

ることで、細胞内の標的 mRNA が分解し標的蛋白が特異的にノックダウンされる。

ここで重要なことは非増殖性のレトロウイルスを用いる点にある。レトロウイルスは増殖性のグリア細胞にのみ感染し、非増殖性の神経細胞にはいっさい感染しないという特性を有している。この特性通り共培養下でも、レトロウイルスはオリゴデンドロサイト前駆細胞にのみに感染する。したがって、この標的探索の実験系では、神経細胞へのサイドエフェクトを考慮に入れる必要はなくなり、毎回安定した実験結果を得ることができ。

#### 【ShRNA ライブラリーから標的分子を同定する】

レトロウイルスにコードされた shRNA ライブラリー中のおおのの遺伝子の 5' 側と 3' 側に哺乳動物ゲノムに存在しない人工配列を付加している。そのため、ポジティブな結果の得られた共培養に関して、そのカルチャーから RNA を抽出し、RT-PCR およびダイレクトシーケンシングを行うことで、標的となる分子を同定することが可能になる。

この探索研究で獲得される標的分子は2種類に分類される。ひとつはノックダウンされることによって髄鞘変性が改善されるものであり、それは病態時に活性化されている分子であると推定される。勿論、この結論を得るために、PLP1 を導入していない共培養での結果との比較を必要とする。もうひとつは、逆に、ノックダウンされると髄鞘変性がさらに促進されるものであり、それは通常の髄鞘形成に関与していると推定される。これも PLP1 を導入していない場合と比較する必要があるが、これは髄鞘形成に対して保護的な分子であると考えられる。前者の場合は阻害剤が有効な治療薬となる可能性をもち、後者の場合は活性化物質が治療薬や髄鞘保護薬となる可能性をもち。ただ、一般的には阻害剤が治療薬になることが多い。

しかし、この何れの場合も、その標的分子が既知のものであるか既知のものでないか、または高次構造が明らかにされているものか、されていないものかによって、PMD 創薬の難易度が変わるため、はじめに複数の標的候補を明らかにしておくことが重要である。

#### 【阻害剤ライブラリーや抗体ライブラリーを用いた治療薬の標的分子のスクリーニング】

阻害剤の濃度は 1 または 10  $\mu\text{M}$  の濃度で、抗体ライブラリーは 1 または 10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度でスクリーニングを行った。他の方法は shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングに準じる。

#### 【標的分子のアッセイ系の確立】

将来、民間企業等でのハイスループットスクリーニングで、分子標的化合物をとるためのアッセイ系の確立を目指す。

リン酸化酵素および蛋白質分解酵素に関するアッセイ系を構築している。これらは、多検体同時測定プレートリーダーを用いるなど、一般的に行われているハイスループット系のアッセイとほぼ同じであるため、簡単に記載するに留める。リン酸化酵素および蛋白質分解酵素が主な標的分子として考えられたので、その基質としては最も簡単な構造をもつものを選択し、アッセイ系を確立する。例えば、リン酸化酵素ならば、それは最小認識配列をもつペプチドである。ペプチドに蛍光物質を付加しリン酸化による構造変化での蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) を測定することで、酵素活性と分子標的化合物の効果を測定できる。蛋白質分解酵素も同様で、ペプチドが分解されることでおきる FRET を測定することで分子標的化合物の効果を検討できる。

#### 【インビボで標的分子を評価するための髄鞘組織特異的遺伝子改変マウスの作製技術の開発】

先述したように、既存の治療薬は、標的分子の分子機能を阻害することで、その効果を示している例が多い。そのため、まず、インビボで、標的候補分子の機能阻害が病態改善に有効かどうかを判断する必要があると考えられる。それには、標的分子をノックアウトまたはノックダウンすることが非常に有効な手段として考えられている。しかしながら、前者ではノックアウトマウスを作成するのに時間がかかるため、期間内での評価研究としては現実的ではないと考えられる。一方、後者の特徴としては、トランスジェニック技術を応用して遺伝子改変動物を作成するため、その作成に費やす時間は前者ほどではない。また、標的候補分子は複数存在するので、トランスジェニック技術は、この目的においては有効であると考えられる。勿論、研究の過程で、その標的が非常に重要であると判断した場合は、ノックアウトマウス (コンディショナル・ノックアウトマウス) の作製も並行して行う。

さて、具体的にトランスジェニックの配列に関して述べたい。それは、線状型ノックダウン配列 (shRNA) をもつ遺伝子断片をマイクロ RNA (miRNA) 骨格のなかにいれ、それを対象組織特異的に転写させるというものである。標的に対する shRNA 配列を、miRNA 配列のなかのノックダウン配列領域と置換することで、全体としての RNA の配列を長くし、それらを一般的なプロモーターで制御できるようにしたものである。これを通常

のトランスジェニックマウス作製と同様に、マウス受精卵にインジェクションして、目的とするマウスを作成する。その他の遺伝子改変動物の作成方法は、一般的なトランスジェニックマウス作成技術と同様である。詳細な遺伝子配列情報に関しては、現在、投稿準備中の原著論文に記載し、その後、研究室のウェブサイトで公開予定である。以上、現在まで確立されているトランスジェニックマウス作成技術を用い、新規トランスジェニックマウスの shRNA の配列を標的ごとに変えるだけで、インビボレベルで治療薬標的候補分子の評価が可能となる。

一方、標的分子の分子機能を促進することで、病態改善に有効である分子が同定された場合は、単純に、髄鞘特異的なトランスジェニックマウスを作製することになる。

最後に、作製された遺伝子改変マウスを PMD 病態モデルマウス (PMD 病態モデルとして一般的に用いられているものは PLP1 のトランスジェニックマウスであり、これを生理学研究所の池中一裕教授から使用許可を受け譲渡された) と交配し、PMD 病態が改善されれば、その標的分子の評価ができるはずである。PMD 病態モデルマウスは国立成育医療研究センターで B6 バックグラウンドに純化させている。

#### 【インビボでの標的分子の組織評価試験】

髄鞘組織を研究対象としているため、組織染色ばかりではなく電子顕微鏡解析も行い、髄鞘変性の改善効果の評価する。組織染色に関しては一般的な手順で行われ、染色に用いる抗体等は細胞染色の項目に記載したものと同様なものを用いる。また、電子顕微鏡解析は定法で行われるが、髄鞘組織は薄膜が 50 層以上に重なる場合があるため、標本の固定には注意が必要であり、2%パラホルムアルデヒドと 2%グルタルアルデヒドのリン酸緩衝液を用いる必要がある。

#### 【インビボでの標的分子の機能評価試験】

まず、マウスのテイルフリック試験に関してであるが、これは熱性の痛覚の異常を測定するものである。これは痛覚を伝える神経とテイルを動かす運動神経の連合運動を測定するものであるため、必ずしも髄鞘機能だけが関係しているものではないが、脳と脊髄経路を通過する神経の機能を測定する一般的な方法である。跳躍伝導を司る髄鞘の変性が進行すると、神経だけが変性する状態に比べ、神経の伝導速度が著しく遅延することが知られているため、熱性痛覚反応がきわめて鈍感になる。原理は簡単で、熱源から熱照射 (55 度以上の照射熱) をマウスのテイルに行い、テイルが動くまでの時間やその動き方の幅を測定する。

次に、ローターロッド試験を記載する。これは主に運動テストである。ローターロッド試験は協調運動のテストであり、テイルフリック試験のような脊髄経路を通る痛覚神経と運動神経の両方を判定する試験と異なる。したがって、運動神経経路を測定するローターロッド試験は、テイルフリック試験より、その解釈は単純である。マウスを回転するロッドにのせると、はじめ、マウスは落ちないようにロッドの上を歩き、ロッドの回転速度をだんだん速くすると、マウスがロッドから滑り落ちるため、そこまでの時間を測定する。

#### (倫理面への配慮)

組換え DNA 実験に関しては、独立行政法人国立成育医療研究センター研究所、首都大学東京、株式会社免疫生物学研究所、田辺三菱製薬株式会社の各委員会で承認を得ており、非拡散の規則を遵守し実験を行っている。

実験動物および遺伝子改変動物の取り扱いに関しても独立行政法人国立成育医療研究センター研究所、首都大学東京、株式会社免疫生物学研究所、田辺三菱製薬株式会社の各委員会で承認を得ており、3Rs を遵守し実験を行っている。

### C. 研究結果

【インビトロ髄鞘変性システムを用いた治療薬標的分子のスクリーニング】

ShRNA スクリーニングと阻害剤スクリーニングから明らかになった PLP1 が誘導する髄鞘変性を改善する標的は以下の 2 種類であった。また、抗体スクリーニングからも TACE と考えられる分子が標的としてあげられた。これらは、その活性を阻害することで髄鞘変性が改善された。

○ MAPK1 (まだ例数がすくなく予備実験段階である。)

○ TACE と推定される蛋白質分解酵素

一方、ShRNA スクリーニングで以下の 2 種類の標的の活性化または保護が髄鞘変性を改善する可能性が分かった。

○ 0346 (最近、国際統一名として cytohesin-1 という名称が使われている:「論文発表」の項参照、「髄鞘保護に関わる創薬標的」として新聞および一般情報ウェブサイトで報道されたもの)

○ 36253

【髄鞘特異的 shRNA トランスジェニックマウス (標的分子のノックダウンマウス) の技術開発】

髄鞘特異的に標的をノックダウンする ShRNA トランスジェニックマウスの開発に成功した (現在、投稿準備中である。。「研究方法」の項に作製手順を記載。

【髄鞘特異的 shRNA トランスジェニックマウス (標的分子のノックダウンマウス) の作製】

先行研究から明らかにされたもののうち、shRNA でノックダウンすることで髄鞘変性の改善効果が強くみられたものから、それらを分担しながら各研究者間で協力して作製している。

- キナーゼ型ヘレグリン受容体 ErbB2
- 非キナーゼ型ヘレグリン受容体 ErbB3
- キナーゼ型神経栄養因子受容体 TrkC

これらの分子に関する研究は古くから行われているが髄鞘組織特異的ノックアウトマウスを作製したという報告はなく十分に解析がなされていなかった。これら 3 種類は受容体であるため、創薬標的として優れていると考えられる。

また、本年明らかにされた分子を標的にしたマウスも作製予定である。

#### 【機能評価試験】

PMD モデルマウスに合わせて測定機器類を調整し、刺激時間やその強さ等のパラメーターを決定した。

#### D. 考察

これらの標的分子が、なぜ髄鞘変性に対して改善効果を示すのかということ考察したい (現時点ではインビトロでの結果だけを抽出する。)。これらの標的は、すべてが以下に記載する推定分子経路に含まれるわけではないが、髄鞘発生に必須であり発生過程で厳密に活性制御を受けているヘレグリン受容体および神経栄養因子受容体とその細胞内シグナル経路に存在する (または存在すべき) 分子群である。また、TACE はそれらの受容体リガンド蛋白質を成熟させる過程で負に影響することが知られている。

最近になって、研究代表者や分担者および欧米の他の研究から、PMD 病態ではヘレグリン受容体や神経栄養因子受容体の異常活性化がおきることが明らかにされた。つまり、これらの受容体とその下流経路を適度に阻害すると髄鞘変性が改善されると推定できる。今後、このような仮説が実証できるかどうか検討する予定である。

#### E. 結論

以上をまとめると、

(1) インビトロ髄鞘変性システムを用いて、髄鞘発生過程に含まれると推定される分子経路の分子群のうち、TACE と推定される蛋白質分解酵素と MAPK1 が新規標的として明らかにされた。他に 2 種類の標的となる可能性のある分子も明らかにした。

(2) 先行研究から明らかにされた PMD の標的分子のなかで、効果が強いと予測された、いくつか

の髄鞘特異的 shRNA トランスジェニックマウスをそれぞれ分担しながら研究者間で作製している。これらのマウスが作出された後、PMD モデルマウスと交配させ、モデルマウスの髄鞘変性の改善効果を検討する。

#### F. 健康危険情報

現在のところ報告すべき情報はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

【独立行政法人国立成育医療研究センター 山内淳司、宮本 幸】

(1) Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Shou Takashima, Kazumi Kondo, Katsumasa Kawahara, Noriko Nemoto, Jonah R. Chan, Gozoh Tsujimoto, and Akito Tanoue (2012) Phosphorylation of cytohesin-1 by Fyn is required for initiation of myelination and the extent of myelination during development. *Science Signaling* (サイエンス姉妹誌) 5, ra69

Picked up as 'cover image': Phosphorylation of cytohesin-1 by Fyn is required for initiation of myelination and the extent of myelination during development. *Science Signaling* Vol. 5, No. 243 (2012)

毎日新聞夕刊社会面 (同年 9 月 26 日)、朝日新聞朝刊科学面 (10 月 1 日)、Yahoo! ニュースおよび goo ニュース (ともに 9 月 26 日午前配信) にて「髄鞘保護に関わる創薬標的」として報道された。

(2) Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Natsuki Yamamori, Takahiro Eguchi, Motoshi Nagao, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi (2012) Paxillin is the target of c-Jun N-terminal kinase in Schwann cells and regulates migration. *Cell. Signal.* 24, 2061-2069

(3) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Kazuaki Nakamura, Masahiro Maeda, Akito Tanoue#, and Junji Yamauchi# (2012) Arf6 guanine-nucleotide exchange factor, cytohesin-2, interacts with actinin-1 and regulates neurite extension. *Cell. Signal.* 24, 1872-1882 #These authors contributed equally to this work

(4) Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi (2012) Pelizaeus-Merzbacher disease-associated

proteolipid protein 1 inhibits oligodendrocyte precursor cell differentiation via extracellular-signal regulated kinase signaling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 424, 262-268

(5) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Motoshi Nagao, Naoko Onami, Hideki Tsumura, Masahiro Maeda, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi (2012) Knockdown of Dock7 in vivo specifically affects myelination by Schwann cells and increases myelin thickness in sciatic nerves without affecting axon thickness. **Am. J. Mol. Biol.** 2, 210-216

(6) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Kohji Nishimura, Kazuaki Nakamura, Masahiro Maeda, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi (2012) The polybasic region of cytohesin-2 determines paxillin binding specificity to mediate cell migration. **Adv. Biol. Chem.** 2, 291-300

(7) Reiko Mizutani, Kazuaki Nakamura, Natsuko Kato, Kazuko Aizawa, Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue (2012) Expression of sorting nexin 12 is regulated in developing cerebral cortical neurons. **J. Neurosci. Res.** 90, 721-731

#### 【首都大学東京 久永眞市】

(1) Hisanaga S., Asada A. Cdk5-induced neuronal cell death: the activation of the conventional Rb-E2F G1 pathway in post-mitotic neurons. **Cell Cycle News & Views**, 11, 2049, 2012.

(2) Takano, T., Tomomura, M., Yoshioka, N., Tsutsumi, K., Terasawa, Y., Saito, T., Kawano, H., Kamiguchi, H., Fukuda, M., Hisanaga, S. (2012) LMTK1/AATYK1 is a novel regulator of axonal outgrowth that acts via Rab11 in a Cdk5-dependent manner. **J. Neurosci.** 32, 6587-6599.

(3) Hayashi, Y., Nihonmatsu-Kikuchi, N., Hisanaga, S., Yu, X., Tatebayashi, Y. (2012) Neuropathological similarities and differences between schizophrenia and bipolar disorder : a flow cytometric postmortem brain study. **PLoS One** 7, e33019.

(4) Asada, A., Saito, T., and Hisanaga, S. (2012) Subcellular localization of active Cdk5 is determined by its own kinase activity. **J. Cell Sci.** 125, 3421-3429.

(5) Shahpasand, S., Uemura, I., Saito, T., Asano, T., Hata, K., Shibata, K., Toyoshima, Y., Hasegawa, M., and Hisanaga, S. (2012)

Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by Tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. **J. Neurosci.** 32, 2430-2441.

#### 【株式会社免疫生物学研究所 前田雅弘】

(1) Saeki H, Hashizume A, Izumi H, Suzuki F, Ishi K, Nojima M, Maeda M, Hino O (2012) The utility of serum N-ERC/mesothelin as a biomarker of ovarian carcinoma. **Oncol. Lett.** 4 637-641

(2) Samukawa T, Hamada T, Uto H, Yanagi M, Tsukuya G, Nosaki T, Maeda M, Hirano T, Tsubouchi H, Inoue H (2012) The elevation of serum napsin A in idiopathic pulmonary fibrosis, compared with KL-6, surfactant protein-A and surfactant protein-D. **BMC Pulm. Med.** 12 55

(3) Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Nguyen PT, Siriwardena SB, Tsunematsu T, Ohbayashi M, Ando T, Hatakeyama D, Shibata T, Koizumi K, Maeda M, Ishimaru N, Ogawa I, Takata T (2012) Periostin directly and indirectly promotes tumor lymphangiogenesis of head and neck cancer. **PLoS One** 7 e44488

他3報は独立行政法人国立成育医療研究センター研究所との共同研究であり、同項目の(3)(5)(6)である。

#### 【田辺三菱製薬株式会社 加藤 稔】

(1) Kato M, Hashimoto T, Shimomura T, Kataoka H, Ohi H, Kitamura N: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 inhibits protease activity and proteolytic activation of human airway trypsin-like protease. **J. Biochem.** (2012) 151 (2):179-187

#### 2. 学会発表

【独立行政法人国立成育医療研究センター 山内淳司、宮本 幸】

(1) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, and Akito Tanoue, and Junji Yamauchi Arf6 guanine-nucleotide exchange factor, cytohesin-2, interacts with actinin-1 to regulate neurite extension The Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry November 2012, Kobe, Japan

(2) 鳥居知宏、宮本 幸、川口祥吾、山盛奈月、江口貴大、中村和昭、田上昭人、山内淳司 Arf6 guanine-nucleotide exchange factor,

cytohesin-2, interacts with actinin-1 to regulate neurite extension (ショートトークにピックアップされる) 日本分子生物学会大会 2012年12月・福岡

(3) 宮本 幸、山内淳司 Novel signal transduction pathway controlling myelination (New dynamic signaling to form unique structures between glial and neuronal cells: シンポジウム企画/座長 山内淳司、緒方 徹) 日本神経科学学会大会 2012年9月・名古屋

(4) 宮本 幸、鳥居知宏、山盛奈月、中村和昭、田上昭人、山内淳司 Jun キナーゼはパキシリンをリン酸化することでシュワン細胞の遊走を制御する 日本生化学会大会 2012年12月・福岡

(5) 宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司 The mood stabilizer valproic acid improves defective neurite formation caused by Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant Rab7 through the JNK signaling pathway 日本神経科学学会大会 2012年9月・名古屋

(6) 鳥居知宏、宮本 幸、田上昭人、山内淳司 Molecular mechanisms involved in the regulation of neurite extension through actinin interaction with Arf6 activator, cytohesin-2 日本神経科学学会大会 2012年9月・名古屋

(7) 鳥居知宏、宮本 幸、川口祥吾、山盛奈月、江口貴大、中村和昭、田上昭人、山内淳司 Arf6 活性化因子サイトヘジン2は、巣状分節状糸球体硬化症関連遺伝子 アクチニンを結合パートナーとして細胞の形態変化を制御する 日本生化学会関東支部例会 2012年5月・群馬

#### 【首都大学東京 久永眞市】

(1) Hisanaga S, Shahpasand K, and Hasegawa M. The effect of Alzheimer disease phosphorylation of Tau on mitochondrial transport. Alzheimer Association International Conference 2012, 2012.7.15 Vancouver, Canada (国際学会の口頭発表である。学会発表は、代表的なもののみを示した)

#### 【株式会社免疫生物学研究所 前田雅弘】

(1) 五十嵐清子, 鈴木文男, 廣橋朋子, 阿部雅明, 前田雅弘, 樋野興夫「大型研究型検診の検査の取組み」第59回日本臨床検査医学会学術集会 (2012年11月)

(2) Hirohashi T, Igarashi K, Abe M, Maeda M, Hino O 「The interim assessment of a

large-scale research screening for early diagnosis of mesothelioma」第71回日本癌学会総会 (2012年9月)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当無し。

2. 実用新案登録  
該当無し。

3. その他  
該当無し。

# HDL上昇と機能増進を核とした動脈硬化予防 治療薬開発のための基礎的研究

国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部  
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①血中HDLの大部分を産生する肝のABCA1トランスポーターの、肝特異的転写制御の解明と発現促進化合物の探索、②HDLと炎症・動脈硬化病変形成の解明により、「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ABCA1バリエントL3のエンハンサーに転写因子HNF4 $\alpha$ が結合活性化する機序を明らかにするとともに、肝型L3発現を促進する酒類成分、肝と末梢のABCA1を上昇するLXR/RXRを低濃度で強力に活性化する胆汁酸誘導体を見いだした。また肝ABCA1発現促進化合物のin vivoでのHDL上昇効果を検証した。②動脈硬化症発症前の中膜平滑筋層で抗酸化タンパクペルオキシレドキシニン2の発現低下を見出した。

## 研究分担者

- (1) 興和(株)東京創薬研究所  
田辺宗平、浅沼章宗、山崎裕之
- (2) サントリーホールディングス株式会社 諏訪芳秀
- (3) 名古屋市立大学大学院医学研究科  
堂前純子、横山信治
- (4) 昭和大学薬学部 板部洋之
- (5) 広島国際大学薬学部 宇根瑞穂

## 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%のリスク低下が予測されるが、HDLを直接上昇する薬は実用化されていない。本研究では、①血中HDLの大部分を産生する肝のABCA1トランスポーターについて、申請者が発見したヒト肝型バリエントの独自機能と転写制御、②炎症性アミロイドSAA含有HDLや関連分子ABCA7の機能、③脂質蓄積による動脈硬化病変形成の機序を解析し、④「HDLの質と量を高める」化合物の探索を行い、予防・治療薬創製に貢献する。

[I] 肝のABCA1は血中HDLの8割を生産する。申請者らは、肝ABCA1は肝独自のプロモーターと末梢型のプロモーターによる二重の転写制御を受けることを初めてラットで見いだした。引き続きヒト肝に特異的に発現する肝型ABCA1バリエントL3を発見し、

HDL産生に大きな寄与を持つことを明らかにしている(特願2010-159674)。本研究では、①ヒト肝特異的なL3バリエントの機能と転写制御システムの完全理解、細胞およびin vivoでの薬物探索モデルの構築により、治療薬創製への貢献をめざす。②肝ABCA1発現を促進する胆汁酸代謝産物・化合物・食品成分を探索し、③HDLによる末梢から肝へのコレステロール輸送である「コレステロール逆転送」での役割を評価する。

[II] 慢性炎症反応は動脈硬化の発症進展の因子として注目される。ABCA1は炎症性アミロイド蛋白SAAによるアミロイド沈着に関わり、関連分子ABCA7は細胞食作用を制御することを発見している。本研究では、①アミロイドーシス発症におけるHDL結合型SAAの役割や、ABCA7機能ドメイン解析から機序を解明し、慢性炎症でのHDL関連分子の役割を明らかにする。また、②細胞への脂質蓄積が炎症や病変形成を引き起こす機序を、脂質代謝や酸化反応産物・抗酸化防御システムの変化に着目して解明し、発症の引き金となる事象を解明するとともに、予防薬やHDL効果の評価につながるマーカーを探る。

## B. 研究方法

### B-1 HDL産生の促進

①ヒト肝に特異的なABCA1 mRNAバリエントL3のエンハンサー領域をルシフェラーゼベクターに組み込み、短縮欠失変異作成によりステロールによる発現制御に関わるエレメントを探索し、結合活性化する

転写因子を調べた。②ABCA1 発現促進作用を示す胆汁酸代謝産物や誘導体を探索した。③食品成分からABCA1 発現促進因子をマクロファージ系細胞および齧歯類肝で探索した。④ラットモデルを用いて肝 ABCA1 発現促進薬物の血中 HDL への影響を in vivo で評価した。④ABCA1/ABCA7 のキメラ分子を作成し HDL へのコレステロール組込機構を解析した。

## B-2 HDLと炎症・動脈硬化病変形成

①炎症性タンパク SAA は ABCA1 により HDL に組み込まれ血中に放出される。SAA の尿への排出、尿管上皮細胞での再吸収・分解における ABCA1 の役割を KO マウスを用いて解析した。②動脈硬化モデルマウスの大動脈において、病態進展に伴い発現するタンパクをプロテオミクス・免疫染色で解析した。

(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 のヒト肝での転写制御機構 [最上]

肝 ABCA1 は血中 HDL 形成に最大の寄与を持つとともに、肝特異的な発現制御を受ける。これまでの研究で、ヒト肝に特異的な ABCA1 mRNA バリエント L3 を見だし、「肝型」のコレステロール応答(コレステロール低下による発現上昇)を示すプロモーター・エンハンサー領域を同定した。本年度はその転写制御の解析を進め、L3 エンハンサーの短縮・欠失変異により、コレステロール応答に必須の配列を三カ所同定した。その一つ(+3172/+3183)はホモロジーサーチより HNF4 $\alpha$  結合サイトと推定された。HNF $\alpha$  がこのエレメントに依存してエンハンサーを活性化することを HNF4 $\alpha$  およびドミナントネガティブ体の共発現、siRNA-ノックダウンにより明らかにした。さらに CHIP、EMSA、DNA 結合アッセイにより HNF4 $\alpha$  のエレメントへの結合が示された。肝由来細胞 JHH-5 の HNF4 $\alpha$  を siRNA でノックダウンしたところ、ABCA1 mRNA の肝型バリエント L3 および L2b の発現が著しく低下し、ステロール低下による肝型発現誘導が消失した。したがって、HNF4 $\alpha$  は肝特異的な ABCA1 バリエントの

発現に必須の役割を果たすことが判明した。

#### 2) LXR/RXR を活性化する胆汁酸誘導体の発見 [宇根]

胆汁酸とその代謝産物はコレステロールホメオスタシス制御に深く関わることから、コレステロール排出トランスporterである ABCA1 の発現を制御する可能性を検討した。LXR/RXR を活性化する化合物は末梢および肝の双方で ABCA1 の発現を促進可能であることから、今年度はヒト LXR $\alpha$ /RXR 活性化を指標に検索を行った。

胆汁酸はヒト LXR $\alpha$ /RXR 活性化能を示さなかったが、いくつかの胆汁酸誘導体に活性が認められたことから構造と活性との関係を調べた。その結果に基づき、新規に胆汁酸類縁体・誘導体を合成し、顕著な LXR $\alpha$ /RXR アゴニスト活性を示す化合物を見いだした。本化合物 compound A は、内因性 LXR アゴニストとして知られるオキシステロール 22(R)-hydroxycholesterol (22(R)-HC)以上の活性をより低濃度において示した。胆汁酸をリガンドとすることが知られる受容体への compound A の作用を検討したところ、核内受容体 FXR、エネルギー消費に関わる GPCR である TGR5、およびビタミン D 受容体である VDR に対して作用を示さなかった。

#### 3) ABCA1 発現を促進する食品酒類成分 [諏訪]

ABCA1 発現を促進する食品酒類成分を探索したところ、ホップ成分の 8-プレニルナリンゲニンが肝由来細胞 JHH-5 のヒト肝特異的な ABCA1 mRNA バリエント L3 の発現を約2倍上昇させ、総 ABCA1 mRNA 発現ならびにタンパク発現を有意に上昇させる作用を示した。

一方、セサミンを投与すると、ラット肝においてレチノイン酸(ビタミン A) 生合成系の酵素である ALDH1A1 (acetaldehyde dehydrogenase 1A1、RALDH) の遺伝子発現が約 10 倍、マウスにおいてレチノイン酸の核内移行を受け持つ RA 結合蛋白である CRABP2 遺伝子の発現が約 6 倍、過剰なレチノイン酸を分解する酵素である CYP26A の遺伝子発現も上昇し、セサミン(エピセサミン)にはレチノイン酸の核内移行を促す作用があることが示唆された。

末梢型 ABCA1 プロモーター活性化成分を探索するとともに、PPAR $\delta$ あるいはRAR $\alpha$ の共発現によるスクリーニング系の改良を検討した。

#### 4) 肝 ABCA1 発現促進薬物の in vivo での HDL 上昇

## 作用の検証 [田辺]

これまでの研究で、ピタバスタチンがラットの肝由来細胞ならびに *in vivo* で ABCA1 発現を上昇し、血中 HDL 濃度上昇作用を示すことを明らかにするとともに、肝型 ABCA1 プロモーターおよび PPAR $\alpha$  を活性化して ABCA1 タンパク発現を増強するメカニズムを支持する結果を得ている。本年度は同様に肝細胞 ABCA1 発現を促進するアトルバスタチンとの差異を検討した。ピタバスタチンおよびアトルバスタチン両薬剤それぞれのコレステラミンとの併用投与開始1週間後より、正常食対照群に比べ HDL-C 濃度の増大が認められた。投与 3-4 週間後から減少傾向に転じたものの、コレステラミンと両薬剤併用時の HDL-C 濃度の高値はいずれも 5 週間後まで持続した。各薬剤の単剤投与群では HDL-C 濃度に明らかな影響は認められなかった。また、Statin を投与した群ではトリグリセライド (TG) 濃度の明らかな低下を認め、とくに各 Statin とコレステラミンとの併用投与において、この低下作用は投与 5 週間後まで持続した。LDL-C 濃度に関しては、すべての薬剤投与群でほとんど影響がみられなかった。

## 5) ABCA1/ABCA7 による HDL 粒子へのコレステロール組み込みメカニズム [堂前]

ABCA1 による HDL 粒子へのコレステロール組み込み機序を明らかにすることを目的に、ABCA1 と ABCA7 キメラ分子を用いた解析を行った。C 末端に GFP を融合させた 6 種類の ABCA1/ABCA7 キメラ分子を作成し、HEK293 に導入して産生される HDL の詳細を調べた。HDL 粒子のコレステロール/リン脂質比は、C 末ドメインが ABCA1 のものでは高く、ABCA7 のもので低い傾向が見られた。dBcAMP や PMA に対する反応性は、C 末ドメインが ABCA1 のものでは ABCA1-GFP 発現株のパターンと一致したが、C 末ドメインが ABCA7 のものでは ABCA1-GFP 発現株とも ABCA7-GFP 発現株とも異なっていた。したがって、ABCA1 による粒子径サイズの大きくコレステロール含有比率の高い HDL 粒子の形成は、ABCA1 の C 末領域が、ABCA7 による粒子径サイズが小さくコレステロール含有比率の低い HDL 粒子産生には、同様に ABCA7 の C 末領域が関与することが明らかになった

## 5) 日本住血吸虫の病原性と HDL 代謝 [堂前]

Cholesteryl ester transfer protein (CETP) は血中 HDL の異化を担う。CEPT 欠損症の分布は日本住血

吸虫の歴史的感染地域と重なることに着目し、日本住血吸虫症と CETP 欠損症を結ぶ因子として、日本住血吸虫の卵成熟に HDL が関わる可能性を調べた。日本住血吸虫卵の成熟には、ヒト血清中の HDL が必要であり、虫卵は CETP の作用を受けた HDL 粒子から、コレステロールエステルを特異的に取り込むこと、2 個の膜貫通部位を持つ糖タンパク質 CD36RP が取り込みを担うことが示された。細胞外ドメインに対する抗体を用い、コレステロールエステル取り込みを阻害すると卵成熟が抑制されること、CD36RP は巨大化した CETP 欠損 HDL に対しては有効に働けないことが示された。

## C-2 HDL と炎症、動脈硬化病変形成

### 1) SAA-HDL 形成とアミロイドーシス[堂前]

急性期反応物質の一つである serum amyloid A (SAA) は慢性炎症時に沈着する AA アミロイドの前駆体であり、動脈硬化性疾患の発症/進展への関与も推測される。肝で産生される SAA は ABCA1 により HDL 粒子に組み込まれ血中に放出される。

SAA-HDL 形成と血中濃度レベル維持の関係を調べるため、ABCA1 KO マウスを用い、原尿中への排泄と尿細管上皮細胞での再吸収・分解機構が SAA にも存在するかどうかを調べた。近位尿細管に障害をもたらすマレイン酸の投与により、WT マウスと ABCA1 KO マウスの両方で、尿中に投与前には検出されなかった apoA-I が出現し、その量は ABCA1 KO マウスの方が多かった。

### 2) 動脈硬化病変形成期の蓄積脂質と酸化ストレス [板部]

動脈硬化モデル動物である apoE-KO マウスは、通常食飼育でも 20 週齢以降著しく大動脈の病変面積が増大する。一方、血漿酸化 LDL レベルは病巣進展前の 20 週齢の時点で一過的に上昇する。動脈硬化病巣形成初期の血管壁を免疫染色で調べたところ、10 週齢の大動脈中膜平滑筋層に、すでに脂質過酸化生成物であるアクロレインの沈着が認められた。

血管壁組織に発現するタンパク質プロファイルを二次元電気泳動により調べた。10 週齢の apoE-KO マウスの大動脈を、起始部および弓部 (動脈硬化好発部位)、胸部および腹部 (動脈硬化発症の遅い部位) の 2 つに分けて、両者で発現量に差の見られたタンパク質を MALDI-TOF-MS により同定した中で、ペルオキシレドキシシン 2 (Prx2) に注目した。Prx2 は、胸



部および腹部の血管壁に比べて、起始部および弓部での発現が有意に少なかった。

免疫組織化学染色にて apoE-KO マウス大動脈血管壁での Prx2 の発現パターンを検討した。4週齢では中膜平滑筋層に Prx2 の発現が確かめられたが、10 週齢ではその発現が減弱していた。20 週齢の大動脈の動脈硬化病巣では Prx2 が強く発現している。病巣部分に接する中膜平滑筋層では、Prx2 の発現がほとんど見られない場合と強く発現している場合とがともに観察され、病巣形成後の中膜平滑筋の状態は複雑に変化する可能性が考えられた。

## D. 考察

### D-1 ABCA1 の転写制御による HDL 産生の促進

#### 1) ABCA1 のヒト肝での転写制御機構 [最上]

肝は HDL 産生に中心的な位置にあり、アポ A-I から HDL 前駆体を形成し、末梢組織からコレステロールを搬出するために供給する役割が示唆されている。肝の ABCA1 は血中 HDL の8割を産生する最重要の役割を持つとともに、他組織とは異なる遺伝子発現制御のもとにある。主任研究者は肝独自の二重転写制御システムをラットで発見しており、これまでヒト独自の肝型 ABCA1 mRNA バリエント L3 型を見だし、機能的・量的に重要なバリエントであることを示している。本年度はその転写制御機構の解明を進め、イントロン 3 に同定したエンハンサー領域の中に、コレステロール応答を担う三カ所のエレメントを見いだした。その一つに転写因子 HNF4 $\alpha$  が結合し、エンハンサーを活性化すること、HNF4 $\alpha$  をノックダウンすると L3 のみならず L2b 型の mRNA 発現も著しく低下することから、肝特異的な ABCA1 バリエントの発現には HNF4 $\alpha$  が必須の役割を担うことが明らかになった。HNF4 $\alpha$  は肝細胞の分化や肝特異的遺伝子発現に大きく関わる転写因子である。コレステロール低下による発現誘導には、二カ所のエレメントと相互作用する他因子も関わる可能性が大きく、今後検討を進める予定である。

#### 2) LXR/RXR を活性化する胆汁酸誘導体の発見 [宇根]

肝 ABCA1 発現が肝内の内因性代謝物により制御される可能性を考え、コレステロールホメオスタシス制御に関わる胆汁酸に着目し、代謝産物や誘導体の活性を調べた。今年度は LXR/RXR 活性化を指標に検討し、構造活性相関の結果に基づいて新規誘導体を合成したところ、内因性 LXR アゴニストとして知ら

れる 22(R)-hydroxycholesterol を上回る親和性と活性を示す化合物 compound A を見いだした。本化合物は強力に末梢型プロモーターを活性化することが予想され、肝および末梢細胞の双方で ABCA1 発現を促進することが期待される。末梢組織と肝の ABCA1 はそれぞれ、細胞コレステロールを HDL として放出、コレステロール引き抜き能の高い HDL 前駆体 (pre  $\beta$  HDL) を形成する異なる役割を持つことが提唱されている。末梢型・肝型それぞれの ABCA1 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、動脈硬化を抑制する効率の良い治療薬創製に貢献することが期待される。

#### 3) ABCA1 発現を促進する食品酒類成分 [諏訪]

肝 ABCA1 の発現を促進する食品・酒類成分の同定を進め、ホップ成分の 8-プレニルナリンゲニンがヒト肝型 ABCA1 バリエントである L3 型ならびに ABCA1 タンパク発現を促進する作用を見いだした。またセサミンが *in vivo* で肝のレチノイン酸代謝関連遺伝子の発現を著しく上昇し、レチノイン酸の核内移行を促す作用があることが示唆された。セサミンによる RAR/RXR 経路の亢進の可能性が示唆される。

#### 4) 肝 ABCA1 発現促進薬物の *in vivo* での HDL 上昇作用の検証 [田辺]

ラット肝 ABCA1 発現を促進することを見いだしたピタバスタチンおよびアトルバスタチンの *in vivo* での HDL 上昇効果を、コレステラミンとの併用により検証するラットモデルを用いて検討した。程度にやや差異がみられたものの、いずれの薬剤も数週間にわたって HDL-C 濃度の増大を示した。これまでのピタバスタチンを用いた *in vitro*, *in vivo* の検討結果から、この HDL-C 増加機序のひとつとして SREBP2 および PPAR $\alpha$  の活性化を介した ABCA1 蛋白の発現増加が関与することが推定される。HDL-C 濃度の増大が同様に認められていても、HDL 粒子の亜分画の組成に与える影響に差異が存在する可能性も考えられる。そこで HDL 濃度上昇作用の機序をさらに明らかにするため、2次元電気泳動法を用いた HDL の亜分画解析および HDL 粒子径の測定方法の検討を現在実施している。

### D-2 HDL と炎症、動脈硬化病変形成

#### 1) SAA-HDL 形成とアミロイドーシス [堂前]

アミロイド沈着の前駆体 SAA は HDL に組み込まれると (SAA-HDL) 血中濃度が維持される。その機構を

腎からの排出に着目して検討した。同様に ABCA1 により HDL に組み込まれる apoA-I と遊離 apoA-I を比較すると、遊離 apoA-I は糸球体で HDL 結合型より濾過されやすいことが確認された。これは ABCA1 KO マウスで血中 apoA-I が低値であること、原尿中の apoA-I は近位尿細管表面の megalin を介して取り込まれ、細胞内で分解を受けるという報告と矛盾しない。遊離 SAA についても、ABCA1 KO マウスではアミロイドとしての組織への沈着がわずかであることより、遊離 apoA-I と同様の機序で血中から除去されているものと推測される。

## 2) 動脈硬化病変形成期の蓄積脂質と酸化ストレス [板部]

動脈硬化症の発症を引き起こす要因を特定し、発症機構を解明する作業はほとんど進んでいないのが現状である。本研究では、世界中で広く使われている動脈硬化モデルマウスである apoE-KO マウスを利用し、動脈硬化発症に関わる因子を探索した。

プロテオミクス解析から、Prx2 が、動脈硬化好発部位で発現低下していることを見出した。10 週齢での Prx2 の発現低下は、大動脈の免疫組織染色により確かめられた。

Prx2 は細胞内の主要な抗酸化タンパク質の一つであり、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を還元する。今回得られた結果から、動脈硬化症発症の初期のある時点で平滑筋層の Prx2 の発現が減弱し、それによって平滑筋層内の抗酸化能力が低下することが、組織での細胞膜あるいはリポタンパク質などの血清成分の酸化変性を促しているのではないかと考えられた。組織が本来持っている抗酸化能力が低下することが、酸化ストレスの実態なのかもしれない。

## E. 結論

1. 肝の ABCA1 は抗動脈硬化性リポタンパク HDL 産生の大部分を産生する。肝特異的 mRNA バリエントのエンハンサーに HNF4 $\alpha$  が結合して転写を活性化する機序を明らかにした。
2. 肝と末梢の ABCA1 発現を上昇する LXR/RXR を、低濃度で強力に活性化する胆汁酸誘導体を合成した。
3. ABCA1 ヒト肝型バリエント L3 の発現をホップ成分 8-プレニルナリンゲニンが促進することを見いだした。セサミンは RAR-RXR 経路を亢進させることが示唆された。
4. 肝 ABCA1 産生を促進する薬物ピタバスタチンと

アトルバスタチンは、コレステラミンとの併用投与によりラット血中 HDL-C 濃度を数週間にわたって増加させた。

5. 1) ABCA1 の作用で産生される HDL 粒子が大形で高いコレステロール/リン脂質比を持つためには、ABCA1 の C 末領域を必要とすることがわかった。  
2) ABCA1 KO マウスでは apoA-I や SAA から HDL を生成できず、lipid-free のアポリポタンパク質は糸球体で濾過されることを見だし、血中濃度低下の原因と示唆された。
6. 動脈硬化症発症前の中膜平滑筋層でペルオキシレドキシニン2の発現低下を見出し、抗酸化タンパク発現低下による局所的な酸化ストレスの亢進が動脈硬化発症の引き金となる可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

論文発表

1. Ohoka N, Okuhira K, Cui H, Wu W, Sato R, Naito M, Nishimaki-Mogami T. HNF4 $\alpha$  Increases Liver-specific Human ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression and Cholesterol Efflux to ApoA-I in Response to Cholesterol Depletion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2012) 32:1005-1014
2. Fujino T, Takeuchi A, Maruko-Ohtake A, Ohtake Y, Satoh J, Kobayashi T, Tanaka T, Ito H, Sakamaki R, Kashimura R, Ando K, Nishimaki-Mogami T. Ohkubo Y, Kitamura N, Sato R, Kikugawa K, Hayakawa M. Critical role of farnesoid X receptor for hepatocellular carcinoma cell proliferation. *J Biochem.* (2012) 152:577-86
3. Shinji Yokoyama, Reijiro Arakawa, Cheng-ai Wu, Noriyuki Iwamoto, Rui Lu, Maki Tsujita, and Sumiko Abe-Dohmae Calpain-mediated ABCA1 degradation: Post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* (2012) 1821: 547-551.
4. Takashi Miida, Kunihiko Nishimura, Tomonori Okamura, Satoshi Hirayama, Hirotohi Ohmura, Hiroshi Yoshida, Yoh Miyashita, Masumi Ai, Akira Tanaka, Hiroyuki Sumino, Masami Murakami, Ikuo

- Inoue, Yuzo Kayamori, Masakazu Nakamura, Tsutomu Nobori, Yukihisa Miyazawa, Tamio Teramoto, Shinji Yokoyama. A multicenter study on the precision and accuracy of homogeneous assays for LDL-cholesterol: Comparison with a beta-quantification method using fresh serum obtained from non-diseased and diseased subjects. *Atherosclerosis* (2012) 225: 208-215.
5. Sumiko Abe-Dohmae, Shinji Yokoyama. ABCA7: a potential mediator between cholesterol homeostasis and the host defense system. *Clinical Lipidology*, (2012) 7: 677-687
  6. Kuniko Okumura-Noji, Yutaka Miura, Rui Lu, Kiyofumi Asai, Nobuo Ohta, Paul J. Brindley, and Shinji Yokoyama. CD36-Related Protein in *Schistosoma japonicum*: Candidate mediator of selective cholesteryl ester uptake from high density lipoprotein for egg maturation. *FASEB Journal*, (2013) 27: 1236-1244
  7. Hagey L.R., Ogawa S., Kato N., Satoh R., Une M., Mitamura K., Ikegawa S., Hofmann A.F. and Iida T. A novel varanic acid epimer – (24R,25S)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,24-tetrahydroxy-5 $\beta$ -cholestan-27-oic acid – is a major biliary bile acid in two varanid lizards and the Gila monster. *Steroids* (2012) 77: 1510-1521
  8. Itabe H.: Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of in vivo oxidative stress: from atherosclerosis to periodontitis. *J. Clin. Biochem. Nutr.* (2012) 51: 1-8.
  9. Suzuki M, Tsujikawa M, Itabe H., Du ZJ, Xie P, Matsumura N, Fu X, Zhang R, Sonoda K, Egashira K, Hazen SL, and Kamei M: Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration. *J. Cell Sci.* (2012) 125: 2407-2415.
  10. Kawakami Y, Hosokawa T, Morinaka T, Irino S, Hirano S, Kobayashi H, Yoshioka A, Suzuki-Yamamoto T, Yokoro M, Kimoto M, Tsuji H, Yamashita H, Doi S, Yutani C, Kato R, Itabe H., Kanada T, Hada T, Takahashi Y.: Antiatherogenic effect of guava leaf extracts inhibiting leukocyte-type 1 12-lipoxygenase activity. *Food Chem.* (2012) 131: 1069–1075.
- 学会発表
1. Ohoka N, Okuhira K, Cui H, Wu W, Naito M, Nishimaki-Mogami T. Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$ (HNF4 $\alpha$ ) Regulates Liver-specific Human ATP-binding Cassette Protein A1 (ABCA1) Gene Expression in Response to Cholesterol Depletion ASBMB Symposium "Frontiers in Lipid Biology" (2012. 9.5, Banff)
  2. Ohoka N, Okuhira K, Cui H, Wu W, Sato R, Naito M, Nishimaki-Mogami T. HNF4 $\alpha$  regulates human liver-specific ABCA1 gene expression 第44回日本動脈硬化学会学術集会(2012.7 福岡)
  3. Obama T, Takahashi, Kusunose Y, Kanoh A, Tanabe K, Hamasaki Y, Kato R, Aiuchi T, Yamaguchi T, Koba S, Kobayashi Y, Itabe H.: Characterization of oxidized phospholipids and cholesterol esters in human oxidized low-density lipoproteins by LC-ESI-MS/MS 第44回日本動脈硬化学会 2012年7月 福岡
  4. Itabe H., Obama T, Koba S, Aiuchi T, Kato R, Yamaguchi T.: Separation and characterization of oxidized LDL from human plasma ICBL, Banff, Canada 2012 9/5-9
  5. Nose F, Yamaguchi T, Aiuchi T, Yamamoto M, and Itabe H.: Perilipin-3 (TIP47) has a crucial role in formation of lipid droplets and PGE2 production in HL-60-derived neutrophils. ICBL, Banff, Canada 2012 9/5-9
- H. 知的財産権の出願・登録情報
1. 特許出願 なし
  2. 実用新案登録 なし

# GMP 準拠国産ウイルスベクターを用いた 遺伝子治療臨床研究の実施とその支援体制の構築

国立成育医療研究センター研究所  
成育遺伝研究部  
小野寺 雅史

**研究要旨** 小児難治性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療の実施に向け、1)臍帯血由来ヒト CD34 陽性細胞を用いた Dry Run の実施、2) GMP 準拠国産ウイルスベクターの有効性の評価、3) 当センター病院内での遺伝子治療準備委員会の設置、4) 患者由来 iPS 細胞を用いた慢性肉芽腫症の病態解析、5) GMP 準拠臨床用ウイルス上清の製造、6) 治療用ベクターの染色体挿入部位の解析等を行い、当研究センターで進めている慢性肉芽腫症への遺伝子治療臨床研究の実施体制の整備を行った。なお、本遺伝子治療臨床研究は平成 24 年 6 月 14 日付けで厚生労働大臣により承認された。

## 研究分担者

- (1) 峰野 純一 (タカラバイオ株式会社)
- (2) 大津 真 (東京大学医科学研究所)
- (3) 河合 利尚 (国立成育医療研究センター)

## A. 研究目的

現行の遺伝子治療は外来遺伝子を用いて疾患に治療にあたるもので、疾患の原因となる異常遺伝子を修正 (gene correction) し、疾患を治療するものではない。つまり、ウイルスベクター等により治療遺伝子を患者細胞に導入して治療するので (gene addition)、特に、原発性免疫不全症など造血幹細胞移植が治療となり得る疾患に対しては、患者造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) を回収し、そこにレトロウイルスやレンチウイルスを用いて治療遺伝子導入し、再び、造血幹細胞移植同様、患者に投与するものである。欧米ではこのような方法で数多くの原発性免疫不全症患者が治療され、疾患によっては移植医療が対象とならない患者に対する有効な治療法として認識されている。ただ、我が国にはこれら遺伝子治療を包括的に支えていく体制が整っておらず、我が国の遺伝子治療は欧米のそれと比べて大きな遅れをとっている。特に、遺伝子導入に関する培養技術や遺伝子導入細胞を投与した後の安全性評価系に関しては、大きく遅れている。

そこで本研究では、我が国の遺伝子治療を支えていく基盤整備として、臨床用ウイルスの製造やそのウイルスベクターを用いた遺伝子導入、治療後の安全性評価系としての治療ベクターの挿入部位解析など主に遺伝子治療の技術面に焦点を当てて研究を進めているが、今年度は 1) 臍帯血由来ヒト CD34 陽性細胞を用いた Dry Run の実施、2) GMP 準拠国産ウイルスベクターの有効性の評価、3) 当センター病院内での遺伝子治療準備委員

会の設置、4) ヒト由来 iPS 細胞を用いた新規ベクターの評価系の構築、5) GMP 準拠臨床用ウイルス上清の製造、6) 治療用ベクターの染色体挿入部位の解析等を行った。

## B. 研究方法

### 1. 慢性肉芽腫症造血幹細胞遺伝子治療の現状

今回の X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) に対する遺伝子治療臨床研究は平成 24 年 6 月 14 日付けで厚生労働大臣より承認されたが、使用する細胞が患者由来造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) であることから、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に抵触するのではとの疑義があり、これに関する疑義照会を「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」に対して行ったところ、当該遺伝子治療研究は「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」には抵触しないとの連絡があり (平成 24 年 10 月 18 付け)、本遺伝子治療臨床研究は最終的に承認された。

### 2. 臍帯血由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入

理研バイオバンクより研究用ヒト臍帯血を入手し、比重遠心法により単核球を分離した後、CliniMacs (Milteny Biotec 社) を用いて CD34 細胞を分離した。そして、これら細胞を X-vivo10、サイトカンとして SCF、TPO、Flt-3L、IL-3 を使用して培養し、MSCV-EGFP ベクターにて EGFP 遺伝子を導入した。同時に、タカラバイオ社が、現在、臨床用ウイルスと製造している GMP 準拠レトロウイルスベクター MFGSGP91 を用いて遺伝子導入実験を行った。

### 3. CGD 遺伝子治療に対する当センター病院の実施体制の強化

遺伝子治療臨床研究を遅滞なく進めるために、当センター病院内に遺伝子治療委員会を設置し、看護部、薬剤部、臨床検査部、院内感染対策チーム (ICT)、臨床研究センター、血液腫瘍科、総合診療部などの複数名の代表者が構成メンバーとなり、各々の状況において必要となる手順書 (SOP) を作成し、電子カルテシステムへの取り込みを行った

### 4. 患者 iPS 細胞を用いた病態解析

これまでに患者由来 iPS 細胞を樹立しているが、本年度はその前駆段階としての造血幹・前駆細胞を細胞表面マーカー、存在頻度等で分画し、さらにコロニー形成能の評価を行った。当研究室で開発した嚢状物 (iPS-sac) 形成法を用い、分化開始 14 日目に sac より回収した細胞 (d14-HSPC) について複数のモノクローナル抗体と多染色フローサイトメトリー法により解析した。ソーターにより分取した細胞についてはメチルセルロース半固形培地中で、IL-3, SCF, Epo, GM-CSF 存在下にコロニー形成を行った。クローン間のばらつきを考慮し、患者由来細胞株については 3 株を用いて健常人株との比較を行った。

### 5. 治療用ベクターの網羅的挿入部位同定法

解析する検体としてレトロウイルスベクターにて GFP を導入した CEM 細胞クローンのうちプロウイルスが 3 コピーである細胞株を使用した。これら細胞をソニケーションして断片化し、シーケンシングアダプターをライゲーションした後、電気泳動にて平均 300bp と 1kp のフラグメントを回収した (Paired-End ライブラリー)。一方、同様にソニケーションして断片化した後、平均 3k bp のフラグメントを電気泳動で回収して、末端をピオチン標識 d NTPs で修復し、環状化した後に 400 ~ 600bp で再び断片化し、アビジンカラムで回数した (Mate-Pair ライブラリー)。これらサンプルを次世代シーケンサーで解読した。

### 6. 臨床ウイルスベクターの試験製造

CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療用のレトロウイルスベクター MFGSgp91 を産生するマスターセルバンク 293-SPA-MFGS gp91-155 MCB (MAGENTA Corp) から作製したワーキングセルバンク (WCB) を用い、その臨床用レトロウイルスベクター製造時のハーベスト条件を検討した。

検討項目は以下の通りである。

- ・添加剤 酪酸ナトリウムの濃度：5 mM、10 mM
- ・ハーベスト培地量：0.1 mL/cm<sup>2</sup>、0.2 mL/cm<sup>2</sup>
- ・ハーベスト温度：32°C、37°C

### (倫理面への配慮)

遺伝子治療臨床研究に向けた研究においては、「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」(平成 16 年 2 月 19 日) に従って準備し、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(平成 14 年 3 月 27 日、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正) に基づいて行った。実施計画書作成に必要な前臨床研究の一部では、臍帯血等の造血幹細胞を利用しているが、それら一連の研究は施設内の倫理委員会の承認を受けている。動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」「動物愛護管理法の一部を改正する法律」「国立成育医療研究センターにおける動物実験に関する指針」を遵守して行う。また、挿入部位同定に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき行い、得られたデータの管理に関しては、連結可能匿名化にて、個人情報保護法を遵守して行った。

## C. 研究結果

### 1. 慢性肉芽腫への造血幹細胞遺伝子治療の実施

本遺伝子治療臨床研究は最終的に承認されたので、現在、適切な被検者選定を行っているところであり、当センターの「遺伝子治療臨床研究適応・評価判定委員会」の承認の下、遺伝子治療は開始される。

### 2. 臍帯血由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入

私達がこれまでに開発した完全閉鎖系培養システムは G-CSF にて刺激を受けた患者より末梢血単核球を採取し、培養、遺伝子導入、細胞洗浄等を全てバッグ等に行うため、一度もバッグ外に細胞を取り出すことなく再び患者に投与することができる。本研究ではヒト臍帯血由来単核球を用いて遺伝子治療臨床研究における遺伝子導入操作を行った。その結果、CliniMacs による CD34 陽性細胞の分離は 95% を超え、また、これら分離された細胞を安定して培養することができた。さらに EGFP 遺伝子を用いた遺伝子導入実験で、67.9% という極めて高い遺伝子導入効率を得ることができた。

次に、現在、タカラバイオ社が製造している臨床用ウイルスベクターの品質チェックであるが、これはウイルス自体の製造は大方終了しているが、まだ、品質試験が終了していないものを使用した。その結果、K562 細胞に対して 65.8% とこれも極めて高い遺伝子導入効率を示した。一方、実際に欧州の遺伝子治療で用いられた SF71gp91 ベクターを用いた遺伝子導入実験では 28.4% であったことから、今回、製造したウイルス上清は実際の遺伝子治療臨床研究においても使用可能で

あることが示唆された。

### 3. CGD 遺伝子治療に対する当センター病院の実施体制の強化

当研究センター病院では、電子カルテシステムを採用しているため、遺伝子治療臨床研究に対応するようカルテシステムへの追加・変更を容易にするため、プロトコルに従い被験者の記録を明記するために、患者情報、検査結果、有害事象、評価についてテンプレートを作成した。また、各工程に関する詳細な手順書として、1) 自家末梢血幹細胞採取の際の SOP、2) 病棟管理の SOP、3) 患者排泄物の SOP などを作成し、同時に入院後の被験者への説明の際に用いる「入院のしおり」や、「遺伝子治療パンフレット」などを作成した。

### 4. 患者 iPS 細胞を用いた病態解析

患者の iPS 細胞から終末分化させた好中球については PMA 刺激後の活性酸素産生が完全に欠如しており、病態の再現に成功した。しかしながら、この時点で、成熟好中球に特徴的なマーカーである CD15 陽性 CD64 陽性の細胞分画の出現頻度が健常人に比較して低い現象が観察されたため、好中球誘導前の段階の細胞、d14-HSPC について詳細に比較することとした。

既報のマーカーについて異なる蛍光色素の組み合わせ等を試行し、種々の iPS 細胞、ES 細胞を用いた比較から d14-HSPC を CD34 と CD45 の発現により明確に3分画するマーカー展開法を決定した。これにより、gp91phox 欠損 iPS 細胞株由来 d14-HSPC の分化過程に健常人と異なるパターンを見出した。次に、各分画についてコロニー形成能を比較したところ CD34-bright, CD45neg/dull 分画のみが能力を有していることを確認した。興味深いことに、患者由来 d14-HSPC に由来するコロニーは疎に配置する CFU-G タイプが有意に多く、健常人由来細胞との間に差をみとめた。

### 5. 治療用ベクターの網羅的挿入部位同定法

3種類のシーケンスライブラリー (300PE、1kPE、3kMP) の両末端のシーケンシングアダプター特異的なプライマーを用いてシーケンシングを行い、リードペアとして、それぞれ 20 倍、8 倍、4 倍の冗長性が得られた。得られたリードをヒトゲノム配列 (UCSC hg19 assembly) にマッピングしたところ、Paired-End ライブラリー (300PE、1kPE) から得られたリードは両方とも 93% が単一の配列にマップされたが、Mate-Pair ライブラリー (3kMP) から得られなかったことから、Paired-End ライブラリーの方が利用できるリードペアが多いことが判明した。また、インサート長が短いほど検出の精度 (ジャンクション検出間の

距離) は高いが、インサート長が長いほど検出感度 (検出に使われるリードペア数) は上昇することが判明した。

### 6. 臨床ウイルスベクターの試験製造

本研究で WBC から製造されるウイルス上清の回収条件として、1) ハーベスト添加剤である酪酸ナトリウムの濃度は 10mM より 5mM がよく、2) その培地量は 0.2mL/cm<sup>2</sup> より 0.1mL/cm<sup>2</sup> が良く、3) 温度に関しては 32°C よりも 37°C の方が良かった。そして、その最適条件での SupT1 細胞への感染効率は平均プロウイルスコピー数で 2.74 copies/cell であった。

### D. 考察

現在、当センターで計画している CGD への遺伝子治療は、最終的に昨年 11 月 18 日付けで厚生労働省に承認され、現在、広く遺伝子治療の被験者を募集しているところである (UMIN 000008235)。

さて、本研究の主たる目的は、実際に遺伝子を行うことではなく、遺伝子治療を行う際に必ず必要となる周辺技術の改良や開発にある。たとえば、ヒト造血幹細胞への遺伝子導入法の改良などがそれである。実際、ヒト造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) に遺伝子を導入することは研究レベルで良くあることだが、その細胞数は極めて少数で、10<sup>8</sup> 個以上の細胞に遺伝子を導入することはない。これに対して、私達は理研バイオバンクより 300 バイアルを超える臍帯血を購入し、そこから実際に臨床研究で使用する CliniMacs を用いヒト CD34 陽性細胞を分離した。そして、そこで得られた 10<sup>7</sup> 個に近い CD34 陽性細胞にバッグ等を用いて遺伝子を導入し、高い遺伝子導入効率と無菌性を含む安全性を確認した。また、ここで行われた全ての工程を文書化し、SOP としてまとめた。このような研究は一般的な研究 (新事実の発見) とは内容を異にし、なかなか通常の研究費では実施するのが難しい分野であり、ないがしろにされやすいを考えると、本研究においてこの遺伝子導入法の検討は十分に意味がある。同様に、病院内の体制強化も重要な課題である。これは、被験者への配慮はもとより、現在、遺伝子治療が生物多様性条約において第一種認定であることから通常臨床研究とは異なり、被験者管理が最重要課題となる。特に、野生型ウイルスの存在の有無は重要であり、その意味で被験者排泄物の管理は SOP により一元管理される必要がある。

本研究では、特に次世代次世代シーケンサーを用いた治療ベクター染色体挿入部の網羅的解析法に焦点を当てて研究を進めている。これは、現在、染色体挿入タイプベクター (レトロウイル

スやレンチウイルスベクター)を使用した場合、その染色体挿入部位を決定する必要があるため、以前はLN-PCRやLAM-PCRと呼ばれる制限酵素を用いた方法が行われていたが、この方法では制限酵素の種類により核酸配列に偏位(バイアス)が起り、一部の挿入部位のみが強調されたり、あるいは全く検出されない挿入部位も出現することがある。一方、今回のように物理的な方法でDNAを断片化する方法では制限酵素を使用せず、バイアスが起りにくいため欧米ではこの方法が採用されつつある。もちろん、信頼性の観点から、現在もLAM-PCRは並行して行われているが、複数の検出方法を併せて最終的に遺伝子治療の安全性を評価することは極めて重要と思われる。

今後は、当センター病院でCGDに対する遺伝子治療を行っていくが、その際生ずる種々の問題に関しても本研究内で検討していきたいと考えている。

## E. 結論

- 1) ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に効率良く遺伝子を導入できる閉鎖系培養システムを確立し、そのSOPを作成した。
- 2) 遺伝子治療臨床研究を遅滞なく進めるために当センター病院内に遺伝子治療準備委員会を設置した。
- 3) 患者由来iPS細胞を用いてCGDの好中球の特性解析を行った。
- 4) 次世代シーケンサーを用いて治療用ベクターの染色体挿入部位同定解析を行った。
- 5) 臨床用ウイルス製造のためのGMP準拠のウイルス上清を製造し、その有効性を実際の遺伝子導入の系で評価した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Fujisaka S, Iskandar K, Sekioka R, Hayashi Y, Tobe K, Kasuga M, Noda T, Yoshimura A, Onodera M, Itoh H: Loss of PDK1-Foxo1 signaling in myeloid cells predisposes to adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Diabetes* 61: 1935-1948, 2012.
- 2) 堀内清華、石黒精、中川智子、庄司健介、永井章、新井勝大、堀川玲子、河合利尚、渡辺信之、小野寺雅史. 甲状腺機能低下症と1型糖尿病に難治性下痢症を合併し、Foxp3低下を認めたIPEX症候群の女児例. *Jpn J Clin Immunol* 35:526-532, 2012.
- 3) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, et al. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without

endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood*. 2012;119(8):e45-56.

- 4) Nakanishi M, Otsu M. Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. *Current gene therapy*. 2012;12(5):410-6.
- 5) Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood*. 2012;119(26):6234-42.
- 6) Lin HT, Otsu M, Nakauchi H. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2013;368(1609):20110334.
- 7) Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, et al. Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Blood*:119, 5458-5466, 2012.
- 8) Imagawa T, Takei S, Umebayashi H, Yamaguchi K, Itoh Y, Kawai T, et al. Efficacy, Pharmacokinetics, and Safety of Adalimumab in Pediatric Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis in Japan. *Clin Rheumatol*: 31, 1713-1721, 2012.
- 9) 河合利尚. 慢性肉芽腫症と他の食細胞機能異常症. *小児内科* 2012; 44 巻:242-243

### 2. 学会発表

- 1) ONODERA M. What we learnt from the gene therapy for ADA deficiency. Joint symposium Japanese and European societies2; Genetic diseases in the ESGCT 20<sup>th</sup> annual meeting.
- 2) Inaki M, Onodera M. Gene transfer to human hematopoietic cells with GaLV pseudotyped retroviruses concentrated from serum-free supernatants by PEG precipitation with polyvalent immunoglobulin. The 15th Annual Meeting of American Society of Gene&Cell Therapy, Philadelphia, 2012. 5.16-19.
- 3) Protection of hematopoietic stem cells from stress-induced functional impairment by very low-dose interleukin-1 stimulation. Makoto Otsu et al. The 20th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy. 2012, Paris.
- 4) Pleiotropic nature of hematopoietic stem cell responses to an inflammatory niche environment. Makoto Otsu. The 2nd Joint Global COE

Symposium of the IMSUT & RCAST Global  
COE, The Univ of Tokyo and Chiba Univ Global COE.  
2013, Tokyo

5) 田村英一郎、河合利尚、中澤裕美子、原山静子、  
清水泰岳、伊藤玲子、井田博幸. 慢性肉芽腫症腸  
炎における腸内細菌スクリーニング検査. 2012 第  
44 回小児感染症学会

**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



## システムアプローチの構築による創薬ターゲットの 同定と医療への応用

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  
高田 修治

### 研究要旨

ポストゲノムアプローチである MGC ライブラリを使用したハイスループット遺伝子導入アッセイにより *IL-6* の mRNA 安定化に関わる因子、TGF $\beta$  シグナルの制御に関わる因子を探索した。

### 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所 システム発生・再生医学研究部 浅原弘嗣
- (2) 慶應義塾大学医学部 分子生物学 塩見春彦
- (3) 日本臓器製薬株式会社生物活性科学研究所薬理研究部 内木充
- (4) 参天製薬株式会社リウマチ研究開発センター 青野浩之

### A.研究目的

世界的に高齢化社会を迎えることから、今後さらに老年者が増加する中で、変形性関節症 (Osteoarthritis: OA)、リウマチ疾患 (Rheumatoid arthritis: RA) の発生率は増加が継続と推定される。OA や RA による関節の破壊は、患者に局所の苦痛に加え運動に制限が加わるため、はかりしれない苦痛を与える。近年、OA や RA に対する新規治療法や診断法の発見には注力され、革新的かつ効力の高い治療薬の開発が待たれている。生物学的製剤の登場はこれらの疾患治療にパラダイムシフトをもたらし、道を拓いたが、副作用の問題等、未だ解決すべき点が多い。移植、再生を含む根本的治療の開発が待たれているが、骨・軟骨の発生、分化を制御する分子メカニズムなど依然解決されていない部分が数多く残されている。

関節炎治療市場は 2010 年には 210 億ドルの規模になると予測され、新薬の開発は、製薬企業にとっては医療への高い貢献だけでなく、またとない市場機会が与えられていると言える。しかし、創薬において、従来の手法では、すでにほとんどの探索 (スクリーニング) が終わっており、新規の創薬ターゲットを見出すには、これまでにない新規のスクリーニング法により探索する必要がある。

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・再生医学研究部が運用しているハイスループット遺伝子導入スクリーニング

は、疾患遺伝子の発現に関与する因子を、網羅的かつ効率的に探索することができるシステムの一つであり、既存の方法ではできない新しい側面での創薬ターゲットを高効率で見出すことの出来るシステムである。集積されたデータの解析・利用により、創薬をはじめ、あらゆる分野で極めて重要なデータが得られることが期待できる。また、このアッセイ系は、遺伝子導入する cDNA の代わりに、低分子化合物を用いたスクリーニングにも利用でき、より創薬に向けた研究開発、さらには、新しいポストゲノムの複合的機能的遺伝子スクリーニングとして、他の疾患治療研究のモデルとなることが期待される。

本研究では、このハイスループット遺伝子導入アッセイシステムを運用し、炎症性疾患に関わる遺伝子の発現を制御している遺伝子を探索することで疾患遺伝子のスクリーニングを行い、創薬ターゲットの同定を目指す。

### B.研究方法

#### (1) *IL-6* の mRNA の安定化に関わる因子のスクリーニング

昨年度までに、*IL-6* の mRNA 安定化に関わる AU-rich element (ARE) を含む 3' 非翻訳領域 (UTR: Untranslated region) を繋いだレポーター・プラスミドと Mammalian Gene Collection (MGC) ライブラリの約 6,000 因子の発現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っている。その結果得られた候補因子について、遺伝子データベースの Gene Ontology 情報に基づいて候補因子の絞り込みを行なった。絞り込んだ候補のうち、12 因子について、*IL-6* の 3'UTR より、ARE を含む領域と含まない領域をそれぞれ繋いだレポーター・ベクターを作製してルシフェラーゼ・アッセイを行なった。

## (2) TGFβ シグナルを制御する因子のスクリーニング

TGFβ シグナル伝達系を制御する因子のスクリーニングのため、MGC ライブラリと、TGFβ シグナルを伝える Smad3/Smad4 複合体に応答するレポーター・プラスミド (pCAGA12-luc) を用いてハイスループット遺伝子導入アッセイを行った。

MGC ライブラリは、384 ウェルプレートに 50ng/well で高密度に配置し、密閉して-20℃で凍結保存している。このアッセイ・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、Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。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 ウェルプレートに空きのウェルを用意し、バックグラウンドを測定する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。

### (倫理面への配慮)

本研究においては、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。ヒトクローン胚、ヒト ES 細胞などは使用せず、患者サンプルのヒト遺伝子解析は行っていない。遺伝子治療などの臨床・疫学研究はこれを行わない。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、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、独立行政法人国立成育医療研究センターの動物実験委員会の承認を得ている。遺伝子組み換え実験については、当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。

今後も必要な場面では、独立行政法人国立成育医療研究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

### (1) IL-6 の mRNA 安定化に関わる因子のスクリーニング

昨年度までに炎症性サイトカインである *IL-6* の mRNA 安定化に関わる AU-rich element (ARE) を含む 3'非翻訳領域 (UTR:Untranslated region) を繋いだレポーター・プラスミドを用いて、MGC ライブラリの発現プラスミドを高密度に配置した 383 ウェルプレートと自動分注機を用いてハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、候補因子を得ている。これらの候補因子は直接あるいは間接的に *IL-6* の 3'UTR に作用する候補因子群である。本研究では直接 *IL-6* の 3'UTR に結合して発現を制御する因子を創薬ターゲットとして同定するため、遺伝子データベースに登録されているそれぞれの候補因子の Gene Ontology を調べ、nucleotide binding が付与されている因子を調べ、二次スクリーニングの対象とした。また、これまでに機能が未知の因子についても二次スクリーニングの対象とし、この過程により 20 弱の候補因子を得た。二次スクリーニングとして、mRNA の安定化に重要な ARE 配列に直接作用するか検討するため、*IL-6* の 3'UTR の ARE 配列が含まれる領域と含まれない領域を繋いだレポーター・ベクターを作製し、これらのベクターを使用してレポーター・アッセイを行なった。これまでに 12 個の候補因子について検討を行ない、RNA 結合ドメインを持つ候補因子 X を有力な創薬ターゲットとして同定した (図 1)。

この候補因子は *IL-6* の mRNA の安定性に関わる因子のスクリーニングより得られた候補であることから、この候補因子 X の gain-of-function および loss-of-function の解析を細胞と実験動物を用いて行い、*IL-6* の発現亢進に伴う炎症反応にどのように作用するかについて検討する計画を立てた。

細胞においてはヒト細胞株に候補因子 X の過剰発現および発現抑制を行ない、*IL-1β* や *TNF-α*、LPS 刺激等による *IL-6* の発現誘導における影響について調べることを計画した。そのため、候補因子 X を発現させるレンチウイルスベクターの設計を行ない、作製した。コントロールとして既に *IL-6* の安定化に関わることが報告されているトリステトラプロリン (tristetraprolin: TTP) (Zhao W., et al., J Interferon Cytokine Res. 2011) についてもレンチウイルスベクターを作製した。また、*in vivo* での炎症反応における影響を解析することを目的とし、関節炎モデルマウスを使用した過剰発現および発現抑制の実験を行なうことを計画した。このため、候補因子 X を過剰に発現するトランスジェーンを設計し、マイクロインジェクション法により導入し、目的の DNA 断片が組み込まれたトランスジェニックマウスを得た。

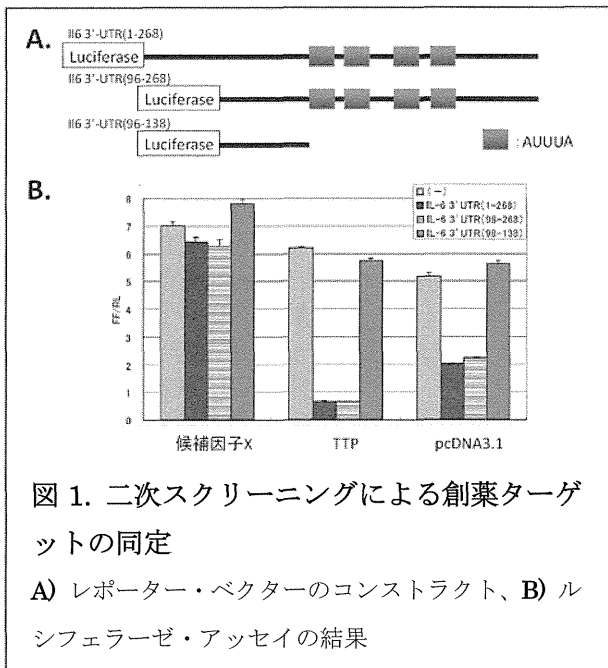


図 1. 二次スクリーニングによる創薬ターゲットの同定

A) レポーター・ベクターのコンストラクト、B) ルシフェラーゼ・アッセイの結果

## (2) TGFβ シグナルを制御する因子のスクリーニング

### 1. スクリーニングの条件検討

TGFβ シグナルを制御する因子を探索するため、MGC ライブラリを用いたハイスループット遺伝子導入アッセイを行うことを計画した。このため、TGFβ シグナル応答性のルシフェラーゼ・レポーターとして多く使用されている pCAGA12-luc をレポーターとして用い、MGC ライブラリの遺伝子導入とともに低濃度の TGFβ を培養細胞に加え、ルシフェラーゼ活性を増加あるいは低下させる遺伝子を探索することにした。

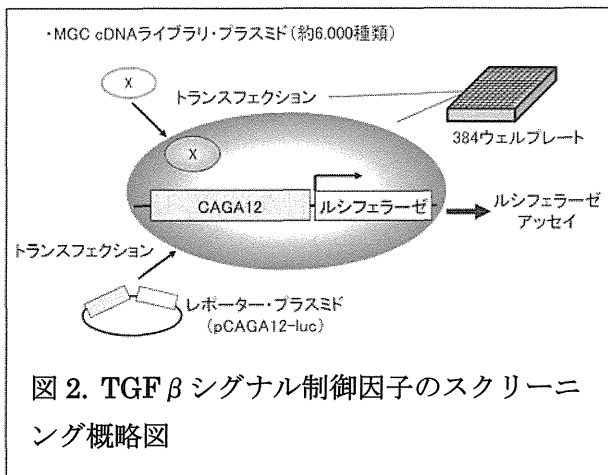


図 2. TGFβ シグナル制御因子のスクリーニング概略図

はじめに、既知の TGFβ 制御因子と pCAGA12-luc を使用して 384 穴プレートで、細胞数、レポーター・プラスミド量、TGFβ の濃度、培養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高い 293T 細胞を用いることにし、条件検討を行なった結果、細胞数 10,000、レポーター・プラスミド 20ng/well、FuGENE HD

Transfection Reagent は 0.2μl、TGFβ は 0.1ng/ml の添加で 12 時間培養という条件において感度良く既知因子による制御が観察できたため、この条件を用いてスクリーニングを行うこととした (図 2)

### 2. スクリーニングの評価

条件検討により決定した条件でハイスループット遺伝子導入アッセイを行なった。MGC ライブラリは約 6,000 個の遺伝子の発現プラスミドとなり、既存のプレートで最もウェル数の多い 384 ウェルプレートに配置させても 18 枚に相当する。複数のプレートでアッセイすることにより、一度に同条件で行なったとしても、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る。この問題を解決させるために、それぞれのプレートに MGC ライブラリのプラスミドの配置されていない、コントロールとなるウェルを用意し、そのウェルの数値により各プレートのバックグラウンドを補正する作業を加えることを計画した。

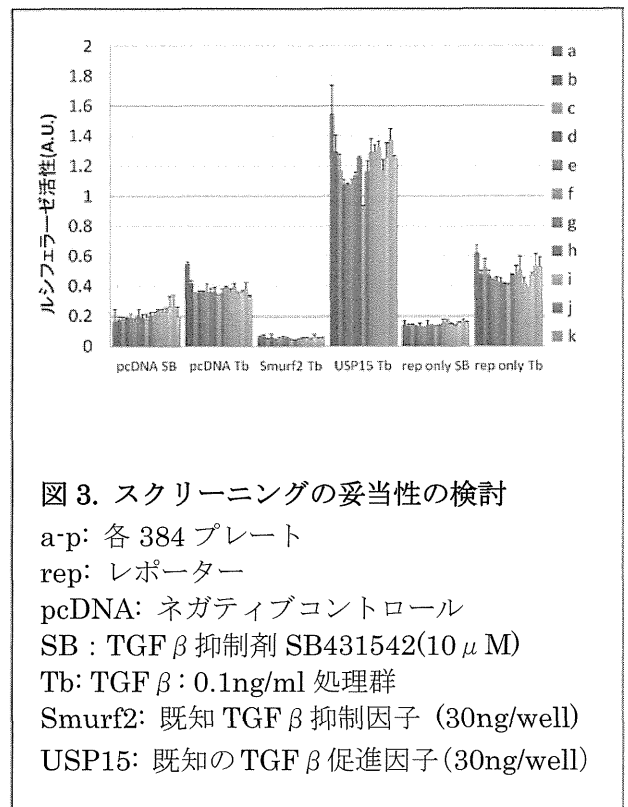


図 3. スクリーニングの妥当性の検討

a-p: 各 384 プレート

rep: レポーター

pcDNA: ネガティブコントロール

SB : TGFβ 抑制剤 SB431542(10 μM)

Tb: TGFβ : 0.1ng/ml 処理群

Smurf2: 既知 TGFβ 抑制因子 (30ng/well)

USP15: 既知の TGFβ 促進因子(30ng/well)

まず、上記のように複数のプレートで行なったアッセイで得られたスクリーニングデータであるため、これを一つのデータとして比較する妥当性について、各プレートに存在するコントロールウェルの値を比較することで検討した。各プレートのコントロールウェルの値を比較すると、数値がばらつくものの、その平均値からの大きなずれがないことがわかった (図 3)。この結果より、本研究で得られたスクリーニングデータは同一条件

件下の一連のデータとして処理することは妥当であると結論し、解析を進めた。

### 3. 一次候補因子の選定およびバリデーション

上記スクリーニングによって得られた結果のうち、pCAGA12-luc のルシフェラーゼ活性を亢進させる遺伝子上位 50 および抑制させる遺伝子上位 50 を一次候補因子とした。これらの中には TGFβシグナルの伝達因子である Smad3や既知の抑制因子である TRAF2 等も含まれており、スクリーニングの妥当性を支持する結果であった。これらの因子について 96 ウェルプレートによる二次スクリーニングを行なった。96 ウェルはスクリーニングで用いた 384 ウェルに比較して 4 倍の表面積であることから細胞数やレポーター・プラスミド量は 4 倍とし、TGFβ 刺激の強度・時間はスクリーニングと同様、候補因子のプラスミド量は 10、30、100ng/well と 3 条件により検討した。その結果抑制因子では上位 50 のうち 46 因子、促進因子では上位 50 のうち 42 因子でスクリーニングの結果を再現する結果が得られた (図 4)。

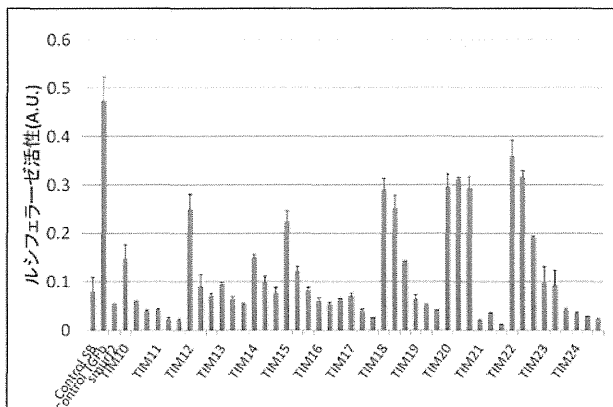


図 4. TGFβ 抑制因子候補の二次スクリーニング

SB : TGFβ 抑制剤 SB431542(10 μM)  
 TGFβ: TGFβ 0.1ng/ml 処理。SB 処理サンプル以外は TGFβ 処理サンプル  
 Smurf2: 既知 TGFβ 抑制因子 (30ng/well)  
 TIM: TGFβ 抑制因子候補. 各因子左から 10/30/100ng/well の 3 カラム

### D. 考察

#### (1) IL-6 の mRNA 安定化に関わる因子のスクリーニング

これまで、遺伝子発現は転写因子等による転写調節を中心に解析されてきているが、近年、転写後に発現が調節されることの重要性が明らかになってきている。転写後調節とは転写後の mRNA の安定化、スプライシングの制御、翻訳の調節等、

遺伝子が遺伝子産物 (タンパク質) の形成に至るまでに受ける調節のことであり、これらの制御により、実際に機能するタンパク質の合成量が調整されている。

ARE は多くの mRNA の 3'UTR に存在し、mRNA の安定化に関わることが報告されている (Chen CY., et al., Trends Biochem Sci. 1995)。この領域に様々な RNA 結合タンパク質が結合することで、mRNA を安定化あるいはその逆に不安定化 (分解) へと導くことになる。炎症反応においては、重要な炎症性サイトカインである TNF-α と IL-6 の 3'UTR に存在する ARE が、それらの mRNA の安定化に関わることが示されており (Neininger A., et al., J Biol Chem. 2002)、IL-6 の ARE に TTP が結合し、mRNA を不安定化することが報告されている (Zhao W., et al., J Interferon Cytokine Res. 2011)。しかしながら、これらの炎症性サイトカインの mRNA の安定化・不安定化に関わる因子とその制御メカニズムはそのほとんどが未解明のままである。これらの炎症性サイトカインの発現は変形性関節症やリウマチ疾患を含む様々な炎症性疾患の病態に関わることから、これらの mRNA の安定化・不安定化に関わる新たな因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。

本研究では IL-6 の ARE を含む 3'UTR を繋いだレポーター・プラスミドと約 6,000 因子の発現プラスミドを使用してハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、IL-6 の mRNA の安定化に関わる因子を探索し、新規の IL-6 の発現制御因子候補を複数見出した。また、有力な創薬ターゲットを絞り込むことを目的として二次スクリーニングを行い、候補因子 X を IL-6 の新規発現制御因子として同定した。この候補因子は二次構造として RNA 結合ドメインを持つことから、直接 IL-6 の 3'UTR に結合し、IL-6 の発現制御に関わると考えられる。IL-6 の異常産生はリウマチをはじめとした炎症性疾患に深くかかわることから、この候補因子 X は IL-6 の発現制御を介してこれらの疾患に関わる可能性が考えられる。今後、培養細胞や実験動物を用いた検討により IL-6 の産生にどの程度関わるか、実際に炎症性疾患の病態に関わるか等について調べ、これらの解析により新たな病態メカニズムを明らかにする。また、コラーゲン誘導関節炎(CIA)や zymosan 誘発性関節炎などの自己免疫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。これらにより、新規治療法や診断法の開発を目指す (図 3)。

また、一次スクリーニングから二次スクリーニングに進むにあたり、有力な候補因子に絞り込むため、直接 IL-6 の 3'UTR に結合して制御に関わりそうにない因子は除外したため、多くを解析対