。ucp2 及び ucp3 は肝で最も大きく増加した。

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。Riccardin C の溶液中での立体構造の予測から、その1つのエチレンリンカーをアミド結合に代替した化合物をデザインした。8工程で合成した環化前駆体を用いて、Riccardin C 合成の際と同様の条件で SNAr 反応を行ったところ、収率よく環化体を得ることができた。この化合物を共通中間体として、二級アミド誘導体および三級アミド誘導体を合成することに成功した。これらの立体構造を温度可変 NMR で解析したところ、Riccardin C と類似の立体構造をとることが示唆されたが、LXR α および LXR β を用いた転写活性化試験の結果、これらのアミド誘導体には LXR リガンド活性は認められなかった。また、この合成法を応用して、非環状誘導体を10種合成した。現在、これらの生物活性の評価を進めている。

3) ABCA1 分解抑制・HDL 上昇・動脈硬化抑制薬物の発見 [横山]

我々は先に、細胞表面の ABCA1 が細胞内に取り込まれてカルパインにより分解されることを示したが、今回は、スピロキノンとジフェノキノンが ABCA1 の活性阻害を行わず分解のみを阻害することを見いだした。これらの化合物は in vivo で血漿 HDL を増加させることが確認され、コレステロール負荷した家兎で動脈硬化進展の抑制作用が認められた (*J Lipid Res* 50: 2299, 2009)

4) HDL 代謝とステロール平衡における ABCA1 と LCAT の役割 [横山]

ABCA1 と LCAT はそれぞれ HDL 産生と細胞コレステロールの HDL への流出に必須であり、コレステロールの逆転送系の二大因子と言える。これらの生理的役割を検証するため、すでに確立した ABCA1 欠損と LCAT 欠損のマウスを掛け合わせて二重欠損状態を創出し、その表現型を観察した。HDL 代謝回転は二重欠損で促進されたものの、臓器へのコレステロール蓄積などには変化は認められず、二重欠損マウスはコレステロール負荷でそれぞれの単独欠損よりも大きい蓄積が肝臓で観察された。このように、マウス HDL 産生は主に肝臓で行われること、マウスにおけるこの二大因子欠損は全身性のコレステロール蓄積をもたらさず、異化のためのコレステロール輸送は何らかで代償されていると考えられた (*BBA*, 1791: 1197, 2009)。

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食作用の制御 [横山]

ステロール代謝と生体防御反応を結びつける因子として、SREBP2 による発現制御をうける ABCA7 による細胞食作用の促進に対するリポ蛋白質代謝の関与を検討した。ABCA1 のカルパイン分解は HDL アポ蛋白質である apoA-I などヘリックスアポリポ蛋白質により抑制される。これと同様の現象が ABCA7 にも認められ、ABCA7 による食作用が促進されることが、ABCA7 欠損マウスの細胞レベルや動物レベルを含めた観察結果で証明された。

2) 細胞内組織内の中性脂質蓄積機構とその制御 [板部]

極長鎖脂肪酸の DHA (C22:6) は胎児の発育と胎盤の増殖に必要で、母体血から胎盤を介して胎児に供給される。また、DHA は RXR の内在性リガンドとも指摘され、ADRP の転写にも関わる可能性が考えられた。そこで、ヒト胎盤絨毛細胞株 BeWo 細胞の ADRP の発現調節への DHA と核内受容体の関与について検討した。BeWo 細胞の ADRP は DHA により著しく誘導され、TG が蓄積した。DHA による ADRP の mRNA とタンパク質発現は RXR アンタゴニスト (PA452、HX531) により強く抑制されたが、OA による ADRP 発現は抑制されなかった。ADRP の mRNA は RXR アゴニスト (PA024、HX630) により誘導されたが、ADRP タンパク質、TG 量とも増加しなかった。脂肪酸なしでは ADRP が分解され、脂肪滴は形成されることが確かめられた。RXR とヘテロダイマーを形成する PPAR γ のアンタゴニスト (GW9662) は DHA や OA による ADRP の mRNA とタンパク質発現を抑制した (*Biol Pharm Bull*, 2009)

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甲状腺機能低下症モデルラット大動脈を用いて、不溶性エラスチン含量の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) 群と比較して不溶性エラスチン含量の有意な低下が認められた。新生コラーゲン線維含量は、Hypothyroid 群と Euthyroid 群との間で差が認められなかった。また、エラスチンの線維形成を促進するタンパク質である DANCE (FBLN5) および LTBP4 をそれぞれコードする Fbln5

および Ltbp4 の発現量は、Euthyroid 群と比較した場合に有意な低下が認められたが、Efemp2 の発現量には変化が認められなかった。②合成型表現型のラット大動脈平滑筋細胞においては、生理的濃度の T3 の処理により、Fbln5 の発現量が有意に上昇したが、Ltbp4 および Efemp2 の発現量については変化が認められなかった。また、RNAi による甲状腺ホルモン核内受容体遺伝子 Thra の発現抑制を行ったところ、T3 の Fbln5 発現促進作用が消失したことから、T3 は核内受容体 TR α 1 を介して Fbln5 の発現を調節していることが示唆された。

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]

正常食群に比べ高脂肪食群では HbA1c が増加して、糖尿病の病態が悪化していることが示された。コレステミドは、HbA1c を正常食群とほぼ同等の値まで低下させた。また、肝臓の cholesterol 7 α -hydroxylase 活性は高脂肪食群に比べ 3.5 倍程度増加し、コレステミドによるコレステロール異化の促進作用が示された。

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]

側鎖長の異なる様々な胆汁アルコールの FXR アゴニスト活性を検討したところ、側鎖長の短縮に伴って、活性は有意に減少した。また、それら胆汁アルコールの TGR5 に対するアゴニスト活性はほとんど変化を認めなかった。さらに、TGR5/FXR selectivity について詳細に検討したところ、側鎖末端に存在する水酸基の数が多いほど、TGR5 に対する選択性が高くなった。また、胆汁酸の母核の 7 位にアルキル基を導入することで TGR5 に対する選択性が向上し、その選択性は導入するアルキル基の炭素数 (n:1-3) と比例関係にあった。

D. 考察

D-1 HDL 産生の促進

5) ABCA1 のヒト肝における転写制御機構 [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。HDL の 8 割を生産する肝 ABCA1 について、ヒト肝での遺伝子発現制御の解明を試みた。肝型および末梢型プロモーターの二重制御を受けるマウスラットと同様に、ヒト肝にも末梢型 ABCA1 mRNA に加えて 3 グループ 5 種類の肝特異的 mRNA が存在していた。そのうち、type L3 ならば

に type L4a,L4b はヒト独自の転写産物と判明した。肝での発現制御を研究するうえで、in vivo を反映する肝細胞モデルが必要となる。ヒト肝ガン細胞を探索し、ヒト肝と同レベルに type L2b、type L3 を発現する細胞を三種類同定した。今後、それぞれのプロモーター同定をはじめとして、この発見は転写制御の解析、発現促進薬物の探索に有用で、新薬開発に大きく貢献できると考えられる。

2) HMG-CoA 還元酵素阻害薬の HDL 代謝調節 [前嶋・田辺]

肝細胞の ABCA1 は ApoA-I に脂質を負荷させ安定化に寄与する。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、肝の ABCA1 は HDL-C 産生に重要な役割を果たすと考えられる。ピタバスタチンならびに類薬スタチンはラット肝ガン細胞株 McARH7777 細胞で ABCA1 mRNA の発現を増強させた。また、この作用には SREBP2 の活性化が関与し、スタチンの肝臓での SREBP2 活性化は LDL 受容体の発現増強作用を介した血中 LDL-C 低下だけでなく ABCA1 発現増強作用を介した HDL-C 増加にも寄与することが明らかとなった。

加えて、ピタバスタチンによる PPAR α の活性化は ABCA1 タンパクの安定化に寄与することが示唆された。eNOS の mRNA およびタンパク安定化と同様に PPAR α が ABCA1 タンパクの安定化にも寄与することが示された。

3) PPAR γ 、PPAR α と HDL 上昇 [青塚]

PPAR γ アゴニスト rosiglitazone は糖尿病患者で HDL 上昇を示すが PPAR α アゴニスト fenofibrate と機序は異なると予想されることから、両者の脂肪酸や糖代謝への影響を比較した。Rosiglitazone は肝臓では解糖系抑制、脂肪酸 β 酸化亢進、熱産生促進が、骨格筋では解糖系・TCA サイクル促進、ATP 生成促進が、脂肪組織では解糖系抑制と脂肪酸 β 酸化亢進、ATP 生成促進が推察された。Rosiglitazone の血糖低下作用は骨格筋における糖代謝の亢進によることが示唆され、その背景には脂肪細胞における ATP 産生に伴う分化促進の影響が推察された。また、肝臓及び脂肪組織での angpl4 の発現の増加により、肝臓でのコレステロールの取込みが抑制され、LPL 活性が抑制され、HDL 生成は調節されると推察された。一方、Fenofibrate は、肝臓では脂肪酸 β 酸化の亢進、解糖系抑制、熱産生促進が、骨格筋では強く発現する pdk4 の発現抑制により、解糖系亢進による血

糖低下作用が、脂肪組織では、解糖系抑制と脂肪酸 β 酸化亢進が推察された。また、脂肪組織では angpl4 が発現増加するが、TG は十分低下し LPL 活性抑制や HDL 生成への寄与は小さいと推察される。

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 の効率的な合成方法の有用性を示すために、そのアミド誘導体の合成を行った。鍵反応である SNAr 反応では 72% の高収率で環化成績体を得た。収率の向上には、アミド結合カルボニル結合の電子吸引力も寄与していると考えられる。アミド誘導体の立体構造が Riccardin C と類似であるにも関わらず、LXR リガンド活性が認められなかったことは、環構造の電子的効果、疎水性が重要であると考えられる。結論: 本研究者が確立した Riccardin C の効率的な合成法が幅広い誘導体合成に応用可能な手法であることを示した。今後は、この合成法をもとに、Riccardin C をリード化合物とした高い受容体親和性や選択性をもつ LXR リガンド開発へと展開しようと考えている。

D-2 炎症・脂質沈着・動脈石灰化と動脈硬化

1) 細胞内組織内の中性脂質蓄積機構とその制御 [板部]

本研究により、DHA が生体内の内在性 RXR リガンドとして ADRP の発現制御に関わっていることが示された。RXR と PPAR γ のヘテロダイマーは、それぞれが異なる脂肪酸によって活性化されている可能性が考えられた。DHA のような脂肪酸が TG 前駆体としてだけでなく、転写制御因子としても作用することが示された。ただし、脂肪酸の作用は、細胞、組織により異なる可能性がある。3T3-L1 脂肪前駆細胞では DHA による脂質蓄積の抑制が報告されている。

ADRP は種々の組織で普遍的に発現している脂肪滴タンパク質であり、動脈硬化巣の泡沫細胞や脂肪肝の肝実質細胞など、脂質蓄積を伴う疾患病変部で高発現している。病的な脂質蓄積は、過剰な脂質供給による分解系の抑制に加え、脂肪酸などの物質による ADRP の発現亢進によるものと考えられた。

2) 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は動脈血管平滑筋細胞中の核内受容体に直接作用し、Fbln5 発現を調節することにより動脈血管中のエラスチン線維形成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エラスチン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られる。

D-3 胆汁酸による糖・脂質代謝制御

1) 胆汁酸吸着樹脂の糖代謝制御 [坂井ほか]

これまで、コレステロール低下剤である胆汁酸吸着樹脂のコレスチミドが、抗肥満作用やインスリン抵抗性改善作用を示し、抗糖尿病作用を持つことを示した。また、非吸収性コレスチミドは胆汁酸の再吸収を抑制することで肝臓や小腸の遺伝子発現に影響を与え、全身の糖・代謝に影響を及ぼす可能性を指摘した。今回の結果はコレスチミドが、糖尿病や高コレステロール血症の両方に有効性を発揮することを示したものである。実際に、最近報告されたコレスチミドを用いた 2 型糖尿病患者の臨床試験においても、HbA1c と LDL-コレステロールの両方を有効に低下することが示されている。コレスチミドは胆汁酸を吸着することで、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。

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]

胆汁酸の側鎖カルボキシル基の酸素原子は FXR のリガンド結合ポケットの入り口のアミノ酸と水素結合し、リガンド-レセプター複合体の安定化に寄与することが報告されている。側鎖長の短縮によってその水素結合が形成できなくなり、複合体が不安定化し FXR アゴニスト活性の低下に繋がったと示唆された。また、胆汁アルコールの側鎖短縮が TGR5 アゴニスト活性にほとんど影響を与えなかった。この結果は、ステロイドホルモンが TGR5 アゴニスト活性を有することを裏付けるものである。しかし、カルボキシル基を有する胆汁酸の側鎖短縮は TGR5 アゴニスト活性を著しく減少させる結果となり、側鎖構造と活性については更なる検討が必要であろう。

両レセプターに対する選択性については、ほとんどの化合物はそれぞれのレセプターに対し同程度の活性化能を有していたが、胆汁アルコールの側鎖末端に存在する水酸基の数が増えるほど TGR5 に対する親和性が増加した。この変化はそれぞれの受容体のリガンド結合領域、特にステロイド側鎖と作用する部分の構造の違いによるものと示唆された。また、胆

汁酸の 7 位にアルキル基を導入することによって TGR5 に対する選択性が著しく増加し、アルキル基のかさ高さと共に増加した。このことから、ステロイド母核の 7 位に近接するヒト TGR5 のリガンド結合領域に比較的広い疎水性ポケットの存在が示唆された。

E. 結論

1. 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、ヒト肝での制御の解明をめざし、ヒト独自の肝型 mRNA を見だし、ヒト肝型の mRNA を発現する肝由来細胞を探索した。
2. HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチンはラット肝細胞において SREBP2 および PPAR α の活性化を介して ABCA1 の発現を増強し、HDL コレステロール代謝に影響を及ぼすことが示唆された。
3. PPAR γ の活性化は脂肪組織や肝での angptl4 発現増加を介して HDL 生成に影響することが推察され、PPAR α や PPAR δ の活性化による HDL の増加とは異なる機序が示唆された。
4. 本研究者が確立した Riccardin C の効率的合成法が幅広い誘導体合成に応用可能な手法であることを示した。今後は、高い受容体親和性や選択性をもつ LXR リガンド開発へと展開しようとする。
5. 1) PPAR 活性化の LXR を介する ABCA1 遺伝子転写促進に、PPAR と LXR が相互転写促進する「反応増殖ループ」を見いだした。2) ABCA1 のカルパインによる分解を抑制する薬物を見だし、HDL 上昇と動脈硬化抑制を認めた。3) ABCA1 と LCAT 二重欠損マウスで、コレステロール逆転送系にバイパスが示唆された。4) アポ A-I などヘリックスアポ蛋白が ABCA1 の分解を抑制して活性を増強し、細胞食作用を増強することを見いだした。
6. メタボリックシンドロームの主要な原因である中性脂質の蓄積制御に関して、細胞内脂肪滴局在タンパク質 ADRP の発現に関わる因子の作用を特異的阻害剤を用いて検討した。
7. 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、動脈血管の弾性を担う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弾性繊維の形成に寄与する Fbln5 遺伝子を標的として同定した。
8. 胆汁酸吸着樹脂コレスチミドは高脂肪食 KKAY マウスで胆汁酸の再吸収を阻害して肝の胆汁酸合成-コレステロール異化を促進、血糖低下指標の血中 HbA1c を低下し、全身の糖脂質代謝を改善した。

9. 様々な胆汁酸誘導体及び胆汁アルコールの FXR 及び TGR5 アゴニスト活性を網羅的に評価することにより、それぞれのレセプターに選択的に作用する化合物の創製が現実的となった。

F. 研究発表

論文発表

1. Iguchi Y, Kihira K, Nishimaki-Mogami T, Une M Structure-activity relationship of bile alcohols as human farnesoid X receptor agonist. *Steroids*. 75: 95-100 (2009)
2. Iguchi Y, Yamaguchi M, Sato H, Kihira K, Nishimaki-Mogami T, Une M. Bile alcohols function as the ligands of membrane-type bile acid-activated G protein-coupled receptor *J Lipid Res*. 2009; in press
3. 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. *J. Lipid Res* (2009) 50: 1156-1164
4. 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 *Atherosclerosis* (2009) 205: 413-419.
5. Arakawa R, Tsujita M, Iwamoto N, Ito-Ohsumi C, Lu R, Wu CA, Shimizu K, Aotsuka T, Kanazawa H, Abe-Dohmae S, Yokoyama S. *J Lipid Res*. (2009)50:2299-305
6. Nishida T, Ito J, Nagayasu Y, Yokoyama S. FGF-1-induced reactions for biogenesis of apoE-HDL are mediated by src in rat astrocytes. *J Biochem*. (2009);146:881-886
7. Hossain MA, Tsujita M, Akita N, Kobayashi F, Yokoyama S. Cholesterol homeostasis in ABCA1/LCAT double-deficient mouse. *Biochim Biophys Acta*. (2009)1791:1197-1205
8. 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) 29:33-39.
9. 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) 29:33-39.
10. Suzuki, K.; Takahashi, K.; Nishimaki-Mogami, T.; Kagechika, H.; Yamamoto, M.; Itabe, H. Docosahexaenoic acid induces adipose differentiation-related protein through activation of retinoid X receptor in human choriocarcinoma BeWo cells. *Biol. Pharm. Bull.* (2009) 37:1177-82
11. Hatanaka, M.; Shimba, S.; Sakaue, M.; Kondo, Y.; Kagechika, H.; Kokame, K.; Miyata, T.; Hara, S. Hypoxia-Inducible Factor-3 α Functions as an Accelerator of 3T3-L1 Adipose Differentiation. *Biol. Pharm. Bull.* (2009) 32, 1166-1172.
12. Nishida M, Suda R, Nagamatsu Y, Tanabe S, Onohara N, Nakaya M, Kanaho Y, Shibata T, Uchida K, Sumimoto H, Sato Y, Kurose H. Pertussis toxin upregulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation. *J Biol Chem* (2010) in press
13. Sakamoto K, Hiraiwa M, Saito M, Nakahara T, Sato Y, Nagao T, Ishii K. Protective effect of all-trans retinoic acid on NMDA-induced neuronal cell death in rat retina. *Eur J Pharmacol.* (2010) in press
14. Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima N, Ide T, Inoue R, Kurose H. Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *J Biol Chem* 2010 (in press)
15. Tanabe S, Sato Y, Suzuki K. Characteristics of stem cells based on expression profile of molecular markers. *Res. Adv. in Biochemistry*. 2009:1-8.

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