

T3のみを分取し、T3含量が70%以上のT3素材を得た。このT3素材をガンマーシクロデキストリン(CD)と水と攪拌し、凍結乾燥し、T3-CD包接体を得た(T3含量、13.73%)。また、T3の水酸基の部分にコハク酸をエーテル結合で結合させたエーテル誘導体6-0-carboxypropyl-alpha-tocotrienol(T3E)を合成した。

T3の生体内動態の解析:ラットおよびマウスを軽度のビタミンE欠乏状態にし、T3包接体を含む試料溶液を強制的に1回経口ないしは食餌に混合し1ヶ月間摂取させ、血中、各臓器および腫瘍組織のレベルをHPLCないしはLC-MS/MSで定量した。

T3の抗酸化および抗炎症作用評価:ミトコンドリアへの酸化的ストレスを非浸潤的に測定するためにcomplex Iとcomplex IVの機能を評価できる尿検査用試薬を開発し、その妥当性を評価した。また、in vivoでの抗酸化能を評価するために、LacZ遺伝子を導入されたMutaないしはgpt-deltaマウスを用いて軽度のビタミンE欠乏状態にし、T3包接体を含む試料溶液を経口投与。その後4時間後から通常の飼料を与え、20時間後に8GyのX線を全身照射した。その後さらに3日を経た所でサンプリングし、小腸近位部上皮での突然変異頻度を調べた。さらに、抗炎症作用を評価するために、以下の細胞・動物実験を行なった。マウスマクロファージ培養細胞株RAW264を96well plateに播種(2×10^4 cells/well in 100 μ l medium)し一晩培養後、T3など試験化合物を含む新鮮な培地に交換し、1 μ g/ml LPSおよび100 U/ml IFN γ 刺激した。24時間後、LPS/IFN γ の一酸化窒素(NO)生成誘導に対する試験化合物の抑制効果を定法に従いNOの酸化化合物である培地中の亜硝酸イオン(NO $_2^-$)濃度を測定することにより評価し、いくつかの炎症性タンパクの発現レベルを評価した。さらに、マウスLPSエンドトキシンショックモデルを用いて、T3のCD包接体の抗炎症作用をin vivoで評価した。

細胞・動物モデル系を用いたT3の機能性評価:T3の中皮腫細胞の薬剤耐性改善効果を検証するために、薬剤耐性中皮腫細胞培養系を用いて、シスプラチンとT3の併用効果を検討した。また、T3-CD包接体の中皮腫に対する抑制効果を検証するために、中皮腫移植マウスモデルを構築し、T3のCD包接化による抗中皮腫活性の評価を行なった。また、変形性骨関節症を自然高発(1年で100%)するマウスモデル系を用いて、T3-CD包接体の効果を検討した。また、FoxO1ノックアウトマウスおよびFoxO1遺伝子欠損膵ベータ細胞株を用いて、FoxO1制御を介した膵ベータ細胞におけるERストレスの制御とII型糖尿病発症抑制の可能性を検証した。

中皮腫細胞に対するT3Eの機能性評価:中皮腫細胞培養系を用いて、T3Eの殺細胞効果とその作用機構を解析した。

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

C. 研究結果

T3安定化体の作成:米ぬかから効率的にT3を抽出・精製する方法論およびT3を安定してCD包接化する技術を改良し、高品質なT3-CD包接体(ヒトへの使用可能)の安定製造が可能になった。

T3の生体内動態の解析:T3包接化によるT3の生体内動態の変化を検討したところ、経口摂取後の小腸でのトコトリエノールの吸収が促進し、主要臓器への取り込み量も増加することが明らかになった。また、CD包接化によりT3のCmaxやAUCが増加し、T3のCD包接化によりT3の生体利用性が向上することが明らかになった。

T3 の抗酸化および抗炎症作用：ミトコンドリアへの酸化ストレスを非浸潤的に測定するために complex I と complex IV の機能を評価できる尿検査用試薬が抗酸化成分の機能を評価するために適していることを確認した。また、LPS が誘導する致死刺激に対する新規トコトリエノール安定化体の生存率に対する効果を検討した結果、新規トコトリエノール安定化体（包接体）を含む飼料を投与した群で最も高い生存率を示した。T3 および T3+CD にも生存率に対する効果は認められたが、包接体よりも弱い効果であり、CD には効果は認められなかった。

細胞・動物モデル系を用いた T3 の機能性評価：

T3 を CD 包接化することにより、T3 の持つ抗がん活性が格段に強化され、薬剤耐性中皮腫細胞の *in vitro* および *in vivo* での増殖を有意に抑制した。また、代表的な中皮腫治療薬であるシスプラチンとの併用効果を検討したところ、シスプラチン 1.5 μ M と γ -T3 10 μ M の組み合わせで相乗的な殺細胞効果の増強が認められた。変形性膝関節症自然発症マウスに生後 6 週齢より CD および T3-CD 包接複合体含有粉末飼料の経口投与を行い、経過観察を行い X 線診断を行った結果、改善効果が認められた。FoxO1 ノックアウトマウスおよび膵ベータ細胞を用いた 2 型糖尿病に関する解析では、FoxO1 が膵ベータ細胞において ER ストレスを正の方向に制御している可能性が示唆された。

中皮腫細胞に対する T3E の機能性評価：T3E の顕著な中皮腫細胞増殖抑制効果は、Src の直接的な抑制と IL-6R の発現抑制に起因した Stat3 の活性化抑制等、中皮腫の悪性化に寄与する主要なシグナル系を同時に抑制する事に依存していることが明らかになった。

D. 考察

CD は、消化管内のアミラーゼによってその α 1,4 結合が切断されて分解されるため、経口摂取した

T3-CD 包接体は、フリーの T3 として小腸で吸収されると考えられる。したがって、包接化による T3 の吸収促進は、経口摂取した T3 が小腸に到達するまでの消化管内で、その安定性が向上した結果である推測された。

T3 の抗酸化作用の評価系として、ミトコンドリア機能評価の簡便化に成功し、この方法により加齢に伴った脳ミトコンドリア機能の低下を検出した。また、LPS/IFN γ が誘導する NO 産生に対して T3 および包接体は濃度依存的な抑制効果を示し、さらに、実験動物を用いた検討より、包接体は T3 に比べ LPS が誘導する致死刺激に対して有意に生存率を増加させる効果を示した。このことは T3 包接化により T3 の持つ抗酸化や NO により惹起される炎症性反応等の抑制効果が強化されることを示している。

変形性膝関節症自然発症モデルマウスを用いた変形性膝関節症に対する T3-CD の作用に関する解析では、T3-CD 包接含有粉末飼料の長期経口投与による改善効果は見られて、この難治性の疾患予防および治療に T3-CD は有効である可能性が推測される。FoxO1 ノックアウトマウスおよび膵ベータ細胞を用いた 2 型糖尿病に関する解析から、T3 が FoxO1 の機能を制御可能を示されたので、FoxO1 の制御を介した 2 型糖尿病発症予防が可能になるかもしれない。また、NO が糖尿病発症に関わる要因として報告されているが、上述のように、T3 は NO 産出を有意に抑制することから、この側面から T3 は糖尿病を発症予防する可能性が考えられる。

T3 に含まれる主な抗癌成分である γ -T3 の活性がほぼ T3E と同じであることが判明し、かつ IC50 から判断した γ -T3 レベルは、T3 の包接化により血中レベルで充分到達可能であり、さらに、シスプラチンとの併用効果においても、臨床的に通常のシスプラチン投与患者に認められる血中レベルの範囲にあるシスプラチン 1.5 μ M で T3 との併用効果が認められた。さらに、T3 の CD 包接化は *in vivo* で有意に中皮腫の増殖した。従って、T3-CD 包接

体は単独でも、シスプラチンの併用でも中皮腫治療の選択肢として有用であることが示された。また、T3E の優れた抗中皮腫活性は単剤で中皮腫の悪性化に寄与する主要なシグナル系を同時に抑制する事に依存していることが明らかになったので、T3E をベースにした新たな抗中皮腫治療薬の開発が期待される

E. 結論

- 1) 米ぬかからの効率的な T3 抽出法ならびに安定した T3-CD 包接化技術を構築した。
- 2) T3 の CD 包接化により T3 の生体利用性が格段に向上することが証明された。
- 3) T3 の抗酸化を評価する非浸潤的な簡便法を開発した。
- 4) T3 の CD 包接化が NO により誘発される炎症や慢性疾患（糖尿病等）発症を抑制するのに有効である可能性が示唆された。
- 5) T3 の CD 包接化が変形性膝関節症予防に有効である可能性が示された。
- 6) T3 が中皮腫に対する化学療法の効果を増強することが示された。
- 7) T3E が優れた抗中皮腫活性を持っていることが明らかになった。

F. 研究発表

1) 国内

口頭発表	93 件
原著論文による発表	8 件
それ以外の発表	11 件

その主なもの

論文発表

矢野友啓、Alpha-トコトリエノールコハク酸エーテル誘導体の新規抗がん剤としての可能性、ビタ

ミン 83:607-611(2009)

学会発表

倭英司、南田理絵、田代文、宮崎早月、古山達雄、稲垣忍、宮崎純一、膵β細胞における FoxO1 遺伝子の機能解析、第 19 回分子糖尿病学シンポジウム、H19 年 12 月 8 日

2) 海外

口頭発表	48 件
原著論文による発表	77 件
それ以外の発表	5 件

その主なもの

論文発表

Yano T, Virgona N, Anti-cancer effects of tocotrienols and tocopherols irrespective of anti-oxidant properties. Tocotrienols: Vitamin E beyond Tocopherols, pp171-183, 2008, AOCS.

Yamaguchi S, Miyazaki J et al., ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic beta cell survival under endoplasmic reticulum stress. Cell Metab. 7: 269-276, 2008.

学会発表

Kashiwagi K, Yano T et al., A redox-silent analogue of tocotrienol acts as a potential anti-mesothelioma agent via the inhibition of Yes and Stat3: 2009AACR annual meeting: 2009.4.19

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

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

所 属 (独) 国立健康・栄養研究所 補完成分プロジェクト
研 究 者 矢野 友啓

研究要旨

新規トコトリエノール安定化体(トコトリエノール・シクロデキスト包接体とトコトリエノールエーテル誘導体)を用いて、酸化ストレスや慢性炎症等が要因となって引き起こされる慢性疾患(難治性腫瘍、変形性関節症等)に対する予防・治療の可能性を探るために、本年度は昨年度に引き続き安定化体の製造法の改良、各疾患モデル系を用いたトコトリエノール安定化体の効果やその作用機構の解析を行なった。

- (1) 医薬基盤研究所 野村大成
- (2) 大阪大学大学院 宮崎純一
- (3) 東北大学大学院 小野哲也
- (4) 静岡県立大学大学院 大島寛史
- (5) 日本アムウエー(株) 技術部 栗下昭弘
- (6) オリザ油化(株) 岡田忠司
- (7) シクロケム(株) 寺田啓二

A. 研究目的

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

品由来成分で、抗酸化作用以外に抗炎症作用等の多様な生理作用をもつ機能性成分が慢性疾患の予防・治療に有効と予測される。

食品由来の機能性成分の中で、ビタミンE同族体であるトコトリエノールは抗酸化作用以外に次に示す抗酸化作用に関与するOH基以外の構造部分に基づく新たな生理作用として、1) コレステロール合成阻害による高コレステロール症の改善、2) Ras family シグナル伝達系抑制による細胞増殖および骨代謝抑制作用、3) cytokine 産出制御による抗炎症作用、4) 血管新生抑制作用が報告され、これ以外にも脳機能障害の予防等のい

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

B. 研究方法

トコトリエノール安定化体の作成：米ぬかよりヘキサン抽出後、高温真空条件化で蒸留および濃縮し、ビタミンE高濃度画分を分取した。この高濃度画分から合成吸着剤を充填したカラムを用いて、トコトリエノール(T3)のみを分取し、T3含量が70.9%のT3素材を得た。このT3素材をガンマシクロデキストリン(CD)と水と攪拌し、凍結乾燥し、T3-CD包接体を得た(T3含量、12.9%)。また、T3の水酸基の部分にコハク酸をエーテル結合で結合させたエーテル誘導体6-O-carboxypropyl-alpha-tocotrienol(T3E)を合成した。合成したT3EはGC-MS, 1H-NMR, 13C-NMR, IRで構造を確認した。

T3の生体内動態の解析：マウス、C57BL/6Jを28日間ビタミンE free diet(フナバシファーム)を自由摂取させた。Day 28から1日毎に被験試料を計3回経口投与した(day 28, 30, 32)。経口投与の前後1.5時間(計3時間)は絶食を行った。血中トコトリエノール濃度測定は以下の3群を用いて行った。コントロール群、TRF群(2.79 mg TRF in 0.2 ml corn oil)、TRF/CD群(14.5 mg TRF/CD 0.2 ml corn oil)。各群n=6で、day 28, 30, 32の経口投与後それぞれ経時

的(0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24時間後)に尾静脈から採血を行い、HPLC(SHISEIDO Nanospace SI-1)、MS(Applied Biosystems API 2000)、イオン源はESI、カラムはWaters Xbridge C18 2.1×150 mmを使用し、PMC(内標)はm/z 221.3/165.1 および m/z 221.3/69.2 をγ-T3 m/z 411.5/191.1 および m/z 411.5/151.3を検出し定量解析を行った。

T3の抗酸化および抗炎症作用評価：H20年度に引き続きミトコンドリアへの酸化的ストレスを非浸潤的に測定するためにcomplex Iとcomplex IVの機能を評価できる尿検査用試薬を開発し、その妥当性を評価した。また、in vivoでの抗酸化能を評価するために、in vivoでの抗酸化能を評価するために、LacZ遺伝子を導入されたMutaないしはgpt-deltaマウスを用いて軽度のビタミンE欠乏状態にし、T3包接体を含む試料溶液を経口投与。その後4時間後から通常の飼料を与え、20時間後に8GyのX線を全身照射した。その後さらに3日を経た所でサンプリングし、小腸近位部上皮での突然変異頻度を調べた。さらに、抗炎症作用を評価するために、LPSエンドトキシンマウスモデルを用いて検証した。オスC57BL/6マウスをビタミンE欠乏飼料(船橋ファーム)を4週間(day 0-28)自由摂取させ、試験試料としてコントロール群(0.2 ml コーンオイル: Oil)、包接体群(14.5 mg/0.2 ml Oil)、T3群(2.79 mg/0.2 ml Oil) シクロデキストリン(CD)群(11.71 mg/0.2 ml Oil) T3+CD群(2.79+11.71 mg/0.2 ml Oil)を調製し、各群n=6~7で1日毎に計3回(day 28, 30, 32)試料を強制的経口投与した。また、試料の経口投与する前後各1.5時間(計3時間)絶食を行った。Day 32経口投与3時間後にPBSに溶解させたLPSを60 mg/kg B.W.で腹腔内投与し、そこから3時間毎に72時間までマウスを観察し、新規トコトリエノール安定化体の死亡率に対する影響を検討した。また、肝臓における炎症関連遺伝子群の変化をマイクロアレイで網羅的に解析した。

細胞・動物モデル系を用いた T3 の機能性評価：
T3 の中皮腫細胞の薬剤耐性改善効果を検証する
T3-CD 包接体の中皮腫に対する抑制効果を検証す
るために、中皮腫移植モデルを用いて、T3 の CD
包接化の影響を検討した。変形性骨関節症を自
然高発（1年で100%）するマウスモデル系を用い
て、T3-CD 包接体の効果を検討した。生後6週齢
より CD および T3-CD 包接複合体各 0.1% 含有粉末
飼料を投与し、1 年間の経過観察をレントゲン診
断、病理診断を用いて行い、形性骨関節症発生率
を比較検討した。Foxo1 の flox allele を
homozygote で有する MIN6 細胞とその細胞に
CAG-Cre アデノウイルスベクターを感染させる
ことにより得られた Foxo1 欠損 MIN6 細胞を用い
て、ER ストレスに対する Foxo1 の役割を解析し
た。

中皮腫細胞に対する T3E の機能性評価：中皮腫細胞
培養系（低酸素分圧条件下）を用いて、T3E の殺
細胞効果とその作用機構を解析した。

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

C. 研究結果

T3 安定化体の作成：米ぬかより T3 の効率的単離・
分離技術の検討を行い、昨年度の方法をスケール
アップし、トコフェロールを殆んど含まない T3
が 70% 以上含む包接化に使用できる T3 精製品を
作成できた。また、T3 の包接化技術についても、
昨年度よりもスケールアップしても CD 包接化が
可能であり、包接化による T3 の変化がないこと
を確認した。また、T3E の合成については、純度 90%
以上の合成品が得られた。

T3 の生体内動態の解析：

T3 の抗酸化および抗炎症作用：ミトコンドリア
への酸化的ストレスを非浸潤的に測定するため
に complex I と complex IV の機能を評価できる尿
検査用試薬が抗酸化成分の機能を評価するため
に適していることを確認し、この方法で加齢に伴
ったミトコンドリア機能の低下を評価できるこ
とが明らかになった。また、T3 非投与及び投与
後の小腸上皮での突然変異頻度の結果から、放射
線照射により突然変異頻度の増加傾向は見られ
るが、その量は予想していた程に増加せず、従っ
て T3 の影響を評価できる結果にならなかった
（この結果は昨年度と同じ）。しかし、LPS が誘
導する致死的刺激に対する新規トコトリエノール
安定化体の生存率に対する効果を検討した結
果、新規トコトリエノール安定化体（包接体）を
含む飼料を投与した群で最も高い生存率を示し
た。T3 および T3+CD にも生存率に対する効果は
認められたが、包接体よりも弱い効果であり、CD
には効果は認められなかった（昨年度の結果を再
現）。また、T3 投与により LPS 投与による炎症関
連遺伝子群の上昇が抑制傾向を示した。

細胞・動物モデル系を用いた T3 の機能性評価：
T3 の CD 包接化により T3 の中皮腫の増殖抑制効果
は増強され、この増殖抑制作用に比例して、T3 の
組織への取り込みも CD 包接化で有意に増加した。
さらに、T3 の CD 包接化により中皮腫組織におけ
る血管新生や浸潤に関係する因子の産出能が有意
に抑制されていることが明らかになった。また、
変形性膝関節症自然発症マウスに生後 6 週齢より
CD および T3-CD 包接複合体含有粉末飼料の経口投
与を行い、経過観察を行い X 線診断および病理診
断を行った結果、改善効果が認められた。Foxo1
欠損腓胝細胞株はコントロールの flox allele
を有する腓胝細胞株に比して、ER ストレスに対
して apoptosis 関連蛋白が強く発現する傾向があ
った。また腓胝細胞において、酸化ストレス
負荷時に減少が認められる腓胝細胞特異的転
写因子 Mafa が ER ストレスでも低下することを

見出し、同時に Foxo1 欠損膵ベータ株ではその低下が顕著であることも判明した。また、Foxo1 欠損ベータ細胞株ではグルコース反応性インスリン分泌が亢進していること、および細胞分裂反応が亢進していることが判明し、これと関連して、種々の細胞増殖マーカー遺伝子や膵ベータ細胞機能維持に重要とされる既知遺伝子の発現上昇も確認された。

中皮腫細胞に対する T3E の機能性評価：低酸素分圧条件下で T3E は顕著な中皮腫細胞増殖抑制効果を示し、この抑制効果と関連して、がん細胞の低酸素分圧下への適応に重要な遺伝子群が T3E によって有意に抑制されていることが明らかになった。

D. 考察

米ぬかから効率的に T3 を抽出・精製する方法論および T3 を安定して CD 包接化する技術を改良し、高品質な T3-CD 包接体（ヒトへの使用可能）の安定製造が可能になった。また、T3 包接化による T3 の生体内動態の変化を検討したところ、経口摂取後の Cmax および AUC に増加傾向が認められ、CD 包接化により T3 の生体利用性が向上することが明らかになった。また、この T3 の生体利用性の向上が腫瘍組織への T3 の取り込みの増加と抗腫瘍活性の増加につながるという結果が得られた。このことから、T3 の CD 包接化は T3 の癌治療への応用するために有用だと考えられる。

T3 の抗酸化作用の評価系として、昨年度確立したミトコンドリア機能評価法を用いて解析したところ、加齢によるミトコンドリア機能低下が評価できる可能性が判明し、今後加齢による疾患に対する T3-CD]包接体の評価に使える。また、包接体は T3 に比べ LPS が誘導する致死的な刺激に対して生存率を増加させ、かつ炎症関連遺伝子群の発現を抑制したことから、T3 包接化による生体内での生体内代謝に対する安定性向上が T3 の抗炎症作用増強に寄与している可能性を示唆している。

変形性膝関節症自然発症モデルマウスを用い変

形性膝関節症に対する T3-CD の作用に関する解析では、T3-CD 包接含有粉末飼料の 1 年間経口投与による改善効果は見られ、T3-CD 包接体の変形性膝関節症の予防に有用と考えられる。FoxO1 欠損膵β細胞を用いた解析から、Foxo1 が膵ベータ細胞において、ストレスに対し防御的に機能している可能性を示し、Foxo1 の活性化がストレス防御のターゲットの 1 つである可能性が示された。マ膵ベータ細胞に対する ER ストレス等のストレスが 2 型糖尿病の発症に関与することが報告されが、FoxO1 は膵ベータ細胞において ER ストレスを正の方向に制御している可能性が示唆された。従って、T3 の FoxO1 の制御を介した 2 型糖尿病発症予防の可能性がある。また、NO が糖尿病発症に関わる要因として報告されているが、以前の報告のように、T3 は NO 産出を有意に抑制することから、この側面からも、T3 は糖尿病を発症予防する可能性が考えられる。

T3 のもう 1 つの安定誘導体である T3E に中皮腫の低酸素分圧条件下での増殖・浸潤を抑制することが明らかになったことから、T3 の CD 包接化と並んで、T3E が有用な中皮腫治療成分になる可能性がある。

E. 結論

T3 を CD 包接化することにより、T3 の生体利用が向上し、T3 の持つ生理活性が強化される。従って、T3 の CD 包接体は糖尿病、がん等の慢性疾患の予防・治療に有効な成分といえる。

F. 研究発表

Kashiwagi K, Virgona N, Harada K, Kido W, Yano Y, Ando A, Hagiwara K & Yano T. A redox-silent analogue of tocotrienol acts as a potential cytotoxic agent against human mesothelioma cells. Life Sciences 84: 650-656, 2009

Sato H, Iwata H, Takano Y, Yamada R, Okuzawa

H, Nagashima Y, Yamamura K, Ueno K, Yano T. Enhanced effect of connexin 43 on cisplatin-induced cytotoxicity in mesothelioma cells. J Pharmacol Sci 110: 466-475, 2009

矢野友啓, Alpha-トコトリエノールコハク酸エーテル誘導体の新規抗がん剤としての可能性, ビタミン 83: 607-611, 2009

Nagaskima K, Virgona N, Miyazawa M, Watanabe T, Yano T. The tocotrienol-rich fraction from rice bran enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human mesothelioma H28 cells. Phytotherapy Research in press.

Kodaira M, Ryo H, Kamada N, Furukawa K, Takahashi N, Nakajima H, Nomura T, and Nakamura N. No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. Radiat. Research (2010) in press

Iwamori M, Shibagaki T, Nakata Y, Adachi S, Nomura T. Distribution of receptor glycolipids for Lactobacilli in murine digestive tract and production of antibodies cross-reactive with them by immunization of rabbits with Lactobacilli. J Biochem. 146(2):185-91, 2009.

Lai, Y.L., Aoyama, S., Nagai, R., Miyoshi, N., Ohshima, H. Inhibition of L-Arginine Metabolizing Enzymes by L-Arginine-derived Advanced Glycation End Products. J. Clin. Biochem. Nutr., (2010) in press.

Tomono, S., Miyoshi, N., Sato, K., Ohba, Y., Ohshima, H. Formation of cholesterol ozonolysis products through an ozone-free mechanism mediated by the myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system. Biochem. Biophys. Res. Commun., (2009) 383: 222-227.

Okudaira N, Uehara Y, Fujikawa K, Kagawa N, Ootsuyama A, Norimura T, Saeki K, Nohmi T, Masumura K, Matsumoto T, Oghiso Y, Tanaka K,

Ichinohe K, Nakamura S, Tanaka S, Ono T. Radiation dose-rate effect on mutation induction in spleen and liver of gpt delta mice. 2010 in press

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

带状疱疹ワクチン開発のための疫学研究

所属 独立行政法人医薬基盤研究所

研究者 山西 弘一

研究要旨 本疫学研究に登録した者を対象に、带状疱疹の発症頻度、発症者の痛みの程度と持続時間、水痘带状疱疹ウイルス (VZV) に対する細胞性免疫と液性免疫の相関、生活習慣や社会的心理的要因と带状疱疹の相関についての調査を行った。

研究分担者

- | | |
|-------------------|-------|
| (1) 大阪大学大学院医学系研究科 | 磯 博康 |
| (2) 独立行政法人医薬基盤研究所 | 森 康子 |
| (3) 奈良県立医科大学 | 浅田 秀夫 |
| (4) 財団法人阪大微生物病研究会 | 奥野 良信 |

A. 研究目的

带状疱疹について、米国では水痘ワクチンの力を高めたワクチンを用いて、大規模臨床試験 (M. N. Oxman, et al.) が行なわれ、その結果を基に同ワクチンが带状疱疹ワクチンとして承認されている。また、ACIP (米国予防接種勧告委員会) も 60 歳以上の人への带状疱疹ワクチン接種を推奨している。

一方国内では、带状疱疹発症の詳細な疫学研究は無く、水痘ワクチンを高齢者に接種すると水痘带状疱疹ウイルス (VZV) に対する細胞性免疫の増強効果が解明された (平成 12 年厚生科学研究費補助金 带状疱疹神経痛の予防を目的とする成人高齢者への水痘ワクチン接種による免疫増強に関する研究)。しかし、細胞性免疫の程度と带状疱疹発症の相関や免疫持続期間については検証されていない。

本研究では、将来の带状疱疹ワクチン開発のための基礎的な検討を行うため、香川県小豆郡における 50 歳以上の住民 17,323 人 (平成 20 年 10 月 1 日時点) のうち本研究に登録した方を対象に、带状疱疹の発生頻度と発症者における痛みの程度と持続期間、VZV に対する免疫の程度と带状疱疹発症の相関、細胞性免疫と液性免疫の各種抗体価の相関、及び免疫持続期間について、3 年間のプロスペクティブな疫学調査を行う。

推進体制は「带状疱疹疫学研究の体制図」参照。

B. 研究方法

本疫学研究の規模および研究テーマは、以下の通りである。

1. 本疫学研究の対象者と目標登録者数
本疫学研究対象者は、香川県小豆郡在住の 50 歳以上の男女 17,323 人 (平成 20 年 10 月 1 日時点) であり、対象者の 69.3% に当たる 12,000 人を目標登録者数とした。
2. 研究テーマの内容について
 - 1) テーマ A (目標登録者数 12,000 人以上)
電話による聞き取り調査。
 - 2) テーマ B (目標登録者数 5,000 人以上)
水痘皮内反応による細胞性免疫の測定
 - 3) テーマ C (目標登録者数 200~300 人)
 - (1) 水痘皮内反応及び ELISPOT 法による細胞性免疫の測定 (登録時、1 年後、2 年後に測定)
 - (2) gp-ELISA 価測定法、中和抗体価測定法、IAHA 価測定法による VZV に対する液性免疫の測定 (登録時、1 年後、2 年後に測定)
 - 4) 発症時の調査及び回復時の調査に基づく带状疱疹の確定診断
 - 5) 带状疱疹重症度評価と細胞性免疫の程度との相関の検討
 - 6) 带状疱疹の発生頻度と発症者における痛みの程度と持続時間の調査
 - 7) 生活習慣・社会心理的要因・VZV に対する細胞性免疫の程度と带状疱疹発症の関係に関する調査
 - 8) 細胞性免疫と液性免疫の関係及び免疫持続時間の調査

【研究倫理面への配慮】

「带状疱疹ワクチン開発のための疫学研究」は、(独) 医薬基盤研究所の倫理委員会 (山西、森) (H20 年 11 月 11 日)、(財) 阪大微生物病研究会 (奥野) の倫理委員会 (H20 年 8 月 23 日)、奈良

県立医科大学の倫理委員会（浅田）（H20年12月12日）及び大阪大学の倫理委員会（磯）（H21年2月12日）で承認を得た。

C. 研究結果

1. 登録対象者17,323人のうち、12,925人(72.3%)が登録を行った。テーマ別では、テーマA：12,522人（達成率104.4%）、テーマB：5,685人（達成率113.7%）、テーマC：365人（達成率121.7%）であった。
2. 帯状疱疹発症歴調査では、登録者12,522人にアンケート調査を行い、帯状疱疹発症歴有と回答した者は1,992人であり、そのうち85人が帯状疱疹を2回以上発症していた。
3. テーマB及びテーマCの登録者5,685人うち5,681人に対して水痘皮内反応を実施し、紅斑長径(mm)の平均値は13.79、中央値は13.69、標準偏差は10.02であった。紅斑長径が5mm以上の者は4,462人、5mm未満の者は1,219人であった。
4. テーマC登録者365人から採取した血液検体を用いて試験を行った結果、gp-ELISA抗体価(Log₁₀)の平均値は3.76、標準偏差は0.36で、IAHA抗体価(Log₂)の平均値は6.27、標準偏差は1.33であった。また、344人の中和抗体価(Log₂)の平均値は5.51、標準偏差は1.56であった。
5. テーマCから採取した血液検体から得られた抹消血単核球(PBMC)についてVZV抗原及びPHAにて刺激を行いIFN γ -ELISPOT法による細胞性免疫の測定結果と水痘皮内反応結果を比較検討した結果、エリスポットの値(スポット数)と皮内反応(陽性)の相関係数は0.23であり、弱い正の相関を認めた。
6. 医療機関において「帯状疱疹である」または「帯状疱疹の疑いがある」と診断された発症者114例のうち、発症時の調査及び回復時の調査で実施した各種試験、検査が全て終了した15例について、確定診断を行った結果、9例が「帯状疱疹である」、6例が「帯状疱疹でない」であった。PCR試験において、「帯状疱疹である」と診断した9例中8

例でVZVが検出され、「帯状疱疹ではない」と診断した6例中1例で単純疱疹ウイルス(HSV)検出された。

7. 発症時の調査のPCR試験の結果、VZV陽性であった帯状疱疹発症者25例(テーマB、C登録者)について、臨床症状の調査票及び臨床写真より皮診の性状(皮診出現の範囲及び神経分節数、紅斑の程度、水疱の程度)スコア化し、各症例の重症度を判定し、帯状疱疹の重症度と登録時の細胞性免疫の程度(水痘皮内反応)との相関について検討したところ、細胞性免疫の程度が弱くなっている者が重症化しやすい傾向であった。

8. 登録者12,522人のベースラインデータを収集し、以下の3つのデータベースの現状と研究作業仮説を構築した。

①帯状疱疹の発生頻度と発症者における痛みの程度と持続期間の調査

【作業仮説数 12】

②生活習慣病・社会心理的要因・VZVに対する細胞性免疫の程度と帯状疱疹発症の関係に関する調査

【作業仮説数 6】

③細胞性免疫と液性免疫の関係及び免疫持続時間の調査

【作業仮説数 4】

D. 考察

1. 地元の医師会、行政、自治会の協力により、自治会単位での登録会を開催し、目標の12,000人を大きく上回る12,522人の登録者数を確保することができた。

また、登録者に対するアンケートによって、登録者の15.9%に過去に帯状疱疹発症歴があり、そのうちの4.3%の者が帯状疱疹を複数回発症していることが明らかになった。

登録者の水痘皮内反応結果は、紅斑及び浮腫の長短径ともに、加齢に伴い減少傾向を示した。このことから、細胞性免疫の程度は加齢に伴い低下することが推察される。一方、液性免疫の程度は各測定法とも加齢に伴い僅かに上昇傾向を示した。

また、細胞性免疫、液性免疫とも、測定値に性別による差は見られなかった。

2. IFN- γ ELISPOT による VZV 特異的免疫の測定結果と皮内反応結果を比較したところ、エリスポット値（スポット数）と皮内反応結果の陽性は弱い正の相関を示したが、皮内反応結果が陰性にも関わらず、エリスポット数が高い検体が数検体あったことに関して詳細な解析が必要であると考えられる。

3. 帯状疱疹の重症度の判定及び細胞性免疫の程度との相関を検討するため、臨床症状のスコア化を試みた結果、細胞性免疫の程度が低下しているの方が、帯状疱疹が重症化しやすい傾向であった。今後、皮診の性状だけではなく、疼痛、合併

症等に関連するスコア化方法の検討が必要であると考えられる。

E. 結論

来年度も引き続き調査を実施することで統計学的に解析可能な症例数が確保できれば、帯状疱疹の疫学の実態が明らかになると考える。

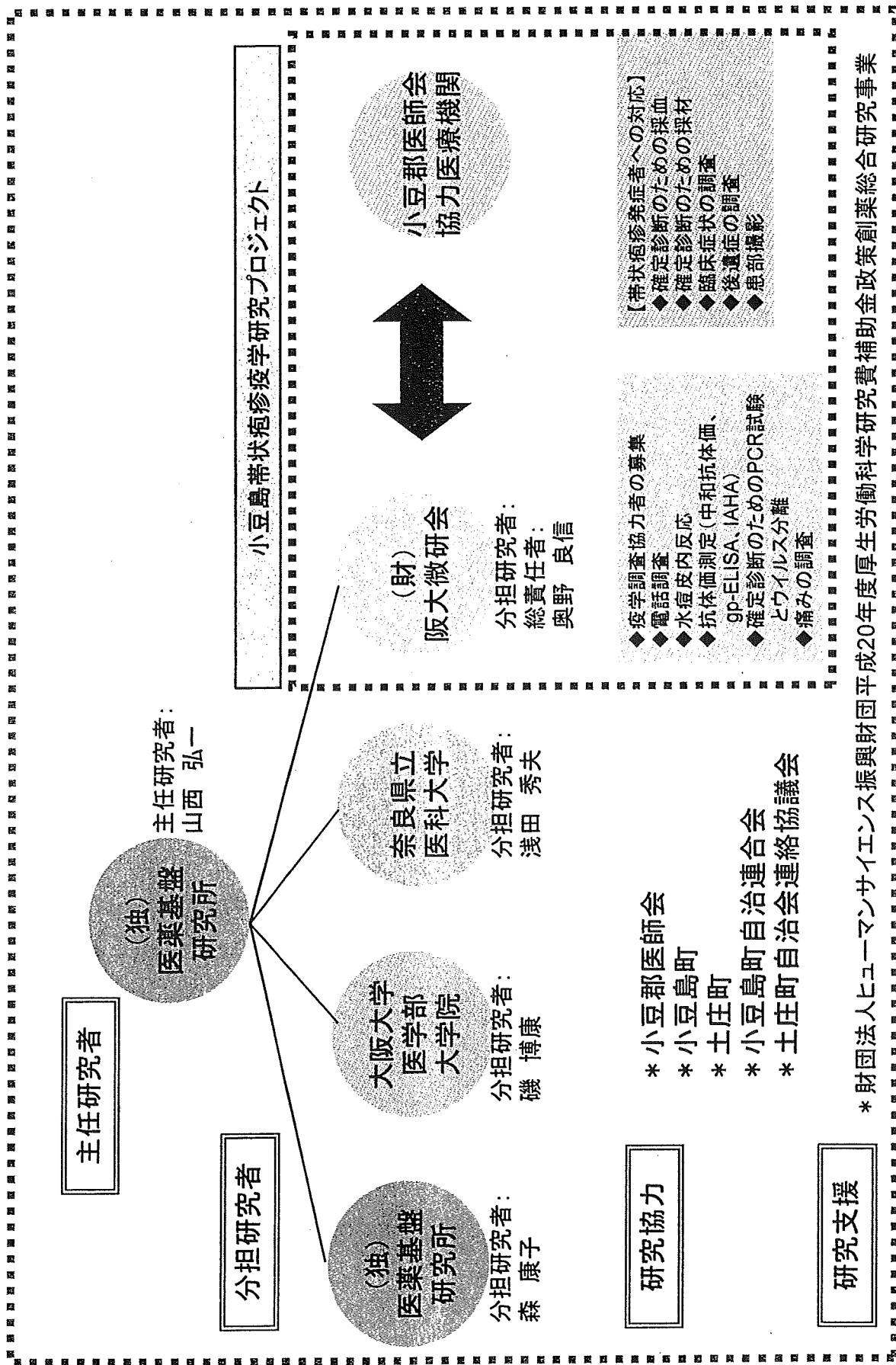
F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

带状疱疹疫学研究の体制図



内因性幹細胞の動員・生着・分化と心筋細胞肥大の 情報伝達を標的とした新規心不全治療法

所属 (独) 国立病院機構京都医療センター 展開医療研究部
研究者 長谷川 浩二

研究要旨 内因性幹細胞の動員、生着、分化と心筋細胞肥大の情報伝達を標的とした新規心不全治療法の確立を目的とし、p300 特異的アセチル化阻害作用を持つクルクミンのヒト臨床試験に向けて、本グループは吸収効率を改善した経口クルクミン DDS を開発し (特許申請中)、その心機能改善効果を動物レベルで証明し、ヒトでの血中濃度測定も行った。また p300/GATA4 蛋白複合体解析により新規結合蛋白を同定すると共に、新たなクルクミン誘導体も合成している。遺伝子導入により内因性幹細胞を活性化し、心血管構築細胞を再生する心不全再生療法確立を目的とし、iPS 細胞の心筋分化における Wnt シグナルの重要性、及び不全心における内因性再生機能の低下を示し、また抗線維化因子 MMP-1 遺伝子の徐放化投与の有効性を動物モデルで証明した。

分担研究者

- (1) セラバリュース(株)プロテオミクス解析センター
センター長 福田 宏之
- (2) 静岡県立大学薬学部分子病態学
教授 森本 達也
- (3) 京都大学大学院医学研究科心臓血管外科
准教授 池田 義
- (4) 京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻
教授 掛谷 秀昭

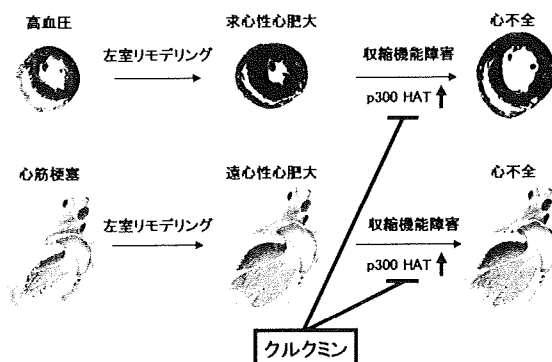
A. 研究目的

我が国においても生活習慣病の最も重篤な合併症である冠動脈硬化症ならびに心筋梗塞後心不全の発症頻度が急増している。21世紀の高齢化社会の到来と共にこれからますます増加する心不全に対して、その発症・増悪を抑制すると同時に、末期心不全に対する新たな治療法を確立することは社会的、医療経済的急務である。

我々は心不全のより根本的治療を確立するため、心筋細胞情報伝達の最終到達点である核内の共通経路の解明を精力的に行ってきた。我々は心不全発症の心筋遺伝子発現調節にヒストンアセチル化酵素 (Histone Acetyltransferases, HAT) 活性を持つ転写コアクチベーター p300 と心筋 GATA 転写因子群の協力 (p300/GATA 経路) が中心的な役割を果たしていることを見いだした (*Mol Cell Biol* 2003;23:3593-606)。さらに心筋梗塞後の左室心筋細胞において核の過

剰なアセチル化が認められること、トランスジェニックマウスの作成により p300 蛋白を心筋に過剰発現することによりアセチル化を促進すると、心筋梗塞後のリモデリングが増悪し、その増悪には p300 の HAT 活性が必要であることを見出した (国際特許出願中、Circulation 2006; 113:679-690)。こうして、心筋細胞核のアセチル化、脱アセチル化のコントロールが心不全の進行に極めて重要であることが国際的に認識されつつある。また最近、健康食品として使用され天然物ウコンの成分であるクルクミンが p300 の特異的アセチル化阻害作用を持つということが明らかになったが、我々はクルクミンが培養心筋細胞肥大を抑制すると同時に高血圧性心疾患ならびに心筋梗塞後の心不全発症を抑制することも動物モデルで確認した (図 1、J Clin Invest. 2008;118:868-78)。

図1) クルクミンは心不全の増悪を抑制する



一方、心筋細胞の脱落が激しい心臓移植が必要な末期心不全に対する根本的治療としては、心筋再生療法が必須である。骨髄、骨格筋心臓あるいは脂肪組織内の内因性幹細胞を採取して、これらを ex vivo 培養系で増殖、心筋に分化させて移植するアプローチが試みられようとしてきたが、これら幹細胞の増殖能・分化効率は極めて低く、臨床応用できる段階ではない。胚性幹 (ES) 細胞は無限増殖能をもちつつ多分化能を有するため、倫理的問題をクリアすれば大いに期待されるアプローチである。しかし、ES 細胞から心筋細胞への分化効率は依然低く、また、分化した細胞を移植しても組織に生着する細胞数が少ないという欠点がある。最近、ES 細胞と同様の多分化能と無限増殖能を持つ人工多能性幹 (induced pluripotent stem, iPS) 細胞が体細胞への遺伝子導入により作出された。iPS 細胞は ES 細胞の免疫拒絶の可能性や倫理的問題をクリアし、再生医療における移植細胞の新たなソースとして期待されている。

そこで本研究の目的は、内因性幹細胞の動員、生着、分化と心筋細胞肥大の情報伝達を標的とした新規心不全治療法を確立することであり、そのため、

1) 心不全発症の情報伝達を標的とした新規薬物療法

経口クルクミン Drug delivery system (DDS) を用いてクルクミンの腸管からの吸収効率を改善する、あるいは新規クルクミン誘導体・類縁化合物の合成を行い、効率よい心不全治療法を開発し、ヒト臨床試験に向けた前臨床研究を行う。

2) 末期心不全に対する内因性幹細胞の活性化による心筋再生療法

遺伝子を体細胞に導入し、内因性幹細胞を活性化、あるいは体細胞を心血管細胞前駆細胞に変換することにより治療する心不全再生療法の確立に向けた基盤研究を行う。また細胞が組織に生着するための遺伝子や増殖因子の徐放化局所投与に関する研究を行う。

B. 研究方法

分担研究者の福田らは経口クルクミン DDS 製剤を開発し、クルクミン血中濃度測定システムを確立、ラット心筋梗塞において経口クルクミン DDS 製剤の有効性を検討し、ヒト健常人においてクルクミン血中濃度を測定した。掛谷らはクルクミン誘導体・類縁化合物の合成を行った。森本らは p300/GATA4 軽度のさらなる解明を目

指し、蛋白複合体解析を行った。川村らは iPS 細胞における心筋細胞分化機構の解明、及び不全心における心筋前駆細胞の解析を行った。池田らは遺伝子徐放化投与による幹細胞生着療法の確立を目指した前臨床研究を行った。

C. 研究結果

福田らは血漿中クルクミン濃度測定法を LC/MS/MS を用いて確立し、吸収効率のよい経口クルクミン DDS (コロイダルディスパージョン型クルクミン) を開発した (特願 2009-112637、2009 年 5 月 7 日出願)。DDS 製剤は、そのままのクルクミン粉末試薬に比べて、ラット経口投与時に約 30 倍以上の血中濃度を示す。本 DDS 製剤の心不全に対する効果を心筋梗塞ラットにおいて検討した。論文 (*J Clin Invest* 2008) ではそのままのクルクミンを 50mg/kg/日 で投与したが、DDS 製剤ではその 100 分の 1 である 0.5mg/kg/日の低用量経口投与でも有意に心不全改善効果を認めた。そのままのクルクミン 0.5mg/kg/日では心不全改善効果は認められなかった。さらに開発したクルクミン DDS 製剤はヒトにおいても高い吸収性能を示すことが確認され、またヒトで 100mg/日程度の DDS 製剤経口摂取は安全性に問題が無いと考えられた。

掛谷らは効率よい心不全治療法を開発するため、クルクミンをリード化合物として、その誘導体及び類縁化合物を短工程で合成し、またリンカー結合型蛍光団を効率的に合成する経路を確立した。

森本らは心不全発症の心筋細胞内情報伝達に中心的な役割を果たす p300/GATA 経路のさらなる詳細な解析のため、蛋白複合体を解析した。転写の伸長反応の促進に関与する P-TEFb (positive transcription elongation factor-b) のキナーゼである Cdk9 が p300 及び GATA4 と結合し、複合体を形成することを示した。そしてキナーゼ活性を消失した変異体 Cdk9 や shRNA による Cdk9 のノックダウンによって心筋細胞肥大が抑制されることを示した。

本研究グループはこれまで胚性幹 (ES) 細胞において心筋特異的転写因子のアセチル化を介した心筋分化効率の著明な亢進などの重要な知見を見出してきた。最近、遺伝子を皮膚線維芽細胞などに導入することによりプロモングを誘導し、体細胞から幹細胞が作成されることが報告された (iPS 細胞)。川村らはマウス iPS 細胞株において心筋分化システムを確立し、Wnt シグナルの古典的および非古典的両経路が iPS 細胞から心筋細胞分化において時間依存性に密

接な関係を持つこと示した。また不全心において幹細胞や早期中胚葉のマーカーの発現が低下していることも示し、心臓内幹細胞の活性化が今後新たな治療標的になりうるということが明らかになった。

MMP-1 はマトリックスポテアーゼファミリーの一つでコラーゲン線維を減少させる間質コラゲナーゼである。池田、丸井らはラット心筋梗塞モデルに MMP-1 を局所投与することで、MMP-1 の抗線維化効果により心機能が改善するかどうかを検討した。生体吸収性ゼラチン水和ゲルを用いた遺伝子徐放システムを利用して半減期の短い MMP-1 を徐放化し、その効果をラット心筋梗塞モデルで検討した。心臓カテーテルにて左室収縮能、拡張能指標が改善し、線維化も抑制されることを示した。

D. 考察

本研究グループは、心不全発症の心筋細胞内情報伝達を標的とした治療法に向けた基盤研究を行い、p300 のアセチル化作用を有するクルクミンが心筋 GATA4 のアセチル化を抑制することにより心不全の増悪を抑制することを高血圧心疾患及び梗塞後心不全の2つの動物モデルで確認した (*J Clin Invest* 2008; 118: 868-878)。平成 20 年度においては、梗塞後心不全において、クルクミンと心不全の標準治療薬である ACE 阻害薬は相加的に心機能を改善すること、ヒトで安全性の確かめられているクルクミン 2g/日経口投与により、心不全治療効果のあるラット 50mg/kg/日経口投与よりも高い血中濃度が得られることを見出した。これらの事実は心筋細胞核内情報伝達を標的とした薬物療法が臨床現場において有用であることを示唆する。さらに高い血中濃度の得られる経口クルクミン DDS を開発し、創薬に向けた新規誘導体作成のための合成経路も確立し、実用化に向けて着実に進みつつある。

遺伝子導入により体細胞がリプログラミングし、幹細胞化することが報告された (iPS 細胞)。この方法は ES 細胞の倫理的問題をクリアすると同時に、分化効率の高い幹細胞が得られる可能性がある。そこで末期心不全に対する心筋再生療法に関しては、本年度は遺伝子導入により内因性幹細胞を活性化し、心血管構築細胞を再生する治療法の確立に向けて iPS 細胞の分化解析を行い、複数の iPS 細胞株において心筋細胞分化システムを確立した。また増殖因子徐放投与の有効性を種々の動物レベルで証明した。

E. 結論

本研究グループは心筋細胞分化と肥大の情報伝達において多くの新たな知見を見出してきた。p300 特異的アセチル化阻害作用を持つクルクミンによる心不全治療においてはヒトで臨床試験を行う一歩手前まで到達した。末期心不全に対する心筋再生療法に関しては、体細胞への遺伝子導入による心血管構築細胞再生に向けて前進した。心不全の新規治療法の確立、臨床現場における実用化に向けて今後も突き進む予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sunagawa Y, Morimoto T, Takaya T, Wada H, Kawamura T, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K Cyclin-dependent kinase-9 is a component of p300/GATA4 complex required for phenylephrine-induced hypertrophy in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* in press
- 2) Hayashi, Y., Sankar, K., Ishikawa, H., Nozawa, Y., Mizoue, K., Takeya, H. Total synthesis and determination of the absolute configuration of FD-838, a naturally occurring azaspirobicyclic product. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (14): 3863-3865, 2009.
- 3) Yoshida Y, Morimoto T, Takaya T, Kawamura T, Sunagawa Y, Wada H, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K. Aldosterone Signaling Associates with p300/GATA4 Transcriptional Pathway During Hypertrophic Responses of Cardiomyocytes. *Circ J.* 2010;74:156-162.
- 4) Takaya T, Ono K, Kawamura T, Takanabe R, Kaichi S, Morimoto T, Wada H, Kita T, Shimatsu A, Hasegawa K. MicroRNA-1 and MicroRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells. *Circ J.* 2009;73:1492-1497.
- 5) Lin X, Tambara K, Fu M, Yamamoto M, Premaratne GU, Sakakibara Y, Marui A, Ikeda T, Komeda M, Tabata Y. Controlled release of matrix metalloproteinase 1 with or without skeletal myoblasts transplantation improves cardiac function of rat hearts with chronic myocardial infarction. *Tissue Eng Part A.* 2009;15 (9) :2699-2706.

2. 学会発表

- 1) T Yoichi Sunagawa, Hiroyuki Fukuda, Hiromichi Wada, Tomohide Takaya, Teruhisa Kawamura, Kazuhide Uemura, Akira Shimatsu, Takeshi Kimura, Masatoshi Fujita, Koji

Hasegawa, Tatsuya Morimoto: Novel Oral Curcumin Drug-delivery System Improves the Deterioration of Systolic Function after Rat Myocardial Infarction 第12回日本心不全学会学術集会, 2009, 10.16~18, 横浜

2) 掛谷秀昭. シンポジウム「ゲノム薬理学と創薬」:ケミカルバイオロジー研究を基盤としたアカデミアにおける創薬研究. 第68回日本癌学会学術総会. 横浜, 10月, 2009

3) Kawamura T. The p53 pathway as a guardian against reprogramming. The 5th China-Japan Cardiovascular Forum (Beijing, China), Oct 12th 2009 (招待講演)

4) Yoichi Sunagawa, Hiroyuki Fukuda, Hiromichi Wada, Tomohide Takaya, Akira Marui, Kazuhide Uemura, Akira Shimatsu, Masatoshi Fujita, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto: Novel drug-delivery system of oral curcumin that prevents the deterioration of systolic function after myocardial infarction in rats. The 82th American Heart Association Annual Scientific Sessions 2009, 11.1~3, Orlando, USA

5) Yoichi Sunagawa, Tatsuya Morimoto, Masatoshi Fujita, Koji Hasegawa: A novel component of p300/GATA4 complex, Cyclin-dependent kinase-9, is required for hypertrophic responses in cardiomyocytes. The 25th Annual Meeting of ISHR Japanese Section, 2009, 12.4-5, Sapporo, Japan

6) Kawamura T, Suzuki J, Wahl GM, Izpisua-Belmonte JC. Links between p53 tumor suppressor pathway and somatic cell reprogramming. 第32回分子生物学会年会 (横浜), Dec 9th 2009 口頭発表 (ワークショップ)

7) Yoichi Sunagawa, Hiroyuki Fukuda, Hiromichi Wada, Tomohide Takaya, Akira Marui, Kazuhide Uemura, Akira Shimatsu, Masatoshi Fujita, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto: A Novel Drug-delivery System of Oral Curcumin Markedly Improves Efficiency of Heart Failure Treatment after Myocardial Infarction in Rats 第74回日本循環器学会総会・学術集会, 2010, 3.5-7, Kyoto, Japan

8) Kawamura T and Suzuki J. p53 tumor suppressor pathway as a novel checkpoint during somatic cell reprogramming. 第9回再生医療学会 (広島), Mar 18th 2010 (招待シンポジスト)

(特願 2009-112637、2009年5月7日出願)

「心疾患予防治療剤①」特願 2009-18813

「心疾患予防治療剤②」特願 2009-18814

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願 (申請中)

「ウコン色素組成物による心機能改善効果」

経口脂肪酸摂取によるアルツハイマー病の発症予防法 開発に関する研究

所属：国立長寿医療センター研究所 アルツハイマー病研究部
研究者 道川 誠

研究概要) アルツハイマー病の予防法の開発を目的に、(1)加齢に従って変動すると考えられる脳内脂質代謝との関連から必須多価脂肪酸の脳内における APP 代謝への影響を検討した。その結果、アラキドン酸含有食餌の経口摂取によって、マウスモデルにおける脳内 A β 沈着の減少、その理由として Ab 産生系が抑制されること、ならびに認知障害発症が予防されることが明らかになった(前臨床試験終了)。これらの結果は、脂肪酸の経口摂取やサプリメント摂取によってアルツハイマー病の発症を予防できる可能性をしめしている。次年度に疫学調査によってヒトでも同様の効果があるかどうかを検証し、効果があることが明らかになれば介入試験を計画する予定である。

分担研究者

- (1) サントリーウエルネス株式会社
健康科学研究所 河島 洋
- (2) サントリーウエルネス株式会社
健康科学研究所 紺谷 昌仙
- (3) 福祉村病院長寿医学研究所
赤津 裕康

A. 研究目的

経口脂肪酸摂取によるアルツハイマー病病理である脳内 A β 代謝ならびに認知機能障害に対する予防効果を検討する。そのために、アルツハイマー病モデル動物に様々な脂肪酸構成を変化させた餌を長期投与し、脳内 A β 沈着ならびに認知機能進行に対する予防効果の評価と、そのメカニズムの解明を行う。さらに、ヒト脳サンプルにおける脂肪酸解析と A β 沈着との関連を解析する。

B. 研究方法

アルツハイマー病モデルマウスの Tg2576 マウスに各種脂肪酸を含む餌を長期間摂餌(9ヶ月齢から17ヶ月齢)させた後、脳を回収、ELISAによるA β 量の定量、thioflavin S染色や抗A β 抗体を用いた免疫染色による老人斑形成について評価を行った。この実験は、前年度に行った実験の再現性の確認と、新たな生化学的解析を目的として行った。その結果、前年度と同様にアラキドン酸を摂餌したTg2576で脳内A β 沈着の抑制が認められた。この結果を踏まえ、更にアラキドン酸がA β 産生、分解、除去といったA β 代謝に及ぼす影響を検討した(以上、道川)。また、赤津らは、ヒト組織、血液、髄液を用いた解析のためにヒトサンプルの収集を行った。さらに細胞膜、

脂質・脂肪酸の変化、 β ・ γ セクレターゼ活性および $A\beta$ 分解活性への影響、疾患・病態との関連の検討に備えて、各種アッセイ系、測定系を準備した。各種脂肪酸を含む餌の作成ならびにマウス・ヒト脳、各種臓器の脂肪酸解析では、モデルマウス(17月齢)から大脳皮質、肝臓、血液(血漿、赤血球)を採取し、それぞれの組織より油脂を抽出した上で、薄層クロマトグラフィーでリン脂質画分を分画し、メチルエステル体に誘導した後に、ガスクロマトグラフィーにより、脂肪酸の同定および定量を行った(サントリー研究所河島、紺谷)。また、マウスの学習試験を行うために、Tg2576 マウスに各種脂肪酸を含む餌を長期間摂餌(9ヶ月齢から13ヶ月齢)させた後に、各種行動試験を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組換え実験およびヒト由来試料を用いる実験については、研究計画申請を当該研究施設に提出し、その内容については倫理委員会または実験動物倫理委員会によって法令(下記を参照)に定められた基準への適合性について審査され、承認を得て行う。動物実験については、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知における基本指針」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、「動物の処分方法に関する指針」等の遵守、また遺伝子組換え実験においては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、ヒト由来

試料を用いる実験においては、生命倫理面および個人情報管理面で最大限の努力を払い、「ヘルシンキ宣言」などの法令等を遵守して研究を行う。

C 研究結果および D 考察

(1)脂肪酸種類の違いによる $A\beta$ 沈着への影響の分子メカニズムの解明:経口脂肪酸摂取によって、アルツハイマー病理である脳内 $A\beta$ 沈着抑制効果ならびに認知機能障害予防効果を検討した。本年度は、アルツハイマー病モデル動物に様々な脂肪酸構成を変化させた餌を長期投与し、脳内 $A\beta$ 沈着ならびに認知機能進行に対する予防効果を評価し、更に、そのメカニズムの解明を行った。アラキドン酸含有餌の摂取によってアルツハイマー病モデル動物脳における $A\beta$ 沈着が抑制されること、アラキドン酸または DHA 含有餌は APP トランスジェニックマウスにおける認知機能障害を予防することを明らかにした。また、その分子機構としてアラキドン酸や DHA が脳内 APP 代謝を変化させるためであることを明らかにした。これらの結果は、脂肪酸の経口摂取によってアルツハイマー病発症を予防できる可能性を示している。今後は、疫学研究による検証を行い、介入試験の実施の可能性を探る。

E. 結論

(1)アルツハイマー病モデルマウスに不飽和脂肪酸を経口摂取させることにより、脳内 $A\beta$ 代謝を調節することができることが明らかになった。このことは食餌療法やサプリメント投与によってアルツハイマ

一病発症予防ができる可能性を示しており、今後、疫学研究や介入研究をする必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura T, Watanabe A, Fujino T, Hosono T, and Michikawa M Apolipoprotein E4 (1-272) fragment is associated with mitochondrial proteins and affects mitochondrial function in neuronal cells.

Mol. Neurodegener., 4: 35, 2009.

2. Doi Y, Mizuno T, Maki Y, Jin S, Mizoguchi H, Ikeyama M, Doi M, Michikawa M, Takeuchi H, and Suzumura A. Microglia activated with toll-like receptor 9 ligand CpG attenuate oligomeric amyloid- β neurotoxicity in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease.

Am. J. Pathol., 175: 2121-2132, 2009.

3. Maeda T, Marutani T, Zou K, Araki W, Yagishita N, Yamamoto Y, Amano T, Michikawa M, Nakajima T, and Komano H. An E3 ubiquitin ligase, Synoviolin is involved in the degradation of immature Nicastrin, and regulates the production of amyloid b-protein.

FEBS J., 276: 5832-5840, 2009.

4. Zou K, Maeda T, Oba R, Komano H, and Michikawa M. A β 42-to-A β 40- and angiotensin- converting activities in different domain of angiotensin-converting enzyme. **J. Biol. Chem.**, 284:31914- 31920, 2009.

5. Tesseur I, Brecht W, Corn J, Gong J-S, Yanagisawa K, Michikawa M, Weisgraber K, Huang Y, and Wyss-Coray T. Bioactive TGF- β can associate with lipoproteins and is enriched in those containing apolipoprotein E3.

J. Neurochem., 110(4): 1254-1262, 2009

6. Minagawa K, Gong J-S, Jung C-G, Watanabe A, Lund-Katz S, Phillips M C, Saito H, and Michikawa M. Mechanism underlying apolipoprotein E isoform-dependent lipid efflux from neural cells in culture. **J. Neurosci. Res.**, 87: 2498-2508, 2009.

7. Fukumoto N, Fujii T, Combarros O, Kamboh MI, Tsai SJ, Matsushita S, Nacmias B, Comings DE, Arboleda H, Ingelsson M, Hyman BT, Akatsu H, Grupe A, Nishimura AL, Zatz M, Mattila KM, Rinne J, Goto YI, Asada T, Nakamura S, Kunugi H. Sexually dimorphic effect of the Val66Met polymorphism of BDNF on

susceptibility to Alzheimer's disease:
New data and meta-analysis. **Am J
Med Genet B Neuropsychiatr Genet.**
in press.

8. Kimura R, Yamamoto M, Morihara
T, Akatsu H, Kudo T, Kamino K,
Takeda M. SORL1 is genetically
associated with Alzheimer disease in
a Japanese population. **Neurosci Lett.**
2009 461(2):177-80.

9. Hata S, Fujishige S, Araki Y, Kato N,
Araseki M, Nishimura M, Hartmann
D, Saftig P, Fahrenholz F, Taniguchi
M, Urakami K, Akatsu H, Martins RN,
Yamamoto K, Maeda M, Yamamoto T,
Nakaya T, Gandy S, Suzuki T.
Alcadein cleavages by APP
{alpha}-and {gamma}- secretases
generate small peptides p3-Alcs
indicating Alzheimer disease-related
{gamma}-secretase dysfunction.
J Biol Chem. in press.

10. 道川 誠(アルツハイマー病研究部)
第4章:コレステロール代謝とアルツハイ
マー病. 脳内老化制御とバイオマーカー:
基盤研究と食品素材.(株)シーエム
シー出版、東京、2009. pp129-136.

2. 学会発表:

道川 誠

レニンアンジオテン系とアミロイドβ蛋白
代謝. 第28回日本認知症学会シンポジ
ウム、平成21年11月21日、仙台

道川 誠

The cholesterol paradox in the
pathogenesis of Alzheimer's disease.
第51回 日本脂質生化学会シン
ポジウム、平成21年7月30日、名
古屋

道川 誠

アルツハイマー病の予防・治療法
開発の最前線、平成21年度日本
大学生物資源科学部市民講座
講演、平成21年7月4日、藤沢

道川 誠

脳内脂質代謝の生理学的ならびに病理
学的意義について
日本膜学会シンポジウム「脂質低下療法
時代の生体膜研究」
東京理科大学森戸記念館 平成21年5
月22日、東京

赤津裕康 1,2, 伊苺弘之 1, 松山善次郎
1, 小橋修 1, 瀬藤光利 2, 山本孝之 1
高カロリー輸液にて栄養管理している高
齢者における栄養・微量元素の推移に
関する研究。新薬と臨牀, 58(11):
1921-1930, 2009.

学会発表

高度な前頭・側頭萎縮を示した Lewy
小体型認知症の一例 赤津裕康、堀映、
山本孝之、山縣英久、三室マヤ、吉田
眞理、橋詰良夫 6月5日 神経病理学
会 東京