

第6回寄生虫感染免疫研究会、日本、立山
2014年3月8-9日

酒井一成、森 美穂子、野崎智義、増間碌郎、高
橋洋子、大村 智、塩見和朗 微生物二次
代謝産物からの赤痢アメーバ原虫特異的含
硫アミノ酸代謝酵素阻害物質の探索 日本
農芸化学会 2014 年度大会 東京 March
27-30, 2014.

山野安規徳、永宗喜三郎 シストにも有効な抗
トキソプラズマ薬シード 候補の探索”
第 21 回分子寄生虫学ワークショップ 2013
年 8 月、神戸

松原立真、小嶋美紀子、田原美智留、Syed Bilal
Ahmad Andrabi、福士路花、川原史也、山
野安規徳、榊原均、永宗喜三郎 寄生性原
虫が産生する植物ホルモンの機能解析 第
2 回日本細胞共生学会若手の会 2013 年 9
月、京都

松原立真、小嶋美紀子、田原美智留、Syed Bilal
Ahmad Andrabi、福士路花、川原史也、山
野安規徳、榊原均、永宗喜三郎 寄生性原
虫が産生する植物ホルモンの機能解析 第
46 回日本原生動物学会大会 2013 年 11 月、
広島県東広島市

永宗喜三郎 寄生・共生におけるゾンビ化機構
の分子生物学的解析 第 36 回日本分子生物
学会 2013 年 12 月、神戸

川原史也、鶏コクシジウム症と壊死性腸炎を再
考する、平成 25 年度秋季全国鶏病技術研修
会、2013 年 10 月

川原史也、鶏コクシジウム原虫の分子標的、動物
用ワクチン-バイオ医薬品研究会、2013 年 9
月

福士実咲、柴谷恵太、Hendri Aldrat、北潔、
Fevzi Daldal、坂元君年 Rhodobacter
capsulatus と Rhodospirillum rubrum 間での
キメラ型コハク酸 - ユビキノン還元酵素の
作製 第 86 回日本生化学会大会 平成 25
年 10 月

G. 知的所有権の出願・登録状況

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他

プロテインノックダウン法を基盤とする創薬研究

国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
内藤 幹彦

研究要旨 エストロゲン受容体を選択的に分解する SNIPER(ER)ヲ開発した。SNIPER(ER)は、ER 分解後に ROS 産生を誘導し、乳がん細胞にネクロシスを引き起こす事を明らかにした。また SNIPER(ER)とは構造の異なる新規 ER 分解誘導剤を開発した。

研究組織

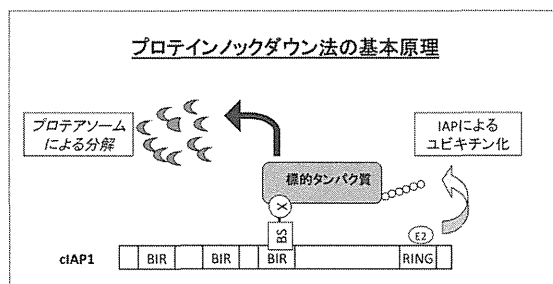
- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 内藤幹彦、栗原正明、柴田識人、服部隆行
- (2) 東京大学医科学研究所 井上純一郎
- (3) 同志社大学生命医科学部 西川喜代孝
- (4) 武田薬品工業(株) 化学研究所 長展生

A. 研究目的

癌治療における選択的キナーゼ阻害剤など、病気の原因となっているタンパク質の機能を阻害する分子標的治療薬の開発が近年盛んに行われている。しかし治療の標的となるタンパク質の中には、病態と関連する酵素活性がないために阻害剤を開発しにくいタンパク質もあり、新しい作用機序をもった画期的医薬品の開発が望まれている。病気の原因となっているタンパク質を選択的に分解する事ができれば、従来にない新しい医薬品を創製できると考えられるが、タンパク質の分解を選択的に制御する技術は国内外ともにほとんど研究が行われていない。

課題責任者らは、独自に分子デザイン・合成した低分子化合物を使って、標的タンパク質を特異的にユビキチン化し、プロテアソームで分解するプロテインノックダウン法を開発してきた(JBC 283, 8961-8 (2008); JACS 132, 5820-6 (2010); FEBS Lett 585, 1147-52 (2011)他)。このプロテインノックダウン法は、ユビキチンリガーゼ cIAP1 に結合する小分子(BS)と標的タンパク質に結合するリガンド(X)とのハイブリッド化合物(BS-X)で両タンパク質を架橋し、標的タンパク質を特異的にユビキチン化するという独創的な作用機序に基づいている(図1)。原理的には、リガンド(X)を置換することにより様々なタンパク

質の特異的分解に応用できる汎用性の高い技術である。



本研究ではこのプロテインノックダウン技術を基盤とした創薬研究を行う。具体的には、標的タンパク質と結合するリガンドを利用して新しい SNIPER 化合物を開発し、そのプロテインノックダウン活性を *in vitro*, *in vivo* で測定し医薬品候補化合物としての評価を行う。適当なリガンドが見つからない標的タンパク質に対しては、新規結合リガンドのスクリーニングを行い、得られたリガンドを用いて SNIPER 化合物の開発をめざす。

本研究の最終的な目標は、病原性タンパク質を分解する新しい作用機序の新規医薬品を開発する事であるが、今年度は昨年度合成した SNIPER(ER)のプロテインノックダウン分子機構及び細胞死誘導機構を明らかにする事、エストロゲン受容体(ER)を標的とする新規エストロゲン受容体分解誘導剤を合成してその活性を評価する事、及び NF κ B シグナル制御因子やキナーゼと結合する新規リガンドを探索する事を目的とした。

B. 研究方法

エストロゲン受容体を標的とする SNIPER(ER)の細胞死誘導機構

ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞及び T47D 細胞を用

いて SNIPER(ER)のタンパク質ノックダウン活性を Western blot 法により評価した。また、ER 分解がユビキチン-プロテアソーム系を介しているかどうか調べるために、プロテアソーム阻害剤 MG132 の影響を試験した。このタンパク質ノックダウン活性における cIAP1 の必要性を調べるため、siRNA を用いて cIAP1 を deplete した条件で同様な実験を行った。ER 下流のシグナルに与える影響は、ER によって転写活性化を受ける pS2 遺伝子の発現を qRT-PCR で定量する事により解析した。細胞死の測定は細胞形態変化及び Propidium Iodide 色素排除法により行った。ネクローシスの進行は、培養液への HMGB1 放出を Western blot 法により解析した。ROS 産生は、細胞に取り込ませた Cell ROX Green Reagent により定量した。

新規エストロゲン受容体分解誘導剤の開発

フルベストラントはエストラジオール骨格に直鎖状の官能基を有した構造であり、その直鎖状の官能基によってERのHelix12の構造が不安定化され、ERの分解が誘導されると考えられている。そこでタモキシフェンに直鎖状の官能基を導入した化合物をデザイン・合成し、その化合物のER α 分解誘導活性について検討した。

タモキシフェン骨格を基本骨格として数種の直鎖アルキル基を有する誘導体を設計した。ER α 陽性乳がん細胞株MCF-7に合成した化合物を添加し、6時間後のER α の発現量をウェスタンブロッティングにて評価した。

His タグタンパク質を標的とした SNIPER(His)の開発

昨年度合成した SNIPER(His)は、極性が高く細胞内への導入効率が低いことが示唆された。細胞内への導入効率を改善するために、(i)化合物修飾により疎水性を高める、(ii)リポソームに胞埋する、(iii)炭酸カルシウムアパタイトと複合体を形成する、(iv)細胞膜透過性ペプチドと複合体を形成する、等の方法で細胞膜透過性が向上するか検討した。

BCR-ABL 等のキナーゼに結合するリガンド探索

新規ペプチド性リガンドの探索は、西川らが開発した多価型ペプチドライブラリー法（特願 2013-13746、特許第 4744443；

2011/5/20、特願 2011-017295、特願 2010-019731、特願 2010-019728、PCT/JP2005/012286）を用いた。使用する多価型ペプチドライブラリーは、各々の標的タンパクについて、結晶構造ならびに結合リガンドの配列情報を基に最適化を行う。各標的に対する結合能力を指標として本多価型ペプチドライブラリーをスクリーニングすることにより、高親和性結合モチーフを同定する。スクリーニングにはビーズに固定された状態でのタンパクが大量に必要となる。そこで、BCR-PHDならびにその変異体についてはN末端あるいはC末端に His-tag を導入したものを大腸菌から大量調製した。ALKdについては、N末端に His-tag を導入した ALKd ならびにその変異体を BacPAK バキュロウイルス発現システムを用いて調製した。

NF κ B シグナル制御因子に結合するリガンド探索

TRAF6 の TRAF-C ドメインが P-X-E-X-X-Ar/Ac（X：任意のアミノ酸、Ar：芳香族アミノ酸、Ac：酸性アミノ酸）配列を含むペプチドに特異的に結合することから、TRAF-C ドメインを含む GST 融合タンパク質（野生型及び変異型）を調製し、上記と同様にペプチドライブラリーから TRAF-C ドメインに強く結合する天然に存在しないペプチド配列を同定するためのスクリーニング系を構築した。

（倫理面への配慮）

遺伝子組換え実験は、カルタヘナ法を遵守し、各研究分担者が所属する研究機関の遺伝子組換え実験安全管理規則等に則って実施する。動物実験は、動物愛護法を遵守し、各研究分担者が所属する研究機関の動物実験規則に則って実施する。

C. 研究結果 エストロゲン受容体を標的とする SNIPER(ER)の開発と細胞死誘導機構

昨年度合成した SNIPER(ER)は（図2）、乳がん由来 MCF7 細胞及び T47D 細胞において、用量依存的に ER 減少させる活性を示す。

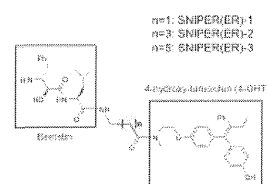


図2、SNIPER(ER)の構造

この減少はプロテアソーム阻害剤 MG132 添加によって阻害された (図 3)。また siRNA を用いて cIAP1 を予め deplete した細胞では SNIPER(ER) による ER 減少が抑制された。これらの結果から、化合物デザインの際に想定したとおり、SNIPER(ER) は cIAP1 によるユビキチン化とプロテアソームによる分解を引き起こす事が示された。SNIPER(ER) 処理した細胞では、ER によって転写活性化を受ける pS2 遺伝子の mRNA 量が減少したことから (図 4)、ER タンパクの減少が ER 下流シグナルを抑制している事がわかった。

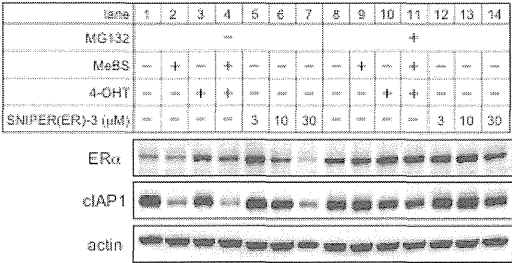


図 3、プロテアソーム阻害剤による ER 分解の阻害

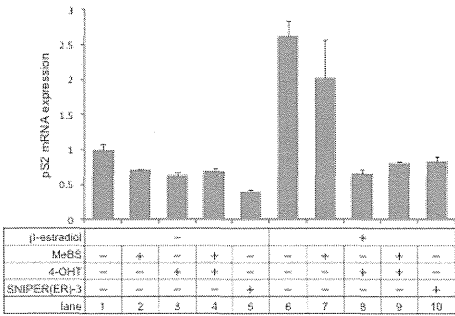


図 4、ER 下流シグナルの抑制

興味深い事に、SNIPER(ER) 処理した MCF7 細胞は速やかに細胞死を起こしたが、MG132 添加により ER 分解を阻害するとこの細胞死も阻害された。また ER を発現していない Hela 細胞や U2OS 細胞では MCF7 細胞で見られたような速やかな細胞死が見られなかった (図 5)。

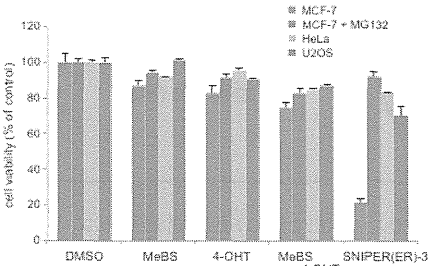


図 5、SNIPER(ER) による細胞死誘導

SNIPER(ER) による細胞死におけるアポトーシスの関与を調べるために、アポトーシス実行

因子カスパーゼの活性化を調べたが全く活性化は見られなかった。一方、ネクローシスのマーカーとして知られている HMGB1 は、SNIPER(ER) 処理した細胞から培養液中に多量に放出される事がわかった (図 6)。これらの結果から、SNIPER(ER) は乳がん細胞において ER 分解後急速にネクローシス様の細胞死を誘導する事が示された。

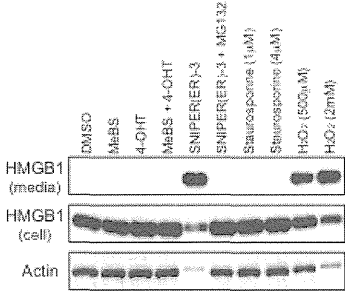


図 6、SNIPER(ER) による HMGB1 の遊離

ネクローシスでは、細胞内で産生される Reactive Oxygen Species (ROS) が重要な役割を果たしている事が知られている。そこで SNIPER(ER) 処理細胞での ROS 産生を調べた結果、細胞死に先立って ROS 産生が起こっていること、MG132 添加により ER 分解を阻害すると ROS 産生も阻害されることがわかった。また ER を発現していない U2OS 細胞では SNIPER(ER) 処理しても ROS 産生は認められなかった (図 7)。一方、ROS スカベンジャーの NAC を処理すると、SNIPER(ER) 処理による細胞死は阻害されたが、ER 分解は阻害されなかった。

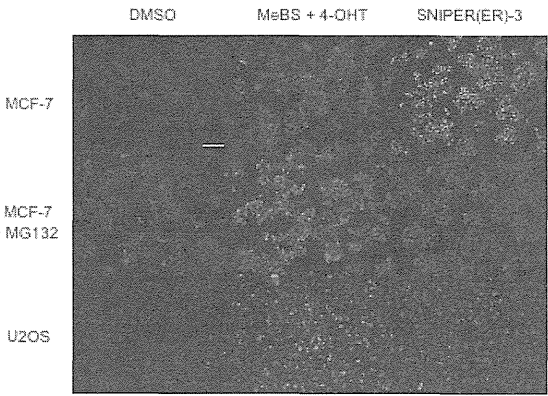


図 7、SNIPER(ER) による ROS 産生

これらの結果から、SNIPER(ER) 処理により MCF7 乳がん細胞では (1) cIAP1 によるユビキチン化とプロテアソームによる ER 分解が起こり、(2) その後 ROS が産生され、(3) 続いてネクローシスを起こす事が明らかになった (図 8)。

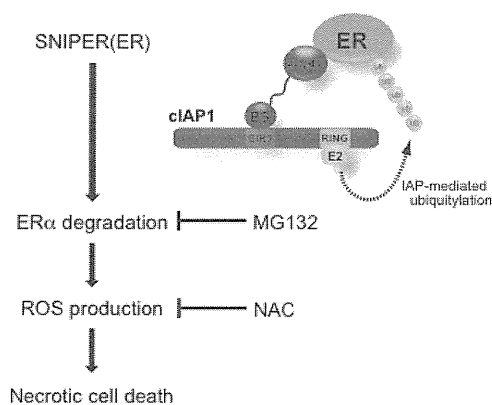
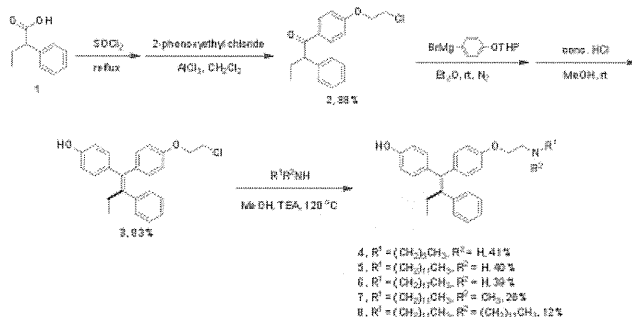


図 8、SNIPER(ER)の作用機序の模式図

新規エストロゲン受容体分解誘導剤の開発

スキーム 1 の合成ルートに従い、化合物 4-8 を合成した。各化合物の最終ステップの収率は 12-41% であり、良好な結果を得た。これらの化合物を用いて細胞内 ERα のタンパク量をウェスタンブロッティングにて検出したところ、化合物 4、6 では ERα の量に変化はなく、化合物 5 で ERα の減少が認められた(図 9)。また、化合物 5 と共にプロテアソーム阻害剤 MG132 を作用させたところ、ERα の減少が阻害された。このことは、化合物 5 による ERα の減少には、プロテアソームによるタンパク質分解系が関与していることを示唆している。以上のことから、化合物 5 は ERα 分解誘導活性を有することが示唆された。



スキーム 1、新規 ER 分解誘導剤の合成

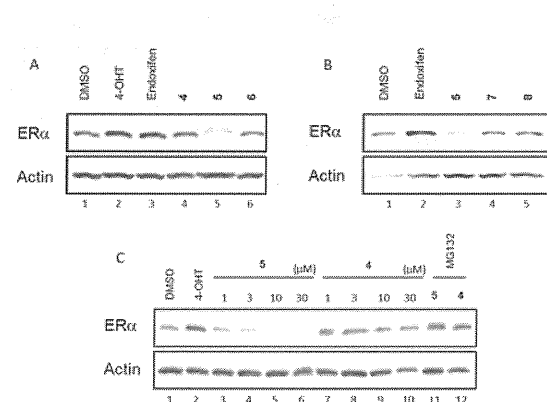


図 9、新規 ER 分解誘導剤による ER の分解

His タグタンパク質を標的とした SNIPER(His)の開発

昨年度までの研究で、単純に Bs と NTA のみをつなげた SNIPER (His)-1 は、細胞内 His タグタンパク質を分解する活性を有していないことが明らかになっている。NTA の 3 つのカルボン酸は水溶性が強く、細胞膜透過性を低下させていることが考えられたので、疎水性残基の挿入、NTA のカルボン酸のマスキング、リポソーム化して細胞へ導入、炭酸カルシウムアパタイト化して細胞へ導入等の方法にて SNIPER (His) を細胞内へ取り込ませることを試みた。しかしながら、これらの方法では SNIPER (His) による His タグタンパク質の分解誘導は見られなかった。

細胞膜透過性が見られなかった SNIPER (His) は、in vitro では His タグタンパク質と cIAP1 を架橋する活性を示す事が確認されている。そこで、細胞膜透過性を示さない SNIPER (His) -1 を効率良く細胞内へ運ぶことを目的に、細胞膜透過性ペプチド (HIV-TAT (48-60)) に 6xHis を付けたペプチド (HIV-TAT-His) を作製した(図 10)。試験管内にて HIV-TAT-His と SNIPER (His)-1 の複合体を形成し、細胞に作用させると、cIAP-1 の分解が誘導され、SNIPER (His)-1 が細胞内に取り込まれたことが示唆された。さらに、この複合体は 7 個の連続した His 残基を持つ c-Cbl を濃度依存的に減少させる活性を有していた。これらのことから、HIV-TAT-His/SNIPER (His)-1 複合体は、細胞内に取り込まれ、cIAP-1 と His タグタンパク質と結合し、両タンパク質を分解することが出来ることが示唆された。

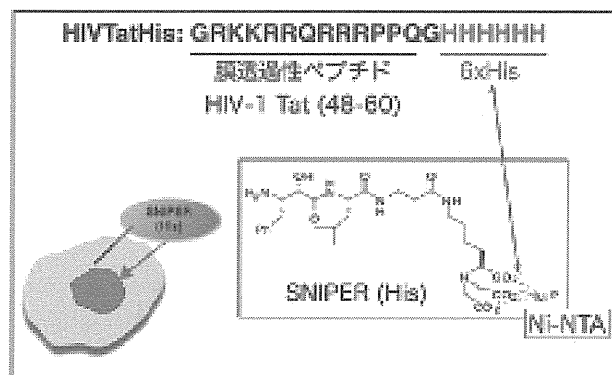


図 10、SNIPER(His)と膜透過性ペプチド

キナーゼに結合するリガンド探索

H24 年度において、BCR-ABL の PH ドメイン (BCR-PHd) を大腸菌内で発現誘導する条件の最適化を行い、N 末端に His-tag を導入した

BCR-PHd の高純度調製法を確立している。また、可溶化した BCR-PHd を用い、ニトロセルロース上にスポットした各種 lipid との結合活性を検討し、PI4P に対してのみ強い結合活性が認められることを確認している。しかしながら本評価系は安定性に乏しく、BCR-PHd の品質を評価する評価系として使用することが困難であるという問題があった。そこで、本年度では、逆に BCR-PHd を固定化し、PI4P 等の lipid をビオチン標識した PE を含む lipid vesicle に含有させ、BCR-PHd に結合後、標識アビジンを用いて結合能力を評価する系の確立を目指した。本系では、リガンドとなる lipid が vesicle 上に存在しているために、より生理的に近い相互作用の検出が可能となる。その結果、極めて高い s/n 比で PI ならびに PI4P 依存的な結合が確認できた (図 1 1)。これまで BCR-PHd と PI との結合は弱いとされていたが、本結果はより生理的な条件下では PI との相互作用が存在する可能性を示唆している。

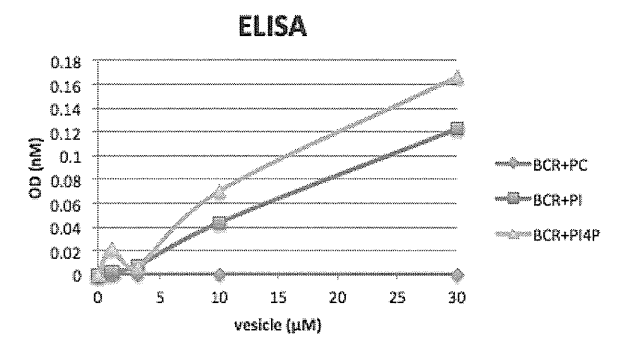


図 1 1 BCR-PHd と PI、PI4P との結合

また ALK の高度な基質認識に関わっている基質結合部位 (ALKd) に対するリガンド探索では、N 末端に His-tag を導入した ALKd を BacPAK バキュロウイルス発現システムを用いて調製した。これまでに高純度 ALKd を得る条件を確立した。今後 kinase assay を行い活性を確認するとともに、ALKd に存在し基質との相互作用に関与している各アミノ酸の変異体を調製してゆく。

NFκB シグナル制御因子に結合するリガンド探索

前年度までに TRAF6 の TRAF-C ドメインを含む TC-a (aa 282-508, Coiled coil 全体を含む)、TC-b (aa 333-508, Coiled coil の一部を含む)、TC-c (aa 346-504, Coiled coil の一部を含む) の GST 融合タンパク質の調製に

成功し、その内 TC-b と TC-c は TRAF6 結合配列と結合するものの TC-a は結合しないことを明らかにした。他の研究グループから、TC-b は多量体形成が可能である事が報告されており、このことはペプチドライブラリーのスクリーニングに有利であるため、今後 TC-b をスクリーニングに使用することにした。

ペプチドライブラリーから TRAF-C ドメインに結合するペプチド配列をスクリーニングする際、TC-b の GST 部分に結合するペプチド配列を候補から除去するために、P-X-E-X-X-Ar/Ac 配列に結合できない TC-b 変異体を作製した。従来の研究から TRAF6 の N 末端側から 471 番目の Phe と 473 番目の Tyr が TRAF-C ドメインと P-X-E-X-X-Ar/Ac 配列との結合に関与することが知られていたため、TC-b の当該アミノ酸を Ala に置換した変異体 (TC-b mut) を発現する plasmid を構築し、GST 融合タンパク質 TC-b mut を精製した (図 1 2)。TC-b と同様に TC-b mut も発現誘導されたタンパク質の多くが不溶性であったが、可溶性画分から融合タンパク質を精製することができた。

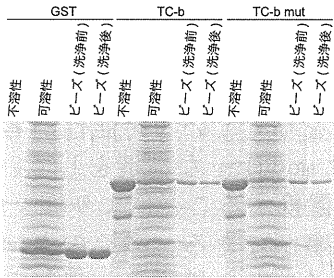


図 1 2 TC-b mut タンパク質の精製

精製した TC-b mut が P-X-E-X-X-Ar/Ac 配列と結合しないことを確認するために、ビーズに結合した GST 融合タンパク質と RANK 強制発現細胞破碎液を反応させた。その結果、TC-b は RANK との結合が見られたが、TC-b mut は RANK との結合が見られなかった (図 1 3)。更に、RANK における全ての TRAF6 結合配列に置換変異を導入した変異受容体 (AAA) は TC-b との結合が見られず、TC-b が P-X-E-X-X-Ar/Ac 配列特異的に結合していることが確認された (図 1 3)。

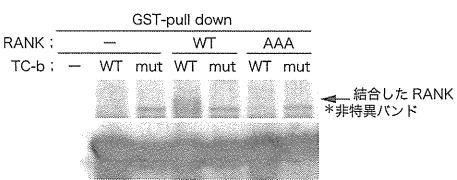


図 1 3 GST-TRAF6 融合タンパク質の TRAF6 結合ペプチドへの結合特異性

これらの GST 融合 TCd とその変異体（ダブルミュータント）を用いて、locking position を 2 カ所（Pro および Glu）に設定した MA-XXXXPXEXXX-A-（X は randomized position）多価型ペプチドライブラリーのスクリーニングを行った。これまでに 2 回のスクリーニングを行い、生理的なリガンドとして知られているモチーフとは異なるアミノ酸が各 position で選択されることを見いだした。この結果は、結合親和性に基づいたスクリーニングにより、阻害能力に特化したモチーフの取得が可能であることを示唆している。現在継続してさらなるモチーフの絞り込みを行っている

D. 考察

MeBS とタモキシフェンを利用した SNIPER(ER) は、MCF7 乳がん細胞で ER 分解とネクロシスを引き起こした。詳細なメカニズム解析から、SNIPER(ER) 処理した細胞では、ユビキチン・プロテアソーム系による ER 分解後に ROS 産生が惹起され、ネクロシスが誘導される事がわかった。ROS が産生されるメカニズムは明らかではないが、ER は ROS 消去活性を持つ SOD と相互作用する事が報告されているため、SNIPER(ER) は ER 分解を介して SOD 活性に影響を与えている可能性が考えられる。

SNIPER は modular な構造をしているため、リガンドを置換することにより様々な SNIPER を開発する事ができる。多くのタンパク質は複数のドメインから構成されているため、異なるドメインに結合するリガンドを利用することにより、一つのタンパク質を標的とする SNIPER でも多様な SNIPER 分子をデザインする事ができる。これはキナーゼ阻害剤などタンパク質の活性中心を阻害するタイプの分子標的治療薬にはない SNIPER の利点であり、新しい分子標的治療薬開発の可能性を広げる事に寄与している。

本年度新たにデザイン・合成した新規 ER 分解誘導剤（化合物 4-8）は、ER のリガンドであるタモキシフェンに直鎖状のアルキル基を有した構造である。この長鎖アルキル基が ER の Helix 12 の正常な構造変化を阻害することで、ER が正常な構造を保てなくなり、分解が誘導されると推測している。合成した化合物のうち、化合物 5（炭素 10）を用いた場合においてのみ ER α の分解が誘導されたことからアルキル基の長さには至適な値があることが示唆された。また、同じ長さのアルキル基で

もアミノ基がメチル化されることでその分解能が消失することから、化合物には二級アミンが必要であることが示された。また、化合物 5 には濃度依存性があり、その分解作用はプロテアソーム阻害剤により阻害されたことから、プロテアソーム依存的に ER が分解されていることが示唆された。

His タグタンパク質を標的とした SNIPER (His) では、His タグと結合する NTA の水溶性の高さから細胞膜透過性が低く、単に Bs と Ni-NTA をつないただけでは SNIPER (His) として機能しなかった。この問題点を克服するために種々の方法を試みてきたが、細胞透過性ペプチドを用いて SNIPER (His) を積極的に細胞内に輸送する方法が有効である事がわかった。6xHis 配列を付与した膜透過性ペプチド HIV-TAT (48-60) は SNIPER (His)-1 と複合体を形成して細胞内に取り込まれ、7 個の連続した His 残基を持つ c-Cbl を減少させた。このことは、この SNIPER (His) 複合体が細胞内に取り込まれた後、一定量の SNIPER (His)-1 が HIV-TAT-His から解離し、標的タンパク質と会合した結果であろうと推測している。

リガンド探索では、今後 BCR-PHd TCd ALKd それぞれについて、リガンド結合部位に対する一連の変異体を作成し、作成でき次第随時多価型ペプチドライブラリースクリーニングによるモチーフ取得、SNIPER 化を試みる。本研究で標的とするタンパクは全て細胞内で機能している。従って、SNIPER (His) の例からもわかるように化合物の膜透過性は大変重要である。この点、ペプチドライブラリー法は、取得されたペプチドモチーフの各ポジションのアミノ酸の重要性を定量的に評価できるという優れた特徴を有している。このため、膜透過性付与をはじめ、protease 耐性、安定性向上など、さまざまな機能修飾が可能である。最終的には、得られたモチーフをベースとして十分な膜透過性、安定性を有する SNIPER へと発展させてゆく予定である。

TC-a が RANK 結合能を持たない理由は不明であるが、TC-b と TC-c については TRAF6 結合配列への結合能が確認できたことと、TC-b は多量体形成が可能である事が報告されていることから、TC-b をスクリーニングに使用することに決定した。ペプチドライブラリーを用いたスクリーニングにはビーズ 100 μ l あたり 1 mg の融合タンパク質が結合していることが望ましいとされており、一番収率が良かった TC-b でさえ約 400 倍濃縮する必要があると思

われた。しかし、培養量を増やしてみたところ、4,000 ml の大量培養で TC-b mut がビーズ洗浄後に消失してしまう理由は不明だが、500 ml の少量培養方法において TC-b はビーズ 100 μ l あたり 276 μ g、TC-b mut はビーズ 100 μ l あたり 197 μ g の融合タンパク質を精製できた。ペプチドライブラリーからのスクリーニングはこの精製濃度でも実施可能であり、これらの精製融合タンパク質を使って TRAF-C ドメインに強く結合する天然に存在しないペプチド配列を同定する予定である。

E. 結論

今年度の研究では、昨年度合成した SNIPER(ER)がヒト乳癌細胞 MCF-7 のエストロゲン受容体を分解して速やかに細胞死を誘導する分子機構を詳細に解析し、SNIPER(ER)はユビキチン-プロテアソーム系を介したエストロゲン受容体の分解後に乳がん細胞で ROS 産生を惹起しネクロシスを誘導する事を明らかにした。SNIPER(ER)は、乳がん細胞における ER の発現そのものを減少させ、がん細胞を細胞死に導くことができるため、乳がんに対する新たな治療薬開発につながる事が期待される。また SNIPER(ER)とはメカニズムが異なるが、新規構造を持つエストロゲン受容体分解誘導剤の開発にも成功した。他のタンパク質を標的とした SNIPER の開発についても、新規結合リガンド探索などで成果を挙げることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, Ohoka N, Shibata N, Nishimaki-Mogami T, Okuda H, Kurihara M, Naito M. Development of hybrid small molecules that induce degradation of estrogen receptor-alpha and necrotic cell death in breast cancer cells. *Cancer Sci* (2013) 104: 1492-8.

T. Shoda, K. Okuhira, M. Kato, Y. Demizu, H. Inoue, M. Naito, M. Kurihara, Design and synthesis of tamoxifen derivatives as a selective estrogen receptor down-regulator, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 24, 87-89 (2014)

2. 学会発表

奥平 桂一郎, 大岡 伸通, 最上 (西巻) 知子, 伊藤 幸裕, 石川 稔, 橋本 祐一, 内藤 幹彦,

細胞内に局在するタンパク質を標的としたプロテインノックダウン効果の検討, 第 17 回日本がん分子標的治療学会 (2013. 6)

Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, Ohoka N, Shibata N, Nishimaki-Mogami, T, Okuda H, Kurihara M, Naito M. Development of hybrid small molecules that induce degradation of estrogen receptor-alpha and necrotic cell death in breast cancer cells. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (2013.10)

加藤雅士, 正田卓司, 奥平桂一郎, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明: エンドキシフェン骨格を持つ新規エストロゲン受容体分解誘導剤の開発, 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2013 年 11 月)

奥平桂一郎, 出水庸介, 服部隆行, 大岡伸通, 柴田識人, 最上 (西巻) 知子, 栗原正明, 奥田晴宏, 内藤幹彦: エストロゲン受容体分解誘導剤による乳癌の細胞死誘導分子機構. 日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

先天性中枢神経脱髄病の治療薬開発に向けた研究

独立行政法人国立成育医療研究センター
研究所 薬剤治療研究部
山内 淳司

研究要旨 遺伝性の中枢神経脱髄疾病であるペリチェウス・メルツバッハ病には特異的治療薬がない。本研究では創薬を目的とした標的分子の探索研究を行い、標的候補分子を評価した。その結果、動物実験レベルでも有効な標的候補を明らかにすることに成功した。
(115 文字)

研究組織

- | | |
|--------------------------|-------|
| (1) 独立行政法人国立成育医療研究センター研究 | 宮本 幸 |
| 所 | |
| (2) 首都大学東京 | 久永 眞市 |
| (3) 株式会社免疫生物学研究所 | 前田 雅弘 |
| (4) 田辺三菱製薬株式会社 | 加藤 稔 |

A. 研究目的

遺伝性の神経変性症のなかには、家族性アルツハイマー病や家族性パーキンソン病のように比較的早期に発症し、神経細胞それ自体が変性する疾患の他に、神経軸索を保護し、電気伝導効率を上昇させる役割をもつ髄鞘が変性した結果、神経細胞を含む神経組織全体が変性する疾患も知られている。

そのなかで、脳や脊髄から構成される中枢神経組織の髄鞘変性症（脱髄疾病）は、ペリチェウス・メルツバッハ病（Pelizaeus-Merzbache disease、PMD）とよばれ、20 万人から 30 万人にひとりの割合で病因を有する稀少疾病である。国内でも疫学調査が行われ、およそ 100 家族いることが知られている。

症状として、頭部の振戦、眼振、歩行時のふらつき、運動障害、言語障害、精神運動発達退行などがみられる重篤なものである。病気が進行すると髄鞘がほとんど消失してしまうため、生命が危険に曝される。

さて、中枢神経の髄鞘形成細胞は希突起膠細胞（オリゴデンドロサイト）とよばれる。PMD の原因遺伝子の蛋白質産物は四回膜貫通型構造を有すると推定される PLP1 で、オリゴデンドロサイトの髄鞘膜と髄鞘膜（髄鞘膜間）をジッパー状に繋ぐ役割があるとされる。PMD では PLP1 をコードする遺伝子が重複、欠損、変異することで発症することが知られている。しかし、この主要な原因遺伝子が数十年前に同定されたにもかかわらず、

今日に至っても、特異的な治療薬や治療方法が開発されていない。その理由はいくつかあるが、最大の理由は治療薬の標的分子が明らかにされていないことである。また、それは髄鞘組織の構造にもある。病変組織である髄鞘はオリゴデンドロサイトが神経細胞の軸索の周りを幾重にも巻くという複雑な構造をとっている。したがって、もし再生医療技術 を応用するとしても、現時点では、そのような複雑な組織構造を再生することは難しいと考えられている。

ところで、先述したように PMD は遺伝性の疾病であるため、治療薬ができて、それを根本的に治療することは難しいかもしれない。しかし、病態時に強く活性化または不活性化される分子または分子経路を阻害または活性化したり、病変細胞を保護するような分子経路を活性化することで病態が改善できると考えられる。

これらの治療方法は、家族性のパーキンソン病などで提案されている欧米の治療戦略と同じである。例えば、パーキンソン病の場合は、変異パーキン蛋白質が原因で細胞内ストレスシグナルが誘導されるが、このストレスシグナルは病態時特有のもので、それを抑制することで病態が改善されることが明らかにされている。

変異 PLP1 が原因でおこる PMD においても、同様の現象が知られており、その経路を抑制することで、すくなくともインビトロレベルで PMD の髄鞘変性が一部改善されることが報告されている。しかし、このストレスシグナルはほとんどの変性疾患で起こりうるものである。

本研究では、このような戦略のもと、PMD 治療薬開発を目的とし、その標的分子を明らかにすることを試みている。独自のインビトロ髄鞘変性システム（共培養系）を利用して、さまざまなライブラリーを用いて PMD 治療薬の標的候補分子を明らかにし、そこで明らかにされた標的候補分子を

インビボレベル（動物実験レベル）で検証する研究を行っている。その過程でいくつかの標的候補をとらえるに成功している。

また、髄鞘病態研究の技術開発を促進し、国内外での PMD の創薬研究を促進させることも研究目的のひとつである。

B. 研究方法

以下、順番に、治療薬の標的候補分子をインビトロで探索する研究から、それを動物実験レベルで検証する方法を記載する。

【インビトロでの髄鞘形成を再現するための必要な神経細胞の単離】まず、神経細胞の単離に関して述べる。神経細胞は、胎生中期のラットやマウスの神経節から実体顕微鏡を用いて単離する。神経節を用いる理由は他の神経細胞に比べて、10 倍以上の神経軸索を伸ばすことができるため、後述の共培養が長時間安定するためである。さて、神経節単離後、それを 0.25%トリプシン（シグマ社が良い）で処理し、細胞を分散させる。その後、I 型コラーゲン基質でコートされた 25mm カバーガラス上に神経細胞をまき、2 日から 3 日おきに 100ng/ml の NGF と N2 サプリメントおよび 5%ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を交換する。このとき、交互に、フルオロウリジンを含む培養液を使用する。これによって、神経細胞以外の線維芽細胞などが除去される。これらの条件下で 2 週間から 3 週間培養すると、高純度の神経細胞が得られる。この条件で神経軸索を 10mm 以上伸ばす細胞もある。

【インビトロでの髄鞘形成を再現するための必要なオリゴデンドロサイトの単離】次に、グリア細胞の単離に関して述べる。オリゴデンドロサイトの単離はきわめて難しいが、研究分担者と研究代表者によって、安定した単離、培養法の確立に成功した。以下、ラット大脳からオリゴデンドロサイトの精製方法を順に述べる。① 胎生 15 日のラット大脳（小脳や視床領域を採取しないように注意する）数個を摘出し、0.25%トリプシンで組織を分解する。このとき、数分毎に組織が分解されているか注意深く観察する。② 組織が完全に分解されてきたら、10%血清の入った MEM 培養液を入れ分解反応を止め、遠心し、沈殿した細胞をポリリジン（PLL）（シグマ社が良い）でコートとした細胞培養皿にまく。③ 1 週間後、0.05%トリプシン（シグマ社が良い）で細胞をはがし、再び PLL でコートとした細胞培養皿にまく。④ さらに 1 週間後、0.05%トリプシンで細胞をはがし、細菌培養皿にまく。この過程で、オリゴデンドロサイト前駆細胞が 95%まで精製される。⑤ 2 日後、

10ng/ml の PDGF 及び 10ng/ml の bFGF の入った Raff 培地に換え、2 日間培養する。この過程で、オリゴデンドロサイト前駆細胞が劇的に増殖する。⑥ 2 日後、10ng/ml の PDG を抜き、10ng/ml の bFGF と 30ng/ml の T3 ホルモンおよび 40ng/ml の T4 ホルモンを添加した Raff 培地に換え、オリゴデンドロサイトへの分化誘導をかける。実験状況に応じ、1 日から 7 日間培養する。以上の方法で、高純度のオリゴデンドロサイト前駆細胞およびオリゴデンドロサイトを得ることができる。

【髄鞘変性を再現するインビトロの共培養システム】神経軸索を伸ばした神経節神経細胞上に、およそ 3×10^6 個のオリゴデンドロサイト（正確に述べると、オリゴデンドロサイト前駆細胞）をまく。さて、上述の分化培地で、およそ 5 日から 7 日間、2 細胞間の接触培養を行うと、オリゴデンドロサイト前駆細胞が神経軸索に沿って増殖する。その後、数週間すると、オリゴデンドロサイト前駆細胞が髄鞘形態をもつオリゴデンドロサイトに分化し、インビトロで髄鞘組織が形成される。この場合、NGF 中和抗体や NGF 中和蛋白質を用いて、髄鞘形成を積極的に誘導することもある。インビトロでの髄鞘形成は実際に生体内でできる髄鞘形成のタイムコースとほぼ等しく、それぞれの時期の遺伝子変動（トランスクリプトームのプロファイリング）はほぼ生体内と同じであることを確認している。オリゴデンドロサイト前駆細胞が神経軸索上で増殖するときに、PLP1 をコードするレトロウイルスを感染させる（後述を参照）と、髄鞘形成不全がインビトロで再現される。ただし、感染したオリゴデンドロサイトは病的な状態ではあるが、細胞死は観察されない。この実験系は、研究代表者および研究分担者らが 2008 年にヒューマンサイエンス振興財団の審査を経て、同財団を通して特許出願（特願 2008-208155）した培養系に若干の変更を加えたシステムである。

【ShRNA 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】PLP1 発現により誘導された不完全髄鞘を改善または抑制する標的分子を明らかにするために、研究代表者および研究分担者らによって作成された線状型 RNA（shRNA）ライブラリーを、レトロウイルス（タカラ-クロンテック社）にパッケージングしたものを、ウイルス力価/MOI 値（タカラ-クロンテック社キットで測定）0.3 から 1 の範囲内で、PLP1 と同時に、オリゴデンドロサイトに共感染させた。このスクリーニングの過程で、おのおののウイルスに含まれる shRNA が細胞に感染することで、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るのである。

【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スを行うことで、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つ。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なのか、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 μ M の濃度で、抗体ライブラリーは1または10 μ 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。現在、セリン・スレオニンリン酸化酵素、チロシンリン酸化酵素の何れのリン酸化酵素も蛋白質分解酵素も96穴プレートアッセイで FRET 測定が可能になっている。

【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、前者に対しては遺伝子改変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マウスを作成するため、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、それらを一般的な組織特異的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

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、新規トランスジェン内の 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。

【標的分子のインビボ評価試験】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兼副所長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 マウス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を評価する。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で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神経運動機能評価試験】PMD の標準的な神経運動機能評価試験は確立されていないため、他の中枢神経髄鞘変性モデルであるリゾレシチン投与による人為的中枢神経脱髄やギランバレイ型中枢神経脱髄モデルなどを参考にして試験法をたてた。まず、フットプリントと言われる最も簡便な神経変性をモニターする測定系に関して述べる。マウスの足に「墨」または「墨様のインク」をつけ、紙の上を歩かせる。もしマウスが直線的に歩かない場合は、マウスの胴体の径をもつ筒のなかを歩かせるなどの工夫をする。野生型の場合は左右対称な逆八の字状の足跡がペイントされる。しかし、神経変性を起こしている場合は、直線的な 2 本の足跡を示す。

この逆八の字から直線までの角度を測定することで、変性状態が分かる。勿論、変性が進行すれば角度測定ができない程度までランダムな足跡を示す。この試験は協調運動を測定するため、どの神経経路に異常があるのかを判断するのは難しい。また、初期の神経変性を見極めるのには適さない。しかし、簡便であるため、多くの神経変性疾患モデルマウスの検定に用いられている。また、PMD の主症状としての「歩行時のふらつき」を測定できる。さらに、人為的に脱髄を誘導し、その後の改善効果を経時的に観察する場合にも一般的に用いられているものである。次に、ホットプレート試験に関して述べる。透明なガラスまたはプラスチックの筒で囲んだ 42 度またはそれ以上の高温のプレート上にマウスを置き、プレートからの逃避行動をとるまでの時間を第一段階から第三段階まで分け、測定するものである。第一段階は手を擦りあわせる動作までの時間を測定する。第二段階は前足で筒に触るまでの時間、第三段階はプレートから逃げようとしてジャンプアップするまでの時間である。痛覚試験の一種なので、必ずしも髄鞘機能だけが関係しているものではないが、脳と脊髓経路を通過する神経の機能を測定できる。温度を変化させられるプレートさえあれば特殊な機械は使用しないため、髄鞘変性症を含めた多くの神経変性症で試される試験である。マウスのテイルフリック試験もホットプレート試験と類似しているが、これは熱性の痛覚の異常をより直接的に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、脳と脊髓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。さいごに、ロータールード試験を記載する。これは、主に、運動テストである。ロータールー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髓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ルード試験は、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て同定された標的候補分子】

インビトロの実験で同定された候補分子は RNA 干渉、阻害剤、抗体等でその活性が阻害されると髄鞘変性が改善されることが分かった。以下、その中でも「強い」病態改善効果をもったもののみを記載する：

- 2 型ニューレグリン受容体
- 3 型ニューレグリン受容体
- セリン・スレオニンキナーゼである MAPK1
- セリン・スレオニンキナーゼである MAPK2
- TACE と推定される蛋白質分解酵素
- 4240

【標的候補分子の活性を減弱させたマウス】

上述の標的候補分子のなかでも、とくに有効なものからマウスを作成した。

○ 3 型ニューレグリン受容体のノックダウンマウスを作成した。ニューレグリン受容体は増殖因子ニューレグリンの受容体であるが、それは 3 型に結合し 2 型には結合しないため、3 型をノックダウンすることでニューレグリン受容体活性のほとんどを抑制できる。2 型は 3 型からのシグナルを受け活性化される受容体である。

○ MAPK は 1 と 2 の分子種があるため、その上流の MAPKK (正確には MAPKK1) の抑制型変異体を発現させるマウスを作成することで、2 種類の分子の活性を一度に抑制することに成功した。

【標的候補分子のインビボ評価】

PMD モデルマウスとこれらの標的分子の活性を減弱させたマウスを交配させた結果、3 型ニューレグリン受容体のノックダウンマウスの場合も、MAPKK1 の抑制型変異体を発現したマウスの場合も、優位な病態髄鞘組織の改善効果を示した。また、神経運動機能として、とくにローターロッド試験において改善効果が認められた。

D. 考察

3 型ニューレグリン受容体も MAPK1 および MAPK2 も、インビトロでの結果ばかりではなく、マウスの髄鞘組織的にも神経運動機能的にも治療標的分子である可能性が示唆された。これらの標的候補はその活性を減弱させることで、PMD 病態が改善するため、PMD 病態発症時に特異的に活性化されていることが考えられる。前者に関しては、海外の研究データで実際のヒト PMD 病態時に優位に活性化されていることが知られてる。研究代表者および研究分担者も PMD モデルマウスでこれらの分子の活性化が起きていることを確認している。

E. 結論

インビトロ、インビボの両方で 3 型ニューレグリン受容体または MAPK1/2 の活性の減弱で PMD の髄鞘脱落が改善されることが判明した。今後、これらが PMD 創薬標的として適しているかどうか、活性ポケットの構造解析などのバイオインフォマティクスを活用したり、これらを標的とした他の疾病の第二相試験で効果がないと判定された化合物の PMD 薬としての有効性を官民共同研究で進める。また、他の創薬標的候補に関しても研究を進める。その場合は、本研究で新たに構築したハイスループットアッセイシステムを用いて有効な化合物を探索する。

F. 健康危険情報

該当しない。

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研究所 山内、宮本】

(1) Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Natsuki Yamamori, Toru Ogata, and Akito Tanoue, and Junji Yamauchi* (2013) Akt and PP2A reciprocally regulate the guanine nucleotide exchange factor Dock6 to control axon growth of sensory neurons. Sci. Signal. (Science 姉妹誌) 6, ra15: *Corresponding author

Picked up as 'cover image': Akt and PP2A reciprocally regulate the guanine nucleotide exchange factor Dock6 to control axon growth of sensory neurons. Sci. Signal. Vol. 6, No. 265 (2013)

朝日新聞朝刊科学面で「神経再生の標的

候補」として論文の内容が報道された。また、サイエンス・シグナリング日本語版ダイジェストでも紹介された。

(2) Atsushi Sanbe, Tetsuro Marunouchi, Tsutomu Abe, Yu Tezuka, Mizuki Okada, Sayuri Aoki, Hideki Tsumura, Junji Yamauchi, Kouichi Tanonaka, Hideo Nishigori, and Akito Tanoue (2013) Phenotype of cardiomyopathy in cardiac-specific heat shock protein B8 K141N transgenic mouse. *J. Biol. Chem.* 288, 8910-8921

(3) Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Kazuaki Nakamura, Shou Takashima, Atsushi Sanbe, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi* (2013) Signaling through Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-1 regulates migration in Schwann cells. *Cell. Signal.* 25, 1379-1387: *Corresponding author

(4) Kazuaki Nakamura, Kazuko Aizawa, Kazuhiko Nakabayashi, Natsuko Kato, Junji Yamauchi, Kenichiro Hata, and Akito Tanoue (2013) DNA methyltransferase inhibitor zebularine inhibits human hepatic carcinoma cells proliferation and induces apoptosis. *PLoS One* 8, e54036

(5) Yu Tezuka, Mizuki Okada, Yuka Tada, Junji Yamauchi, Hideo Nishigori, and Atsushi Sanbe (2013) Regulation of neurite growth by inorganic pyrophosphatase 1 via JNK dephosphorylation. *PLoS One* 8, e61649

(6) Nobuo Terada, Yurika Saitoh, Nobuhiko Ohno, Masayuki Komada, Junji Yamauchi, and Shin-ichi Ohno (2013) Involvement of Src in the membrane skeletal complex, MPP6-4.1G, in Schmidt-Lanterman incisures of mouse myelinated nerve fibers in PNS. *Histochem. Cell Biol.* 140, 213-222

(7) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Naoko Onami, Hideki Tsumura, Noriko Nemoto, Katsumasa Kawahara, Minoru Kato, Jun Kotera, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi* (2013) In vivo expression of the Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-1 in mice exhibits enhanced myelin thickness in nerves. *J. Mol. Neurosci.* 51, 522-531: *Corresponding author

【首都大学東京 久永】

(1) Saito, T., Yano, M., Kawai, Y., Asada, A., Wada, M., Doi, H., Hisanaga, S., Structural basis for the different

stability and activity between the Cdk5 complexes with p35 and p39 activators. *J. Biol. Chem.* 288, 32433-32439, 2013.

(2) Nagano, T., Hashimoto, T., Nakashima, A., Hisanaga, S., Kikkawa, U., Kamada, S. Cyclin I is involved in the regulation of cell cycle progression. *Cell Cycle* 12, 2617-2624, 2013.

(3) Fuchigami, T., Sato, Y., Tomita, Y., Takano, T., Miyauchi, S., Tsuchiya, Y., Saito, T., Kubo, K., Nakajima, K., Fukuda, M., Hattori, M. and Hisanaga, S., Dab1-mediated colocalization of multi-adaptor protein CIN85 with Reelin-receptors, ApoER2 and VLDLR, in neurons. *Genes Cells* 18, 410-424, 2013.

(4) Kimura, T., Tsutsumi, K., Taoka, M., Saito, T., Masuda-Suzukake, M., Ishiguro, K., Plattner, F., Uchida, T., Isobe, T., Hasegawa, M., and Hisanaga, S., Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau at Cdk5-Dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. *J. Biol. Chem.* 288, 7968-7977, 2013.

【株式会社免疫生物学的研究所 前田】

(1) Fujimoto Y, Ozaki K, Maeda M, Nishijima K, Takakuwa H, Otsuki K, Kida H, Ono E (2013) Resistance to influenza A virus infection in transformed cell lines expressing an anti-PB2 monoclonal antibody. *Vet. J.* 198 487-493

(2) Mori T, Tajima K, Hiramama M, Sato T, Kido K, Iwakami S, Sasaki S, Iwase A, Shiomi K, Maeda M, Hino O, Takahashi K (2013) 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 e55

(3) Kawamata F, Homma S, Kamachi H, Einama T, Kato Y, Tsuda M, Tanaka S, Maeda M, Kajino K, Hino O, Takahashi N, Kamiyama T, Nishihara H, Taketomi A, Todo S (2014) C-ERC/mesothelin provokes lymphatic invasion of colorectal adenocarcinoma. *J. Gastroenterol.* 49 81-92

【田辺三菱株式会社 加藤】

(1) Torii T, Miyamoto Y, Onami N, Tsumura H, Nemoto N, Kawahara K, Kato M, Kotera J, Nakamura K, Tanoue A, Yamauchi J: In vivo expression of the Arf6 guanine-nucleotide

exchange factor Cytohesin-1 in mice exhibits enhanced myelin thickness in nerves. J Mol Neurosci (2013) 51: 522-531

2. 学会発表

[主としてシンポジウムなどの重要なものを記載する]

【独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 山内、宮本】

(1) 鳥居知宏、宮本幸、田上昭人、山内淳司 Arf6 活性化因子サイトヘジン2は単状分節状系球体硬化症関連遺伝子産物アクチニンと結合して時空間的に細胞形態を制御する 2013 年 6 月・日本生化学会関東支部例会・甲府

(2) 宮本幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司 Effects of the in vivo knockdown of Dock6 on dorsal root ganglion neurons 2013 年 6 月・日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会・京都

(3) 寺田信生、齋藤百合花、大野伸彦、山内淳司、大野伸一 Src-MPP6-4.1G-CADM4 protein complex in mouse peripheral nervous system myelinated nerve fibers 2013 年 6 月・日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会・京都

(4) 山内淳司、宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人 Knockdown of Dock7 in vivo specifically increases myelin thickness in sciatic nerves without affecting axon thickness

(セッション：座長 小泉修一、山内淳司) 2013 年 6 月・日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会・京都

(5) 鳥居知宏、宮本 幸、田上昭人、山内淳司 Analysis of CYTH2/ACTN1/Arf6 signaling beased on FRET in differentiating N1E-115 cells 2013 年 9 月・日本生化学会大会・横浜

(6) 宮本 幸、山内淳司 Dock6 交換因子の Akt のリン酸化状態によって制御される軸索伸長の新規メカニズム (シンポジウム：企画/座長 山内淳司、佐藤孝哉) 2013 年 9 月・日本生化学会大会・横浜

(7) 山内淳司 Fyn キナーゼと Arf6 交換因子 cytohesin-1 による新規のミエリン形成メカニズム (シンポジウム：企画/座長 山内淳司、佐藤孝哉) 2013 年 9 月・日本生化学会大会・横浜

(8) 鳥居知宏、宮本幸、田上昭人、山内淳司 神

経突起伸長および神経再生における Arf6 活性化因子サイトヘジン2の役割 2013 年 10 月・日本薬理学会関東支部例会「神経変性疾患の新たな治療戦略と創薬」・東京

(9) Junji Yamauchi, Tomohiro Torii, Akito Tanoue, and Yuki Miyamoto Phosphorylation of Arf6-GEF cytohesin-1 by Fyn is required for myelination by Schwann cells. Society for Neuroscience Annual Meeting November 2013, San Diego, USA

(10) Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi Signaling through Fyn and Arf6-GEF cytohesin-1 promotes Schwann cell migration. Society for Neuroscience Annual Meeting November 2013, San Diego, USA

【首都大学東京 久永】

(1) Takano, T., Ogura, T., Saito, T., Asada, A., Fukuda, M., Tomomura, M., Hisanaga, S. LMTK1/AATYK1 negatively regulates dendritic arborization of cortical neurons through endosomal trafficking. ISN (Mexico City, April 2013) (インターナショナル・セッション)

【株式会社免疫生物学研究所 前田】

該当するものはない。

【田辺三菱株式会社 加藤】

(1) 加藤 稔 第 86 回日本生化学会大会シンポジウム「細胞内シグナルの伝達様式を変えさせる交換因子～細胞の運命決定から病態と創薬まで～」(座長 山内淳司、佐藤孝哉) 創薬セッション担当 (2013 年 9 月・横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当するものはない。

2. 実用新案登録

該当するものはない。

3. その他

該当するものはない。

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 代謝生化学部
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 トランスポーターについて、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肝での AMP 活性化プロテインキナーゼによる ABCA1 発現への影響と機序を解明し、肝 ABCA1 発現を促進する食品成分を探索、胆汁酸基本骨格の新規 LXR アゴニストの顕著な ABCA1 発現の機序を解明した。また肝 ABCA1 発現促進化合物の in vivo での HDL 上昇効果の機序を検証した。②動脈硬化症発症前の病変好発部位での抗酸化タンパク発現低下を解析した。

研究組織

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 最上知子
- (2) 興和(株)東京創薬研究所
田辺宗平、井上敬介、安部一豊
- (3) サントリービジネスエキスパート(株) 諏訪芳秀
- (4) 名古屋市立大学大学院医学研究科
堂前純子、横山信治
- (5) 昭和大学薬学部 板部洋之
- (6) 広島国際大学薬学部 宇根瑞穂

発見し、このバリエーションが HDL 産生に大きな寄与を持つことを明らかにしている(*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 特願 2010-159674)。本研究では、①肝独自の転写制御を解明するとともに、②ABCA1 発現促進化合物を生体成分あるいは食品酒成分から探索・合成する。また③in vivo での効果の検証、④ABCA1 の構造と機能について解明を進める。さらに、⑤細胞への脂質蓄積が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、「HDL 上昇」を核とした予防・治療薬創製に貢献する。

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。また HDL は動脈硬化を積極的に退縮する機能を持つことが明らかにされているが、HDL 産生を直接促進する薬は未だ実用化されていない。

HDL 産生には肝の ABCA1 トランスポーターが最大の寄与を持ち、血中 HDL の 8 割の産生を担うことが報告されている。マクロファージなど末梢細胞の ABCA1 発現はコレステロール蓄積により核内受容体 LXR 活性化を介して促進されるが、肝 ABCA1 の発現はコレステロール量により変化せず、肝独自の制御メカニズムが予想されていた。課題代表者は、肝の ABCA1 が他組織とは異なるユニークな転写制御—『肝型と末梢型の二重プロモーター制御』—を受ける機構をラット・マウスで初めて発見した。引き続きヒト肝に特異的に発現する肝型 ABCA1 バリエーション L3 を

B. 研究方法

B-1 HDL 産生の促進

①肝の ABCA1 発現制御における AMP 活性化プロテインキナーゼ(AMPK)の役割を、活性化薬剤を用いて解析した。②ABCA1 発現促進作用を示す胆汁酸代謝産物の作用機序を解明した。③食品種子成分から 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、抗酸化

タンパクの大動脈内発現分布を免疫組織化学で検討するとともに、レーザーキャプチャーマイクロディセクション法で血管中膜平滑筋層のみを切り取り mRNA 発現を調べた。

(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 の肝での発現制御機構 [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。昨年度までの研究で、ヒト肝に特異的な ABCA1 mRNA バリエント L3 を見だし、転写因子 HNF4 α が肝特異的バリエントの発現に必須の役割を果たすことを明らかにした。今年度は肝 ABCA1 の転写制御のさらなる解明をめざし、HNF4 α の機能を制御するシグナルの影響を解析した。AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は HNF4 α をリン酸化し分解促進することにより HNF4 α 発現量を低下することが知られる。そこでラット肝由来細胞 McARH7777 細胞を AMPK 活性化剤である AICAR ならびに metformin で処理したところ ABCA1 のタンパク発現量が低下した。しかしながら、このような AICAR の作用には HNF4 α は関与しないことが siRNA ノックダウンにより判明した。AICAR は ABCA1 mRNA の発現には影響しておらず、ABCA1 タンパクの分解を促進し、ABCA1 発現を低下することが判明した。

2) 胆汁酸基本骨格を有する強力な LXR アゴニストの発見 [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ポーターである ABCA1 の発現を制御する可能に着目し、昨年度の研究において顕著な LXR/RXR アゴニスト活性を示す胆汁酸誘導体 Ccoactivator Assay System (RCAS) により in vitro で測定したところ、24-Nor はその構造が類似した他の化合物と比較して LXR に対し、有意に高い活性、及び親和性を有していた。またヒト単球様細胞株 THP-1 において、24-Nor は LXR 支配下遺伝子である ABCA1 及び

ABCG1 の発現を増加させた。一方、ヒト肝がん細胞株 Huh-7 を用いて同様の検討を行ったところ、24-Nor は THP-1 細胞で確認されたように ABCG1 mRNA 発現レベルを増加させたが、SREBP1c mRNA 発現レベルには影響しなかった。さらに末梢細胞において 24-Nor の用量依存的な HDL 産生 (アポ A-I 依存コレステロール排出) 促進作用も認められた。

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、昨年度はホップ成分の 8-プレニルナリンゲニンがヒト肝特異的な ABCA1 mRNA バリエント L3 とタンパク発現を促進することを見いだした。今年度はゴマ種子や亜麻仁種子に多く含まれるリグナン類 4 種に着目して検討を進めたが、いずれのリグナン種にも ABCA1 上昇を促進する活性は認められなかった。他方、リグナン以外のゴマ種子成分から ABCA1 mRNA 発現を増加させる化合物を見いだした。

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

これまでの研究において、スタチンによる HDL 増加作用をコレステラミンとの併用投与により検証するモデル動物を構築した。ピタバスタチンあるいはアトルバスタチンをコレステラミンと併用してラットに投与すると、正常食対照群に比べ 1 週間後から 5 週間後まで血中 HDL が持続的な高値を示した。機序を明らかにするために 5 週間後の肝組織中の遺伝子発現量を解析したところ、各スタチンとコレステラミンとの併用群にて肝臓中の apoA-I mRNA 発現量が上昇していた。アガロースゲル電気泳動を用いて血漿中の HDL 粒子の解析を行ったところ、各スタチン-コレステラミン併用群にて HDL の移動度がやや大きくなる傾向がみられたが、今回の検討では明らかな差異を見出せなかった。

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。ABCA1 の C 末領域は、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 粒子の形成や A キナーゼや C キナーゼによるタンパク質量や脂質放出量の増加に必要と考えられるが、これを含むタンパク質を発現させた細胞の脂質放出活性は低い傾向が

あり解析が難しい。放出されるコレステロール／リン脂質比は、脂質受容体となるアポリポタンパク質の種類によらず一定の範囲を示すが、ABCA1 と ABCA7 では脂質搬出効率のよいアポリポタンパク質の種類が異なることが判明した。

アポリポタンパク質刺激から脂質放出に至る応答機序を解析した。ApoA-I により細胞内 cdc42 の GTP 結合型レベルと Rho kinase 活性が上昇し、caveolin-1 の細胞骨格との相互作用やコレステロールの細胞内輸送が行われる。siRNA や、阻害剤の実験から、cdc42 は ABCA1 の下流、Rho kinase は cdc42 の下流にあると考えられた。したがって、apoA-I が ABCA1 に作用すると cdc42 の GTP 結合型レベル上昇が生じ、これが Rho kinase を活性化し、その結果 caveolin-1 の微小管様構造への結合や細胞内コレステロールの輸送、そして脂質放出が起きると考えられる。

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。SAA-HDL 形成と血中濃度レベル維持の関係を調べるため、LPS 投与で肝 SAA 産生は増加するのに血中 SAA 濃度上昇がなく、しかもアミロイド沈着は WT マウスよりも少ない ABCA1 KO マウスを用い、SAA-HDL が形成されないことによる、ABCA1 KO マウス SAA の特性変化の機序を調べた。高感度 ELISA による SAA 濃度測定系を用いたところ、特定の条件下 (SAA 産生あり/再吸収抑制あり) のみで尿中に SAA が存在することが示された。

2) 動脈硬化病変形成期の蓄積脂質と酸化ストレス [板部]

血管壁組織のプロテオーム解析から、10 週齢 apoE-KO マウスの大動脈起始部および弓部 (動脈硬化好発部位) で、Prx2、Transgelin-2 が動脈硬化遅発部位に比べて発現が低減するタンパク質として同定された。血管中膜平滑筋層での酸化ストレス亢進が平滑筋細胞の分化を促し、動脈硬化発症に繋がる種々の変化を引き起こしている可能性を考えた。

免疫組織化学染色の結果、apoE-KO マウスの大動脈起始部 (好発部位) での Prx2 発現は、4 週齢では中膜平滑筋層に発現していたが 10 週齢では発現が減弱していた。20 週齢では、再び中膜平滑筋層で

の Prx2 発現が強くなっている部分が見られた。また、10 週齢のアポ E-KO マウス大動脈起始部 (好発部位) は、同じ 10 週齢の胸部大動脈 (遅発部位) よりも Prx2 発現の低下傾向が観察された。大動脈起始部での Prx2 発現低下は、mRNA レベルでも観察された。

10 週齢のアポ E-KO マウス大動脈では、Transgelin-2 の発現が起始部 (好発部位) 下の発現が胸部 (遅発部位) より低下していることが観察された。この時期の平滑筋細胞の分化状態が変化する可能性が示唆された。また、この時期の大動脈中膜平滑筋で MCP-1 の mRNA 発現が亢進していた。

アポ E-KO マウス大動脈から得た、初代培養平滑筋細胞の Prx2 発現を siRNA で抑制したところ、 α SM アクチンの発現が抑制される傾向が認められ、Prx2 が平滑筋の分化状態に影響を与える可能性が考えられた。

D. 考察

D-1 HDL 産生の促進

1) ABCA1 の肝での発現制御機構 [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ち、他組織とは異なる遺伝子発現制御のもとにある。課題責任者は肝独自の二重転写機構を発見し、HNF4 α が肝型の発現を制御する機構を明らかにしている。今年度はリン酸化を介して HNF4 α の発現を制御することが知られる AMPK の役割を解析した。AMPK 活性化剤である AICAR および metformin はラット肝細胞において ABCA1 mRNA 発現には影響せずに、ABCA1 タンパク分解を促進して ABCA1 発現を低下することが判明した。この応答に HNF4 α は関与していなかった。AMPK は生活習慣病の予防や治療の標的として注目されており、肝細胞で AMPK が活性化すると、コレステロール合成は抑制されることが知られている。本研究により、HDL 動態においても AMPK が重要な役割を持つことが示唆された。

2) 胆汁酸基本骨格を有する強力な LXR アゴニストの発見 [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て探索合成を行い、強力

な LXR アゴニスト 24-Nor を見いだした。24-Nor は他の合成アゴニストとは異なり、天然に存在する胆汁酸と同様の基本骨格を有し、その調製方法も極めて簡便である。また、内因性 LXR アゴニストであるオキシステロールと同等かそれ以上の活性を有していた。合成 LXR アゴニストは SREBP1c を介した中性脂肪増加作用が問題となっているが、24-Nor は SREBP1c 発現には影響しておらず、副作用を回避できる可能性が示された。

3) ABCA1 発現を促進する食品酒類成分 [諏訪]

近年、米国 CDC が率いる疫学研究(NHANES)が注目されている。この研究から生活習慣病の予防効果は、リグナン類の摂取で顕著にもたらされることが明らかにされた。とりわけ、リグナン類の摂取が用量相関を伴って HDL を上昇させることが示された。そこで本年度はリグナン類の中で、油滴機能に関わる、あるいは種子の発芽前後に存在するリグナン類に着目して ABCA1 発現への影響の解析を開始したが、4 種類に上昇活性は認められなかった。リグナン類のさらなる調製を進めており、今後の展開が期待される。

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

これまでにコレステラミンとの併用によりスタチンによる HDL 増加作用を検証可能なモデル動物を構築している。このモデルを用いて、異なるスタチン間での HDL に及ぼす影響の差異について検討を行った。ピタバスタチンあるいはアトルバスタチンをコレステラミンと併用投与したところ、血中 HDL が持続的に高値を示す投与開始 5 週間後においていずれの場合にも ApoA-I mRNA の発現増加が認められた。この結果から、スタチン-コレステラミン併用による HDL の増加作用に ApoA-I mRNA 発現の亢進が関与する可能性が示唆された。

本モデルにおけるスタチンの HDL への作用を解析するため、アガロースゲル電気泳動法を用いて血漿蛋白を分離し、HDL 粒子の移動度の変化について検討した。アガロースゲル電気泳動を用いてリポ蛋白粒子のもつ電荷の違いにより、HDL 亜分画の分布変化を解析できる可能性がある。今回の検討では各スタチンとコレステラミンとの併用投与によって HDL 粒子の移動度がやや大きくなる傾向がみられたが、その群間における差異は顕著なものではなかった。さらにサンプル数を増やし、持続的に HDL が高値を示す時点での亜分画分布について解析を行えば、差

異が明らかになると考えている。

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。SAA-HDL 形成が行われていても、SAA の糸球体濾過を完全に防ぐものではないことが示された。ABCA1 KO マウスでは、lipid-free SAA が容易に原尿中へ排泄され、近位尿細管上皮での再吸収と分解を受けるために血中からの消失が早まっていると考えられる。

2) 動脈硬化病変形成期の蓄積脂質と酸化ストレス [板部]

長期に亘り徐々に病巣が形成される動脈硬化症の初期の変化は捉えることが難しく、発症要因、発症機構の解明はほとんど進んでいないのが現状である。本研究では、動脈硬化モデル動物の apoE-KO マウスを用い、病巣形成ごく初期の血管組織の変化を解析した。Prx2 が 10 週齢の動脈硬化好発部位で発現低下していることを見出した。Prx2 は H_2O_2 を還元する細胞内の主要抗酸化酵素である。Prx2 の発現低下が、血管組織での細胞膜あるいはリポタンパク質などの酸化変性を促進するだけでなく、平滑筋細胞の脱分化や単球などの炎症性細胞の遊走を促して、動脈硬化症発症に繋がっているものと考えられた。

E. 結論

1. 肝の AMPK を活性化すると、ABCA1 の mRNA 発現には影響せず、ABCA1 タンパクの分解が亢進することを見いだした。
2. 胆汁酸誘導体 24-Nor は LXR に高親和性を示し ABCA1 発現を顕著に上昇し HDL 産生を強力に活性化することを明らかにした。
3. ゴマ種子等に含まれるリグナン類による ABCA1 発現への影響を解析した。
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肝のアポ A-I 発現と血中 HDL を増加させた。
5. アポ A-I が ABCA1 に結合し Rho-kinase を介する脂質放出のメカニズムを解析した。
6. 動脈硬化症発症前のマウス病変好発部位でペルオキシレドキシニン2の発現低下、中膜平滑筋で平滑筋細胞の脱分化、MCP-1 発現亢進を見出し、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につなが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. Yokoyama S. A potential screening factor for accumulation of cholesteryl ester transfer protein deficiency in East Asia: *Schistosoma japonicum*. ***Biochim. Biophys. Acta*** 2014, in press.
2. Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H, Miyashita Y, Ai M, Tanaka A, Sumino H, Murakami M, Inoue I, Kayamori Y, Nakamura M, Nobori T, Miyazawa Y, Teramoto T, Yokoyama S. Validation study of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples derived from healthy and diseased subjects. ***Atherosclerosis*** 2014, in press.
3. Yokoyama S., Ueshima H, Miida T, Nakamura M, Takata K, Fukukawa T, Goto T, Harada-Shiba M, Sano M, Kato K, Matsuda K. High-density lipoprotein of Japanese has markedly increased over the past twenty years. ***J. Atheroscl. Thromb.*** 2013, 21: 148-154
4. Ito J, Nagayasua Y, Hoshikawa M, Kato K, Miura Y, Asai K, Hayashi H, Yokoyama S., Michikawa M. Enhancement of FGF-1 release along with cytosolic proteins from rat astrocytes by hydrogen peroxide. ***Brain Research*** 2013, 1522:12-21.
5. Kheirollah A, Nagayasu Y, Ueda H, Yokoyama S., Michikawa M, Ito J. Involvement of cdc42/Rho kinase in apoA-I-mediated cholesterol efflux through interaction between cytosolic lipid-protein particles and microtubules in rat astrocytes. ***J. Neurosci. Res.*** 2014, 92:455-463
6. Nakamura K, Kondo K, Kobayashi T, Noguchi A, Ohmori K, Takabatake R, Kitta K, Akiyama H, Teshima R, Nishimaki-Mogami T. Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. ***Biol Pharm Bull.*** 2014;37:1-5.
7. Nakano T, Ninomiya T, Sumiyoshi S, Onimaru M, Fujii H, Itabe H., Nakashima Y, Sueishi K, Tsuruya K, Oda Y, Kitazono T, Kiyohara Y.: Chronic kidney

disease is associated with neovascularization and intraplaque hemorrhage in coronary atherosclerosis in autopsy samples from Japanese elders: the Hisayama Study. ***Kidney International***, 2013, 84:373-380.

8. Kitabayashi C, Naruko T, Sugioka K, Yunoki K, Nakagawa M, Inaba M, Ohsawa M, Konishi Y, Imanishi M, Inoue T, Itabe H., Yoshiyama M, Haze K, Becker AE, Ueda M.: Positive association between plasma levels of oxidized low-density lipoprotein and myeloperoxidase after hemodialysis in patients with diabetic end-stage renal disease. ***Hemodialysis International***, 2013 in press
9. Nose F, Yamaguchi T, Kato R, Aiuchi T, Obama T, Hara S, Yamamoto M, Itabe H.: Crucial role of perilipin-3 (TIP47) in formation of lipid Droplets and PGE2 production in HL-60-derived neutrophil. ***PLoS ONE***, 2013, 8: e71542
10. Noguchi E, Kato R, Ohno K, Mitsui A, Obama T, Hirano T, Itabe H., Yamamoto M.: The apolipoprotein B concentration in gingival crevicular fluid increases in patients with diabetes mellitus. ***Clinical Biochemistry***, 2014, 47:67-71

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許出願
核内受容体肝臓 X 受容体アゴニスト
井口裕介、宇根瑞穂
特願 2013-183522
(出願年月日:平成 25 年 9 月 3 日)

2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし