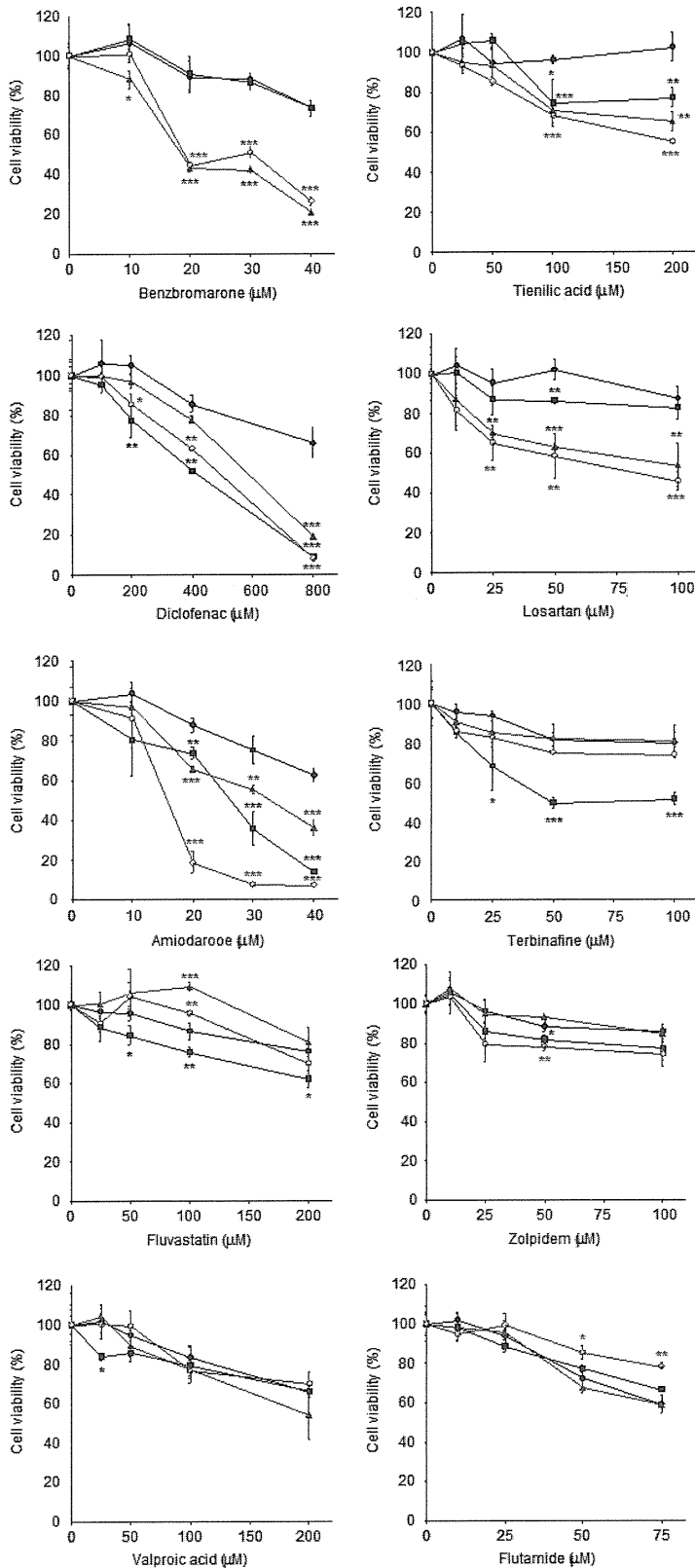
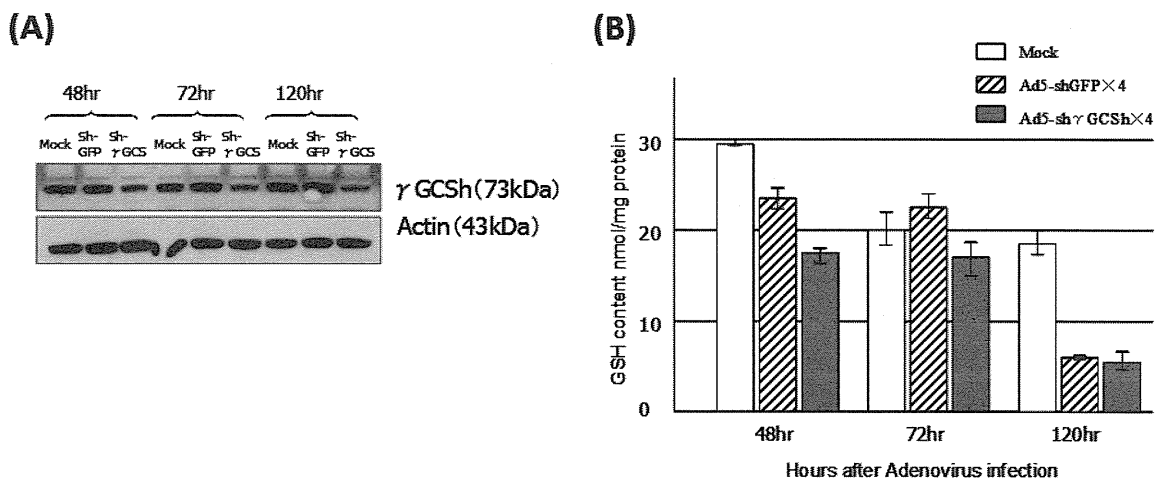


**Figure 3. Testosterone 6β-hydroxylase activity in adenovirus-infected HepG2 cells.** HepG2 cells were infected with adenovirus for 2 days. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). ND: not detected. <sup>a</sup> Donato et al. (1995).

● AdGFP  
 ▲ AdCYP2C9  
 ■ AdCYP3A4  
 ○ AdCYP2C9, 3A4

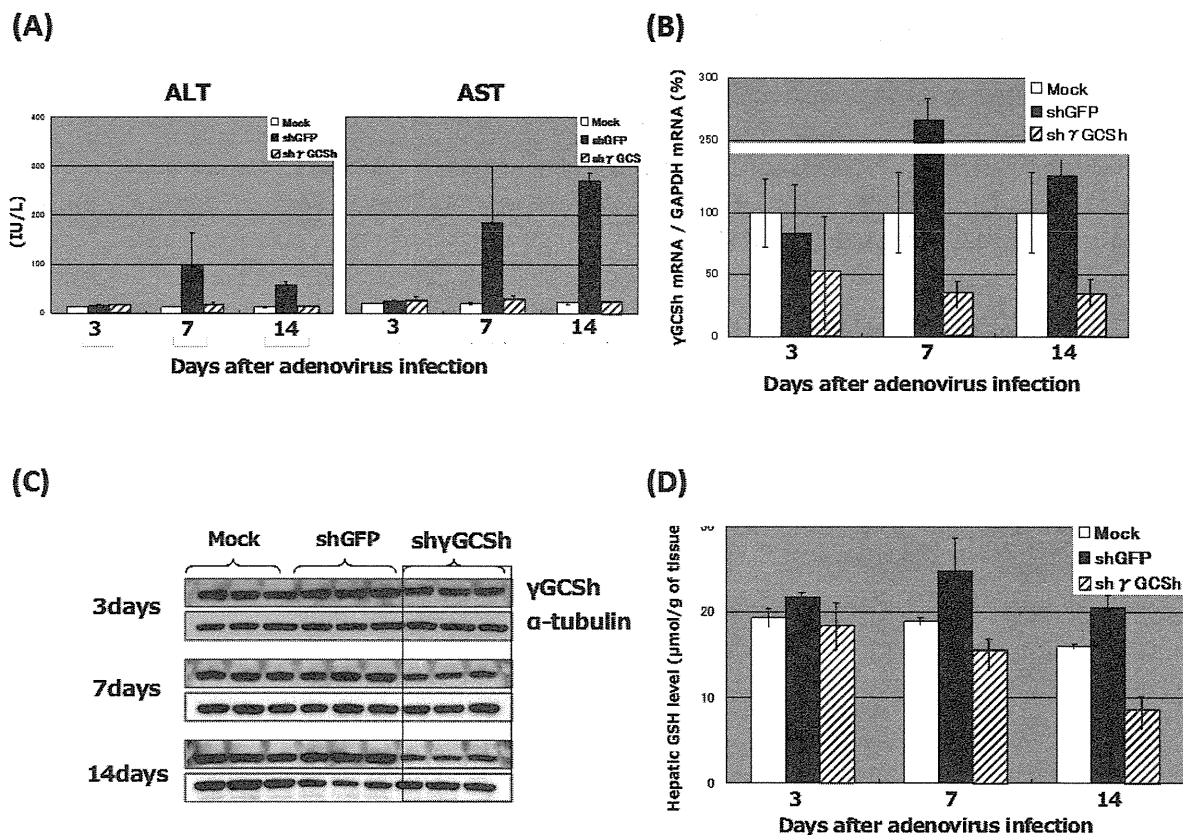


**Figure 4. MTT assay in adenovirus-infected HepG2 cells transfected with siNrf2 after 24 hour exposure of hepatotoxic drugs.** Cell viability is expressed as percentage of solvent-treated cells. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.001 compared with AdGFP-infected groups.



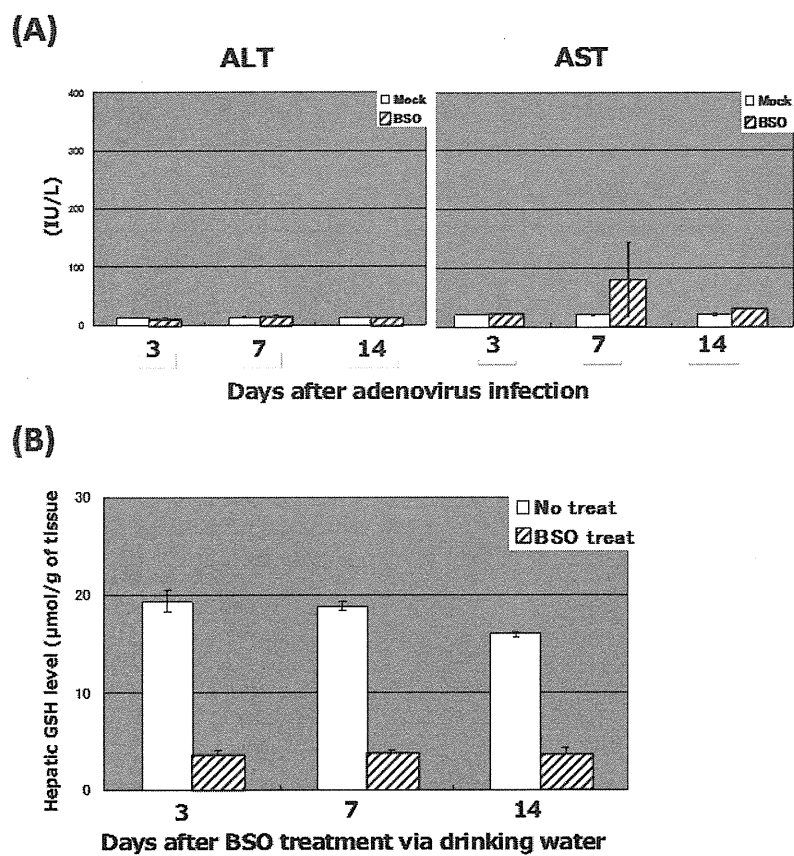
**Figure 5. Knockdown of  $\gamma$ GCSH in H4IIE cells transduced with AdGCSH-shRNAx4.**

(A) The GCSH protein levels and (B) GHS content in the cells were examined on day 2, 3, and 5 after AdGCSH-shRNAx4 transduction.



**Figure 6. Knockdown effects and hepatotoxicity in Ad-GCSH-shRNAx4-injected mice.**

Mice were intravenously injected with AdGCSH-shRNAx4. (A) Serum ALT and AST levels were determined on day 3, 7, or 14 days after Ad vector injection. (B) GCSH mRNA expression levels and (C) GCSH protein levels were examined by quantitative RT-PCR analysis and Western blot analysis, respectively. (D) Hepatic total GSH content was determined on day 3, 7, or 14 days after Ad vector injection.



**Figure 7. Effect of BSO treatment via drinking water in C57BL/6J female mice.**  
 (A) Hepatic total GSH content and (B) Serum ALT and AST levels were on day 3, 7, and 14 days after BSO treatment (20 mM).

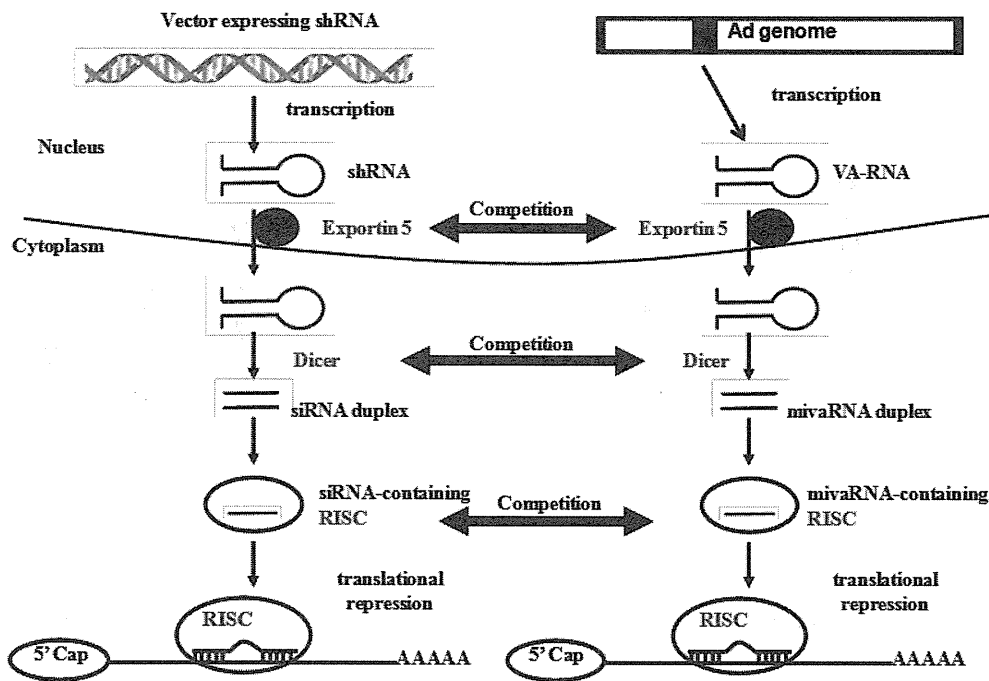


Figure 8 Process of the generation of siRNA from shRNA and miRNA from VA-RNA.

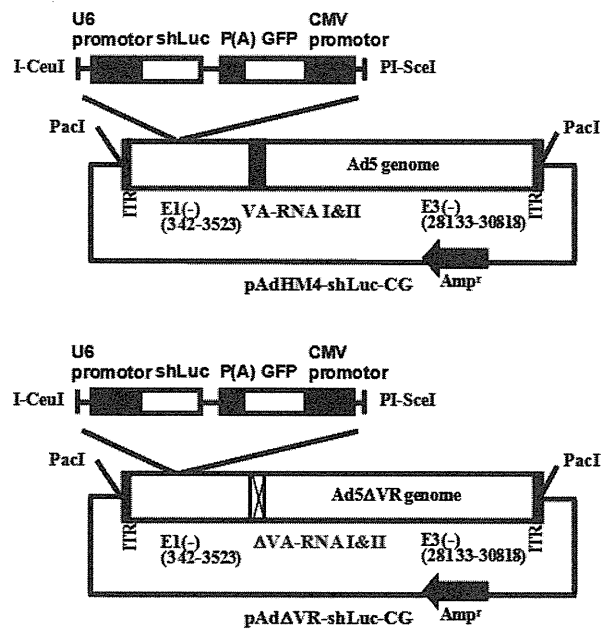
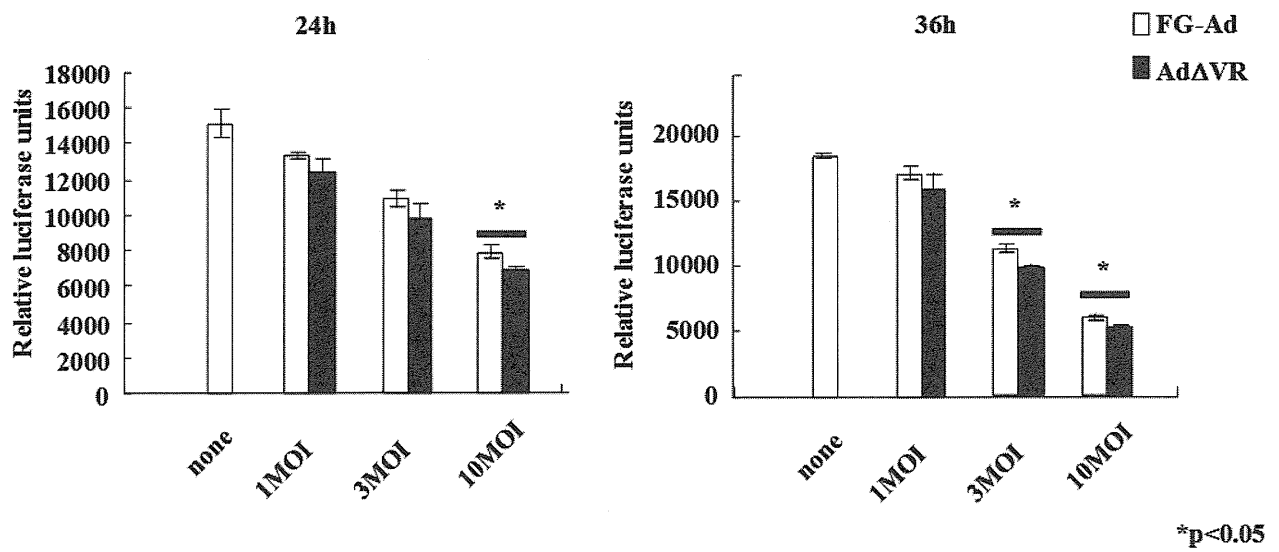
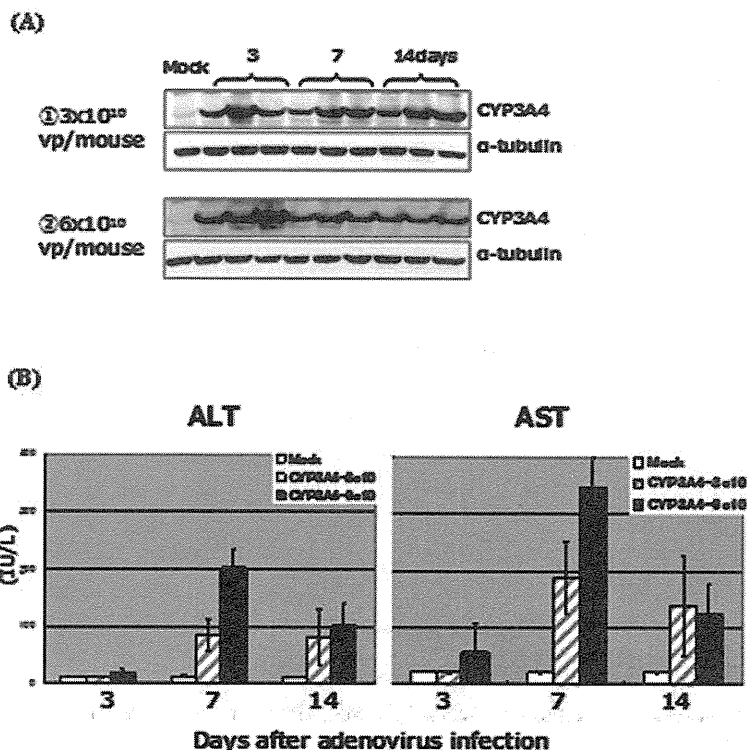


Figure 9 Schematic diagram of Ad vector plasmid expressing shRNA against luciferase.

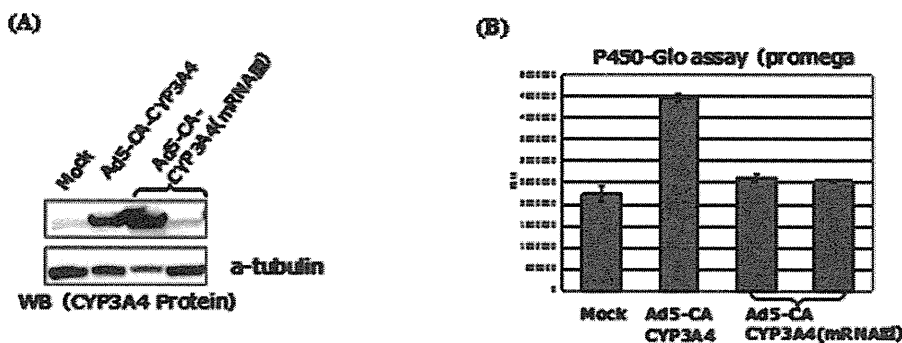


**Figure 10** Luciferase expression levels in cells transduced with FG-Ad-shLuc or AdΔVR-shLuc vectors.

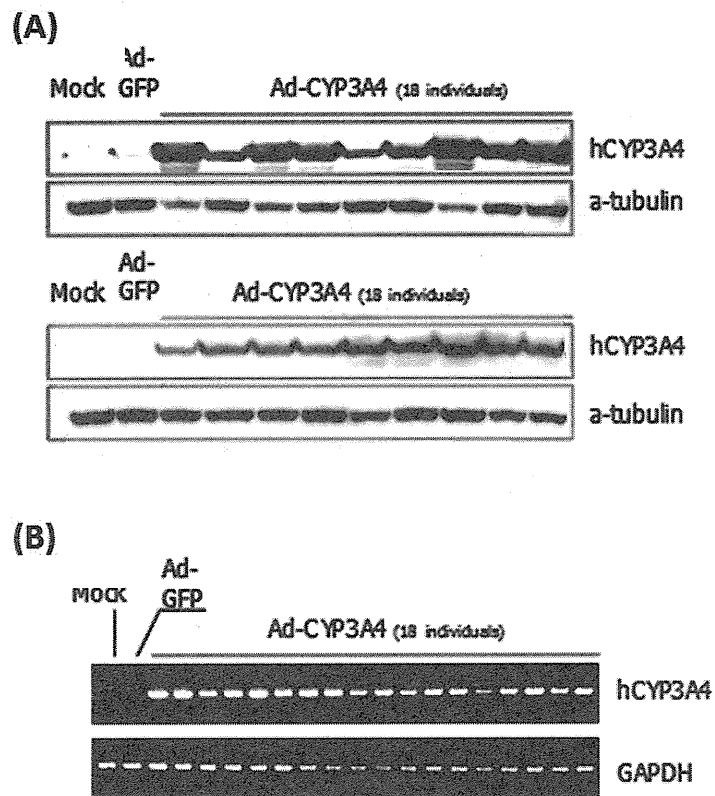
SK HEP-1-Luc cells were transduced with FG-Ad-shLuc-CG or AdΔVR-shLuc-CG at an MOI of 1, 3 or 10. After 24 or 36 h incubation, luciferase production in the cells was determined using a luciferase assay system. The data are expressed as the means  $\pm$  S.D. (n=3).



**Figure 11. Expression of human CYP3A4 in the liver in AdCYP3A4-injected mice.** (A) Human CYP3A4 protein in mouse liver was detected by Western blot on day 3, 7, or 14 days after the administration of AdCYP3A4. (B) Serum ALT and AST levels in mice were determined on day 3, 7, or 14 days after Ad vector injection. Mice injected with  $3 \times 10^{10}$  vp/body (▨) or  $6 \times 10^{10}$  vp/body (■).



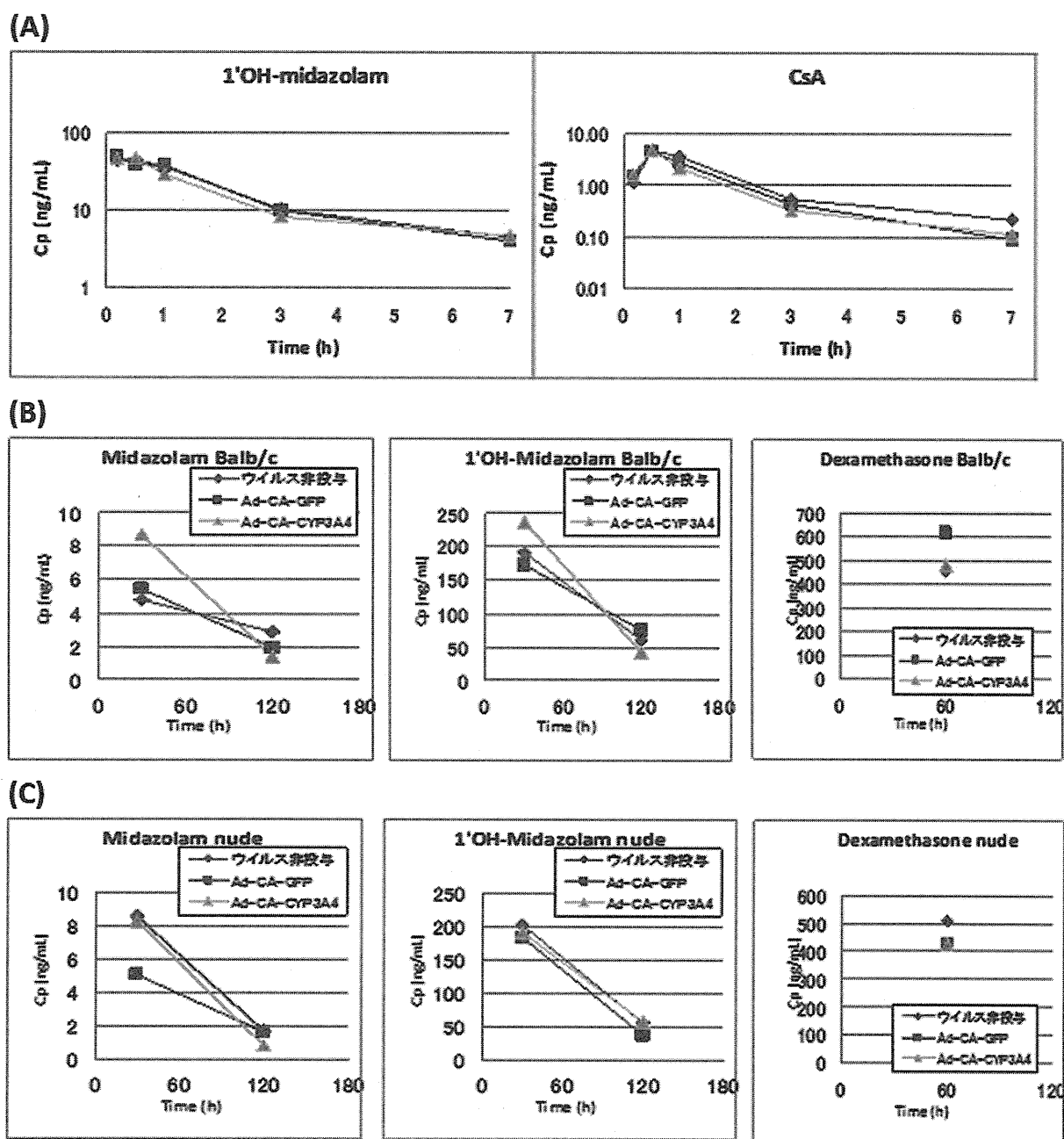
**Figure 12. Adenovirus-mediated overexpression of human CYP3A4 in the liver of F344 male rats at 48 hours after Ad vector injection.** (A) Human CYP3A4 protein in rat liver was detected by Western blot analysis. (B) Human CYP3A4 enzyme activities in rat liver homogenates were measured using P450-Glo assays.



**Figure 13. Expression of human CYP3A4 in the liver in Ad-CYP3A4-injected mice (All individuals).**

(A) The expression of human CYP3A4 protein and mRNA in mouse liver was detected by (A) Western blot analysis and (B) conventional RT-PCR analysis on day 2 after the administration of Ad-CYP3A4 or Ad-GFP.





**Figure 14. In vivo metabolism of midazolam, cyclosporineA and dexamethasone in Ad-CYP3A4-injected mice**

After C57BL/6j, BALB/c, or nude mice were injected with Ad-CYP3A4 or Ad-GFP, mice were orally administered each substrate. (A) Plasma concentration versus time curves of 1'OH-midazolam and cyclosporineA after oral administration (midazolam (0.1 mg/kg) and cyclosporineA (0.1 mg/kg)) in C57BL/6J female mice. (B) Plasma concentration versus time curves of midazolam, 1'OH-midazolam and cyclosporineA after oral administration (midazolam (2 mg/kg), cyclosporineA (0.5 mg/kg), dexamethasone (2 mg/kg) in BALB/c female mice. (C) Plasma concentration versus time curves of midazolam, 1'OH-midazolam and cyclosporineA after oral administration (midazolam (2 mg/kg), cyclosporineA (0.5 mg/kg), dexamethasone (2 mg/kg)) in BALB/c-nu/nu female mice. Symbols are shown in no-treat mice (◆), Ad-GFP-injected mice (■), and Ad-CYP3A4-injected mice (▲).

## 神経免疫ネットワークの破綻・修復の基盤研究と評価法の確立

所属 国立精神・神経医療センター神経研究所免疫研究部

研究代表者 三宅 幸子

研究期間 平成 22 年 4 月～平成 24 年 3 月

研究要旨 試験管内でのミクログリア様細胞の誘導法開発、MAIT 細胞と多発性硬化症疾患活動性の相関の発見、脊髄損傷マウスにおける IL-1 の抗炎症作用の発見、核蛋白質によるアミロイドベーター繊維形成阻害、パーキンソン病モデル抑制を見いだした。

### 研究分担者

- 1) 昭和大学医学部第一解剖 塩田清二
- 2) 日生バイオ株式会社 松永政司

### A. 研究目的

炎症を伴う神経疾患において病態とミクログリアの機能をモニターすることにより、神経病態においてミクログリアがどのようにその作用を使い分けているか、またその作用を決定づける因子は何かについて検討すると共に、ミクログリアやその機能を調節する他の細胞を介した病態のモニターや薬剤効果の評価法を確立することを目的とする。治療法が乏しく新規治療法の開発が切望されている多発性硬化症、脊髄損傷、アルツハイマー病を標的疾患とし、その病態とミクログリアの機能がどのように相関するかを明らかにする。脊髄損傷では炎症および再生となるマーカーを探索する。また、MAIT 細胞や骨髄幹細胞による病態抑制効果、核タンパクによる神経炎症の予防・治療効果の検討を行い、これらの病態におけるミクログリア細胞の機能解析を行う。

### B. 研究方法

雄性の野生型 C57BL/6 マウス (8~10 週齢) に、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetra hydro pyridine HCl (MPTP, Sigma, St Louis, MO) を 20mg/kg を 2 時間ごとに 4 回腹腔内投与し、パーキンソン病 (PD) モデル動物を作製した。投与 7 日前より無核酸餌もしくは無核酸餌に核タンパク質を 1.2%含有させた餌を摂取させた。Foot-fault

test により運動機能を評価した。組織検査にて中脳黒質におけるドーパミンニューロン (Tyrosine Hydroxylase 免疫染色陽性) の同定、ethidium 蛍光を用いたスーパーオキシド測定を行った。アミロイド  $\beta$  ペプチドのアミロイド線維形成法および核タンパク質の効果を検討するため、アミロイド  $\beta$  ペプチド (1-42) ( $A\beta$ ) 凍結乾燥粉末は、DMSO に溶解。ペプチド凝集体はシャフトジェネレーターにて粉碎、均一化した後、超音波処理を行い 10 mM PBS で終濃度 10  $\mu$ M に希釈し反応に供した。 $A\beta$  の線維形成量は、チオフラビン T が、アミロイド線維に特徴的な四次構造であるクロス  $\beta$  構造に結合すると蛍光強度が上昇することにより測定した。 $A\beta$  を含む溶液に、チオフラビン T (10  $\mu$ M) および核タンパク質、プロタミン、DNA もしくは溶媒 (対照群) を混合し、96 ウェルマイクロプレートに添加、37°C でインキュベート開始後、20 分毎に 30 時間後までチオフラビン T 由来蛍光強度 (Ex: 440 nm Em: 480 nm) を測定し、 $A\beta$  線維形成量の経時変化を調べた。脊髄損傷モデルは第 9-10 胸椎間をマイクロ剪刀にて切断後、患部を止血し作製した。初代培養マイクログリアに IFN- $\gamma$  もしくは IL-4 を添加し、炎症に関わる古典的活性型、抗炎症、組織修復に関わる代替経路型のミクログリアを作成した。GFP トランスジェニックマウス骨髄より骨髄細胞を抽出し、CD3, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD11b/MAC-1 $\alpha$ , B220, Gr-1, and TER-119 抗体付着免疫ビーズを用いてこれらの抗体に付着した細胞を除去することにより、lineage marker

negative (LN) 細胞を調整した。末梢血から単球を調整後、CD11b 陽性細胞をセルソーターを用いて分離した。初代混合グリア培養 14 日間培養し、CD11b 付着ビーズを用いて CD11b 陽性細胞を除去したものをアストロサイトとして用いた。ヒトアストロサイトは市販の細胞を購入した。スライスカルチャーは、生後 5-7 日の C57BL/6J マウスの脳から 350nm のスライスを Tissue chopper を用いて調整し、porous translucent membrane 上で培養した。細胞表面分子発現については、フローサイトメトリーを用いて解析した。Trem2 の発現ならびに形態学的観察には、免疫組織染色後に共焦点顕微鏡を用いて解析した。MAIT 細胞の解析：健康者、および寛解期、再発期の MS 患者を対象とし、末梢血単核細胞を分離後、MAIT 細胞の頻度、表面抗原をフローサイトメーターで解析した。MAIT 細胞は  $V\alpha 7. 2^+CD161^{high}$  の  $\alpha\beta$  T 細胞集団と定義した。加えて、MAIT 細胞の頻度と  $V\alpha 24$ NKT 細胞, Natural Killer (NK)細胞, およびそれらのサブポピュレーションの頻度との相関関係を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。多発性硬化症患者ならびに健康人末梢血の解析に際しては、文書を用いて説明し同意を得た上で行った。個人情報管理を含め、当センターの倫理規定にしたがった。

### C. 研究結果

終濃度 0.6、6、60  $\mu$ g/ml の核タンパク質を反応溶液中に添加したところ、インキュベーション開始 30 時間後におけるチオフラビン T 由来の蛍光強度は、対照群に比べそれぞれ、 $93.0 \pm 6.8$ 、 $83.8 \pm 12.5$ 、 $23.1 \pm 7.9$  % であり、核タンパク質による A $\beta$  の線維形成を濃度依存的に抑制がみられた。プロタミンは対照群に比べ蛍光強度の上昇を抑制した。終濃度 0.1、1、10、100、1000  $\mu$ g/ml のプロタミンを添加したところ、30 時間後におけるチオフラビン T 由来の蛍光強度は、それぞれ、 $96.8 \pm 14.0$ 、 $105.2 \pm 20.7$ 、 $59.9 \pm 4.8$ 、 $56.4 \pm 6.6$ 、 $18.4 \pm 2.1$  % であり、プロタミンは A $\beta$  の線維形成を濃

度依存的に抑制した。鮭白子由来の核タンパク質の摂餌により、PD モデルにおいて、運動機能障害、ドーパミン神経の脱落および酸化ストレスの増加を抑制した。また、試験管内の試験において核タンパク質がアルツハイマー病の進展因子の一つである  $\beta$ -amyloid の凝集を抑制することを明らかにした。脊髄損傷 (SCI) においては、急性期では炎症の増幅に係る古典的活性型の MG/MP が増加したが亜急性期には修復に係る代替経路型 MG/MP が増加した。

代替経路型 MG/MP のマーカーとしては、Ym1、CD206、Arginase I が有用であったが古典的活性型 MG/MP に特異的なマーカーは炎症性サイトカイン以外には得られなかった。IL-1 $^{-/-}$ マウスでは、急性期より運動機能および損傷領域の有意な改善が認められ、古典的活性型 MG/MP および炎症性サイトカインの減少が認められたが、亜急性期において組織の再生・修復に係る代替経路型の MG/MP の低下もみられ、炎症の誘導のみならず抗炎症・修復の過程においても IL-1 が関与している可能性が示唆された。In vitro にて、分離したミクログリア IFN $\gamma$  添加で classical 活性化型を誘導し、IL-4 添加により抗炎症および組織修復に働く alternative 活性化型を誘導した。IFN $\gamma$  と IL-1 $\beta$  を共添加した場合、NO、TNF $\alpha$  の産生が増加した。IL-4 と IL-1 $\beta$  の共添加においても TNF $\alpha$  の増加、alternative 活性化型のマーカーである Arginase 活性、Ym1 および CD206 レベルの増加が認められた。

ミクログリアを生体検体を用いた評価を可能にするために、ミクログリア様細胞の in vitro 誘導法の開発を行った。マウス LN 細胞もしくは末梢血単球を分離し、新生仔脳の一次混合培養上またはアストロサイト上で培養し、Trem2 発現、スライスカルチャーにおけるミクログリア様形態、その他表面マーカーの解析などから、ミクログリア様細胞が誘導されることを明らかにした。また、ヒトの末梢血単球をアストロサイト上で共培養することによって、ミクログリア様細胞が誘導されることが明らかとなった。さらにミクログリア様細胞の誘導には、IL-34 が重要であることを発見した。また、神経炎症疾患病態を調節する細胞の候補である MAIT 細胞について、多発性硬化症末梢血において疾患活動性に相関して減少していること、IFN- $\gamma$  産生抑制に関与することを明らかにした。

## D. 考察

核タンパク質がアミロイド線維形成を抑制することを明らかにした。また、MPTP 投与によるパーキンソン病様モデルに核タンパク質含有餌を摂取させることで、核タンパク質摂取がパーキンソン病を予防できることを明らかにした。今後はミクログリアの関与、さらに病態モニターに使用できるかどうかについて検討をすすめることが重要である。

脊髄損傷モデルにおいては、急性期では炎症の増幅に係る古典的活性型の MG/MP が増加したが亜急性期には修復に係る代替経路型 MG/MP が増加すること、炎症の誘導のみならず抗炎症・修復の過程においても IL-1 が関与している可能性が示唆されたが、ミクログリアの活性型のモニターが予後の判定に使えるか、また活性化をモニターできる明らかなマーカーの同定には至らなかった。この解決のためにはより詳細な脊髄損傷の病態の解析が必要と思われる。そして既存の病態に関わる因子の役割を再度見直し組織の修復再生へのチューニングがどのように行われているか丹念な解析が必要であると考えられる。

マウス骨髄 LN 細胞もしくは末梢血単球をアストロサイト上で培養することにより、ミクログリアと類似したフェノタイプを有するミクログリア様細胞を誘導した。この誘導には、液性因子としては IL-34 が重要であることがわかったが、これまでの結果から、ミクログリア様細胞の誘導には、アストロサイトとの接触が必要であることが示唆されている。ミクログリア様細胞への分化に必要なアストロサイト表面分子を同定することが、ヒトミクログリア様細胞の培養を可能にするために重要であると考えられる。

## E. 結論

鮭白子由来の核タンパク質が、アルツハイマー病の原因と考えられているアミロイド  $\beta$  ペプチドのアミロイド線維形成を抑制し、核タンパク質の摂取は神経変性疾患モデルにおいて病態を抑制した。脊髄損傷モデルにおいて、炎症急性期と組織修復期ではミクログリアのフェノタイプが古典的活性型から代

替経路型へと変化した。骨髄 LN 細胞もしくは末梢血単球をアストロサイト上で培養することによって、ミクログリア様細胞を誘導する方法を開発し、IL-34 が重要な因子であることを明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 原著

- 1) Noto D, Takahashi K, Miyake S, Yamada M. In vitro differentiation of lineage-negative bone marrow cells into microglia-like cells. *Eur J Neurosci* 31:1155-63, 2010
- 2) Dohi K, Ohtaki H, Nakamachi T, Yofu S, Satoh K, Miyamoto K, Song D, Tsunawaki S, Shioda S, Aruga T: Gp91phox (NOX2) in classically activated microglia exacerbates traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*, 7 41, 2010
- 3) Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H, Ohara K, Miyamoto K, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Matsunaga M and Shioda S: Regulation of Oxidative Stress by Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Mediated by PACAP Receptor. *J Mol Neurosci*, 42 (3); 397-403, 2010
- 4) Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A, Endo K, Iso Y, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A and Shioda S: Cardioprotective Effect of Endogenous Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide on Doxorubicin- Induced Cardiomyopathy in Mice. *Circ J*, 74 (6); 1183-90, 2010
- 5) Ohtaki H, Yofu S, Nakamachi T, Satoh K, Shimizu A, Mori H, Sato A, Iwakura Y, Matsunaga M, Shioda S: Nucleoprotein Diet Ameliorates Arthritis Symptoms in Mice Transgenic for Human T-Cell Leukemia Virus Type I (HTLV-1). *J Clin Biochem Nutr*, 46 (2); 93-104, 2010

- 6) Liu Y, Namba T, Liu J, Suzuki R, Shioda S, Seki T: Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus. *Neuroscience*, 166 (1): 241-51, 2010
- 7) Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Nakamura S, Shioda S, Aruga T: Novel free radical monitoring in patients with neurological emergency diseases. *Acta Neurochir Suppl*, 106 315-9, 2010
- 8) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T: Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(9):3701-3706, 2011
- 9) Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, Lantz O, Yamamura T: Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol* 23(9):529-535, 2011
- 10) Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S: Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* 64(1):153-61, 2011
- 11) Ichikawa D, Mizuno M, Yamamura T, Miyake S: Gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) regulates cytoskeletal reorganization thorough ubiquitination and degradation of Arp2/3-5 and coronin A. *J Biol Chem* 286(50):43465-74, 2011
- 12) Hori M, Nakamachi T, Rakwal R, Shibato J, Nakamura K, Wada Y, Tsuchikawa D, Yoshikawa A, Tamaki K, Shioda S. Unraveling the ischemic brain transcriptome in a permanent middle cerebral artery occlusion mouse model by DNA microarray analysis. *Dis Model Mech*. 2011 (in press)
- 15) Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*. 2011;147(5):1146-58.
- 16) Namba T, Mochizuki H, Suzuki R, Onodera M, Yamaguchi M, Namiki H, Shioda S, Seki T. Time-lapse imaging reveals symmetric neurogenic cell division of GFAP-expressing progenitors for expansion of postnatal dentate granule neurons. *PLoS One*. 2011;6(9):e25303.
- 17) Tanaka S, Kondo H, Kanda K, Ashino T, Nakamachi T, Sekikawa K, Iwakura Y, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T. Involvement of interleukin-1 in lipopolysaccharide-induced microglial activation and learning and memory deficits. *J Neurosci Res*. 2011;89(4):506-14.
- 18) Mihara Y, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Ohtaki H, Shioda S, Aruga T. Expression and localization of the orexin-1 receptor (OX1R) after traumatic brain injury in mice. *J Mol Neurosci*. 2011;43(2):162-8.
- 19) Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, Yamamura T, Koen Vandebroek, Miyake S: A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. *Arthritis Res Ther* 14(1):R9, 2012

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

アミロイド線維の形成を伴う神経変性疾患の予防・改善薬、(発明者) 塩田清二、大滝博和、小林夏季、(出願人) フォーデイズ株式会社、特願 2011-32506 (平成 23 年 2 月 17)

## 神経免疫ネットワークの破綻・修復の基盤研究と評価法の確立

所 属 国立精神・神経医療センター神経研究所免疫研究部  
研究代表者 三宅 幸子

研究要旨 試験管内でのミクログリア様細胞の誘導法開発し、ミクログリア様細胞の誘導には IL-34 が重要であることを見いだした。脊髄損傷においては、急性期では炎症の増幅に係る古典的活性型の MG/MP が増加したが亜急性期には修復に係る代替経路型 MG/MP が増加すること、IL-1 は炎症作用とともに抗炎症作用を有することを明らかにした。また核蛋白質がパーキンソン病モデルを抑制することがわかった。今後は、これら炎症、変性といった過程をミクログリア様細胞を用いてモニターできるかどうかを検証していくことが重要である。

### 研究分担者

- 1) 昭和大学医学部第一解剖 塩田清二
- 2) 日生バイオ株式会社 松永政司

### A. 研究目的

炎症を伴う神経疾患において病態とミクログリアの機能をモニターすることにより、神経病態においてミクログリアがどのようにその作用を使い分けているか、またその作用を決定づける因子は何かについて検討すると共に、ミクログリアやその機能を調節する他の細胞を介した病態のモニターや薬剤効果の評価法を確立することを目的とする。

### B. 研究方法

雄性的野生型 C57BL/6 マウス (8~10 週齢) に、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetra hydro pyridine HCl (MPTP, Sigma, St Lois, MO) を 20mg/kg を 2 時間ごとに 4 回腹腔内投与し、パーキンソン病 (PD) モデル動物を作製した。投与 7 日前より無核酸餌もしくは無核酸餌に核タンパク質を 1.2%含有させた餌を摂取させた。Foot-fault test により運動機能を評価した。組織検査にて中脳黒質におけるドーパミンニューロン (Tyrosine Hydroxylase 免疫染色陽性) の同定、ethidium 蛍光を用いたスーパーオキシド測定を行った。脊髄損傷モデルは第 9-10 胸椎間をマイクロ剪刀にて切断後、患部を止血し作製した。初代培養マイ

クログリアに IFN- $\gamma$  もしくは IL-4 を添加し、炎症に関わる古典的活性型、抗炎症、組織修復に関わる代替経路型のミクログリアを作成した。GFP トランスジェニックマウス骨髄より骨髄細胞を抽出し、CD3, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD11b/MAG-1 $\alpha$ , B220, Gr-1, and TER-119 抗体付着免疫ビーズを用いてこれらの抗体に付着した細胞を除去することにより、lineage marker negative (LN) 細胞を調整した。末梢血から単球を調整後、CD11b 陽性細胞をセルソーターを用いて分離した。初代混合グリア培養 14 日間培養し、CD11b 付着ビーズを用いて CD11b 陽性細胞を除去したものをアストロサイトとして用いた。ヒトアストロサイトは市販の細胞を購入した。スライスカルチャーは、生後 5-7 日の C57BL/6J マウスの脳から 350nm のスライスを用いて調整し、porous translucent membrane 上で培養した。細胞表面分子発現については、フローサイトメトリーを用いて解析した。Trem2 の発現ならびに形態学的観察には、免疫組織染色後に共焦点顕微鏡を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

多発性硬化症患者ならびに健常人末梢血の解析に際しては、文書を用いて説明し同意を得た上で行った。個人情報の管理を含め、当センターの倫理規定にしたがった。

### C. 研究結果

鮭白子由来の核タンパク質の摂餌により、PD モデルにおいて、運動機能障害、ドーパミン神経の脱落および酸化ストレスの増加を抑制した(松永・塩田)。また、試験管内の試験において核タンパク質がアルツハイマー病の進展因子の一つである $\beta$ -amyloid の凝集を抑制することを明らかにした(松永・塩田)。脊髄損傷 (SCI) においては、急性期では炎症の増幅に係る古典的活性型の MG/MP が増加したが亜急性期には修復に係る代替経路型 MG/MP が増加した。代替経路型 MG/MP のマーカーとしては、Ym1、CD206、Arginase I が有用であったが古典的活性型 MG/MP に特異的なマーカーは炎症性サイトカイン以外には得られなかった。IL-1 $^{-/-}$ マウスでは、急性期より運動機能および損傷領域の有意な改善が認められ、古典的活性型 MG/MP および炎症性サイトカインの減少が認められたが、亜急性期において組織の再生・修復に係る代替経路型の MG/MP の低下もみられ、炎症の誘導のみならず抗炎症・修復の過程においても IL-1 が関与している可能性が示唆された(塩田・三宅)。ミクログリアを生体検体を用いた評価を可能にするために、ミクログリア様細胞の *in vitro* 誘導法の開発を行った。マウス LN 細胞もしくは末梢血単球を分離し、新生仔脳的一次混合培養上またはストロサイト上で培養し、Trem2 発現、スライスカルチャーにおけるミクログリア様形態、その他表面マーカーの解析などから、ミクログリア様細胞が誘導されることを明らかにした(三宅・論文投稿中)。また、ヒトの末梢血単球をアストロサイト上で共培養することによって、ミクログリア様細胞が誘導されることが明らかとなった(三宅・論文投稿中)。さらにミクログリア様細胞の誘導には、IL-34 が重要であることを発見した(三宅・論文投稿中)。また、神経炎症疾患病態を調節する細胞の候補である MAIT 細胞について、多発性硬化症末梢血において疾患活動性に相関して減少していること、IFN- $\gamma$  産生抑制に関与することを明らかにした(三

宅・Int Immunol. 2011)。

### D. 考察

核タンパク質がアミロイド線維形成を抑制することを明らかにした。また、MPTP 投与によるパーキンソン病様モデルに核タンパク質含有餌を摂取させることで、核タンパク質摂取がパーキンソン病を予防できることを明らかにした。今後はミクログリアの関与、さらに病態モニターに使用できるかどうかについて検討をすすめることが重要である。

脊髄損傷モデルにおいては、急性期では炎症の増幅に係る古典的活性型の MG/MP が増加したが亜急性期には修復に係る代替経路型 MG/MP が増加すること、炎症の誘導のみならず抗炎症・修復の過程においても IL-1 が関与している可能性が示唆されたが、ミクログリアの活性型のモニターが予後の判定に使えるか、また活性化をモニターできる明確なマーカーの同定には至らなかった。この解決のためにはより詳細な脊髄損傷の病態の解析が必要と思われる。そして既存の病態に関わる因子の役割を再度見直し組織の修復再生へのチューニングがどのように行われているか丹念な解析が必要であると考えられる。

マウス骨髄 LN 細胞もしくは末梢血単球をアストロサイト上で培養することにより、ミクログリアと類似したフェノタイプを有するミクログリア様細胞を誘導した。この誘導には、液性因子としては IL-34 が重要であることがわかったが、これまでの結果から、ミクログリア様細胞の誘導には、アストロサイトとの接触が必要であることが示唆されている。ミクログリア様細胞への分化に必要なアストロサイト表面分子を同定することが、ヒトミクログリア様細胞の培養を可能にするために重要であると考えられる。

### E. 結論

鮭白子由来の核タンパク質の摂餌は、神経変性疾患モデルにおいて病態を抑制した。脊髄損傷モデルにおいて、炎症急性期と組織修復期ではミクログリアのフェノタイプが古典的活性型から代替経

路型へと変化した。骨髄 LN 細胞もしくは末梢血単球をアストロサイト上で培養し、ミクログリア様細胞を誘導する方法を開発し、IL-34 が重要な因子であることを明らかにした。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

原著

1) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T: Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(9):3701-3706, 2011

2) Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, Lantz O, Yamamura T: Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol* 23(9):529-535, 2011

3) Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S: Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* 64(1):153-61, 2011

4) Ichikawa D, Mizuno M, Yamamura T, Miyake S: Gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) regulates cytoskeletal reorganization thorough ubiquitination and degradation of Arp2/3-5 and coronin A. *J Biol Chem* 286(50):43465-74, 2011

5) Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, Yamamura T, Koen Vandebroek, Miyake S: A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. *Arthritis Res Ther* 14(1):R9, 2012

6) Hori M, Nakamachi T, Rakwal R, Shibato J, Nakamura K, Wada Y, Tsuchikawa D, Yoshikawa A, Tamaki K, Shioda S. Unraveling the ischemic brain transcriptome in a permanent middle cerebral artery occlusion mouse model by DNA microarray analysis. *Dis Model Mech*. 2011 (in press)

7) Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Sato A, Ohara K, Miyamoto K, Nakano H, Kiriya K, Dohi K, Hiraizumi Y, Matsunaga M, Shioda S. Establishment and characterization of primary adult microglial culture in mice. *Acta Neurochir Suppl* 2011 (in press)

8) Miyamoto K, Ohtaki H, Dohi K, Tsumuraya T, Nakano H, Kiriya K, Song D, Aruga T, Shioda S. Edaravone increased regional cerebral blood flow after TBI. *Acta Neurochir Suppl* 2011 (in press)

9) Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*. 2011;147(5):1146-58.

10) Namba T, Mochizuki H, Suzuki R, Onodera M, Yamaguchi M, Namiki H, Shioda S, Seki T. Time-lapse imaging reveals symmetric neurogenic cell division of GFAP-expressing progenitors for expansion of postnatal dentate granule neurons. *PLoS One*. 2011;6(9):e25303.

11) Tanaka S, Kondo H, Kanda K, Ashino T, Nakamachi T, Sekikawa K, Iwakura Y, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T. Involvement of interleukin-1 in lipopolysaccharide-induced microglial activation and learning and memory deficits. *J Neurosci Res*. 2011;89(4):506-14.

12) Mihara Y, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Ohtaki H, Shioda S, Aruga T. Expression and localization of the orexin-1 receptor (OX1R) after traumatic brain injury in mice. *J Mol Neurosci*. 2011;43(2):162-8.



## 2. 学会発表

- 1) Miyake S. Innate lymphocytes in autoimmune diseases. Autoimmunity Congress Asia. Singapore, 18 November, 2011
- 2) Ogawa T, Rakwal R, Shibato J, Sawa C, Saito T, Murayama A, Kuwagata M, Kageyama H, Matsunaga M, Usumi K, Shioda S: 「Effect of nucleoprotein (NP) diet on expression of gene candidates for developmental origins of health and disease (DOHaD)」, 7th World congress on developmental origins of health and disease (Portland, 2011.09)
- 3) Hori M, Nakamachi T, Rakwal R, Shibato J, Ogawa T, Tsuchikawa D, Tsuchida M, Wada Y, Farkas J, Yoshikawa A, Kagami N, Imai N, Tamaki K and Shioda S. Ischemic brain transcriptome by dna microarray analysis in pMCAO model mice: identifying genes in PACAP neuroprotection. The 10th International Symposium on VIP-PACAP and Related Peptides (Eilat, Israel, 2011.12)
- 4) Wada Y, Nakamachi T, Endo K, Seki T, Ohtaki H, Tsuchikawa D, Hori M, Farkas J, Tsuchida M, Yoshikawa A, Kagami N, Imai N, Shioda S. The retinoprotective effect of exogenous PACAP involves a modulation of retinal microglia/macrophage. The 10th International Symposium on VIP-PACAP and Related Peptides (Eilat, Israel, 2011.12)
- 5) Tsuchikawa D, Nakamachi T, Tsuchida M, Wada Y, Hori M, Farkas J, Yoshikawa A, Kagami N, Imai N, Shioda S. The neuroprotective effect of endogenous PACAP on spinal cord injury. The 10th International Symposium on VIP-PACAP and Related Peptides (Eilat, Israel, 2011.12)
- 6) Tsumuraya T, Ohtaki H, Song T, Nakamachi T, Sato A, Hiraizumi Y, Atsumi T, Shioda S. Possible involvement of PACAP on improvement of spinal cord injury by human mesenchymal stem cells. The 10th International Symposium on VIP-PACAP and Related Peptides (Eilat, Israel, 2011.12).
- 7) Tsuchikawa D, Nakamachi T, Tsuchida M, Wada Y, Hori M, Farkas J, Yoshikawa A, Kagami N, Imai N, Atsumi T, Shioda S. Endogenous PACAP Acts as Neuroprotectant against Spinal Cord Injury. Satellite Symposium of the 20th Annual Meeting of the Israel Society for Neuroscience Basic and Clinical Research of GPCRs (Eilat, Israel, 2011.12).
- 8) Ohtaki H, Miyamoto K, Tsumuraya T, Kiriyaama K, Nakano H, Song D, Nakamachi T, Hiraizumi Y, Matsunaga M, Shioda S. Suppression of Oxidative Stress on PACAP Might Involve in the Neuroprotection. Symposium of the 20th Annual Meeting of the Israel Society for Neuroscience Basic and Clinical Research of GPCRs (Eilat, Israel, 2011.12).
- 9) Wada Y, Nakamachi T, Endo K, Seki T, Ohtaki H, Tsuchikawa D, Hori M, Farkas J, Tsuchida M, Yoshikawa A, Kagami N, Imai N, Shioda S. The Exogenous PACAP is Possible Modulator of the Activation of Retinal Microglia/Macrophage in the Injured Retina. Annual Meeting of the Israel Society for Neuroscience Basic and Clinical Research of GPCRs (Eilat, Israel, 2011.12).
- 10) Miyamoto K, Ohtaki H, Dohi K, Song D, Tsumuraya T, Nakano H, Kiriyaama K, Kageyama H, Aruga T, Shioda S; Edaravone suppressed secondary neuronal cell damage after traumatic brain injury in mice. Neuroscience 2011 (Washington DC, 2011. 11)
- 11) Ohtaki H, Sato A, Tsumuraya T, Song D, Nakano H, Kiriyaama K, Miyamoto K, Shioda S. Interleukin-1 gene deficient mice modulate microglial activation after spinal cord injury Neuroscience 2011 (Washington DC, 2011. 11)
- 12) Ohtaki H, Song D, Nakano H, Miyamoto K, Tsumuraya T, Dohi K, Prockop DJ, Shioda S.

Anti-inflammatory effect of human MSCs on global ischemia. Brain Edema 2011 (2011. 10, Tokyo, Japan)

13) Miyamoto K, Ohtaki H, Dohi K, Song D, Tsumuraya T, Nakano H, Kiriya K, Aruga T, Shioda S. Therapeutic time window of edaravone on traumatic brain injury in mice. Brain Edema 2011 (2011. 10, Tokyo, Japan)

14) Nakamachi T, Ohtaki H, Dohi K, Kagami N, Shioda S. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor expression on reactive astrocyte after brain ischemia in mice. The XVth International Symposium of Brain Edema and Cellular Injury Brain Edema 2011 (2011. 10, Tokyo, Japan)

2) 三宅幸子: 自己免疫疾患におけるMAIT細胞. 第39回日本臨床免疫学会総会・学術集会6学会合同特別シンポジウム、東京、9月16日、2011

3) 三宅幸子: 腸管免疫の視点から:腸管リンパ球と多発性硬化症. 第23回日本神経免疫学会総会、東京、9月17日、2011

4) 千葉麻子、三宅幸子: マスト細胞の活性阻害を介した関節炎の抑制. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、7.19, 2011

5) 千葉麻子、田村直人、松平欄、頭山尚子、高崎芳成、山村隆、三宅幸子: 膠原病におけるMucosal-associated invariant T細胞の解析. 第39回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、9.17, 2011

6) 山村隆、荒浪利昌、大木伸司、三宅幸子: 多発性硬化症:自己免疫病仮説の再検証. 第39回日本臨床免疫学会総会・学術集会6学会合同特別シンポジウム、東京、9.16, 2011

7) 林幼偉、三宅幸子、山村隆: EAEの寛解維持機構: 'armoured' Tregの誘導. 第23回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9.15, 2011

8) 能登大介、三宅幸子、高橋和也、山村隆、山田正仁: マウス及びヒトにおける末梢血単球からミ

クログリアへの分化誘導. 第23回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9.17, 2011

9) 富田敦子、佐藤和貴郎、市川大樹、林幼偉、岸田日帯、三宅幸子、小川雅文、岡本智子、村田美穂、黒岩義之、荒浪利昌、山村隆: メタロプロテイナーゼとオステオポンチンを高発現するCCR2陽性CCR5陽性T細胞のMS病態への関与. 第23回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9.17, 2011

10) 千葉麻子、田村直人、松平欄、高崎芳成、山村隆、三宅幸子: 膠原病におけるMucosal-associated invariant T細胞の解析. 第40回日本免疫学会総会・学術集会、千葉、11.27, 2011

11) 小林夏季・大滝博和・宋丹丹・宮本和幸・圓谷智海・吉田武美・松永政司・塩田清二: 核蛋白質によるパーキンソン病予防効果の検討. 第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会(横浜, 2011. 3)

12) 宋丹丹・大滝博和・小林夏季・圓谷智海・平泉裕・井上富雄・塩田清二: 異なる継代回数における骨髄由来間葉系幹細胞の特性比較. 第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会(横浜, 2011. 3)

13) 大滝博和・佐藤敦・小原賢司・圓谷智海・加藤慎・宋丹丹・小林夏季・渥美敬・塩田清二: インターロイキン1の欠損は脊髄損傷のマイクログリア・マクロファージ活性化に影響する. 第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会(横浜, 2011. 3)

14) 松永政司: 「核酸・核タンパクの機能と遺伝子栄養学について」, 第14回日本病態栄養学会年次学術集会(2011.1.15 パシフィコ横浜)特別講演

15) 小林夏季・大滝博和・宋丹丹・宮本和幸・圓谷智海・吉田武美・松永政司・塩田清二: 核蛋白質によるパーキンソン病予防効果の検討.

第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 (横浜, 2011. 3)

2011-32506 (平成 23 年 2 月 17)

16) Rakwal, Randeep、小川哲郎、柴藤淳子、澤智華、養父佐知子、齋藤智美、村山 綾、宇住晃治、松永政司、塩田清二:「成人期疾患胎児期起因説に基づく生活習慣病関連遺伝子の網羅的検索と核酸栄養の効果」, 第 6 回核酸・核タンパク機能性研究会 (恵庭、2011.8.8)

17) 桐山恵介、大滝博和、小林夏季、松永政司、塩田清二:「核タンパク質のパーキンソン病モデル動物に対する予防効果の検討」, 第 6 回核酸・核タンパク機能性研究会 (恵庭、2011.8.8)

18) 鈴木健、高橋環奈、西原雅夫、杉正人、松永政司:「3次元ヒト皮膚モデルを用いたオリゴDNAの紫外線(UV)照射損傷予防効果の検討」, 第 6 回核酸・核タンパク機能性研究会 (恵庭、2011.8.8)

19) 多田祐也、許善花、王 琦、杉正人、松永政司:「The effect of Antrodia cinnamomea on the suppression of chronic alcohol liver injury」, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (2011.9.7)

20) 高橋千尋、池野博貴、許善花、西村太輔、王琦、西原雅夫、杉正人、松永政司:「北海道産機能性素材の寿命延長効果」, 日本補完代替医療学会 (2011.11.5 石川)

21) 養父佐知子、Rakwal, Randeep、小川哲郎、柴藤淳子、澤智華、齋藤智美、村山 綾、宇住晃治、松永政司、塩田清二:「肝臓の網羅的遺伝子発現解析による核タンパク栄養の効果の検討」, 第 117 回日本解剖学会 (山梨、2012. 3)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

アミロイド線維の形成を伴う神経変性疾患の予防・改善薬、(発明者) 塩田清二、大滝博和、小林夏季、(出願人) フォーデイズ株式会社、特願

## 医薬品開発のための副作用予測法・評価法の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部  
研究代表者 黒瀬 光一  
研究期間 平成22年7月～平成24年3月

研究要旨：副作用の予測法・評価法として、次の4項目に関して研究を行い、医薬品開発過程を迅速・効率化するための技術基盤確立に向けた研究を推進した。(1) ヒトでのアレルギー性を予測可能なインビトロ感作性試験法、(2) GST T1 および M1 KO マウスを用いたバイオマーカー探索、(3) iPS 細胞の各種特性解析法、肝細胞への効率的分化・機能評価法、(4) 遺伝的要因に基づく副作用予測法

### 研究分担者

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部  
齋藤嘉朗・前川京子・杉山永見子
- 2) 積水メディカル(株) つくば研究所 森 篤雄
- 3) 田辺三菱製薬(株) 薬物動態研究所 丹羽卓朗
- 4) 東京大学大学院 薬学系研究科 杉山雄一
- 5) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 埴岡伸光
- 6) 九州大学大学院 農学研究院  
田代康介・久原 哲
- 7) Meiji Seika ファルマ(株) 医薬研究所 土屋敏行
- 8) 第一三共(株) 薬物動態研究所 渡邊伸明
- 9) 帝京大学 医学部 滝川 一
- 10) 金沢医科大学 循環器内科学 梶波康二
- 11) 塩野義製薬株式会社 創薬・開発研究所 山口嘉隆
- 12) 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 松永民秀
- 13) 小野薬品工業(株) 創薬技術部 松本範人
- 14) プレシジョン・システム・サイエンス(株)  
上田哲也

### A. 研究目的

医薬品開発の効率化や安全性の確保を目指して、副作用予測法・評価法の実用化を図る。具体的な項目としては、必要性和参加企業のニーズを踏まえ、次の4項目とした。(1) ヒトでのアレルギー性を予測し得るインビトロ感作性試験法の開発、(2) GST T1 および GST M1 ノックアウトマウスを用いたバイオマーカーの探索、(3) iPS 細胞による安全性評価系開発に向けての iPS 細胞特性解析、肝細胞への効率的分化法の開発等、(4) 遺伝的要因に基づく副作用予測系の開発として薬物性肝障害・筋障害の症例集積と分析および副

作用発症に関連する遺伝子多型の迅速タイピング系の開発

### B. 研究方法

以下の各項目について、情報・技術を官民で共有し、連携を図りながら研究を遂行した。

#### (1) ヒトでのアレルギー性を予測し得るインビトロ感作性試験法

アレルギー性の検出には、ヒト THP-1 細胞において、免疫応答性の補助刺激分子 CD54 と CD86 が皮膚感作性物質により発現誘導されることを利用する human Cell Line Activation Test (h-CLAT) 法の適用と応用を検討した。まずは、3施設間(国立衛研、Meiji Seika ファルマ、塩野義製薬)における h-CLAT のバリデーションを行い、施設間差のないことを確認した。被験物質として、アレルギー性副作用報告のある薬物を用いた。また、界面活性剤との同時暴露による被験物質に対する感度上昇の改良を試みた。被験物質の代謝活性化を考慮した評価が行えるように、ラットおよびヒト肝 S9 を利用して代謝活性化法の導入を検討した。またミクロペルオキシダーゼ (MPO) による薬物の代謝活性化に起因するアレルギー性を検出可能とするため、MPO を安定的に THP-1 細胞で発現する細胞株の樹立を行った。さらに、MPO 発現 THP-1 細胞における MPO 代謝活性を調べるため、本酵素による代謝が報告されているチクロピジン、アミノピリン、フェニトインの代謝物分析を LC/MS/MS により行った。

#### (2) GST T1 と GST M1 ノックアウトマウスを用いたバイオマーカーの探索

Gstm1<sup>-/-</sup>、Gstt1<sup>-/-</sup> ノックアウトマウスは、第一三共(株) 安全性研究所において、定法である ES 細胞の相同組換え法により、C57BL/6J と 129S1 系統の掛け