

人由来の W-1 株と W-2 株については、いずれの細胞株でも TEER 値の変動は認められなかった。

C-3) 調査と情報収集

C-3-1) 角化及び血管内皮細胞と培地のセット化による製品化と流通

C-3-1-1) 必要性

30 社中、29 社から回答を得た(回収率 96.7%)。回答のなかの解析不能なものを除去して 24 社のデータを利用した。この中で、ヒト正常細胞の必要性については、図 1 に示すように、ヒト細胞の必要性が高い及び中程度という施設数は 19 であった。一方、必要性が低いと回答及び回答なしが合計 5 施設あった。必要性が低いという施設はすべてヒト組織・細胞の使用経験がなかった。以後、この 19 施設の結果を解析した。

C-3-1-2) 過去の使用経験

・過去の使用組織・細胞

複数回答から、組織では、肝臓、癌組織、血液の利用頻度が高かった。一方、細胞では肝臓、リンパ、血管内皮、癌細胞の利用頻度が高かった。

・これまでの入手先

複数回答から、組織・細胞を業者及び大学・研究所から入手している場合が多かった。

・入手にあたっての問題点

複数回答から、安定供給がなされないという問題点が一番多く、倫理委員会の煩雑性、要求通りの組織・細胞は入手できなかったが上位を占めた。

C-3-1-3) 今後の要望

・利用したい使用組織・細胞

複数回答から、いずれも肝臓、腎臓、癌の 3 種がベスト 3 であった。ただし、これ以外にも目的のより異なる、多数の品揃えを希望するという声もあった。皮膚を求める意見は 1 件しかなかった。

また、アジア人細胞の必要性は、目的によると回答した施設も含め、16 施設がその必要性を感じていた。

・利用にあたっての情報

適した培養条件、その細胞を用いた薬効評価の情報を求めることも多かった。

・利用に関する要望

安定供給と要求通りの組織・細胞の入手を求める声が多かった。

C-3-2) 倫理問題の改善と確認

これまでの提供者に対するアンケート調査では、企業が提供した細胞・組織・医療情報(ヒト試料等)を利用して研究することに抵抗感がある提供者があることを示されている。また、

企業がヒト試料等を利用した研究から利益を得た場合の分け前を受けたいという意識を市民は持っていることも示されている。これは裏返すと自らが無償で提供したヒト試料等を使った研究が金銭を生むことに対する不公平感に起因するものと考えられる。「私が知らないところで、私が無償で提供したヒト試料等が利用されて設けている人がいる」という意識があるのだろう。

提供されたヒト試料等に対して、誰が所有権を主張できるかについては、海外でも議論のあるところである。最近の米国のケースでは、ある有名な泌尿器科の医師に提供されたがん組織について、その医師の属する大学が「所有権」を持つという判決が出ている。提供者すらそのヒト試料等の行く先について発言権を持たないのである。また、1980-90 年に議論となり裁判のあった採取された細胞の産物から利益を得た企業について、提供者がその分配を求めた裁判では、下級審で配分を認めない判決が出たが、提供者と企業の和解において多額の金銭が動いたといわれている。このように、ヒト試料等の所有権・管理権については、混乱がある。

製薬会社としては、ヒト試料等を使う際にそのようなトラブルのないことを重視している。そのため、少々購入費用がかかるとしても、後々トラブルの無いヒト試料等を利用したいという立場を取っている。ただ、現在の日本の状況を見ると、ヒト試料等の提供の無償原則は動かないと考えられる。また、現在の日本は広く不平不満が蔓延しており、その点ではトラブルは起きやすい環境が整っている。そこで、製薬企業の位置づけを含めて、企業によるヒト試料等の研究・開発利用について広く市民への説明に利用できるパンフレットの存在が重要である。

そこで、本研究においては、製薬工業協会から推薦された 3 名の協力を得て、パンフレット内容の検討を開始した。その結果、以下のような形で議論をすることが決まった。

- ① 最初にヒト試料等の必要性。日本人試料等の必要性。日本人特有という視点と、アジアの窓としての日本人。
- ② 研究成果の社会還元のみかメカニズムとしての企業活動。企業による薬の開発生産の重要性。
- ③ 医薬品研究開発の難しさについての現状について。臨床でのドロップアウト事例の損失など。
- ④ 医薬品研究開発におけるヒト試料の有用性について薬効、動態、毒性の見地から概説する。
- ⑤ 実例として日本人試料を用いる有用性をこれも薬効、動態、毒性の見地から概説。
- ⑥ ヒト試料等の所有・支配権の問題について。

- ⑦ おわりに
という形で、7つの話を作る。

D. 考察

日本国内におけるヒト正常細胞分譲システム網を確立することの意義とその必要性については、あまり論議になるとは考えられない。しかし、組織の提供を受けて得られた細胞を、広く分配することについての倫理的な問題と、実際のシステム構築上の問題は、さまざまな議論を巻き起こす可能性があると言える。

HUVEC を作成するための臍帯提供については、通常廃棄する臍帯から比較的容易な手技により HUVEC の回収が可能であるため、これまで実態として各研究機関と分娩施設（主に開業医など）が、個別に契約し（あるいは口頭で依頼し）、臍帯の提供を随時受けていた可能性が高い。

しかし、これらの場合、施設内倫理審査委員会（IRB）など、適正な倫理審査機関において、その組織提供に関連する科学的あるいは倫理的問題について、十分な検討が行われない場合があると考えられる。また、海外から輸入された HUVEC については、ある程度標準化された細胞であると言えるのに対し、国内で各研究施設により独自に作成された HUVEC は、必ずしも十分な標準化が行われた研究材料とは言えない。

したがって、従来国内で用いられてきた HUVEC については、多少の倫理的な問題を内包している可能性があるだけでなく、これらを用いた研究の相互比較などには、各種の潜在的な科学的な問題点があると思われる。

そこで、本研究では、臍帯提供についての倫理的な問題を明確にするため、埼玉医科大学病院アイ・アール・ビーに審査を付託し、患者に配布する説明文書や同意書を、適切に作成することができた。また、臍帯提供から HUVEC 作成を実際に回収・運搬を含めて試行することにより、本格的な HUVEC 提供システムのための、予備的なシステム構築ができるものとする。

皮膚についても、福井県済生会病院から財団法人ヒューマンサイエンス振興財団細胞バンクへの正常皮膚組織の供給が可能になったことから、既に、福井県済生会病院より財団法人ヒューマンサイエンス振興財団細胞バンクにヒト組織譲渡申請書が提出され、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団の倫理審査委員会の承認待ちの状況である。

一方、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より正常皮膚組織の譲渡を受けるためには、藤田保健衛生大学、コージンバイオ、J-TEC、メナードが共同で、ヒューマンサイエンス振興財団細胞バンク所長へヒト組織譲渡申請書を提出する必要があり、それぞれの倫理審査委員会

の承認も含め、現在準備中である。

申請・承認後は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団細胞バンクから福井県済生会病院に担当者が出向き、その組織をコージンバイオへ運び、角化細胞を調製し、J-TEC、メナードへ送付するシステムで進行予定である。

細胞を用いた検討において、角化細胞は、継代回数や培養条件により、分化の状態が変わり、遺伝子発現が変化するので、種差を比較するためには、採取方法や細胞の培養条件などを同一にする必要がある。それ以前に、今回の試験結果では、単層培養において大型の老化細胞が多数出現し、細胞の状態はそれほど良くないと考えられた。表皮細胞の培養において、細胞の大型化は細胞老化を示す場合が多く、本研究においても、提供されたヒト表皮角化細胞は、既に老化を示す細胞を多く含んでいたと推察する。その中でも、老化の傾向は白人由来表皮角化細胞で特に顕著であり、P2 では細胞増殖能が明らかに減少した。これは、老化細胞の増加とともに、相対的に表皮幹細胞が減少したためと考えられる。表皮幹細胞が減少すると、3次元培養では表皮角化細胞の正常な分化が進行せず、角質層を含む正常組織に類似した表皮組織を再構築できない場合がある。そこで、本研究では、単層培養での継代数ごとの細胞を用いた3次元培養を行い、組織構造を確認した。その結果、日本人、あるいは白人由来表皮角化細胞を単層培養せずに3次元培養した場合には、角質層を含むヒト表皮組織に類似した組織構造を再現したが、日本人由来細胞では、P1細胞を用いると不全角化層を形成し、日本人由来細胞のP2、白人由来細胞P1、P2では角質層を形成せず異型細胞を多く含むランダムな3次元細胞凝集様組織構造を形成した。単層培養により、細胞老化が進行し、相対的に表皮幹細胞が減少した結果、表皮細胞の正常な分化が進行せず、ヒト表皮組織とは類似しない組織構造となったと考えられた。その傾向は、白人由来細胞の方が顕著であったが、この傾向は種差によるものではなく、ドナー細胞の状態やその後の細胞処理の差による可能性が高いと思われた。

一方、白人種由来角化細胞では、involucrin や filaggrin などの分化マーカーの発現が高く、試験に用いた白人種由来角化細胞は分化が進んでいるものと思われる。今後、日本人と白色人種の角化細胞における種差を検討するためには、組織からの細胞を単離する方法や培養条件、継代回数などを統一していく必要があると考えられる。同時に、分化に影響を受けないマーカー遺伝子を調査し、遺伝子発現解析を行っていく。

当初計画では、日本人及び白色人種の角化細

胞を各3種類以上用いて実験を行う予定であったが、細胞が入手できなかったため、各1ロットの細胞を用いて実験を行った。n数が少なく、統計的な処理ができないため、今回の結果は、参考値である。

これらの検討を実施する際には、白人、日本人で複数のロットを確保する必要があると考えられた。今後、細胞の提供を担当する研究分担者、コージンバイオとともに、細胞の培養条件について調整を行っていく。

臍帯細胞の検討においては、コージンバイオ(株)から提供のあったヒト臍帯由来の血管内皮細胞4株は、いずれの細胞株も敷石状形態の細胞に紡錘状形態の細胞が混在した不均一な集団であり、コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内で3次元培養してもTEER値の変動は認められなかった。一方、クラボウより購入したヒト新生児包皮由来の微小血管内皮細胞HMVEC株は、敷石状形態を呈する細胞の均一な集団であり、コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内に3次元培養した際にはTEER値の上昇が確認された。つまり、コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内で3次元培養した敷石状形態を呈する均一な細胞集団では、タイト結合に依存したバリア機能が誘導され、TEER値が上昇したと考えられる。これらの結果は、コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバーを利用してヒト血管内皮細胞のバリア機能が容易に評価できることを示唆する。また、コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバーは他の多孔性プラスチック膜チャンバーと異なり、細胞の観察が良好であることのみならず、両面培養や生理活性物質の徐放等にも対応できるので、将来はより生体内血管に酷似した培養モデルの構築にも応用できると考えている。

調査及び情報収集として行ったアンケートを総括すると、製薬企業の中で、ヒト組織・細胞を求める声は大きかった。アジア人の細胞供給を求める意見も多く、安定な供給や要求通りの組織を求める声も合わせ考察すると、国内市場で要求通りの組織・細胞が安定供給されていないと感じた。ただし、その希望価格は数万円から海外品と同程度という意見がおく、高くとも欧米の2倍以内という声があった。

一方、現在本研究班で検討している皮膚、血管内皮の組織・細胞を求める要求はほとんどなかった。製薬企業の需要にあった供給ではないと考えられる。少なくとも、血管内皮については、使用経験も多く、培養条件や薬効薬理効果に関する情報を付与して、製薬企業での需要を喚起する必要があると感じた。

また、企業のヒト試料等の利用について一般市民や医師、研究者の理解を得ることは、今後の医学研究や産官学の連携にとって不可欠なこ

とである。その点で本パンフレットの作成は画期的なものとなると考えている。

E. 結論

1) 臍帯提供の実施プロトコールと説明書、同意書を作成し、IRBによる承認を得ることで、日本人の臍帯に由来するHUVEC細胞の分譲システム網を確立するための、第一段階の準備が整った。

2) 福井県済生会病院から財団法人ヒューマンサイエンス振興財団への正常皮膚組織の供給に関し、福井県済生会病院の倫理審査委員会の承認を得て、日本人の正常皮膚組織供給施設が確保された。

3) 白人種由来角化細胞では、アジア人と比較して、involucrinやfilaggrinなどの分化マーカーの発現が高く、試験に用いた白人種由来角化細胞は分化が進んでいた。

4) アジア人、白人由来の初代表皮細胞を用いて、3次元組織モデルの培養法について検討を行い、細胞増殖させるための継代培養をしない方法による3次元組織モデル培養法を確立できた。

5) コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内でヒト新生児包皮由来の微小血管内皮細胞HMVEC株を用い、3次元培養血管内皮モデルを構築することに成功した。また、この培養モデルはバリア機能を有し、TEER測定により容易に評価できることが分かった。

6) 日本製薬工業協会へのアンケートにより、ヒト組織・細胞の利用状況と要望をまとめ、アジア人の細胞供給や、安定な供給や要求通りの組織を求める声が多く、培養条件や薬効薬理効果に関する情報を付与して、需要にあった安定供給網を確保する必要があるとの結論を得た。

7) 製薬企業の位置づけを含めて、企業によるヒト試料等の研究・開発利用について広く市民への説明に利用できるパンフレットを作成することになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会等発表

1) 竹澤 俊明「コラーゲンビトリゲル：組織再生に有用な高密度コラーゲン線維の新素材」第9回 バイオテクノロジー国際会議、東京(2010.7)

2) 竹澤 俊明、松下 琢 シンポジウム3 代替法に有用な細胞培養システムへの生物学的アプローチ「シンポジウムの概要」第23回 日本動物実験代替法学会、東京(2010.11)

3) 竹澤 俊明、山口 宏之「化学物質の動態解析

への応用を指向した新しいコラーゲンビトリゲルチャンバーの開発」第10回 日本再生医療学会総会、東京、(2011.3)

- 4) 竹澤 俊明、山口 宏之「新しいバイオマテリアル:取扱い性に優れたコラーゲンビトリゲル膜乾燥体」第10回 日本再生医療学会総会 東京、(2011.3)
- 5) 増井徹:人を対象とした研究の基盤としてのゲノム情報等と社会. 遺伝疾患に関する出生前診断研究会 沖縄(2010.11)
- 6) 増井徹:ヒトのことはヒトで研究する時代の中で—代替法の時代を迎えて. 第23回日本動物実験代替法学会 市民講演会(2010.11)
- 7) 増井徹:ヒト由来試料と情報の研究・開発での流通の問題について. 日本知的財産学会ライフサイエンス分科会(2011.12)

8) 小島 肇:培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価の現状、第10回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー、大阪(2011.1)

- 9) 小島 肇:皮膚細胞研究の応用とその可能性、日本化粧品技術者会大阪支部 第15回勉強会 ワークショップ、大阪(2011.2)
- 10) 小島 肇:動物実験代替法の行政的受け入れと国際協調、シンポジウム S30 レギュラトリーサイエンスは社会にどう役立っているか—薬学系人材の役割と活躍の場を知る—、日本薬学会第131回年会、静岡(2011.3)

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

小児成長疾患に対するトランスレーショナルリサーチ における技術的基盤の創成

所 属 独立行政法人国立成育医療研究センター
生殖・細胞医療研究部
研究者 宮戸 健二

研究要旨 ヒト間葉系細胞が培養条件下で腫瘍化する可能性は現在のところ除外できない。そこで本研究では、間葉系細胞移植法の確立のための基盤的研究として、各種の遺伝子発現、核型解析からの細胞ソースの選別、規格検定法の確立をめざした研究を行った。

A. 研究目的

本研究の目的は間葉系細胞の移植治療法の確立である。これを実現するための基盤的研究として、ヒト間葉系細胞の培養・分化誘導法の確立を目指した研究を行う。本研究から得られる成果は、再生医療材料の産業化を目指す企業の安全性指針となり、医薬品・医療機器総合機構の審査にも活用され、今後の再生医療実用化促進への大きな牽引力となることが予想される。

本研究は、ヒト間葉系細胞から誘導・分化させた細胞を培養し、安全かつ倫理的な問題のないドナー細胞を得ることを目的としたものである。本研究で得られた技術を用いることで、必要となった時に保存された自己細胞からドナー細胞が得られ、自己由来の組織を用いた理想的な細胞移植が実現できると考えられる。

間葉系細胞を用いた細胞移植は新たな治療法として注目を集めており、一部ではすでに臨床応用が開始されているが、治療法自体の安全性、使用する細胞の特徴と規格、治療結果の評価方法などの問題の解決は急務である。そこで、本研究では、再生医療の効果的かつ安全な実施への応用を目指したヒト間葉系細胞の培養技術・特徴解析などの基盤情報整備を行うことを目的として研究を推進する。具体的には、1) 培養法・維持法の

標準化、2) 規格化、安全性評価 3) 治療基盤の確立を目標として設定した。

B. 研究方法

1) 異種動物成分を排除し、ヒト型成分に特化した培養法・維持法の標準化

われわれは今までに、ヒト間葉系細胞を含む10種類以上の組織を供給源として、多数の間葉系細胞株を樹立してきた。そこで、更に数種類の組織に対しても新たな間葉系細胞の分離・培養を行った。その際、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法の開発をめざした。ヒト間葉系細胞の培養維持にはフィーダー細胞は必要ないものの、細胞を増殖させるためには各種の細胞増殖因子添加と、特定の細胞外マトリックスで覆われた培養シャーレを使う必要がある。それらの種類と供給方法、保存方法についても検討を加えた。

2) 細胞の規格化・安全性評価

得られたヒト間葉系幹細胞に対して、網羅的遺伝子発現解析 (Affymetrix 社 GeneChip による解析) ならびにモノクローナル抗体を用いた既知のタンパク質の発現解析を行った。使用するモノクローナル抗体は、ヒト ES 細胞のマーカーとして知られている SSEA 分子群、TRA1、Oct-3/-4、

STRO-1 等の間葉系幹細胞候補マーカーも含む。また、新たなモノクローナル抗体作成による新規分子探索も開始した。アポトーシス関連分子についても、既知分子について遺伝子発現解析を行った。

3) 治療基盤の確立

本研究課題では、ヒト間葉系細胞の分化能検定システムの開発ならびに他の幹細胞による分化形質発現システムを通じた情報収集を行った。ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物 (NOD/SCID/IL-2 受容体 $\gamma^{-/-}$) への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討を開始した。

(倫理面への配慮)

ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮して研究を行った。実験動物を用いる研究については、(独) 国立成育医療研究センター・実験動物指針に準拠して研究を実施した。

C. 研究結果

1) ヒト I 型コラーゲン αI 鎖を高発現するトランスジェニックカイコの作製

コラーゲンはヘリックス構造を有するタンパク質で医学や化粧品などの領域で使用されており、人体には毒性がないことが示されている。また、ES 細胞や iPS 細胞の培養に使用されるゼラチンはコラーゲン線維を熱変性させた状態のものであり、それらの細胞培養には必要不可欠である。現在、一般に市販されているゼラチンはウシ胎児やブタ由来の非ヒト動物性コラーゲンを熱変性させたもので、非ヒト動物成分が含まれてい

るため、基礎研究用の細胞培養には問題がないものの、細胞医療などの臨床応用に用いる際には、ヒトの体内に入った場合に免疫原となる可能性があることから、非ヒト動物成分を含まないゼラチンの開発が必要である。そこで本研究では、カイコを用いてヒトのコラーゲン線維の作製を行い、ヒト細胞の培養における適正を検討した。

免疫生物研究所 (株) [ネオシルク (株) と合併] は遺伝子導入カイコ (トランスジェニックカイコ) を独自に開発し、カイコ卵子に特定のタンパク質発現ベクターをマイクロインジェクションによって導入することにより、ヒトを含めた様々な生物種のタンパク質を発現するカイコ系統の樹立に成功している。カイコで組換えタンパク質を作製する利点として、カイコ繭に特異的に外来性タンパク質を発現させることによって、PBS 緩衝液に一昼夜浸すだけで、カイコ由来の成分を含まない高純度のタンパク質を簡便に精製できる点が挙げられる。さらに、転写のトランスアクチベーター発現ベクターと同時に外来性タンパク質発現ベクターをカイコに導入することにより、繭で大量に組換えタンパク質を作製することができるようになった。そこで本研究に先だって、免疫生物学研究所 (株) においてヒト I 型コラーゲン αI 鎖を繭に特異的に発現するトランスジェニックカイコを作製した。

2) ヒト I 型コラーゲン αI 鎖のカイコ繭からの精製

カイコ繭に発現させたヒト I 型コラーゲン αI 鎖を CBB 染色と Western blot 解析により検討したところ、ヒト I 型コラーゲン αI 鎖の発現を確認した。次に、トランスアクチベーター発現ベクターを同時に導入したカイコ系統を作製したところ、目的のタンパク質の発現が増加することを確認した。そこで、トランスジェニックカイコの繭を一昼夜 PBS 緩衝液に浸すことによってタ

ンパク質の精製を行ったところ、カイコ成分を含まない高純度のヒト I 型コラーゲン α I 鎖を精製することに成功した。

3) カイコ繭から抽出したヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性の検討：フィーダー細胞の培養

ES 細胞および iPS 細胞の培養にはフィーダー細胞を用いないシステムも開発されているが、その場合でもゼラチン処理した培養用シャーレを用いる必要がある。また、現在でも多くの場合はフィーダー細胞を用いて ES 細胞や iPS 細胞は培養されている。そこで、ES 細胞および iPS 細胞を用いて培養条件などを検討する前段階として、フィーダー細胞となるヒト繊維芽細胞の培養を行い、その有用性を検討した。具体的には、カイコ繭から精製された凍結乾燥されたヒト I 型コラーゲン α I 鎖の細胞培養における細胞の形質維持における有用性を検討した。そこで、市販されているヒト皮膚由来繊維芽細胞 HSF (KURABO 社製) を用いて、細胞の伸張程度を指標にして、ヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性を検討した。比較の対象として、市販されている牛胎児由来および豚由来コラーゲンを用いた。

結果として、市販されている非ヒト動物由来コラーゲンに比べて、カイコ繭から精製したヒト I 型コラーゲン α I 鎖は低濃度の場合は、細胞の伸張が劣る結果が出たものの、比較的高濃度 (5mg/ml) で用いた場合は従来から用いられているコラーゲンと同等の結果を得ることができた。以上の結果は、フィーダー細胞の培養には全く問題ないことを示している。

4) ヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性の検討：ES 細胞を用いた検討

ここでは、ヒト由来の ES 細胞と未分化性および多分化能において同等の能力をもっていると考えられているカニクイザル由来 ES 細胞を用い

て検討を行った。また、フィーダー細胞としてはマウス胎児由来の繊維芽細胞を用い、培養にはヒト I 型コラーゲン α I 鎖でコーティング処理した培養用シャーレを用いた。比較の対照として、ブタ由来コラーゲンでコート処理した培養用シャーレを用いた。

カニクイザル由来の ES 細胞はブタ由来コラーゲンを用いて培養した場合は、良好なコロニーを形成した。一方、ヒト I 型コラーゲン α I 鎖でコーティング処理した培養用シャーレを用いた場合でも、同様に良好な形態を維持したコロニーが形成された。しかも、20 継代以上にわたって形態的に未分化性を維持したままの状態でも良好に培養維持が可能であった。以上の結果は、ヒト I 型コラーゲン α I 鎖はヒト ES 細胞の未分化性を維持するのに十分な活性を有しており、一般的に用いられている非ヒト動物由来コラーゲンと比べて同等の活性を有していることを示している。

5) ヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性の検討：ES 細胞での未分化マーカーの発現検討

形態的には、従来から用いられている非ヒト動物由来コラーゲン成分と同等の活性を有していることが示されたことから、更に、ES 細胞が未分化な状態に維持されていること証拠を提示するために、ES 細胞において特異的に発現するタンパク質および糖鎖について検討を行った。検討したのは (1) 未分化性維持において重要な役割を果たしていることが知られている核タンパク質 OCT-3/4、NANOG、SOX2、(2) 未分化な細胞又は胚性幹細胞にのみ存在する表面分子 TRA1-81、(3) ヒト ES 細胞の未分化マーカーの一つで、糖脂質の一種である SSEA-4、である。それぞれ免疫染色法によって発現を調べた。

結果として、標準化された方法で培養されたカニクイザル由来の ES 細胞と、何ら異なることない発現および局在を示すことが確認された。この

結果は、ES 細胞の未分化性が良好に維持されていることを示している。

6) ヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性の検討： 免疫不全マウスへの移植による多分化能の検討

続いて、ES 細胞が様々な細胞に分化できる多分化能を維持している証拠を提示するため、免疫不全マウスを用いて、更に検討を行った。多分化能を有していることは、ES 細胞を様々な細胞（内胚葉、中胚葉、外胚葉由来の組織）に分化させることで調べることができる。培養系を用いても、様々な増殖因子、分化因子などを培養液中に添加することによって神経細胞や心筋細胞に分化させることができるが、最も簡便で信頼される方法としては、免疫不全マウスの皮下に細胞を移植して、(1) 生体内でテラトーマを形成するかどうか、(2) どういった組織が形成されたか、を組織学的に検討する方法がある。ここでは、免疫不全マウスとして SCID マウスを用いた検討を行った。

結果として、SCID マウスの皮下にヒト I 型コラーゲン α I 鎖を用いた細胞培養から得られたカニクイザル由来の ES 細胞を移植したところ、テラトーマが形成され、内胚葉、中胚葉、外胚葉由来のすべての分化した組織が組織学的に確認された。以上のことから、カイコ繭から精製されたヒト I 型コラーゲン α I 鎖をコート処理した培養用シャーレで細胞培養されたカニクイザル由来の ES 細胞は、細胞培養によって、従来の非ヒト動物性コラーゲンを用いた培養方法と同等に未分化性が維持され、多分化性を有していることが確認できた。

7) ヒト間葉系細胞の培養における標準化マーカーの開発：遺伝子発現解析

臍帯血・胎盤・子宮内膜・余剰指といった従来は破棄されてきた組織に着目した結果、これらの組織から豊富な分化・増殖能をもった間葉系細胞を得る

ことができることが我々を含めた最近の研究からわかってきた。そういった廃棄される運命にあった細胞を用いることは、ドナーに侵襲を伴わずに細胞医療に用いることが可能な細胞を得ることができる点で有利である。しかし、ヒト間葉系細胞が培養工程によって変性する可能性、更に腫瘍化してしまう可能性については除外できないのが現状である。そこで、本研究では、ヒト間葉系細胞の遺伝子発現をリアルタイム qPCR 法によって多検体（100 検体以上）について検討した。

今回、発現を検討した遺伝子は (1) 染色体末端伸長因子および細胞不死化の中心的因子であるテロメラーゼであるテロメラーゼ（以下、TERT）とその発現制御因子（c-Myc、Ets 1、SIP1、SIRT1&2）、(2) 酸素応答性転写因子 HIF-1 と HIF3 α および制御因子である Hts2、PIN1、(3) 癌抑制遺伝子 p53、(4) 細胞の寿命制御因子 p16INK4A、(5) 胚性幹細胞（ES 細胞）や iPS 細胞の未分化性維持に重要な Oct3/4 および Klf4、(6) 内部コントロールとして、 β -actin と GAPDH、である。

ヒト間葉系細胞だけでなく、細胞が腫瘍化する場合は、先立って不死化する必要があり、その際に染色体の末端構造（テロメア）を伸張させることにより、染色体の末端領域からの変性を防ぐことが必須である。テロメアを伸張させる酵素として、TERT が知られている。そこで、TERT とその発現調節因子について特に着目した。検討を行ったサンプル数は骨髄由来の間葉系細胞 40 例、臍帯由来の間葉系細胞 17 例、更に小児由来の間葉系細胞 57 例、陽性コントロールとして小児由来の腫瘍細胞 12 例、TERT 遺伝子発現ベクターを導入したヒト間葉系細胞 1 例の合計 127 例であった。

遺伝子発現を調べた結果として、TERT は、発現量に差はあるものの、すべての陽性コントロール（腫瘍細胞）で発現が確認され、TERT 関連遺伝子（Ets, c-Myc, Sir2, SIP1）もまた、TERT の発現量に関わらず何れの細胞でも同程度の発現を確認した。一方、ヒ

ト間葉系細胞では、すべての細胞でTERTの発現が検出感度以下であった。TERT関連遺伝子 (Ets, c-Myc, Sir2, SIp1) については、陽性コントロールと同様に、TERTの発現に関わらず何れの細胞でも同程度の発現を確認した。また、継代によるTERT遺伝子の発現の上昇は認められなかった。更に、TERTcDNAを組み込んだプラスミドを用いて検出感度を算出したところ、今回用いた方法では細胞に含まれる20コピーのTERT転産物を検出できることがわかった。以上の結果は、ヒト間葉系細胞にはTERTの転写産物が19コピー以下であることを示しており、TERT遺伝子が発現していないことを示している。TERTの転写産物が検出されないことは予想外であったが、腫瘍化に先立つ細胞の不死化の指標として、ヒト間葉系細胞ではTERTの発現の有無が有力な指標になることが示された。

TERTとその制御因子以外の遺伝子についても有用な結果が得られた。p53やp16INK4Aは、ヒト間葉系細胞でも、腫瘍細胞でも、同程度の発現が検出された。また、ES細胞などの未分化維持に必要なOct3/4とKlf4については、検出限界を超えて弱く発現しているヒト間葉系細胞も認められたが、細胞ソース、継代数との関連性は認められなかった。それに対して酸素応答性転写因子の一つであるHIF1はどの細胞でも発現が確認されたが、HIF3 α はTERTと同様に、ヒト間葉系細胞では発現が検出感度以下であった。一方腫瘍細胞では発現は認められた。この点も、HIF3 α とTERTの発現は同様の傾向を示した。

以上のことから、TERTとHIF3 α の2つの遺伝子の発現の有無がヒト間葉系細胞の腫瘍化に先立つ不死化の有力な指標になることがわかった。すなわち、遺伝子発現についての検討を行った結果、細胞の培養工程での腫瘍化の懸念を排除できるようなマーカー遺伝子の候補、具体的には、正常細胞ではリアルタイムqPCRによって発現が確認できず、腫瘍化に伴う細胞の生理的変化に応じて発現が認められるようになるヒト遺伝子を、少なくとも2つ(TERTとHIF3 α)、同定することができた(特許出願中)。

8) ヒト間葉系細胞の有用性の検討: 免疫不全マウスへの移植による造腫瘍性の検討

次に、ヒト間葉系細胞の造腫瘍性について、ヒト間葉系細胞を2種類の免疫不全マウス (NOG マウス、Nude マウス) へ移植後、1カ月、3カ月、6カ月経過した時点での腫瘍サイズを測定した。移植に用いた細胞は、骨髄由来の間葉系細胞 5例、小児由来の間葉系細胞 14例、陽性コントロールとして小児由来の腫瘍細胞 4例 (NCR-G1, G3, G4, NCR-EW2)、TERT 遺伝子発現ベクターを導入した間葉系細胞株 2例 (UE6E7T-11, UE7T-13) であった。

方法としては免疫不全マウスの背側の皮下に陰性コントロールとしてそれぞれ2か所に血清無添加培地 (左側) とヒト間葉系細胞 (右側、 5×10^6 個) をマトリジェルと共に移植した。

結果として、陽性コントロールとして用いた小児腫瘍由来 NCR-EW2 細胞を移植した NOG マウスは1週間程度で死んでしまい十分に評価できなかったが、ヌードマウスでは、移植後1カ月経過した時点で腫瘍形成が確認できた。以上の結果は実験系が成立しており、腫瘍形成の評価が可能であることを示している。

一方、ヒト間葉系細胞を移植したヌードマウスでは、異常な免疫反応が誘導されることによって移植部位に細胞の塊が形成されたものの (1カ月後)、その後、消失した (3カ月、6カ月後)。

また、TERT 発現ベクターを導入したヒト細胞 (UEBE6E7T) を移植した NOG マウスでは、6カ月経過した時点で腫瘍形成が確認された。この結果は、TERT を発現させただけでも腫瘍形成につながることを示しているが、マウスでの6カ月はヒトの20年間に相当するため、腫瘍化する可能性は限りなく低いことを示している。これに対して、NOG マウスでは、ヒト間葉系細胞による腫瘍形成は6カ月経過時点まで観察できなかった。

以上の結果から、ヒト間葉系細胞は腫瘍化する

可能性が極めて低い細胞であることがわかった。また、たとえ TERT 遺伝子が発現したとしても、腫瘍化には非常に長い時間が必要であることも示された。

9) 低酸素応答性転写因子 HIF の新たな活性化機構

移植材料の有効性評価基準や品質管理基準について、安全性に関わる細菌等の感染や細胞癌化といった問題点は、すべての細胞に共通した課題である。特に腫瘍化の引き金となる細胞の形質変化についてのメカニズムに関する研究はマーカーの確立に有用な情報と根拠を提示することになる。

低酸素応答性転写因子 Hypoxia-inducible factor (HIF) は、HIF α と β サブユニットからなるヘテロ二量体であり、低酸素によって活性化され、各種解糖系酵素、グルコース輸送蛋白、血管内皮増殖因子 (VEGF)、造血因子エリスロポイエチンなど、多くの遺伝子の発現を転写レベルで制御を介して、生体の低酸素適応を制御する。従来、HIF は腫瘍細胞の増殖、悪性形質の増強などの制御に関わることが示されてきたが、近年、Notch シグナルとの相互作用により、上皮間葉移行をはじめとする細胞の分化制御にも重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。HIF α サブユニットには、HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α の3種類が存在する。このうち HIF-3 α は、むしろ低酸素依存性遺伝子発現を抑制する事も示されており、生体機能制御における HIF-3 α の役割が注目されている。研究において、牧野らは昨年までに、HIF-3 α 遺伝子のプロモーターが HIF-1 α の直接結合により活性化され、HIF-1 α 依存性に HIF-3 α 発現が増強することを明らかにした。すなわち、HIF-1 α の活性化は、従来の細胞の腫瘍化、分化制御、増殖にかかわる標的遺伝子の発現誘導のみならず、HIF-1 α 経路のネガティブフィードバックを含めた精緻な遺伝子発現調節機構

を構成する重要な因子であることが示唆されたといえる。一方、最近、HIF が正常酸素分圧下においても、生体内の代謝異常、炎症などに起因する細胞内外のシグナルにより活性化されることが明らかにされ、酸素分圧非依存性の HIF-1 α 制御機構が、広く細胞、生体機能調節に重要な役割を果たすことが示されつつある。本年は、酸素とならび細胞のエネルギー代謝に重要なグルコースによる HIF-1 α 制御機構の一端を明らかにすることができた。

D. 考察

従来は、非ヒト動物性成分を含んだ培養用試薬で細胞培養が行われてきたが、少しずつではあるが、ヒト成分を用いた細胞培養が可能になってきた。本研究もそういった研究の一つと位置づけられ、トランスジェニックカイコを用いてヒトのタンパク質成分を作製することの有用性を示すことができた。細胞の伸張性には従来の成分に比べてやや劣る点があるものの、ES 細胞の未分化性が十分に保たれていることから、実用可能であると考えられる。

本研究の成果として、TERT 遺伝子の発現の有無はヒト間葉系細胞の腫瘍形成に向けた形質変化に関する有力な指標となることが示された。更に、免疫不全マウスの検討から、ヒト間葉系細胞は腫瘍化する可能性が極めて低い細胞であることが明らかになった。また、染色異常を起こしたヒト間葉系細胞であっても腫瘍化しないことも示すことができた。

また、TERT 遺伝子だけでなく、酸素応答性転写因子である HIF3 α も細胞の不死化の有力な指標となることが明らかになったことから、ヒト間葉系細胞を細胞医療に用いる際に問題となっている細胞の腫瘍化については、その前段階である細胞の不死化の指標が、本研究の成果として同定されたことになる。

E. 結論

細胞移植治療における細胞ソースとして胎盤・臍帯血・月経血・子宮内膜といった組織由来の間葉系幹細胞を用いる試みは、大変ユニークなものである。その採取・樹立においてドナーへの侵襲がないため倫理的問題点が少なく、採取におけるコストが低いことは大きな利点である。これらの細胞ソースの特性を明らかにすることで、より安価で高品質な細胞供給体制の構築が可能となり、再生医療の実現化に向けて大きく前進することができる。本研究の成果として、細胞医療の実現に不可欠な結果を出すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takiyama Y, Harumi T, Watanabe J, Fujita Y, Honjo J, Shimizu N, Makino Y, Haneda M. Tubular Injury in a Rat Model of Type 2 Diabetes Is Prevented by Metformin: A Possible Role of HIF-1 α ; Expression and Oxygen Metabolism. *Diabetes*. 60:981-992, 2011.

2) Isoe T, Makino Y, Mizumoto K, Sakagami H, Fujita Y, Honjo J, Takiyama Y, Itoh H, Haneda M. High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction via carbohydrate response element binding protein in glomerular mesangial cells *Kideny Int.* 78: 48-59, 2010.

3) Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells were immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circulation Res.* 106:1613-23,

2010.

4) Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells. *Artif Organs*. 34:280-8, 2010.

5) Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 106:860-70, 2010.

2. 学会発表

該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

名称：細胞の造腫瘍性試験方法及び腫瘍マーカー

発明者：宮戸健二、梅澤明弘

出願番号：特願 2010-215828

3. その他

該当なし。

新規ステロール制御の代謝改善による次世代の動脈硬化予防治療薬の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

低 HDL 血症は冠動脈疾患の危険を大きく増大するが、HDL を直接上昇する薬は未だ無い。本研究では①HDL 産生トランスポーター ABCA1 の転写・タンパクレベルでの新規調節、②HDL と炎症、③HDL を低下する高トリグリセリド血症・高血糖に着目し、ステロール/胆汁酸による制御を明らかにして「HDL 上昇」を核とした予防・治療薬創製に貢献する。本年度は、①ヒト肝特異的な ABCA1 転写産物の役割をノックダウンにより解明し、末梢型 ABCA1 の転写を促進する新規物質を発見するとともに、アポ A-I が ABCA1 分解を抑制するシグナルならびに calmodulin との相互作用による ABCA1 分解抑制を解明した。②スタチンが ABCA7 発現上昇を介して食作用を亢進する作用などを明らかにした。③エネルギー消費受容体 GPCR/RGR-5 を選択的に活性化する胆汁酸ウルソデオキシコール酸誘導体を創製するとともに、胆汁酸コール酸による2型糖尿病マウスでのトリグリセリド低下、コレステロール上昇による TG 合成酵素 Lipin の発現抑制を見いだした。

分担研究者

- (1) 田辺三菱製薬(株)薬理研究所
塩谷正治、島田浩志、川端(杉本)佳奈美、
長崎正明
- (2) 興和(株)東京創薬研究所
山崎裕之、土肥武、田辺宗平
- (3) サントリーホールディングス株式会社 諏訪芳秀
- (4) 名古屋市立大学大学院医学研究科
横山信治、堂前純子
- (5) 広島国際大学薬学部 宇根瑞穂
- (6) 昭和大学薬学部 板部洋之

A. 研究目的

冠動脈疾患の1/3ではLDLコレステロールは正常であり、HDL の低下が独立した重大なリスクと認識されている。低 HDL 血症は日本人の 10~20%に認められ、HDL が 10mg/dL 上昇すれば 20-30%のリスク低下が期待されるが、HDL を直接上昇する薬は実用化されていない。本研究では、HDL の形成と機能に着目し、①HDL の大部分を生産する肝の膜トランスポーター ABCA1 のヒトでの遺伝子転写調節と翻訳後修飾の解明、②炎症性アミロイド蛋白 serum amyloid A (SAA)を含む HDL や関連分子 ABCA7 の慢性炎症疾患との関わり、③HDL を低下しそのリスクを増幅する

高トリグリセリド(TG)血症・高血糖について、ステロール・胆汁酸代謝物による制御を明らかにし、「HDL」を核とした予防・治療薬創製に貢献する。

[I] 申請者らは血中 HDL の 8 割を生産する肝の ABCA1 が、肝独自の遺伝子転写を受ける機構をラットで見いだしている(*J Biol Chem* 2007;特願 2005-273693)。引き続きヒトの制御を検討したところ、システムはより高度で複雑であり、新規のプロモーターと未知のコレステロール応答転写因子を解明する必要が判明した。本研究では①ヒトシステムの完全理解をめざすと同時に、②核内受容体 RXR による転写制御を明らかにする。また③ ABCA1 は半減期の短いタンパクであり、タンパク分解による発現制御を受ける。ステロール合成制御薬物や相互作用タンパクによる制御を解明する。

[II] 動脈硬化症の発症進展には、血管壁内膜と中膜局所における細胞内脂質沈着、細胞増殖、食作用などの多様な細胞の反応の集積が重要な役割を果たす。HDL 産生に伴う細胞コレステロールの変化が炎症反応や細胞の食作用の制御に関わることが明らかになっている。本年度は、細胞コレステロールによる ABCA7 を介した食作用の制御について解析する。

[III] HDL は末梢組織からコレステロールを肝に運び、胆汁酸への転換と体外排出を促す。胆汁酸や胆

胆汁酸吸着剤の抗肥満・抗糖尿病作用について、①糖尿病モデルマウスでの胆汁酸によるトリグリセリド低下作用を検証し、②胆汁酸刺激でエネルギー消費を促進するGPCR/TGR5の高選択的リガンドを創製する。また③コレステロール上昇によるTG低下の機序を、TG合成酵素Lipinの発現制御に着目して明らかにする。

本研究により、「ステロールによる制御」の視点から各病態の制御が明らかにされれば、HDL改善を起点にメタリックシンドロームの重複リスクを低減する治療薬の実現性が高まると期待される。

B. 研究方法

B-1 HDL産生トランスポーターABCA1の発現調節

①ヒト肝に特異的なABCA1 mRNAバリエーションのステロールによる発現制御、siRNAノックダウンによる機能解析を行った。②RXR/LXR制御化合物やPKD活性制御による末梢型ABCA1発現と細胞コレステロール調節、ならびに新規制御物質のスクリーニングを検討し、③ステロール合成薬物や相互作用タンパクによるABCA1タンパク分解の制御について解析した。

B-2 HDLと炎症

ABCA7の食食促進作用について、コレステロールによる発現制御と食作用との関係を研究した。

B-3 コレステロール/胆汁酸による糖・脂質代謝制御

①2型糖尿病モデルのKKAyマウスを用いて高脂肪食およびコール酸投与の血中代謝パラメーターへの影響を解析した。②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した。③高コレステロール血症のApoE-KOマウスに高コレステロール食を与えて血清コレステロールを高め、肝での遺伝子発現をマイクロアレイで解析した。

(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「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]

ヒト肝には、末梢組織発現のP型に加え、肝特異的なABCA1 mRNAバリエーションが複数存在していた。ヒト肝特異的なL3型は総ABCA1 mRNAの26.2±9.4% (n=4)に相当し、ヒト肝ガン由来細胞HepG2、Hep3B、JHH-5に高発現し、コレステロール低下条件(コンパクトン処理)で発現が上昇することが判明した。L3型はエクソン2に由来するN末端21アミノ酸を欠くものの、特異的siRNAでノックダウンするとABCA1総mRNA、タンパク、アポA-Iに依存した細胞外コレステロール放出(HDL産生)が半減した。したがってL3型は機能的タンパクをコードしており、肝由来細胞でのHDL産生に大きな役割を持つバリエーションであることが明らかになった(特願2010-159674)。

2) 末梢型ABCA1の転写による制御 [最上、諏訪、横山]

①末梢細胞のABCA1は細胞内のコレステロールをHDLとして放出する役割を持ち、コレステロールにより活性化される核内受容体LXR/RXRによる転写促進を受ける。内分泌攪乱物質トリブチルスズ(tributyltin chloride, TBTC)が、LXRα/RXRを活性化し、末梢型ABCA1プロモーターの転写を促進してABCA1 mRNAおよびタンパク発現を促進する活性をもち、アポA-I依存の細胞コレステロール放出(HDL産生)を促進することを見いだした(Nishimaki-Mogami et al., *Biochem Pharmacol* 2011)。②引き続き食品成分からABCA1発現を促進するRXR作動因子を探索するため、スクリーニング系を構築した。③ABCA1遺伝子はPKDによってリン酸化を受ける転写制御因子AP-2aにより負の発現制御を受けることを先に発見した。今年度はPKDによるAP-2bのリン酸化がadiponectin遺伝子の発現を負に制御することを示した(Iwamoto et al., *Atherosclerosis*, in press)。

3) ABCA1タンパク分解の抑制による発現の増強 [横山、田辺ほか、最上]

ABCA1は半減期の短いタンパクであり、分解速度がタンパク発現量に大きく影響する。①Calmodulinはカルシウム依存性にABCA1と結合し、calmodulinをsiRNAでノックダウンするとABCA1の半減期が減少した。ABCA1のPEST配列近くにあるcalmodulin結合配列に変異を導入すると、calmodulinの結合は

失われ、半減期が減少した。Calmodulin 阻害剤である W7 は、calmodulin の ABCA1 への結合を増加し、それによって ABCA1 の半減期を延長して、ABCA1 活性と HDL 産生を増加した (Iwamoto et al, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 2010)。

②ピタバスタチンによる肝 ABCA1 発現上昇の機序を解析した。ラット肝由来 McARH7777 細胞では、LXR 依存の末梢型 ABCA1 mRNA は低下したが、total ABCA1 mRNA とタンパク発現は増加した。この増加は、ピタバスタチンの濃度と時間に依存しており、SREBP2 制御の HMG-CoA Synthase mRNA 増加の濃度・時間依存性と一致した。したがって、SREBP2 制御の肝臓型 ABCA1 mRNA の発現増強作用の寄与が推測された。同時に、ピタバスタチンにより PPAR α 下流遺伝子である acyl CoA oxidase (ACOX)、carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) mRNA の発現が増強され、その濃度依存性は PPAR α 発現の増強に一致していた (Maejima et al., *J Pharmacol Sci*, in press)。

③アポ A-I は ABCA1 の細胞外ドメインに結合して細胞内から輸送された脂質とともに HDL を形成する。アポ A-I はまた ABCA1 タンパクを安定化するが、ABCA1 の C-末端領域とグアニンヌクレオチド交換因子 PDZ-RhoGEF が相互作用し、アポ A-I による安定化シグナルを伝達することを明らかにした (Okuhira et al., *J Biol Chem*, 2010)。

C-2 HDL と炎症 [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、ABCA7 による細胞食作用の促進に対するステロール代謝の関与を検討した。ABCA7 遺伝子は細胞コレステロールが減少すると、SREBP2 により発現が増加する。スタチンを投与すると、細胞の食作用が昂進することが明らかになり、この現象は、ABCA7 ノックダウン細胞や ABCA7 欠損マウスの細胞および動物レベルを含めた観察で証明された (投稿中)。また HDL はそのアポリポタンパク成分が ABCA7 をカルパイン分解から保護し、食作用を促進することを明らかにした (Tanaka et al., *J.Lipid Res*, 2010; *J Atheroscler. Thromb*, in press.)。

C-3 コレステロール/胆汁酸による糖・脂質代謝制御

1) 胆汁酸による糖・脂質代謝調節 [塩谷ほか]

2 型糖尿病モデルの KKAy マウスにコール酸を混餌投与すると、血中の胆汁酸値はコントロールの約 5 倍程度上昇していた。体重の推移はコントロール群と

大きな違いはなく、コール酸による明確な抗肥満作用は見られなかった。一方、血中の TG、遊離脂肪酸値はコール酸投与群で顕著に低下していた。

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]

エネルギー消費を促進する GPCR/TGR5 は胆汁酸により活性化される。TGR5 高選択的リガンドの創製を目的に、核内受容体 FXR アゴニスト活性の弱いウルソデオキシコール酸 (UDCA) を母核とした化学修飾を行った。側鎖の修飾の影響については、天然に見出されるグリシン、タウリン抱合体は遊離の UDCA と比してその活性に大きな差異は見られなかった。また、セリン抱合体も活性に変化は見られなかった。一方、negative charge を 2 つ有するシステイン酸抱合体では全く活性は認められず、ベンゼン環を有する p-アミノ安息香酸抱合体は著しい活性の上昇を認めた。母核の修飾では、UDCA の 3 位へのメチル基の導入は活性を僅かながら低下させる結果に終わったが、7 位へのメチル基の導入は活性化能、親和性共に高めた。また、UDCA の 3 位水酸基の酸化、或いは異性化しても活性に殆ど影響は見られなかった。7 位水酸基への硫酸基の導入は著しい活性低下を導いた。(Iguchi et al., *J Lipid Res* 2010; *Chem Pharm Bull* 2011)

3) コレステロールによる中性脂質代謝調節機構 [板部]

アポ E-KO マウスにコレステロール (Chol) 食を与えると 1 週間後には血漿トリグリセリド (TG) の著しい減少が、より長期では体重増加の抑制と脂肪組織の他萎縮が認められた。肝の mRNA 発現を DNA アレイで解析したところ、脂肪酸合成、VLDL 粒子形成、そして G3P 経路に関わる遺伝子群が低下した。最も強く抑制されたのは lipin1 である。Lipin 遺伝子は PA ホスファターゼ活性を持ち、TG 合成の調節に大きく関わっている。Lipin-1 は、脂肪萎縮症の原因遺伝子として知られ、TG 合成に関わる。Lipin-1 発現は、グルココルチコイドや PGC-1 α により制御されることが知られる。肝のグルココルチコイド量には変動は見られなかったが、PGC-1 α 遺伝子発現は約 70% 抑制され、その支配下にある PPAR α 、ACOX1、CPT-1 などの発現も抑制され、Chol 食摂取による lipin-1 の発現抑制に PGC-1 α が関わるのが強く示唆された。一方、Lipin-2 はヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞でタウロコール酸によりタンパク質レベルが約 60% 減少した。

Chol 添加食によりマウス肝の胆汁酸含量が 40%以上の増加しており、胆汁酸が lipin-2 の発現制御因子となる可能性が考えられた。

D. 考察

D-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]

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。マウスラットと同様に、ヒト肝にも末梢型 ABCA1 mRNA に加えて肝特異的 mRNA が存在しており、ヒト独自の L3 型 mRNA はヒト肝と肝由来細胞において大きな割合を占め、HDL を産生する機能的 ABCA1 をコードすることを特異的 siRNA ノックダウンにより明らかにした。さらに、ヒト ABCA1 遺伝子において、L3 型 mRNA の発現応答を担うプロモーター・エンハンサー領域を同定し、特許を出願した (特願 2010-159674)。肝 ABCA1 は血中 HDL の 8 割を生産する大きな役割を持つ。L3 型プロモーター・エンハンサー配列を利用したアッセイシステムは、強力にヒトに有効な HDL 上昇薬創製に大きく貢献することが期待される。

2) 末梢型 ABCA1 の転写による制御 [最上、諏訪、横山] 3) ABCA1 タンパク分解の抑制による発現の増強 [横山、田辺、最上]

末梢組織の ABCA1 は細胞コレステロールを HDL として放出し、肝細胞の ABCA1 はコレステロール受容体となる HDL 前駆体 (pre β HDL) を産生する役割分担があることが示唆されている。遺伝子転写促進ならびにタンパク分解抑制の 2 つの面から末梢型 ABCA1 の発現を増強する方法が確立できれば、血管壁でのコレステロール蓄積を防ぎ、動脈硬化抑制治療効果を発揮することが期待される。

D-2 HDL と炎症 [横山]

本研究により、ステロール代謝が、エネルギー代謝のみならず、生体防御や細胞の基本的機能に関わっており、複雑な応答機構によりそれらを制御したそれらに制御されていることがわかった。様々な疾患予防治療への試みが、これらの制御システムを介して可能となることを示唆している。

D-3 コレステロール/胆汁酸による糖・脂質代謝制御

1) 胆汁酸による糖・脂質代謝調節 [塩谷ほか]

これまで、コレステロール低下剤胆汁酸吸着樹脂 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、高脂肪食の KKAY マウスなど動物モデルで示してきた。遺伝子発現解析により、コレスチミドは肝臓への胆汁酸再吸収を抑制することで、胆汁酸の受容体である FXR の活性を抑制し、その標的遺伝子である抑制性核内受容体 SHP の遺伝子を発現減少させ、SHP により負の制御を受ける *cyp7 α* の遺伝子発現量を増加させることを示してきた。また、胆汁酸により小腸から分泌される FGF15 の遺伝子発現を抑制することを示した。本年度は、核内転写因子の FXR や細胞表面の GPCR である TGR5 を介して、血糖やエネルギー代謝の改善作用を示す胆汁酸コール酸を高脂肪食負荷 KKAY マウスに投与した。血中の胆汁酸濃度はコール酸の混餌投与により約 5 倍の 20 μ M 程度まで上昇し、抗肥満作用は示さなかったが、血中 TG および遊離脂肪酸の顕著な低下が認められた。胆汁酸は FXR の活性化により脂肪酸や TG の合成系遺伝子の発現抑制作用を示すことが報告され、また FXR の合成アゴニストによる血糖低下作用が報告されている。胆汁酸吸着樹脂や胆汁酸そのものが、核内転写因子や細胞膜のレセプターに作用し、直接あるいはホルモン等の何らかの因子を介して、全身の代謝制御を行っているものと推察される。また、そのメカニズムを解析するために、高脂肪食を負荷した 2 型糖尿病のモデル動物である KKAY マウスは適しているものと考えられた。

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]

UDCA を化学修飾することにより TGR5 選択的な新規誘導体の探索を試みた。1) 側鎖の修飾としてアミノ酸との抱合が TGR5 活性化に与える影響を検討したところ、抱合させるアミノ酸による活性化能の差を認めた。疎水性のアミノ酸の導入は TGR5 活性化能を上昇させたが、FXR に対するリガンド活性の上昇も引き起こし、選択性の向上には至らなかった。2) 母核の修飾では、3 位へのメチル基の導入では顕著な効果は見られなかった。しかし、7 位にメチル基を導入することで TGR5 に対する活性化能、親和性を共に改善し、しかも FXR のリガンド活性にはあまり影響しておらず、より選択性を高める方法とし有効な手法であると考えられる。

3) コレステロールによる中性脂質代謝調節機構

[板部]

本研究により、アポ E-KO マウスにコレステロール添加食を与えた際に著しい血漿リポタンパク質中の TG 含量が減少し組成が大きく異なったリポタンパク質が生じる現象は、肝での TG 合成系である G3P 経路が転写レベルから抑制を受けたためであることが示唆された。従来、TG 合成は脂肪酸の供給量に依存的であろうと考えられており、その発現制御に関する研究はほとんどない。今回の結果は、コレステロール過剰摂取に伴って TG 合成系である G3P 経路の各酵素に転写レベルでの抑制をかける制御機構の存在を強く示唆するものである。

E. 結論

1. 抗動脈硬化性リポタンパク HDL の大部分を生産する肝 ABCA1 について、ヒト肝に特異的な転写産物を発見し、HDL 産生への大きな関与を特異的ノックダウンにより示した。
2. 核内受容体 RXR を活性化し末梢 ABCA1 転写を促進する化合物の食品成分からの探索を進めるとともに、トリブチルスズが HDL 産生を促進する活性を見いだした。
3. ABCA1 の翻訳後調節に着目し、ステロール合成阻害スタチンによる ABCA1 発現上昇の機序、アポ A-I が ABCA1 分解を抑制するシグナルについて、また calmodulin がタンパク相互作用により ABCA1 分解を抑制する機構を明らかにした。
4. スタチンは ABCA1 発現上昇を介して細胞の食作用を亢進することを見いだした。
5. 胆汁酸や胆汁酸吸着剤の抗糖尿病作用について、糖尿病モデルマウスでコール酸が血中 TG・脂肪酸を低下することを見いだした。他の内因性胆汁酸に比して毒性の弱いウルソデオキシコール酸を化学修飾し、TGR5 活性化能を増強することに成功した。
6. コレステロール上昇による TG 合成酵素 Lipin の発現抑制を見いだした。

F. 研究発表

論文発表

1. Cui H, Okuhira K, Ohoka N, Naito M, Kagechika H, Hirose A, Nishimaki-Mogami T. Tributyltin chloride induces ABCA1 expression and apolipoprotein A-I-mediated cellular cholesterol efflux by activating LXRalpha/RXR. *Biochem Pharmacol*. 2011; 81: 819-824
2. Okuhira K, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Ohoka N,

Suzuki K, Sawada JI, Naito M, Nishimaki-Mogami T. Binding of PDZ- RhoGEF to ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) induces cholesterol efflux through RhoA activation and prevention of transporter degradation. *J Biol Chem* 2010; 285: 16369-16377

3. 最上(西巻)知子 HDL 産生トランスポーター ABCA1 の肝での二重転写制御機構 *生化学* 82: 852-856 (2010)
4. Maejima T, Sugano T, Yamazaki H, Yoshinaka Y, Doi T, Tanabe S, Nishimaki-Mogami T. *J. Pharmacol Sci*, In press
5. Iwamoto N, Lu R, Tanaka N, Abe-dohmae S, Yokoyama S. Calmodulin Interacts with ATP Binding Cassette Transporter A1 to Protect from Calpain-Mediated Degradation and Upregulates High Density Lipoprotein Generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2010) 30: 1446-1452.
6. Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Fitzgerald ML, Yokoyama S. Helical Apo- lipoproteins of High-Density Lipoprotein Enhance Phagocytosis by Stabilizing ATP-Binding Cassette Transporter A7. *J. Lipid Res.* (2010) 51: 2591-2599.
7. Akita N, Tsujita M, Yokota T, Gonzalez FJ, Ohte N, Kimura G, Yokoyama S. High Density Lipoprotein Turnover is Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Mice. *J. Atheroscler. Thrombosis.* (2010) 17: 1149- -1159
8. Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Yokoyama S. New insight into the relation between cholesterol homeostasis and host defense system- Helical Apolipoproteins of High-Density Lipoprotein Enhance Phagocytosis by Stabilizing ATP-Binding Cassette Transporter A7. *J Atheroscler. Thromb* in press.
9. Iwamoto N and Yokoyama S. Protein kinase D regulates the adiponectin gene expression through phosphorylation of AP-2; a common pathway to the ABCA1 gene regulation. *Atheroscler.* in press.
10. Nonomura K, Arai Y, Mitani H, Abe-Dohmae S, Yokoyama S. Insulin Down-Regulates Specific Activity Of ATP-Binding Cassette Transporter A1 For High Density Lipoprotein Biogenesis Through Its Specific Phosphorylation. *Atheroscler.* In press.
11. 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.* 2010; 51:1432-1441

12. Iguchi Y, Nishimaki-Mogami T, Yamaguchi M, Teraoka F, Kaneko T, Une M. Effects of chemical modification of ursodeoxycholic acid on TGR5 activation. *Biol Pharm Bull.* 2011;34:1-7
13. Takahashi K, Sasabe N, Ohshima K, Kitazato K, Kato R, Masuda Y, Tsurumaki M, Obama T, Okudaira S, Aoki J, Arai H, Yamaguchi T, and Itabe H.: Glucagon regulates intracellular distribution of adipose differentiation-related protein during triacylglycerol accumulation in the liver. *J. Lipid Res.* 2010, 51: 2571-2580.

G. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許出願

ヒト ABCA1 遺伝子の転写を調整する作用を有する物質のスクリーニング方法

最上知子、大岡伸通、奥平桂一郎

H22.7.14 出願 (特願 2010-159674)

2. 実用新案登録 なし

若手研究者奨励研究

先天性副腎低形成症に対する治療法の開発

所属 国立国際医療研究センター研究所 室長

研究者 千田 大

研究期間 平成21年4月～平成23年3月

研究要旨

先天性副腎低形成症は、難治性疾患克服総合研究事業「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」の中で、研究が進められている。根治不可能で、治療が遅れば生命の危険にさらされる。ACTH 受容体は、先天性副腎低形成症の原因遺伝子のひとつであり、研究代表者は、世界に先駆けて ACTH 受容体 (MC2R) KO マウスを作成、解析し、先天性副腎低形成症モデルとして有用であることを示してきた。本研究では、モデルマウスの解析を通して、先天性副腎低形成症の治療法を開発することを目的として、MC2R KO マウスの病態解明と治療法を開発を進める。

A 研究目的

副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査によると、副腎酵素欠損症の患者は、全体で5年間に1,462例で、その内の多く(87%)が21-水酸化酵素欠損症であり、先天性副腎低形成症の推定患者数は7%である。先天性副腎低形成症の多くは、副腎の発生・分化に関わる転写因子の異常によるものであり、その他、家族性グルココルチコイド欠乏症 (ACTH 受容体遺伝子異常、MRAP 異常)がある。先天性副腎低形成症は、根治不可能であり、急性副腎不全の発症時には、グルココルチコイドとミネラルコルチコイドの速やかな補充と、水分・塩分・糖分の補給が必要であり、治療が遅れば生命にかかわる病気である。また、先天性副腎低形成症の疫学調査によると、グルココルチコイドの補充による治療を受けている患者のQOLは、必ずしも良くない。

研究代表者は、世界に先駆けて、ACTH 受容体 (MC2R) 遺伝子改変マウス (MC2R KO) を作成、解析してきた。ACTH 受容体は、家族制グルココルチコイド欠損症の原因遺伝子として知られており、MC2R KO マウスは、家族性グルココルチコイド欠損症と同様に、低グルココルチ

コイド、高 ACTH、低血糖を示し、モデルマウスとして有用であることを示して来た (Chida et al. PNAS 2007, MCE 2009)。本研究では、MC2R KO の解析を通して先天性副腎低形成症の病態を明らかにし、患者さんの QOL を高めるために有用な治療法を開発を目的として、研究開発を進める。

B 研究方法

副腎皮質機能低下症では、1、免疫異常、貧血、2、食欲不振、体重減少 (成人)、失神低血糖症状、筋萎縮、易疲労、衰弱、耐寒性低下、低血圧、3、体重増加不良 (小児)、4、貧血、5、月経異常、腋毛、恥毛脱落 (女性)、6 便秘、下痢、7、精神異常 (抑うつ傾向)、不安感、8、色素沈着などの様々な症状が報告されている。本年度は、副腎皮質機能低下症モデルマウス、ACTH 受容体遺伝子改変マウス (MC2R KO) において、これらの症状が起こっているかどうか検討し、これらの症状が観察されれば、グルココルチコイド、CRH antagonist によって、症状が回復するかどうか検討した。

MC2R KO マウスを B6 マウスに8回戻し交配した。MC2R KO (N8) では、離乳まで生き残ったホモ

マウスは、得られなかった。B6 背景の MC2R^{+/+}(N8)ヘテロを Balb/c マウスと交配し得られたヘテロマウス同士の掛け合わせを行ない B6/Balb 背景のマウスを実験群として解析を行った。B6/Balb 背景の MC2R^{+/+}マウスでは、約半分が離乳まで生き残り、解析に用いた。

C 研究結果

副腎皮質機能低下症モデルマウス、ACTH 受容体遺伝子改変マウス (MC2R KO) において、体重増加不良、易疲労、哺育不良、貧血、尿量の減少などの副腎皮質機能低下症の症状を検討した。

MC2R KO マウスでは、12 週令までの体重に違いが見られないが、高齢で♂、♀共にコントロールと比べて、痩せていることが明らかになった。さらに、体重に違いが見られない 12 週令においても、脂肪重量が減少していることが明らかになった。

MC2R KO マウスの脂肪組織を組織学的に解析したところ、MC2R KO マウスでは、脂肪細胞の大きさには、違いがなかった。このことから、脂肪細胞の数が減少している可能性が推測された。

さらに、MC2R KO マウスに高脂肪食を与えて飼育しても、コントロールと比べて、体重の増加率、脂肪量の増加率が低下しており、高インスリン血症になりにくい事が明らかになった。さらに、血清蛋白の網羅的な解析から、MC2R KO マウスでは、グルココルチコイドによって制御されている IGF-1 が低下している事を見いだした。

副腎皮質機能低下症で見られる易疲労に着目し、トレッドミル解析を行った。MC2R KO マウスをトレッドミルに慣らした後に、回転速度を徐々に増加させ、最高走行速度を検査した。また、一定の回転速度で、走れなくなるまでの時間、耐久時間を検査した。MC2R KO マウスは、最高速度、対九時間の両方で野生型よりも劣っている事を明らかにした。握力については、大きな違いがなかったことから、MC2R KO マウスは、筋萎縮ではなく易疲労であると考えられ、副腎皮質機能低下症の症状に合致した興味深い知見である。運動中の血糖値を計時的に測定した所、糖新生の異常により血糖値レベルを維持

出来ていない事が明らかになった。グルココルチコイド補充は、トレッドミルの成績を回復させたが、この効果は、グリコーゲン蓄積増加によるものであり、糖新生自体は、回復しなかった。カテコールアミン補充を検討する価値がある。

睡眠異常の可能性について予備的な検討を行ったが、睡眠脳波に大きな違いが見出せなかった。CRH 過剰モデルマウスでは、断眠後の睡眠に異常があることが報告されているので、何らかのストレス下の状態における睡眠恒常性に役割を果たしているのかもしれない。

末梢血の解析から、MC2R KO マウスでは、赤血球数がコントロールマウスと比べて、有意に低下していることを見いだした。約 40% の副腎不全の患者において、貧血が起こっている事が報告されている。MC2R KO マウスの赤血球数が減少している事から、副腎不全に加えて、遺伝的背景の影響により、貧血が起こっていると考えられる。グルココルチコイドを補充すると、赤血球数はコントロールマウスのレベルまで回復した (BBRC 2010 Sato Y et al.)。

これまでの解析の結果から、♀の MC2R KO マウスは、妊娠可能で出産出来るが、MC2R KO マウスから生まれたヘテロマウスは、成体まで成長する事が出来なかった。MC2R KO マウスから生まれたヘテロマウスを里親に育てさせると正常に成体まで成長する事から、母親の哺育不全に伴う出生仔生存率低下である事が明らかになった。グルココルチコイド補充は、出生仔生存率を回復させたが、離乳時の体重は、減少していた (Endocrinology, 2011)。

♀の MC2R KO マウスが性周期異常を起こす事を見出し、副腎皮質機能低下症患者の月経異常と合致したものであった。MC2R KO マウスの卵巣は、携帯学的に異常がなく、正常な排卵能を保っていた。一方、血清中の LH レベルは、低下傾向で、GnRH の発現量が低下していたことから、視床下部性の性周期異常であった。MC2R KO マウスでは、グルココルチコイド欠乏により、慢性的に視床下部の CRH 発現が亢進しており、CRH アンタゴニストの投与により性周期異常が回復することが明らかになった。GnRH パルス状分泌に関わる ARC キスペプチンの発現に異常はなかったが、AVPV キスペプチンの発現が低下していた。副腎皮質機能低下による月経異常の治療に