

- Alzheimer's disease.
Am. J. Pathol., 175: 2121-2132, 2009.
- 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.
- 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.
- 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
- Minagawa H, 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.
- Zou K, Maeda T, Michikawa M, and Komano H.
New amyloid plaques or a game of hide-and-peek?
Int. J. Biol. Sci., 4: 200-201, 2008
- Zou K and Michikawa M
Angiotensin-converting enzyme as a potential target for treatment of Alzheimer's disease: Inhibition or activation?
Rev. Neurosci., 19: 203-212, 2008.
- Zou K, Hosono T, Nakamura T, Shiraiishi H, Maeda T, Komano H, Yanagisawa K, Michikawa M. Novel role of presenilins in maturation and transport of integrin β 1.
Biochemistry, 47(11): 3370-3378, 2008.
- 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. Alcaldin cleavages by APP {alpha}-and {gamma}-secretases generate small peptides p3-Alcs indicating Alzheimer disease-related {gamma}-secretase dysfunction.
J Biol Chem. 2009
2. 学会発表
1) 下方浩史：老化に関する長期縦断疫学研究－老化と老年病の予防を目指して。第3回東京アンチエイジングアカデミー、東京、2010年6月5日。
2) 大塚礼, 加藤友紀, 今井具子, 安藤富士子, 下方浩史：地域在住中高年男女における多価不飽和脂肪酸摂取量と認知機能低下との関連。第32回日本臨床栄養学会, 2010年8月29日, 名古屋。
3) Shimokata H: Geriatrics and Health Promotion for the Elderly by Longitudinal Epidemiological Study. Asia Aging Forum 2010, Oct 30, 2010, Obu.
- 巖 景玉, 赤津裕康, 三浦 裕, 道川 誠, 鄭 且均 APP代謝及びA β 産生におけるATBF1の機能解析 日本認知症学会、平成22年11月5日、名古屋
- 西辻和親, 細野 崇, 内村健治, 道川 誠
リポ蛋白質リパーゼは初代培養アストロサイトによるアミロイド β の取り込みを促進する
日本認知症学会、平成22年11月5日、名古屋
- 細野 崇, 山内玲奈, 紺谷昌仙, 西辻和親, 鄭 且均, 河島 洋, 木曾良信, 道川 誠
多価不飽和脂肪酸餌はLPSで誘導される脳内炎症を抑制する
日本認知症学会、平成22年11月5日、名古屋
- ゾウケン, 劉俊俊, 劉しゅ余, 田邊千晶, 前田智司, 道川 誠, 駒野宏人
Enhanced Alzheimer's-like pathology by ACE inhibition in APP transgenic mouse brain
日本認知症学会、平成22年11月5日、名古屋
- 道川 誠 アポリポ蛋白質Eとアルツハイマー病

教育講演：第18回中部老年期認知症研究会 平成22年10月30日、名古屋

西辻和親、細野 崇、中村俊行、道川 誠
血液脳関門機能に対するアポリポタンパク質E
アイソフォームの影響
Neuro2010, 2010年9月4日、神戸

鄭 且均、巖 景玉、三浦 裕、赤津裕康、
道川 誠 APP代謝及びAb産生機構におけるホ
メオティック因子 ATBF1の機能解析
Neuro2010, 2010年9月3日、神戸

ゾウケン、劉 俊俊、劉 しゅ余、田邊千晶、前
田智司、道川 誠、駒野宏人
ACE阻害によるアルツハイマー病モデルマウス
脳内変化の解析
Neuro2010, 2010年9月2日、神戸

道川 誠 炎症とアルツハイマー病
日本歯周病学会シンポジウム、
2010年9月19日、高松

道川 誠 Apolipoprotein E and Alzheimer's
Disease 招待講演(客員教授授与講演)、中国瀋
陽医学院・何氏視覚科学学院、2010年9月27日、
瀋陽

Zou K, Liu S, Liu J, Tanabe C, Maeda T,
Michikawa M, Komano H.
Potent inhibition of ACE leads to Alzheimer-like
pathology in APP transgenic mouse brain.
International Conference on Alzheimer's Disease
(ICAD), July 11, 2010, Honolulu, Hawaii

Uhm KO, Horike H, Miura Y, Akatsu H,
Michikawa M, Jung CG ATBF1 interacts with
amyloid precursor protein and enhances amyloid
 β -protein production.
The First International Conference on Neural
Cell Culture (ICNCC 2010), June 25, 2010, Seoul,
Korea.

Michikawa M.
Apolipoprotein E and Alzheimer's disease
Hallym University, The 12th Ilsong International
Symposium, Hallym-Nagoya Academic Joint
Meeting
June 24, 2010. Anyang, Gyeonggi-do, Korea

Kazuchika N, Hosono T, Nakamura T, and
Michikawa M.

Effect of apolipoprotein E isoform on formation
and maintenance of blood-brain-barrier
function.

June 7, 2010. Washington University, St. Louis,
USA

道川 誠 レニンアンギオテンシン系とアルツ
ハイマー病 慈恵医大神経疾患研究会、平成22年
2月18日、東京

道川 誠 脳内コレステロール代謝制御による
アルツハイマー病の予防・治療薬開発
アステラス製薬研究所、平成22年2月19日、つ
くば

道川 誠 レニンアンギオテンシン系とアミロ
イドベータ蛋白代謝
日本認知症学会 シンポジウム「生活習慣病対策
から認知症予防を考えるー高血圧治療と認知症」
平成21年11月21日、仙台

細野 崇、紺谷 昌仙、西辻和親、鄭 且均、河
島 洋、木曾良信、道川 誠
必須脂肪酸経口摂取による脳内アミロイドベ
ータ蛋白沈着抑制
日本認知症学会 平成21年11月21日、仙台

ゾウケン、前田智司、渡邊淳、劉俊俊、劉しゅ余、
大葉龍太郎、道川 誠、駒野宏人
 $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ and angiotensin converting
activities in different domains of
angiotensin-converting enzyme.
日本認知症学会 平成21年11月22日、仙台

西辻和親、細野 崇、中村俊行、道川 誠
アポリポタンパク質 E アイソフォーム依存的な血液
脳関門機能制御機構の解明
日本認知症学会 平成21年11月22日、仙台

G. 知的財産兼の出願状況

特許出願

1. 発明の名称：アルツハイマー病の予防及び治
療薬並びにアルツハイマー病の予防及び治療
薬のスクリーニング方法。発明者：道川 誠、
西辻和親。出願者：財団法人ヒューマンサイエ
ンス振興財団。出願日：平成21年12月21日。出
願番号：特願2009-289487

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：独立行政法人 国立長寿医療研究センター
アルツハイマー病研究部
研究者：道川 誠

研究要旨 経口脂肪酸摂取によって、アルツハイマー病病理である脳内 A β 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。アルツハイマー病モデルマウスにアラキドン酸含有餌および DHA 含有餌を長期 (9~17 ヶ月齢) に経口摂取させたところ、アラキドン酸含有餌で飼育したマウスでは脳内 A β 沈着が抑制され、13 ヶ月齢で発症する認知機能障害が緩和されることが明らかになった。その分子機構として脳内脂肪酸組成の変化によって A β 代謝が変動し、A β 42/A β 40 比の低下が引き起こされる可能性が示された。また、アラキドン酸含有餌および DHA 含有餌で飼育したマウス脳では、リポポリサッカライド(LPS)刺激による脳内炎症を有意に抑制することが明らかになった。

ヒトにおける脂肪酸摂取と認知機能との関連性を長期縦断疫学調査から明らかにすることを目的として検討を行った。横断的な解析の結果、女性において、アラキドン酸が多い群で、論理的記憶 I の得点が高い傾向が認められたが、男性でははっきりした結果は得られなかった。収集したデータの縦断的検討を今後に予定している。脂肪酸摂取の有効性が確認されれば、予防法確立に向けて介入試験を行う必要がある。

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
- (4) 独立行政法人 国立長寿医療研究センター 下方浩史

A. 研究目的

経口脂肪酸摂取によるアルツハイマー病の脳病理である A β 沈着と認知機能障害に対する予防効果を検討し、真に有効で比較的容易な予防法を確立する。そのために、**(1)** アルツハイマー病モデル動物にアラキドン酸含有餌を長期投与し、脳内 A β 沈着、及び認知機能障害に対する予防効果の評価とメカニズム解明を行う。**(2)** 野生型マウスに上記餌を3ヶ月投与し、LPSの腹腔内投与で惹起させた脳内炎症に対する効果を検討する。**(3)** 経口脂肪酸摂取によるアルツハイマー病の発症予防法を開発する研究の一環として、ヒトにおける脂肪酸摂取と認知機能との関連

性を長期縦断疫学調査から明らかにすることを目的とする。脂肪酸の中でも特に、認知機能との関連性が報告されつつあるアラキドン酸に着目した検討を行った。

B. 研究方法

- 1)** アルツハイマー病モデルの APP トランスジェニックマウス(Tg2576)に、9 から 17 ヶ月齢まで、不飽和脂肪酸アラキドン酸含有餌あるいは DHA 含有餌で飼育し、17 ヶ月齢時にマウス脳を回収、ELISA による A β 量の定量、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した。更にアラキドン酸が A β 産生、分解、除去に及ぼす影響を生化学的に解析した。17 ヶ月齢で大脳皮質、肝臓、血液(血漿、赤血球)を採取し、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。
- (2)** 野生型マウスに3ヶ月から6ヶ月までアラキドン酸含有餌あるいは DHA 含有餌で飼育し、脳内サイトカインの mRNA レベルを解析した。
- (3)** 学習・記憶行動における脂肪酸摂取の影響(13 ヶ月齢時点)については、

Tg2576マウスを9ヶ月齢からアラキドン酸含有餌あるいはDHA含有餌で飼育し、13ヶ月齢時に行動試験（Y字迷路試験、新規物体認識試験、恐怖条件付け学習試験）を実施した。(4)対象者は「国立長寿医療研究センター・老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)」の第4次調査に参加した40歳以上の男女2,383名である。写真撮影を併用した3日間（連続する平日2日と休日1日）の秤量式食事記録調査(3DR)から、脂肪酸45種類を含む119項目の栄養素、および18群の分類に基づく食品群別摂取量を算出した。また、日本版ウェクスラー記憶検査(WMS-R)の13下位検査のうち、言語性のエピソード記憶を測定する「論理的記憶I」「論理的記憶II」を施行した。論理的記憶I(直後再生)は、対象者が2つの短い物語を聞き、それぞれの物語を聞いた直後に、覚えていることを再生することで記憶力を評価した(得点範囲は0-50点)。論理的記憶II(遅延再生)は、「論理的記憶I」の終了後、約30分の間隔をあけて、覚えていることを再生させることで記憶力を評価した(得点範囲は0-50点)。

(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、倫理委員会または実験動物倫理委員会によって審査・承認を得て行った。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」、「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った。

C. 研究結果

(1) アラキドン酸またはDHA含有餌によるA β 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、アルツハイマー病病理である脳内A β 沈着抑制効果ならびに認知機能障害予防効果をアルツハイマー病モデルマウス(Tg2576)を用いて検討した。その結果、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大脳におけるA β 40沈着がコントロール餌摂取群に比して約35%に統計学的有意差をもって抑制されていた(ELISA法)。更に、A β 42/A β 40比の低下が認められた。また抗A β 抗体を使用した免疫組織学的解析からA β によって形成されるアミロイド沈着がコントロール餌摂取群に比して約40%に統計学的有意差をもって抑制されていた(Thioflavin S染色)。しかし、DHA含有餌で飼育されたマウスでは、コントロール群と有意な差はなかった。脳の生化学的解析により、餌から取り込んだアラキドン酸ならびにDHAは、脳の細胞膜の脂肪酸組成に影響し、それぞれアラキドン酸ならびにDHAのレベルを有意に上昇させたが、アラキドン酸の上昇の方がDHAに比して顕著であった。アラキドン含有餌においては、餌における脂肪酸組成の違いが脳内脂肪酸レベルに影響し、それがA β 代謝に影響を与え、脳内A β 沈着が減少した可能性が考えられた。この研究計画は計画通り終了した(達成率100%)。

(2) アラキドン酸またはDHA含有餌投与による認知機能障害予防効果の検討：更に、アルツハイマー病モデルマウス(Tg2576)を用いて認知機能に対する影響を検討した。Tg2576マウスは10ヶ月齢前後で認知機能障害を呈する。そこで、アラキドン酸含有餌で9ヶ月齢から飼育したTgマウスとコントロール餌で飼育したTgマウスの認知機能検査を13ヶ月齢の時点で行った。その結果、アラキドン酸含有餌で飼育したマウスおよびDHA含有餌で飼育したマウスにおける認知機能は、コントロール群にくらべて障害の程度が有意に緩和されていた。以上(1)(2)の結果は、脂肪酸の経口摂取によって特にアラキドン酸含有餌の場合においては、アルツハイマー病発症を病理学的にも認知機能障害の面でも予防できる可能性を示している。そこで、3年目に疫学研究によ

る検証を行った。

(3) アラキドン酸または DHA 含有餌投与による脳内炎症抑制効果の検討：野生型マウスに3ヶ月から6ヶ月までアラキドン酸含有餌あるいは DHA 含有餌で飼育し、脳内サイトカインの mRNA レベルを解析したところ、アラキドン酸含有餌あるいは DHA 含有餌で飼育したマウスでは両群とも、脳内 IL6, TNF α , iNOS, COX2 等の mRNA 発現が対照群に比して有意に抑制された。

(4) 長期縦断疫学研究データの解析：男女別、アラキドン酸摂取量3分位における論理的記憶 I、論理的記憶 II の得点を共分散分析にて検討した。調整変数として年齢、エネルギー摂取量を用いた。

男女別のアラキドン酸摂取量3分位における年齢、エネルギー摂取量調整後の論理的記憶 I を解析した。女性では、アラキドン酸摂取量が多い群ほど、論理的記憶 I の得点が高い傾向が認められた。男性では有意な関連性が認められなかった。論理的記憶 II の得点を従属変数とした解析では、有意な関連性は認められなかった。

D. 考察

アルツハイマー病モデルマウスにアラキドン酸を含む餌を長期(9~17ヶ月齢)に亘り経口摂取させることにより、脳内 A β 沈着を抑制し、9~13ヶ月齢の投与によっても13ヶ月齢で認められる認知機能障害の発症を緩和させることが明らかになった。その分子機構として A β 42/A β 40 比の低下による可能性が示された。DHA には A β 沈着抑制作用は弱かったが、その理由として経口摂取した DHA が脳内の細胞膜に効率よく反映されていない可能性が考えられた。またアラキドン酸および DHA 摂取は双方とも脳内炎症抑制作用があることが明らかになった。アルツハイマー病では、脳内炎症による2次的な細胞障害が惹起されることが知られていることから、これら脂肪酸摂取は、こうした脳内炎症を抑制することで細胞障害を弱める可能性があると考えられる。

ヒトにおけるアラキドンなどの脂肪酸摂取の影響を検証するために、国立長寿医療研究センター予防開発部で行われている長期縦断疫学調査で得られたデータを解析した。横断的な解析の結果、女性において、アラキドン酸摂取量が多い群で、論理的記憶 I の得点が高い傾向が認められた。すなわちアラキドン酸摂取量が多い群ほど、認知機能が高い可能性が考えられた。一方、男性では有意な関連性が認められなかった。3年目に開始したため横断的な解析までは終了したが、収集したデータの縦断的検討は今後に予定する。脂肪酸摂取の有効性が確認できれば、予防法確立に向けて介入試験を行う必要がある。

E. 結論

不飽和脂肪酸摂取のアルツハイマー病分子病態ならびに認知機能障害への影響をアルツハイマー病モデルマウスを用いて解析した。アラキドン酸摂取により脳内 A β 沈着が抑制され、認知障害発症も緩和された。アラキドン酸摂取群、DHA 摂取群の双方で、脳内炎症抑制効果が明らかになった。また、脂肪酸摂取の影響を検証するために、長期縦断疫学調査で得られたデータを解析した。横断的な解析の結果、女性において、アラキドン酸摂取量が多い群で、論理的記憶 I の得点が高い傾向が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yasuno F, Tanimukai S, Sasaki M, Hidaka S, Ikejima C, Yamashita F, Kodama C, Mizukami K, Michikawa M, Asada T. Association Between Cognitive Function and Plasma Lipids of the Elderly After Controlling for Apolipoprotein E Genotype *Am. J. Geriat. Psychiat.*, in press, 2011.

Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E.

The dissociation of A β from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates A β 42 assembly.
J. Neurosci. Res., in press, 2011.

Takamura A, Okamoto Y, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Mouri A, Nabeshima T, Sun H, Abe K, Shoji M, Yanagisawa K, Michikawa M, Matsubara E. Extracellular and intraneuronal HMW-A β oligomers represent a molecular basis of memory loss in Alzheimer's disease model mouse.
Mol. Neurodegener., 6: 20, 2011.

Nishitsuji K, Hosono T, Uchimura K, and Michikawa M. Lipoprotein lipase is a novel A β -binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of A β in astrocytes.
J. Biol. Chem., 286: 6393-6401, 2011.

Akatsu H, Ogawa N, Kanesaka T, Hori A, Yamamoto T, Matsukawa N, Michikawa M.
Higher activity of peripheral blood angiotensin-converting enzyme is associated with later-onset of Alzheimer's disease.
J. Neurol. Sci., 300: 67-73, 2011.

Minagawa H, Watanabe A, Akatsu H, Adachi K, Ohtsuka C, Terayama Y, Hosono T, Takahashi S, Wakita H, Jung C-G, Komano H, and Michikawa M. Homocysteine, another risk factor for Alzheimer's disease, impairs apolipoprotein E3 function.
J. Biol. Chem., 285:38382-38388, 2010.

Jung C-G, Horike H, Cha B-Y, Uhm K-O, Yamauchi R, Yamaguchi T, Hosono T, Iida K, Woo J-T, Michikawa M.
Honokiol increases ABCA1 expression level by activating retinoid X receptor β .
Biol. Pharm. Bull., 33:1105-1111, 2010.

2. 学会発表

巖 景玉、赤津裕康、三浦 裕、道川 誠、鄭 且均 APP 代謝及び A β 産生における ATBF1 の機能解析 日本認知症学会、平成 22 年 11 月 5 日、名古屋

西辻和親、細野 崇、内村健治、道川 誠 リポ蛋白質リパーゼは初代培養アストロサイトによるアミロイド β の取り込みを促進する
日本認知症学会、平成 22 年 11 月 5 日、名古屋

細野 崇、山内玲奈、紺谷昌仙、西辻和親、鄭 且均、河島 洋、木曾良信、道川 誠 多価不飽和脂肪酸餌は LPS で誘導される脳内炎症を抑制する
日本認知症学会、平成 22 年 11 月 5 日、名古屋

ゾウケン、劉俊俊、劉しゅ余、田邊千晶、前田智司、道川 誠、駒野宏人
Enhanced Alzheimer's-like pathology by ACE inhibition in APP transgenic mouse brain
日本認知症学会、平成 22 年 11 月 5 日、名古屋

道川 誠 アポリポ蛋白 E とアルツハイマー病 教育講演：第 18 回中部老年期認知症研究会 平成 22 年 10 月 30 日、名古屋

西辻和親、細野 崇、中村俊行、道川 誠 血液脳関門機能に対するアポリポタンパク質 E アイソフォームの影響
Neuro2010, 2010 年 9 月 4 日、神戸

鄭 且均、巖 景玉、三浦 裕、赤津裕康、道川 誠 APP 代謝及び Ab 産生機構におけるホメオチック因子 ATBF1 の機能解析
Neuro2010, 2010 年 9 月 3 日、神戸

ゾウケン、劉 俊俊、劉 しゅ余、田邊千晶、前田智司、道川 誠、駒野宏人
ACE 阻害によるアルツハイマー病モデル

マウス脳内変化の解析
Neuro2010, 2010年9月2日、神戸

道川 誠 炎症とアルツハイマー病
日本歯周病学会シンポジウム、
2010年9月19日、高松

道川 誠 Apolipoprotein E and
Alzheimer's Disease 招待講演(客員教授
授与講演)、中国瀋陽医学院・何氏視覚科
学院、2010年9月27日、瀋陽

Zou K, Liu S, Liu J, Tanabe C, Maeda T,
Michikawa M, Komano H.

Potent inhibition of ACE leads to
Alzheimer-like pathology in APP
transgenic mouse brain. International
Conference on Alzheimer's Disease
(ICAD), July 11, 2010, Honolulu, Hawaii

Uhm KO, Horike H, Miura Y, Akatsu H,
Michikawa M, Jung CG ATBF1
interacts with amyloid precursor protein
and enhances amyloid β -protein
production.
The First International Conference on
Neural Cell Culture (ICNCC 2010), June
25, 2010, Seoul, Korea.

Michikawa M.
Apolipoprotein E and Alzheimer's
disease
Hallym University, The 12th Ilsong
International Symposium,
Hallym-Nagoya Academic Joint Meeting
June 24, 2010. Anyang, Gyeonggi-do,
Korea

Kazuchika N, Hosono T, Nakamura T,
and Michikawa M.
Effect of apolipoprotein E isoform on
formation and maintenance of
blood-brain-barrier function.

June 7, 2010. Washington University, St.
Louis, USA

道川 誠 レニンアンジオテンシン系と
アルツハイマー病 慈恵医大神経疾患研究
会、平成22年2月18日、東京

道川 誠 脳内コレステロール代謝制御
によるアルツハイマー病の予防・治療薬開
発
アステラス製薬研究所、平成22年2月19
日、つくば

下方浩史:老化に関する長期縦断疫学研究
—老化と老年病の予防を目指して。第3回
東京アンチエイジングアカデミー、東京、
2010年6月5日。

大塚礼, 加藤友紀, 今井具子, 安藤富士子,
下方浩史:地域在住中高年男女における多
価不飽和脂肪酸摂取量と認知機能低下と
の関連。第32回日本臨床栄養学会, 2010
年8月29日, 名古屋。

Shimokata H: Geriatrics and Health
Promotion for the Elderly by
Longitudinal Epidemiological Study.
Asia Aging Forum 2010, Oct 30, 2010,
Obu.

赤津裕康、山本孝之、丸山光生経腸栄養管
理高齢者へのプレバイオティクス介入
のインフルエンザ抗体価に及ぼす影響
6月17日 基礎老化学会 名古屋

赤津裕康、山本孝之
Alcadin 断片血中測定によるアルツハイ
マー病血液スクリーニング法の確立
6月25日 日本老年学会 神戸

Hiroyasu Akatsu¹⁾, Znjiro Matsuyama¹⁾,
Akira Hori¹⁾, Takayuki Yamamoto¹⁾, Mari
Yoshida²⁾, Yoshio Hashizume²⁾, Satoshi
Makino³⁾, Ikuo Tooyama³⁾, Eric Yezdimer⁴⁾
Copper concentrations are reduced in AD
brains
7月11~15日~国際アルツハイマー学会
ホノルル

村山繁雄、齊藤祐子、高尾昌樹、赤津裕康

神経科学ブレインネットワークの構築
9月2～4日 Neuro2010

由木大、財満信宏、杉浦悠毅、赤津裕康、
橋詰良夫、山本孝之、藤原正美、杉山圭吉、
瀬藤光利

質量顕微鏡法におけるヒト脳脂質の分子
イメージング
9月2～4日 Neuro2010

A. Hori, H. Akatsu, and Y. Hashizume
Transneuronal degeneration of the corpus geniculatum laterale (CGL) after ocular enucleation

9月5日 国際神経病理学会 ザルツブルグ

赤津裕康、今野禎子、羽田沙緒理、小川倫弘、
兼坂岳志、山本孝之、鈴木利治
アルツハイマー病患者における髄液、血液、
尿中 Alcadein 断片測定 of 検討

11月5～6日 日本認知症学会 名古屋

丸山和佳子、日坂真輔、永井雅代、勢能弓、
加藤陽二、大澤俊彦、赤津裕康、直井信
脳神経の膜脂質過酸化は構造異常蛋白室
の生成を介して神経変性に関与する
11月5～6日 日本認知症学会 名古屋

今野禎子、羽田沙緒理、中矢正、濱田由紀子、
前田雅弘、桑野良三、赤津裕康、鈴木利治

Alcadein の g セクレターゼ代謝産物
p3-Alc の血中からの抽出と定量検

11月5～6日 日本認知症学会 名古屋

細野友美、新美しおり、Md Motarab Hossain, Markus Britschgi, 赤津裕康、木全弘治、道川誠、Tony Wyss-Coray、内村健治

アルツハイマーモデルマウス脳内に発現する
ヘパラン硫酸糖鎖内部ドメイン構造の解析

11月5～6日 日本認知症学会 名古屋

横小路美貴子、林紀行、赤津裕康、辰巳真

一、加藤希世子、柳田寛太、児玉高志、森康治、
田上真次、大河内正康、田中稔久、工藤喬、
森原剛史、武田雅俊

異なる背景遺伝子を持つ APP Tg マウスの解析による
アミロイド蓄積量修飾遺伝子 KLC1 の同定

11月5～6日 日本認知症学会 名古屋

Propanoylation of amyloid beta is trigger to the aggregation and enhanced its neurotoxicity

Shinsuke Hisaka, Yoshimi Hayashi, Masayo Nagai, Yoji Kato, Hiroyasu Akatsu, Mitsuhiko Nose, Wakako Maruyama, Toshihiko Osawa

11月17～21日 Society for Free Radical Biology and Medicine フロリダオーランド

G. 知的財産兼の出願状況
なし。

高分化型三次元細胞培養系を用いたヒト血漿蛋白及び ウイルス粒子の大量産生法の開発

所 属 国立感染症研究所

研究者 相崎 英樹

研究要旨：本研究の目的は、ヒト肝細胞を三次元培養装置(RFB)で培養することで効率良く安定的に血漿蛋白(アルブミン(HSA)、フィブリノーゲン(FBG))、ウイルス(HCV)を大量生産する技術を開発することと、そして、生産した血漿蛋白、ウイルスを精製する方法の確立にある。HSA、FBG 高産生のための培養方法を検討したところ、いずれも無血清培地 E-RDF の有効性が確認できたが、HAS は FLC4 細胞、FBG は FLC7 細胞が適していた。FLC4 細胞を RFB で培養した上清を解析したところ、遊離蛋白の 40-47% を HAS が占め、LC-MS/MS 解析による蛋白質帰属同定を行ったところ、同定された蛋白質は約 50 種であった。同定された蛋白質のうち、血漿蛋白質は 47 種類であり、血液凝固因子や補体、脂質代謝関連蛋白質、細胞外マトリックスなどが含まれていた。これまで HCVJFH-1 が Huh7 以外の細胞に感染したという報告はない。今回、RFB によって FLC-4 細胞株を三次元高密度培養することで、JFH-1 の感染・増殖が可能となることが示唆された。今後は、三次元化することによる FLC-4 細胞の蛋白発現の変化をプロテオーム解析し、HCV 感染・増殖に寄与する宿主因子を同定するとともに、感染後のウイルスを解析することで、三次元培養に適した変異の有無を調べる。

研究分担者

- | | |
|------------------------|------|
| (1) 東京慈恵会医科大学 | 大川清 |
| (2) 東京慈恵会医科大学 | 松浦知和 |
| (3) 東京慈恵会医科大学 | 高田耕司 |
| (4) 早稲田大学 | 加藤尚志 |
| (5) エーシーバイオテクノロジーズ石塚保行 | |

A. 研究目的

本研究の第一の目的は、安全で安価な組み換え血漿蛋白製剤をヒト細胞で安定的に大量生産する技術を開発することである。具体的には、HSA および FBG をヒト細胞から大量生産するためのラジアルフロー型バイオリアクターを利用した高密度大量培養法を確立する。そして、培養上清中の目的成分の定量と回収・精製の手法を確立する。さらに、ラジアルフロー型バイオリアクターで無血清培養したヒト肝癌由来細胞の分泌蛋白質を網羅的かつ定量的にモニ

タリングする手法を確立する。

本研究の第二の目的は、肝炎ウイルス粒子の大量生産法の確立である。HCV および HEV に対するワクチンは確立されていない。ウイルス本来の粒子構造を保った抗原が調製できれば、より高い抗原性が期待できるためワクチン候補として極めて有用である。HCV ワクチンは予防的なワクチンとしてだけでなく、IFN 等の既存の治療法で効果がない患者の治療用のワクチンとしても期待されている。

B. 研究方法

1. HSA、FBG 産生

(1) HAS 高産生のための FLC-4 細胞の RFB での培養方法の検討

培養細胞は、高機能ヒト肝細胞癌株 FLC-4 と、前年度相崎班員がヒトアルブミン遺伝子を組み込んで作製した高 rHSA 産生細胞 (FLC-4M#1)

を用いた。2台の5ml容量のRFBに多孔質ハイドロキシアパタイトビーズ (HOYA-PENTAX) を充填し、そこにFLC-4細胞とFLC-4M#1を培養した。培地には3種類の無血清培地を用いた。

(2) FBG高産生のためのFLC-4細胞のRFBでの培養方法の検討とFBGの性状解析

高分化極低悪性度肝細胞癌FLC7を無血清培地で馴化したFLC7亜株 (FLC7-CS) の培養上清に含まれるFBGの糖鎖の定性解析を中心に検討した。

(3) 培養上清中の蛋白の性状解析

FLC-4細胞培養上清を分画分子量3kDaの限外濾過フィルターで濃縮後、還元化バッファーを加えて再度濃縮し、溶液を置換した。そのサンプルを液体クロマトグラフ質量分析装置LC/MSにインジェクションし、展開した。MS/MS解析は、4番目に高いピークまでを分析した。2回目以降ではIBA (Information Based Acquisition) 機能、すなわち存在量が多い蛋白質に由来して既に帰属同定されたペプチドを次回以降では解析対象から外し、「埋もれて」いるペプチド解析を優先させる設定を適用した。ペプチドの質量データは、Xomeで処理し、MS/MSスペクトル抽出後、MASCOTにおける蛋白質の同定を行った。

2. 肝炎ウイルス粒子の大量生産法の確立

(1) RFBを用いた肝炎ウイルス粒子の大量生産法の確立

我々は患者血清由来HCVの感染がすでに報告されているラジアルフロー型バイオリクター (RFB) を使用しウイルス感染実験を試みた。感染材料はHCV (JFH-1) を使用した。感染後、経時的に培養上清中のHCV-RNA量を測定した。また、感染終了後に走査型電子顕微鏡像で細胞の形態の観察を行うとともに、細胞内HCV RNA量を調べた。

(2) 新規三次元培養法の開発

三次元培養用の無処理の担体 (ハイドロキシアパタイト塗布) と、更にラミニンモチーフ (ペプチド) を塗布した担体の2種類に、FLC-4とHuh-7細胞を播種し培養し、肝細胞としての機能として重要な薬物代謝能を指標に培養条件の検討を行った。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は各大学、研究所のバイオリスク管理委員会、組換えDNA実験委員会等の承認を受けて行った。

C. 研究結果

1. HSA、FBG産生

(1) HAS高産生のためのFLC-4細胞のRFBでの培養方法の検討

FLC-4細胞あるいはFLC-4M#1細胞をそれぞれRFB三次元培養システムで高密度培養を行い、細胞がRFB内にほぼ充満した状態での培養液中のHSA濃度を定量した。ASF-104培養液では、FLC-4M#1では単層培養と同様、FLC-4に比較して、高いHSAの産生量を示した。しかし、培養液をE-RDFに交換したところ、高HSA産生株FLC-4M#1のHSA産生は低下し、元株のFLC-4で上昇を認めた。

(2) FBG高産生のためのFLC-4、FLC-7細胞のRFBでの培養方法の検討とFBGの性状解析

ASF104N培地を用いたFLC-4細胞の単層培養の上清から、 10^9 細胞1日あたり30~40 μ gのFBGの産生が確認された。RFBを用いたFLC-4細胞の培養では、 10^9 細胞1日あたり100~300 μ gのFBGの放出が長期間にわたり認められた。FLC-7細胞の単層培養では、ASF-104N培地中での産生量は 10^9 細胞1日あたり約380 μ gであり、FLC-4細胞の場合の約10倍に相当した。

Asn (N型) 結合糖鎖の初期解析に必須のコンカナバリンA (ConA) を用いたレクチン親和性交差免疫電気泳動法によりヒトフィブリノーゲンの糖鎖の変異性を定性解析した。標準品として用いたヒトフィブリノーゲンもFLC7亜株 (FLC7-CS) 由来フィブリノーゲンも同様の泳動パターンを示した。

(3) 培養上清中の蛋白の性状解析

ASF104N, E-RDF, RPMIのそれぞれの培地で三次元培養して回収されたFLC-4細胞の培養上清中総蛋白質のうち、HSAが占める割合は、ASF104N, E-RDF, RPMIでそれぞれ、約40%, 44%, 47%であった。LC-MS/MS解析による蛋白質帰属同定を行ったところ、3種の試料で共通して同

定された蛋白質は 51 種であった。

2. 肝炎ウイルス粒子の大量生産法の確立

(1) RFB を用いた肝炎ウイルス粒子の大量生産法の確立

RFB 内でセルロースビーズを担体とし FLC-4 細胞を培養後、HCVJFH-1 を感染させた。培養上清中の HCV-RNA は感染後 5 日目に最大 10^6 copies/ml に達し、以後 7 週間以上にわたり検出された。

(2) 新規三次元培養法の開発

2 種類の不織布担体に 2 種類の細胞を播種し IMDM 培地で培養し、担体上で増殖速度の大きいクローンをそれぞれ、10 個ずつを選択した。選択したクローンの CYP 活性は弱く、クローン間に差は殆どなかった。次に、CYP1A2 を誘導するために Omeprazole、CYP3A4 を誘導するために Rifampicin を添加し、24 時間培養後、CYP 活性を測定した。薬剤の有無でそれぞれの活性が 3 倍以上増加するクローンを担体の種類に関係なく選択した。この結果、FLC-4 から、5 種類のクローンが選択できた。

D. 考察

相崎班員の開発した高 HSA 産生株 FLC-4M#1 を E-RDF 培養液で三次元培養し、さらなる HSA 産生の増加をめざした。しかし、FLC-4M#1 からの HAS 産生は元株の FLC-4 と異なり、E-RDF では低下した。加藤班員の検討では、どの培養液で培養しても、FLC-4 細胞からの遊出蛋白の 40-47% が HSA であることから、すでに HSA 高産生株である FLC-4 の HSA 産生をさらに上げることは難しいのかもしれない。このため、RFB 培養で高密度に培養した FLC-4 細胞での HSA 産生量の累積に関してシミュレーションを試みた。RFB 培養での最高培養密度を 1×10^8 cells/ml 容量と仮定すると、そのヒト肝臓容量 (1000ml と仮定) の RFB での HAS 産生スピードは 350mg/日となる。体内の半減期の 20 日を仮にあてはめ、1000ml 容量 RFB での産生 HSA 量をシミュレーションすると、10 日目で約 2g/day となってプラトーとなる。RFB 培養の FLC-4M#1 では約 3 倍の 6g/day となる。ヒト肝臓の HSA 産生量は 10-15g/day といわれ、ヒト肝臓に相当する産生レベルである。

FLC-4 細胞を用いた FBG の産生に関しては、単層培養、RFB 培養、共に E-RDF 培地の有効性が確認された。E-RDF は HSA 産生においても他の培地よりも優れることから、両タンパク製剤の原料として、効率的生産の観点から有利な培地と考えられる。さらに、FLC-7 細胞での FBG 産生を定量的に解析したところ、IS-RPMI や ASF104N 培地での産生量は、FLC-4 細胞での数値を大きく上回った。この生産能が高密度三次元培養において、維持増強できるかが今後の課題である。FBG 分子は、 $\alpha\beta\gamma$ のサブユニット集合体の二量体で構成され、その形成には適切な Cys 残基間のジスルフィド結合や糖鎖修飾が不可欠である。従って次年度において、各細胞由来の HSA と FBG の精製と分子構造の確認が必要不可欠である。

ASF104N, E-RDF, RPMI のそれぞれの培地で三次元培養して回収された FLC-4 細胞の培養上清を LC-MS/MS 解析による蛋白質帰属同定を行ったところ、3 種の試料で共通して同定された蛋白質は 51 種であった。同定された蛋白質のうち、血漿蛋白質は 47 種類であった。アルブミンの他、血液凝固因子や補体、脂質代謝関連蛋白質、細胞外マトリックスなどが含まれており、FLC-4 細胞は肝臓の機能を反映する蛋白質を産生していると考えられた。

これまで HCVJFH-1 が Huh7 以外の細胞に感染したという報告はない。今回、RFB によって FLC-4 細胞株を三次元高密度培養することで、JFH-1 の感染・増殖が可能となることが示唆された。今後は、三次元化することによる FLC-4 細胞の蛋白発現の変化をプロテオーム解析し、HCV 感染・増殖に寄与する宿主因子を同定するとともに、感染後のウイルスを解析することで、三次元培養に適した変異の有無を調べる。

E. 結論

高アルブミン産生細胞 FLC-4 を用いた HSA の工業的生産には、FLC-4 細胞を改変して HSA 量を増やすには限界があった。そこで、次年度は①培養液のアミノ酸組成の工夫による HSA 生産性の向上、②効率の良い HSA 生産のための RFB 培養のシミュレーションを進め、ヒト細胞での HSA や FBG 生産技術の確立を目指す。

FBG の効率的産生に適する培養条件として、

細胞は FLC7-CS、培養液は E-RDF 培地の使用が薦められた。ConA 親和交叉免疫電気泳動法での定性的解析から FLC7-CS 由来 FBG の N 型糖鎖としての基本骨格に正常血漿 FBG と差がない可能性が示唆された。さらに、LC-MS/MS 分析系を適用することにより、細胞培養系に存在する多数の蛋白質を微量試料でモニタリングすることが可能になったことから、肝細胞の細胞培養マーカーの合理的探索手段に有用であると考えられた。

FLC-4 細胞を三次元培養することで、HCVJFH-1 の感染・増殖を可能にする細胞培養系を確立した。新規三次元培養系の検討から、不織布担体を RFB で利用する際は、高速で培地が移動することを考えると接着力の強さ(増殖性)と肝機能の保持が重要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 in press.
- 2) Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*. 2011;410:38-47.
- 3) Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res*. 2010;85:520-524.
- 4) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol*. 2010;84:5824-5835.

5) 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博、C 型肝炎ウイルスの複製と粒子形成、日本ウイルス学会、雑誌ウイルス、東京、2011、60、87-92.

6) 相崎英樹、コレステロールとスフィンゴ脂質の C 型肝炎ウイルス生活環における役割、ミノファーゲン製薬、Minophagen medical review、東京、2010、1-10.

7) Eda H, Aoki K, Kato S, Okawa Y, Takada K, Tanaka T, Marumo K, Ohkawa K. The proteasome inhibitor bortezomib inhibits FGF-2-induced reduction of TAZ levels in osteoblast-like cells *Eur J Haematol*. 85, 68-75, 2010

8) Saito R, Ishii Y, Ito R, Nagatsuma K, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Nomoto H, Ohkawa K, Mano H, Aizawa M, Hano H, Yanaga K, Matsuura T. Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney. *Artif Organs*. 35, 80-83, 2011

10) Gotoh Y, Ishizuka Y, Matsuura T, Niimi S. Spheroid Formation and Expression of Liver-Specific Functions of Human Hepatocellular Carcinoma-Derived FLC-4 Cells Cultured in Lactose_Silk Fibroin Conjugate Sponges. **Bio Macromolecules** 2011 *in press*

11) Saito R, Ishii Y, Ito R, Nagatsuma K, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Nomoto H, Ohkawa K, Mano M, Aizawa M, Hano H, Yanaga K, Matsuura T. Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney. **Artif Organs**. 2011; 35:80-3

12) 田中 賢、松浦知和、中田浩二. ^{13}C グルコース呼吸試験を利用した 3 次元還流培養系の活性測定とその応用. **Radioisotopes** 2010;59(7):435-40.

2. 学会発表

- 1) 相崎英樹、HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の機能解析、第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010.
- 2) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H,

Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.

3) Saito K, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M, Inhibition of cellular squalene synthase impairs hepatitis C virus proliferation in cultured cells, 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.

4) 相崎英樹, HCV 粒子形成と脂質の役割、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.

5) 渡辺則幸、村山麻子、Saeed Mohsan、伊達朋子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆字、HCV エンベロープタンパク質に付加される N 型糖鎖の機能解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.

6) 安東友美、今村博臣、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス複製複合体における ATP 制御の可視化と機能解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.

7) 山本真民、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス粒子感染における粒子表面のコレステロールの役割、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.

8) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010.

9) 鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、分割ユビキチン法を利用した HCVNS2 と結合する宿主因子の探索およびウイルス粒子形成への関与、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010.

10) 斎藤恭子、鈴木哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田隆字、西島正弘、深澤征義、Squalane synthase 阻害剤の C 型肝炎ウイルス増殖阻害機構の解析、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010.

11) 松浦知和、田中 賢、松本喜弘。
(ワークショップ) 呼気試験の新たな展開 In

vitro における ¹³C 呼気試験の応用—
¹³C-glucose 呼気試験での検討—、第 14 回日本肝臓学会大会、横浜、2010

12) 松浦知和、田中 賢、池脇克則(防衛医大)、中田浩二。空腹時 ¹³C-glucose 呼気試験による肝臓糖代謝評価法の開発。第 57 回日本臨床検査医学会学術集会、東京、2010

13) Matsuura T, Nagatsuma K, Hano H. Cellular distribution of lecithin: Retinol acyltransferase (LRAT) and cellular retinol binding protein-1 (CRBP-1) in human livers of chronic viral hepatitis. 2010 FASEB Summer Research Conferences Retinoids. Arizona, 2010

14) 松浦知和、石井雄二、相澤 守。(ワークショップ) 肝再生医学 臨床応用を目指した研究の新展開 類洞類似構造を再現した肝臓オルガノイドの作製。第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：バイオリアクター
(特許第 4631049 号)

特許権者：学校法人明治大学

発明者：相澤 守、松浦知和

出願番号：特願 2005-079350

出願人：学校法人 明治大学

出願日：平成 17 年 3 月 18 日

登録日：平成 22 年 11 月 26 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

自己免疫疾患、アレルギー疾患の治療を目標とした ヘルパーT細胞の分化に関わる因子の探索

所 属 独立行政法人国立成育医療研究センター
研究所 システム発生・再生医学研究部
研究者 浅原 弘嗣

研究要旨

約 6000 種類の cDNA ライブラリによるハイスループット遺伝子導入スクリーニングと、マイクロアレイ解析を組み合わせ、更なるスクリーニングと遺伝子データベース等の活用により、13 個の創薬において興味深い IL-17 の制御因子候補を見出した。

研究分担者

- (1) 独立行政法人国立成育医療研究センター研究部
高田 修治、伊藤 義晃
- (2) 慶応義塾大学
吉村 昭彦
- (3) 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社
鈴木 忍、佐藤 弥生、尾崎 修子
- (4) 大塚製薬株式会社
川染 秀樹

A.研究目的

喘息、アレルギー鼻炎やアトピー性皮膚炎などに代表されるアレルギー疾患は、現在約 3 人に 1 人が罹患している。この疾患は、外部の様々な抗原（アレルゲン）に対し、生体内で過剰に免疫反応が起こることで発症する。免疫反応は外来の異物を排除するために働く、生体にとって不可欠な生体反応であるが、疾患の原因となるアレルゲンは、多くの場合、通常生活でさらされる量では無害なことが多く、患者にとっては不快な免疫応答で苦しむことになる。同じように過剰な免疫反応により引き起こされる疾患としては、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患があげられる。この疾患は自己を構成する内部の物質を間違っアレルゲンとして認識され引き起こされる。両疾患はアレルゲンが外部か内部かという点で異なるが、発症原因が過剰な免疫反応という点で同一である。これらの病気はいくつかの治療法が実施／試行されているが、完治させることが困難であり、長期化し、改善どころか悪

化の一途をたどる症例が少なくない。

ナイーブ T 細胞が抗原提示を受けて分化するヘルパー T 細胞のサブセットで、IL-12 や IFN- γ などの刺激により分化誘導される Th1 細胞、IL-4 などにより分化誘導される Th2 細胞は獲得性免疫応答に重要な役割を担っている。Th1 細胞は主に IFN- γ を Th2 細胞は IL-4 を発現し、それらのサイトカインの作用を通して、相互に分化や機能を抑制し合っている。この両者のバランスが免疫応答を制御する上で重要であり、このバランスが崩れると、自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症につながると考えられてきた。

近年、IL-17 を発現する新たな T 細胞サブセットである Th17 細胞が同定され、自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症や病態形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この発見により、Th1 と Th2 のバランスでは説明できなかった病態や現象に新たな展開を与えるとともに、これまで Th1 と Th2 のバランスでのみ説明されてきた免疫応答の分子メカニズムに大きな変更点を加えられることになった。

近年の遺伝子改変技術と疾患モデル動物技術による解析で、IL-17 遺伝子欠損マウスは、自己免疫疾患、アレルギー疾患を強く抑制されることが示されている (Nakae S *et al.*, 2002, *Immunity*, Nakae S *et al.*, 2003, *J Immunol.*)。このことは、自己免疫疾患、アレルギー疾患の治療開発において IL-17 の発現制御、作用制御および Th17 の分化制御が有用であることを示している。現在までに、自己免疫疾患で上昇するサイトカイン IL-6 と TGF- β の刺激で ROR γ t の発現が

誘導され、IL-17 の転写を調節すること、Th17 細胞の分化に転写因子 ROR γ t が必須であることが報告されている (Ivanov II *et al.*, 2006, *Cell*, Ichiyama K *et al.*, 2008, *J Biol. Chem.*)。IL-17 の発現調節に関わる全遺伝子が解明されれば、病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定に極めて有用であるが、IL-17 の発現制御メカニズム、Th17 細胞の分化メカニズムはその多くが未解明である。

これらのことより、本研究では IL-17 の発現制御メカニズムを調べ、アレルギー疾患、自己免疫疾患の新たな創薬ターゲット遺伝子を同定することを目的とし、IL-17 の発現を制御する因子をゲノムワイドに探索する。

B. 研究方法

1. ハイスループット遺伝子導入スクリーニング 一次スクリーニング

Mammalian Gene Collection (MGC) より入手した約 6 千種類のヒト遺伝子の全長 cDNA が哺乳類細胞で発現するようなベクターに入っているプラスミドのライブラリ (MGC ライブラリ) と、IL-17 の発現制御領域 (プロモーター) の下流にレポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミドを用いたハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、IL-17 の制御因子をスクリーニングした。また、Th1、Th2、Th17 細胞のマイクロアレイのデータを組み合わせ解析し、IL-17 の発現制御因子候補を絞り込んだ。

ii) ハイスループット遺伝子導入アッセイ、アッセイ・プレートの作製

MGC ライブラリはそれぞれのプラスミドが大腸菌に導入された状態で、96 ウェルプレート上で -80°C の超低温冷凍庫で保存している。その一部を別の 96 ウェルプレート上の液体培地に移し、培養・増殖させた後、遠心してペレット状にし、96 ウェルフォーマットの吸引式ミニプレップでプラスミドを精製した。それぞれのプラスミド濃度をプレート・リーダーで測定後、濃度調整装置により 50ng/well となるように希釈し、自動分注機を用いて 384 ウェルプレートにライブラリを高密度に配置したアッセイ・プレートを作製した。作製したアッセイ・プレートは密閉後、-20°C で凍結保存し、使用日に室温で融解した後使用した。

ii) ハイスループット遺伝子導入アッセイ

作製したアッセイ・プレートにレポーター・プラスミド、遺伝子導入試薬及び細胞を自動分注機で加えることで遺伝子導入 (リバース・トランスフェクション) し、一定時間培養した後、Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した (図 1)。384 ウェルプレート 1 枚では全てのプラスミドの遺伝子導入は物理的に不可能であり、多数の 384 ウェルプレートを使用することになった。このことにより、アッセイ条件が各プレートで若干異なることになり、プレート間でバックグラウンドの数値が変動する可能性が考えられた。そのため、それぞれの 384 ウェルプレートに MGC ライブラリのプラスミドを配置させていないウェルを用意し、そのウェルをコントロールとすることにより、各プレートで数値を補正する作業を加えて、より確実に正確なデータ解析を行った。

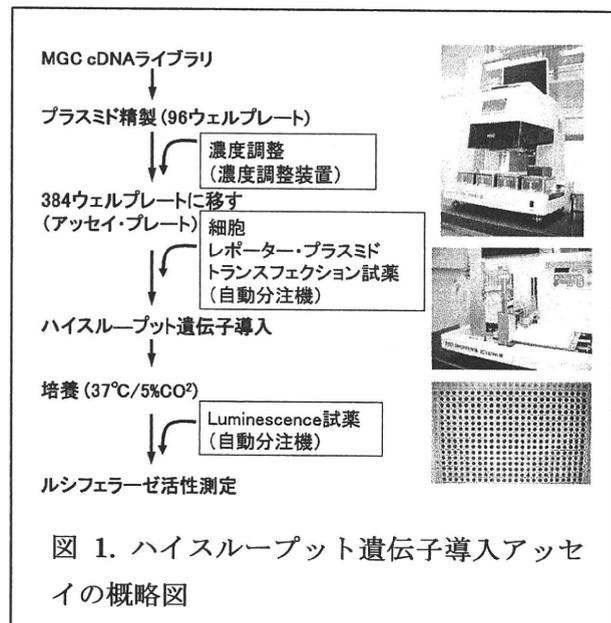


図 1. ハイスループット遺伝子導入アッセイの概略図

iii) マイクロアレイ解析

公的データベースより Th1、Th2、Th17 細胞のマイクロアレイデータを取得し、それぞれの遺伝子発現プロファイルより、遺伝子発現の比較解析を行った。

2. 二次スクリーニング

一次スクリーニングで候補となった因子から、IL-17 を特異的に制御する候補因子を絞り込む

め、IL-4 と IFN γ のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミドと候補因子の発現プラスミドを用いて遺伝子導入アッセイを行った。その後、個々の候補因子について、創薬ターゲットの可能性を遺伝子データベース等の情報を活用して探索することで、更なる絞り込みを行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、独立行政法人国立成育医療研究センターの規約に則り、申請者は「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」(平成 15 年法律第 97 号、平成 16 年 2 月 19 日より施行)を遵守して行うことを誓約し、許可を得ている。

ヒトクローン胚、ヒト ES 細胞などは使用しておらず、患者サンプル等を用いたヒト遺伝子解析は行っていない。遺伝子治療などの臨床・疫学研究は行っていない。本研究においては、ヒト由来細胞を使用しているが、患者サンプルなどではなく、株化細胞を使用しており、倫理的に問題はない。

今後も必要な場面では、当センターにおいて機関の外部委員を含めた倫理審査委員会により生命倫理、安全管理を厳重に審査し、倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。また、マウス等の動物実験は国立成育医療センターの動物実験委員会の承認を得て遂行する。

C. 研究結果

MGC ライブラリ由来の約 6 千種類の遺伝子の発現プラスミドを 384 ウェルプレートに高密度に配置したアッセイ・プレートを用いたハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、IL-17 の発現

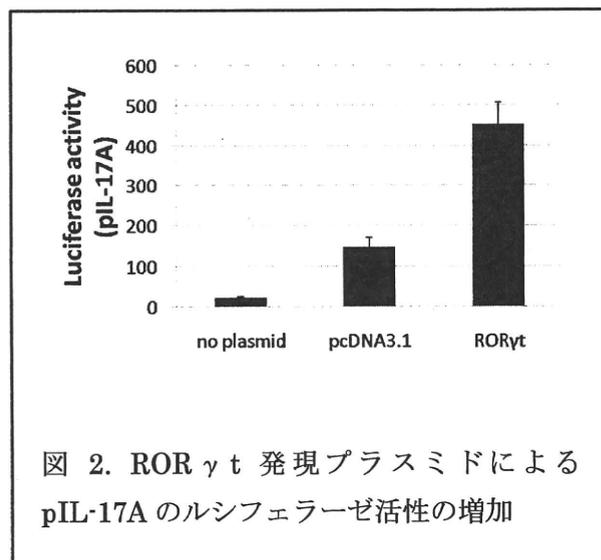


図 2. ROR γ t 発現プラスミドによる pIL-17A のルシフェラーゼ活性の増加

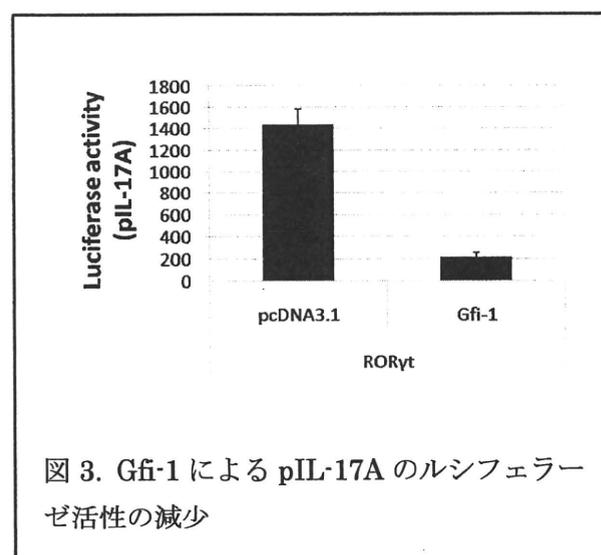


図 3. Gfi-1 による pIL-17A のルシフェラーゼ活性の減少

制御に関わる因子をゲノムワイドに探索した。

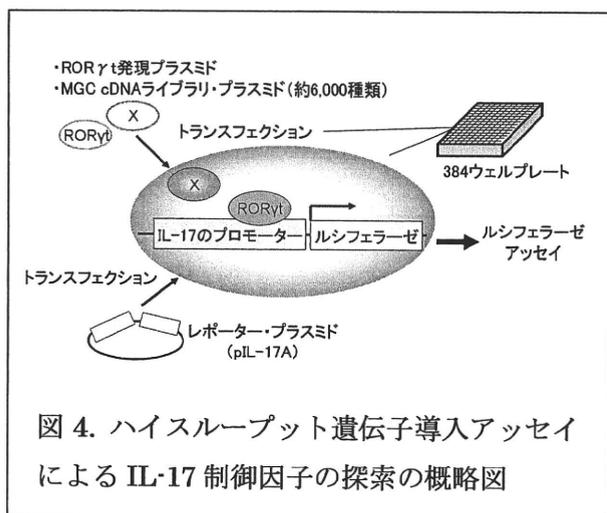
このスクリーニングには研究分担者である慶応大学、吉村教授のグループによって作製、発表された IL-17 の発現を検出する、IL-17 のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミド(pIL-17A: Ichiyama K *et al.*, 2008, *J Biol. Chem.*)を使用することにした。

まず、この pIL-17A とこのレポーター活性を増加させることが明らかとなっている ROR γ t の発現プラスミドを用いて 384 穴プレートで、細胞数、各プラスミド量、遺伝子導入試薬の濃度、インキュベーション時間などのアッセイ条件を検討した。

細胞は遺伝子導入効率がよい 293FT 細胞を用いることにした。この細胞で条件検討を行ったと

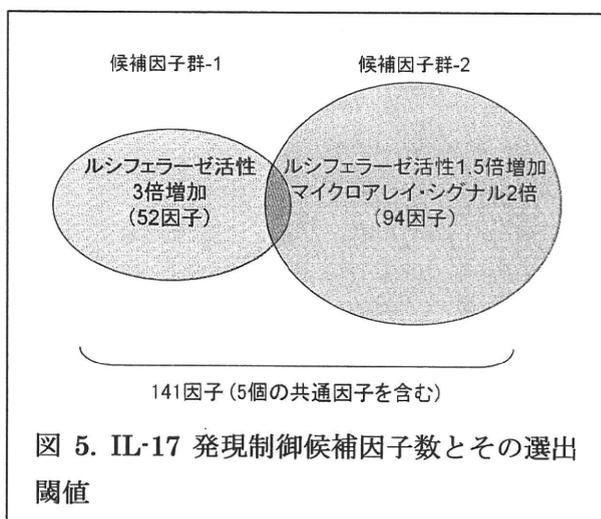
ころ、細胞数が 4,000、pIL-17A プラスミドが 12ng、遺伝子導入試薬である FuGENE®6 Transfection Reagent (Roche) は 0.1µl で遺伝子導入し、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定したとき、RORYt の発現プラスミドの有無で 3~4 倍のルシフェラーゼ活性の増加が見られ、数値も良好な結果が得られた (図 2)。しかしながら pIL-17A 単独でのルシフェラーゼ活性は数値として 100 程度と低く、pIL-17A のルシフェラーゼ活性を抑制するような因子、すなわち IL-17 の発現抑制因子を見出すことが難しいと考えられた。そこで、RORYt の発現プラスミドを加えた状態でハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、RORYt による pIL-17A のルシフェラーゼ活性の増加を抑制するものを IL-17 の発現抑制因子候補とすること考えた。これまでに Roryt による IL-17 の発現増加を抑制する因子として Gfi-1 が報告されていた (Ichiyama *et al.*, 2009, *Int Immunol.*)。そこで、RORYt 発現プラスミドと Gfi-1 発現プラスミドの有無で条件検討を行ったところ、Gfi-1 の発現により 50~90%程度のルシフェラーゼ活性の減少が観察された (図 3)。

これらの条件検討より、本研究においては 4000 個の 293FT 細胞を用いて遺伝子導入試薬 FuGENE®6 Transfection Reagent は 0.1µl、プラスミドは (1)pIL-17A プラスミド (12ng)、(2)RORYt 発現プラスミド (12ng)、(3)MGC ライブラリのプラスミド (50ng) を加えて 24 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定することにした (図 4)。



上記の条件で、MGC ライブラリを 384 穴プレートへ配列させたアッセイ・プレートに各種プラ

ズミドと遺伝子導入試薬を混ぜたものを自動分注機で分注し、さらに 293FT 細胞を分注してハイスループット遺伝子導入アッセイを行った。このスクリーニングは 2 度繰り返しの実験を行い、解析データとした。解析の結果、ルシフェラーゼ活性を 3 倍以上増加させた 52 の因子を IL-17 制御因子候補 (候補因子群-1) とした。また、本スクリーニング・システムは制御因子を効率よく同定する解析法ではあるが、それぞれの因子を強制発現させるため、実際に Th17 で発現して IL-17 の発現制御を行っているかどうかはわからない。そこで、本スクリーニング・システムでルシフェラーゼ活性を 1.5 倍以上増加させた因子で、さらにマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルで、他のヘルパー T 細胞サブセットである Th2 に比べ Th17 でシグナルが 2 倍以上であった 94

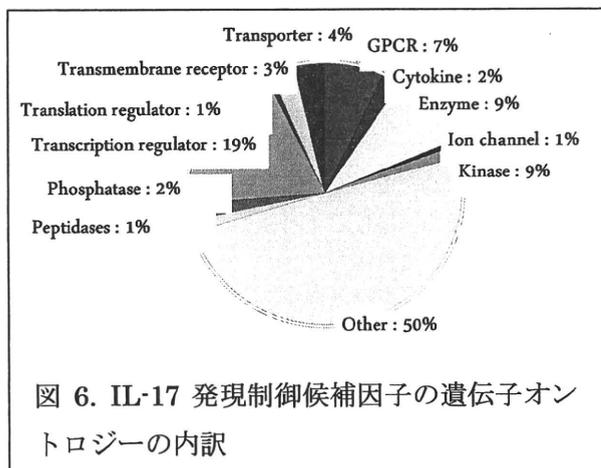


の因子も制御因子候補 (候補因子群-2) とすることにした。これらの異なる 2 つのパラメーターで見出したそれぞれの候補因子群で、5 因子が共通して含まれていた (図 5)。

これら、141 因子の遺伝子オントロジーを調べたところ、その内訳は 19%が転写因子、9%が酵素などであった (図 6)。

これら、141 の IL-17 発現制御因子候補において創薬ターゲットを絞り込むことを目的として、更なるスクリーニングを行うことにした。Th1、Th2 細胞でそれぞれ発現する IL-4、IFN γ のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・ベクターを使用して、IL-17 発現制御因子候補において、これらのルシフェラーゼ活性を上昇させない因子を「IL-17 の発現制御に

特異性を持った因子」であるとしてより優先度の高い創薬ターゲットとすることにした。



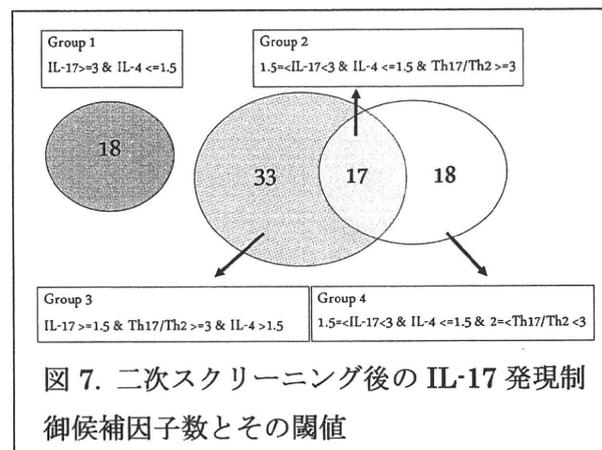
上記の解析の結果を受けて、創薬ターゲットの絞り込みを再検討し、

1. IL-17 のレポーター・プラスミドの活性を 3 倍以上上昇させ($IL-17 \geq 3$)、IL-4 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以下 ($IL-4 \leq 1.5$) の 18 因子: **Group 1**
2. IL-17 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以上 3 倍より小さく ($1.5 \leq IL-17 < 3$)、IL-4 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以下 ($IL-4 \leq 1.5$) で、マイクロアレイのデータで Th2 に比べ Th17 でシグナルが 3 倍以上 ($Th17/Th2 \geq 3$) の 17 因子: **Group 2**
3. IL-17 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以上 ($IL-17 \geq 1.5$)、マイクロアレイのデータで Th2 に比べ Th17 でシグナルが 3 倍以上 ($Th17/Th2 \geq 3$)、IL-4 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍より高い ($IL-4 > 1.5$) の 33 因子: **Group 3**
4. IL-17 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以上 3 倍より小さく ($1.5 \leq IL-17 < 3$)、IL-4 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以下 ($IL-4 \leq 1.5$) で、マイクロアレイのデータで Th2 に比べ Th17 でシグナルが 2 倍以上で 3 倍より小さい ($3 \Rightarrow Th17/Th2 < 3$) の 18 因子: **Group 4**

の 4 つの異なるパラメーターで合計 86 因子を創薬ターゲットとして絞り込んだ (図 7)。

これらの個々の候補因子について、Th17 に関わることが報告されているか、自己免疫疾患やアレルギー疾患との関わりが無いか等を数種の遺伝子データベースや既存のパスウェイ解析ソフ

トなどの情報を利用して、創薬ターゲットの可能性を探索した。これらの解析により、創薬において特に重要と思われる候補因子を 5 個、Th17 の



分化メカニズムにおいて興味深い候補因子を 8 個の合計 13 個の候補因子を見出した。

D. 考察

本研究では、IL-17 の発現制御因子を探索するため、IL-17 のレポーター・プラスミドと約 6000 個の cDNA ライブラリを使用したハイスループット遺伝子導入スクリーニングと、Th2 と Th17 のマイクロアレイデータ解析を組み合わせた一次スクリーニングを行った。その後、IL-4、IFN γ のレポーター・プラスミドを用いた更なる遺伝子導入レポーター・アッセイ、遺伝子データベース等の情報を活用した二次スクリーニングを行い、創薬において特に重要と思われる候補因子を 5 個、Th17 の分化メカニズムにおいて興味深い候補因子を 8 個の合計 13 個を絞り込んだ。これらの IL-17 制御因子候補は、現時点で有力な IL-17 制御因子候補であり、有望なアレルギー疾患、自己免疫疾患の創薬ターゲットである。一次スクリーニングでは MGC ライブラリのプラスミドに加え、ROR γ t の発現プラスミドも同時に遺伝子導入を行ったため、候補因子の機能としては、ROR γ t の活性の調整により IL-17 の発現制御に関わるか、それとは独立に IL-17 の発現制御に関わる可能性が考えられる。このような観点を含め、IL-17 の発現制御因子候補は、IL-17 の発現制御にどのように関わるか、実際に疾患の病態に関わるか、またどのように関わるかを詳細に解析し、病態に密接に関係することが確認できた因子については最適な創薬ターゲットとして設定する (図 8)。こ

これらの創薬ターゲットについては、コラーゲン誘導関節炎(CIA)や実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)などの自己免疫疾患モデル動物を、アルブミンをアレルゲンとして用いる喘息様気道炎症などのアレルギー疾患モデル動物を使用した遺伝子強制発現や発現抑制の研究を行い、治療効果を検討する。更に、ターゲット候補を標的とした化合物スクリーニングを行い、これら化合物は疾患モデルマウスにおいて治療効果を検討する。これらにより、自己免疫疾患に対する新規治療法や診断法の開発を目指す。

一次スクリーニングで見出した141の候補因子は上記13の創薬ターゲットに劣ることのないIL-17制御因子候補である。これらに対して、更なる解析によりIL-17制御因子であるかについて検討する。また、現時点ではIL-17の発現を増加させる候補因子のみを解析対象として選別しているが、発現を抑制する候補因子についても同様に解析を行い、同定する。これらの解析により、IL-17の発現制御を中心としたTh17細胞の分化メカニズム、分子ネットワークを包括的に解明することを試みる。これらの解析はTh17細胞の理解に繋がり、自己免疫疾患の病態メカニズムの全容解明に繋がるものと考えられる。

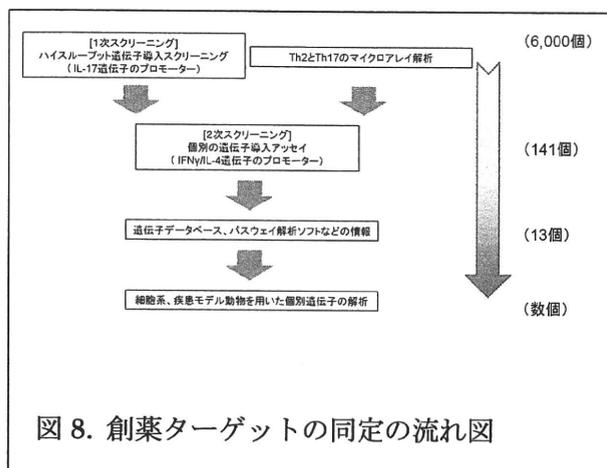


図8. 創薬ターゲットの同定の流れ図

本研究のような複数の大規模データを組み合わせたシステム・アプローチによる解析は、これまでの既存の手法や単独の大規模データだけでは困難な創薬ターゲットの選定を効率的かつスピーディーに決定することができる。このシステムは、今後の継続的かつ様々な運営/活用により多くの疾患メカニズムの解明につながることを期待できると考えられる。

E. 結論

ポストゲノム時代における、新たなアプローチである全長 cDNA 遺伝子導入による機能的スクリーニングのシステムを用いて、IL-17の発現制御に関わる因子をスクリーニングした。これに加え、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル、遺伝子データベース等を利用したバイオインフォマティクスによる情報処理を組み合わせたシステム・アプローチによる解析を行い、アレルギー疾患、自己免疫疾患の創薬ターゲット候補を短時間で効率よく、スクリーニングすることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性、有効性及び生産性に関する研究

所属 国立感染症研究所副所長

研究者 倉根 一郎

研究要旨：

H22年度の本研究班では、危機管理対策として国家備蓄されている細胞培養弱毒生痘そうワクチンの、国民への緊急及び予防的使用を想定して、その安全性と有効性の検証するために動物を用いた評価系、及び臨床疫学研究における有効性の評価系などを構築しデータを蓄積する研究がなされた。また、ワクチンの備蓄保存は長期になることが予想され、保存安定性データを取得するとともに、長期保存における安全性、有効性を確認するための動物試験又は物理化学的試験の評価系を構築しデータを蓄積するための研究がなされた。さらに、弱毒生痘そうワクチンの遺伝子解析などの特性解析、品質試験方法の精度向上のためのデータを蓄積するための研究がなされた。具体的には、1) 霊長類を含む動物モデルを用いた高度弱毒天然痘ワクチン LC16m8 の有効性と安全性に関する研究、2) 同ワクチンが実際にヒトにおいて使用された場合における有効性と安全性に関する研究、3) 同ワクチン製剤の生産性の向上に関する研究、等の大きな3項目の研究がなされた。これらの研究成果は、バイオテロリズム対策および同対策の機能を維持しながら、ワクチン製剤の安定的生産体制の維持と生産性向上を達成することに貢献した。

研究分担者

国立感染症研究所
西條政幸, 森川茂, 永田典代
国立保健医療科学院政策科学部
金谷泰宏
慶應義塾大学医学部
齋藤智也
自衛隊中央病院
藤井達也
一般財団法人化学及血清療法研究所
大隈邦夫, 横手公幸

維持と生産性向上を達成するためのデータを蓄積することが本研究班に与えられた目的である。

A. 研究目的

細胞培養弱毒生痘そうワクチンは危機管理対策のひとつとして国家備蓄されている。非特定の国民への緊急及び予防的使用を想定し安全性、有効性の検証のために動物を用いた評価系、及び臨床疫学研究における有効性の評価系などを構築し、ワクチンの長期備蓄保存のための保存安定性データ、長期保存における安全性と有効性の解析データ、弱毒生痘そうワクチンの遺伝子解析などの特性解析、品質試験方法の精度向上のためのデータ、ワクチン製造施設の他製剤との共用の可能性を検討し、製造施設の稼働効率を高めること等で安定的生産体制の

B. 研究方法

- 1) Lister 株または LC16m8 株の痘瘡ワクチン接種時における EEV 蛋白に対する抗体応答。カニクイザルに高度弱毒化痘瘡ワクチン LC16m8 接種による免疫誘導時における EEV 関連蛋白 (F13L, A33R, A34R, A36R, B5R) に対する免疫誘導能を、LC16m8 株の親株である Lister 株によるそれと比較して検討した。EEV 関連蛋白に対する抗体応答は、プロテオミク解析により明らかにした。
- 2) 長期保管、品質試験法改善に伴う検討及び生物基準・検定基準見直しに関する検討。乾燥細胞培養痘そうワクチンの長期保管における安定性評価、細胞培養痘そうワクチン原液の長期保管における安定性評価、ワクチン添加剤の長期保管における安定性評価、凍結乾燥工程における凍結乾燥機の棚間による製剤の品質に及ぼす影響、現行生物基準及び検定基準の製造工程からの照査と課題整理、等の課題に関する検討がなされた。
- 3) LC16m8 の臨床評価に関する研究。LC16m8