

報告書

平成16年度 丸木記念特別奨学研究費A 研究実績報告書

アルツハイマー病の進展過程における
活性化アストロサイトの関与に関する研究：
アミロイド前駆体蛋白トランスジェニックマウスを用いた解析

受賞者 森 隆 (埼玉医科大学 総合医療センター 研究部)

共同研究者 吉本 信雄¹⁾, 浅野 孝雄²⁾, 深津 亮³⁾, 野村 恭一⁴⁾

1. はじめに

アルツハイマー病 (AD) は、脳の老化を背景に発症し記憶障害を中心とした臨床症状を呈する神経変性疾患である。罹患脳においては、老人斑や神経原線維変性などの特徴的な病理所見が部位選択的に認められる。ADの病態生理の全体像は依然不明であるが、アミロイドβ蛋白 (Aβ) の産生と脳内異常蓄積が疾患成立の中心にあると理解されている。近年、ADの病態を進展させる重要な因子として、脳内で異常蓄積されたAβに対する炎症反応、特にグリア細胞 (ミクログリア/アストロサイト) の機能・動態に関する研究に注目が集まっている。我々は、これまで脳虚血に起因する梗塞巣周辺でのアストロサイトの活性化とサイトカインネットワークの異常亢進が、遷延性の脳梗塞体積増大と神経症状の増悪に関与することを明らかにしてきた。また、AD病態の重要な危険因子としても知られるアポリポ蛋白EのE4アイソフォームを保有することにより、脳虚血においても梗塞巣と神経症状の増悪をきたすことを、遺伝子改変動物を用いて明らかにしてきた。さらに、そのE4アイソフォーム特異的な神経細胞の脆弱性に、アストロサイトの活性化の異常亢進が関与していることを明らかにしてきた。即ち、アストロサイトの活性化がADと脳梗塞の病態進展の共通機序として、脳損傷の増悪に関与する可能性を世界に先駆け提示してきた。老年性痴呆は、高齢化が急速に進行している我が国においては極めて重要な社会問題であるが、その主要原因であるADと脳血管性痴呆

との間に共通して存在すると想定される病因、即ち、アストロサイトの活性化の役割をさらに追究することにより、そのいずれに対しても有効な新規治療薬の開発が可能になると期待される。本研究は、ADと脳梗塞の両者におけるアストロサイトの活性化の役割を、神経病理学および生化学的見地から探究し、既に部分的に薬効が確認されている新規薬剤の臨床応用を目指すtranslational researchの展開を目的として行った。

以下に記載する2-4の結果の概要は、ADの病態モデル動物として広く認知されているアミロイド前駆体蛋白トランスジェニックマウス (APP^{SWE}, line 2576) に対して、arundic acid (ONO-2506; 10 mg/10 mL/kg), 塩酸ドネペジル (1 mg/10 mL/kg), vehicle (0.1 vol% Tween 80 水溶液 10 mL/kg) のいずれかを24時間毎に12ヶ月齢から18ヶ月齢まで6ヶ月間にわたり経口投与し、1ヶ月間の休薬の後にその効果をWild-typeマウスを含めて比較したものである。Arundic acid (ONO-2506) はアストロサイト特異的蛋白 (S100B) の産生を抑制し、アストロサイトの活性化を制御することが知られている新規薬剤である。本研究では、対照薬としてADの病態改善薬として本邦においても臨床応用されている塩酸ドネペジルを用いた。

2. アミロイド前駆体蛋白トランスジェニックマウス (APP^{SWE}) の学習障害に対するarundic acid (ONO-2506) の効果

投与開始後の各月1回の頻度で6ヶ月間にわたり施行した水迷路試験における逃避潜時の結果をFig. 1に示す。APP^{SWE} (2576) Vehicle 群は、Wild 群と比較してpre day 1そして投与開始1カ月後から休薬開始1カ月後までの各セッションにおいて、逃避潜時が有意

1) 埼玉医科大学 総合医療センター 心臓内科
2) 埼玉医科大学 総合医療センター 研究部・脳神経外科
3) 埼玉医科大学 総合医療センター 神経精神科
4) 埼玉医科大学 総合医療センター 神経内科

に延長した(加齢と共に発現し進行するADモデルマウス特有の空間認知障害を示した). APPSWE (2576) ONO-2506 群では, 投与開始1から6カ月後の各セッションにおいて, 逃避潜時がAPPSWE (2576) Vehicle 群と比較して有意に短縮した(ONO-2506の投与により空間認知障害が軽減された). 興味深いことに, 休薬開始1カ月後のセッションにおいてもその効果が維持されていた. 一方, APPSWE (2576) 塩酸ドネペジル群では, 投与開始3そして4カ月後の各セッションにおいてのみ, 逃避潜時がAPPSWE (2576) Vehicle 群と比較して有意に短縮したものの, 投与開始5そして6カ月後, さらに休薬後の各セッションでは, 逃避潜時に有意な変化は認められなかった(薬理効果が投与開始5ヶ月後から失われた).

3. アミロイド前駆体蛋白トランスジェニックマウス (APPSWE) の $A\beta$ 斑形成に対する arundic acid (ONO-2506) の効果

各薬剤投与による $A\beta$ 斑占有率の結果を Fig. 2 に示した. Wild 群では, $A\beta$ 斑は認められなかった. $A\beta$ 斑占有率は cingulate cortex, entorhinal cortex, hippocampus の3領域全てにおいて, Wild 群に比べ APPSWE (2576) Vehicle 群で有意に増加した. APPSWE (2576) ONO-2506 群そして APPSWE (2576) 塩酸ドネペジル群では, いずれの領域においても $A\beta$ 斑占有率が APPSWE (2576) Vehicle 群に比べ有意に減少した. その効果は, APPSWE (2576) ONO-2506 群の方が優っていた.

次に, 観察された全ての $A\beta$ 斑を ①長径 $25\ \mu\text{m}$ 未満, ② $25\ \mu\text{m}$ 以上 $50\ \mu\text{m}$ 未満, ③ $50\ \mu\text{m}$ 以上の3グループに分類し, $A\beta$ 斑占有率の低下がどのタイプの $A\beta$ 斑に有効に作用したことによるものかを検討した. その結果, APPSWE (2576) ONO-2506 群では, いずれの領域においても3分類された全てのタイプの $A\beta$ 斑の数が有意に減少した. 特に, $50\ \mu\text{m}$ 以上の $A\beta$ 斑の数を有意に減少させる効果を示した. このことは, ONO-2506 が $A\beta$ 斑の maturation を抑制する効果があることを示している. 興味深いことに, APPSWE (2576) 塩酸ドネペジル群でも, entorhinal cortex の長径 $25\ \mu\text{m}$ 未満に分類される $A\beta$ 斑の数を除いて, 他の項目で有意に減少した.

4. アミロイド前駆体蛋白トランスジェニックマウス (APPSWE) の $A\beta$ 斑周囲グリーシスに対する arundic acid (ONO-2506) の効果

各薬剤投与による GFAP および S100 占有率の結果を Fig. 3, 4 に示した. GFAP および S100 占有率は, cingulate cortex, entorhinal cortex, hippocampus の3領域全てにおいて, Wild 群に比べ APPSWE (2576) Vehicle 群で有意に増加した. APPSWE (2576)

ONO-2506 群および APPSWE (2576) 塩酸ドネペジル群では, いずれの領域においても APPSWE (2576) Vehicle 群に比べ有意に減少した.

各薬剤投与による Iba-1 占有率は, cingulate cortex, entorhinal cortex, hippocampus の3領域全てにおいて, Wild 群に比べ APPSWE (2576) Vehicle 群で有意に増加した. APPSWE (2576) ONO-2506 群および APPSWE (2576) 塩酸ドネペジル群では, いずれの領域においても APPSWE (2576) Vehicle 群に比べ有意に減少した. その効果は, APPSWE (2576) ONO-2506 群の方が優っていた.

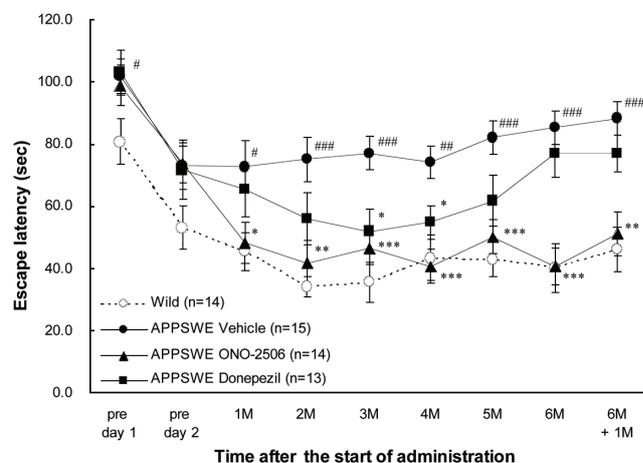


Fig. 1. Effects of ONO-2506 on the escape latency. Data are expressed as the mean \pm standard errors, and the number of animals used is indicated within parenthesis. Differences with $p < 0.05$ (#), $p < 0.01$ (##), and $p < 0.001$ (###) were significant when compared with the wild group (Wilcoxon rank sum test). Differences with $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***) were compared with the APPSWE (2576) vehicle group (Wilcoxon rank sum test).

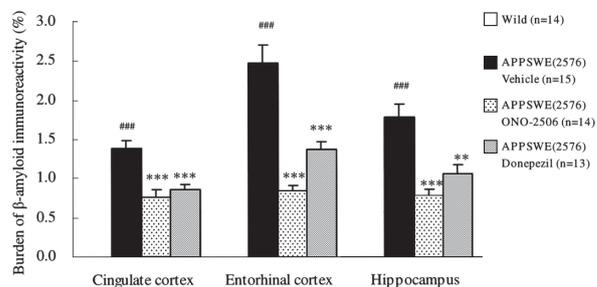


Fig. 2. Effects of ONO-2506 on the burden of β -amyloid immunoreactivity. Data are expressed as the mean \pm standard errors, and the number of animals used is indicated within parenthesis. Differences with $p < 0.001$ (###) were significant when compared with the wild group, while differences with $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) were compared with the APPSWE (2576) vehicle group (Wilcoxon rank sum test).

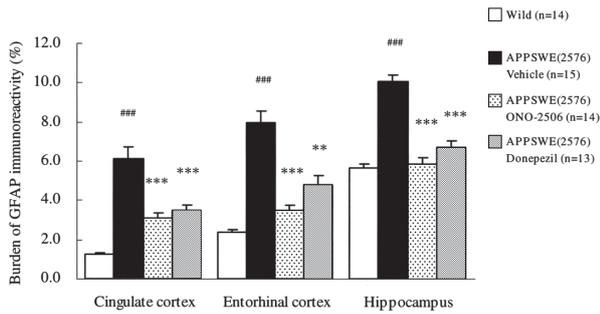


Fig. 3. Effects of ONO-2506 on the burden of GFAP immunoreactivity. Data are expressed as the mean \pm standard errors, and the number of animals used is indicated within parenthesis. Differences with $p < 0.001$ (###) were significant when compared with the wild group, while differences with $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) were compared with the APPSWE (2576) vehicle group (Wilcoxon rank sum test).

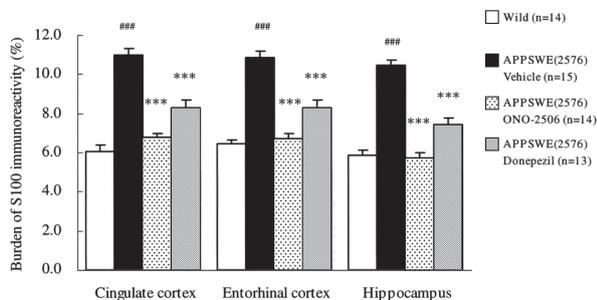


Fig. 4. Effects of ONO-2506 on the burden of S100 immunoreactivity. Data are expressed as the mean \pm standard errors, and the number of animals used is indicated within parenthesis. Differences with $p < 0.001$ (###) were significant when compared with the wild group, while differences with $p < 0.001$ (***) were compared with the APPSWE (2576) vehicle group (Wilcoxon rank sum test).

おわりに

これまで、AD 罹患者に対するアセチルコリンエステラーゼ阻害剤（塩酸ドネペジル）あるいは非ステロイド系抗炎症剤（イブプロフェン）の有効性が報告され、その一部は既に臨床応用されている。さらに、世界の研究グループが、新たなメカニズムからADに対する治療法を模索している。しかし、従来の研究はAD病態のみを対象としていることから、ADと脳血管性痴呆に共通する病態形成機序が存在するという観点が欠落していた。本研究の成果は、ADと脳血管性痴呆等の老人性痴呆のみならず、頭部外傷、てんかん、ダウン症、退行性脳病変を含む痴呆全体を対象とする画期的な治療法への展開が期待される。

謝辞

本研究は、平成16年度丸木記念特別奨学研究費Aおよび日本学術振興会研究費補助金(C)(18500279)により行われた。研究の一部は、米国南フロリダ大医学部 精神神経科 Jun Tan 博士、エール大学 医学部 免疫学教室 Terrence Town 博士との国際共同研究として行われた。

文献

Takashi Mori, Terrence Town, Jun Tan, Nobumichi Yada, Yuko Horikoshi, Junki Yamamoto, Taiji Shimoda, Yoshihisa Kamanaka, Narito Tateishi, Takao Asano. Arundic acid ameliorates cerebral amyloidosis and gliosis in Alzheimer transgenic mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006;318(2):571-8.

報告書

平成16年度 丸木記念特別奨学研究費A 研究実績報告書

骨髄細胞移植による難治性創傷に対する血管新生療法の開発：
生体制御システムにおける環境設計に基づいた臨床応用へのアプローチ

受賞者 市岡 滋 (埼玉医科大学 形成外科)

高齢化や生活習慣病の蔓延によって糖尿病、血行障害、寝たきりなどに起因する慢性創傷・難治性潰瘍が急増しており医療界全体のトピックとなっている。このような状況における形成外科の役割は欠損を速やかに再建・閉鎖することである。通常の保存加療では治癒が困難であるうえに創床の状態が悪く植皮による閉鎖に適さないことも多い。形成・再建外科の観点からは動脈皮弁形成、筋皮弁移植、マイクロサージェリーによる遊離複合組織移植などの血行を有した組織移植の適応といえるが、これらは麻酔や外科手技による侵襲が大きく、全身状態やレシピエント血行の悪条件などから施行できないことも少なくない。また皮弁壊死など移植組織にトラブルが生じた場合はドナーの犠牲も相まって手術前よりも劣悪な状況に陥るリスクがある。

創傷の局所治療では治癒を阻害している要因を除去して創床環境を整備する wound bed preparation といわれるマネージメントが基本となる。しかし最近では末梢動脈閉塞性疾患 (peripheral arterial disease; PAD)、慢性静脈不全 (chronic venous insufficiency; CVI)、糖尿病性足病変などそもそも治癒に必要な組織血流が不全なゆえに難治となる創傷が急増している。これらの症例では通常の創傷局所へのマネージメントのみで治癒を得ることは困難である。

動脈性の血行不全においては経皮経管血管形成術 (percutaneous transluminal angioplasty: PTA) やバイパス手術など血行再建術の適応があれば最優先となる。CVI に関しても表在静脈の抜去 (ストリッピング)、不全交通枝の結紮、硬化療法など血管に対する治療が先決である。

しかし特に糖尿病合併の PAD では病変部位が末梢の細い血管であったり、石灰化が高度で血行再建術の適応とならない場合も多い。血行再建術を行っても創傷治癒に十分な血行が得られるとは限らない。また深部静脈血栓による CVI では血管への根治的治療が困難

な例もある。このような状況において創傷治療の領域では低侵襲で創治癒を促進する手段として再生医療の利用が求められている。

再生医療とは生体材料 (バイオマテリアル)・成長因子・細胞などを積極的に利用して、体の損傷した部分 (組織・臓器) を修復・再生する治療である。

生体材料としては新生血管細胞や線維芽細胞が増殖進展する足場 (scaffold) となる素材が望まれる。この目的に適する承認済み材料がコラーゲンマトリックスである。人工真皮という呼称が一般的である。成長因子製剤ではヒト型組換え塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 製剤が皮膚潰瘍に対して認可を得ている。これらに加え細胞を用いた難治性創傷治療の実用化が本研究の課題である。

治療に用いる細胞として最も注目されているのは骨髄細胞である。骨髄には造血幹細胞をはじめとする血球系細胞のみでなく、間質中には脂肪、骨、軟骨などの中胚葉系組織に分化する間葉系幹細胞やそれらの前駆細胞がある。また1997年 Asaharaらは、成人末梢血中の CD34 陽性細胞の分画から内皮へ分化する一群の細胞が得られることを証明し、成人 (成熟動物) における出生後の血管新生においては、既存の内皮細胞のみでなく、流血中の血管内皮前駆細胞の取り込みという血管発生型の血管形成も関与することを示唆した。これら細胞は骨髄に由来し、低酸素などの刺激・需要に応じて末梢血中に動員 (mobilization) され、血管新生部位に取り込まれることが示唆されている。これらの理由で骨髄が再生医療を遂行するための有力な細胞源とされている。

われわれは自己細胞と scaffold を組み合わせた新鮮非分離自家骨髄浸透コラーゲンマトリックスによる創床再生療法を開発・実用化した。

方法は患者の腸骨から骨髄液を 10-30 ml 穿刺吸引し、新鮮非分離骨髄をコラーゲンマトリックス (人工真皮) に浸透させる (bone marrow-impregnated

collagen matrix). デブリドマンした創面に骨髄細胞浸透コラーゲンマトリックスを移植する. 血管化組織 (vascularized tissue) 誘導後の創収縮・上皮化または二期の植皮術により創を閉鎖する.

先進医療における認可, 保険収載なども視野に入れ, とくに安全性を考慮して細胞分離や培養を行わない自己骨髄全血と, 承認済みで広く臨床で使われているコラーゲンマトリックス (人工真皮) を用いることとした. 骨髄細胞の成長因子産生能, 分化能などの多能性およびコラーゲンマトリックスの scaffold としての機能が創傷治癒過程の血管新生を強力に促進し, 速やかに血行豊富な肉芽組織を誘導して難治性潰瘍を治癒に導くことが期待される.

骨髄から細胞分離を行わないため, 移植される間葉系幹細胞・血管内皮前駆細胞の数が少なく治療効果が十分に得られないという懸念もあるが, 非分離骨髄の移植により著明な創傷治癒血管新生の促進効果が認められることは *in vivo* 微小循環の可視化モデルを用いた実験で確認済みである. さらに骨髄細胞は皮膚の創傷治癒における血管新生のみならずマトリックスの形成にも関与することが実験的に示されている.

以下に本研究に関連する実績を記す.

<実績リスト>

著書・総説

- Ichioka S. Techniques in visualization and evaluation of the *in vivo* microcirculation. In: Leondes CP, editor. Biomechanical systems technology: Cardiovascular systems (Vol.2), World Scientific Publishing Co Pte Ltd, Singapore, In press.
- 市岡滋. 自家骨髄移植による創傷治療. PEPER (印刷中)
- 市岡滋. 難治性潰瘍の再建・再生治療. 関節外科 2007;26(6):707-8.
- 市岡滋. 形成外科医による下腿潰瘍の治療. 皮膚科の臨床 2007;49(3):269-74.
- 市岡滋. 指尖部損傷に対する各種創傷被覆材による治療. PEPERS 2007;13:27-32.
- 市岡滋. 顔面・四肢外傷治療のABC 顔面外傷 創傷形態からみた処置法 擦過傷 (創), 挫傷 形成外科 2007;491:S47-S53.
- 市岡滋. 創傷治療における再生医療. Expert Nurse 2007;23(2):19-21.
- 市岡滋. 形成外科の立場から: 再建外科と再生医療 医工学治療 (NPO 日本医工学治療学会機関誌) 2006;18(3):152-6.
- 市岡滋. 再生医療と創傷ケア. 臨床看護 2006;32(11):1563-6.
- 市岡滋, 横川秀樹. 褥瘡の薬物療法. 薬事新報 2006; 2436:9(899)-15(905).
- 市岡滋. 特集フットケア 難治性潰瘍の再建療法とは. 肥満と糖尿病 2006;5(4):603-4.
- 市岡滋. 骨髄細胞を用いた難治性潰瘍治療. 医学のあゆみ 2006;217(7):795-6.
- 大浦紀彦, 三井秀也, 市岡滋. 皮膚科医のための臨床トピックス 慢性皮膚潰瘍の maggot 治療 (MDT). 臨床皮膚科 2006;60(5):152-5.
- 市岡滋. 実践創傷治療. 京都:金芳堂;2006.
- 市岡滋. 皮膚科に必要な他科の知識: 形成外科 片山一郎, 土田哲也, 橋本隆, 古江増隆, 渡辺晋一, 編集. 皮膚科学. 東京:文光堂;2006;173-5.
- 市岡滋. 褥瘡外科療法の基礎 (解説) 日本褥瘡学会誌 2006;8(1):28-33.
- 市岡滋. 生体反応からみた褥瘡の発生機序. 宮地良樹, 真田弘美 編集. 新・よくわかって役に立つ褥瘡のすべて. 東京:永井書店;2006;17-21.
- 市岡滋. ラップ療法: 私はこう思う Expert Nurse 2005;21(2):119-21.
- 市岡滋. 褥瘡の外科治療に用いる基本手技. 臨床看護 2005;31(10):1479-83.
- 市岡滋. 創傷治療のこれから. Homecare Medicine 2005;6(7):47-50.
- 市岡滋. 糖尿病性足病変② 糖尿病性足病変の診断・治療. Homecare Medicine 2005;6(6):44-8.
- 市岡滋. 糖尿病性足病変① 糖尿病性足病変の病態. Homecare Medicine 2005;6(5):46-8.
- 市岡滋. Moist wound healing (湿潤環境創傷治療). 塩谷信幸 監修 創傷治療. 東京:ブレーン社; 2005;66-75.
- 市岡滋. 創傷被覆材. 波利井清紀, 森口隆彦, 編集. 形成外科 ADVANCE シリーズ 創傷の治療: 最近の進歩. 東京:克誠堂;2005;116-26.
- 市岡滋. 血管病変による難治性潰瘍. Homecare Medicine 2005;6(4):37-41.
- 市岡滋. 褥瘡③ 褥瘡の治療 深い褥瘡・難治化した褥瘡への対応. Homecare Medicine 2005;6(3):33-9.
- 市岡滋. 褥瘡② 褥瘡の治療 予防的ケアと褥瘡治療の概要. Homecare Medicine 2005;6(2):38-41.
- 市岡滋. 真皮欠損グラフト (人工真皮) の新しい展開 細胞 2005;37(5):207-9.
- 浅野隆之, 中川雅裕, 市岡滋, 中塚貴志. リハ医が知っておきたい術式のポイント 形成外科 褥瘡. Journal of Clinical Rehabilitation 2005;14:104-7.
- 浅野隆之, 中川雅裕, 市岡滋, 中塚貴志. リハ医が知っておきたい術式のポイント 形成外科 皮膚移植・皮弁. Journal of Clinical Rehabilitation 2005; 14:4-7.
- 市岡滋. 褥瘡① 褥瘡の発生と見方. Homecare Medicine 2005;6(1):39-43.

原著論文

- Ichioka S, Ando T, Shibata M, Sekiya N, Nakatsuka T. Oxygen consumption of keloids and hypertrophic scars. *Ann Plast Surg* (in press).
- Ichioka S, Sekiya N, Shibata M, Nakatsuka T. AlphaV beta3 ($\alpha v \beta 3$) integrin inhibition reduces leukocyte-endothelium interaction in a pressure-induced reperfusion model. *Wound Repair Regen* (in press).
- Tanaka R, Ichioka S, Sekiya N, Ohura N, Uchino S, Ojima A, Itoh Y, Ishihara O, Nakatsuka T, Ikebuchi K. Elastic plasma protein film blended with platelet releasate accelerate healing of diabetic mouse skin wounds. *Vox Sang* 2007;93(1):49-56.
- Takeda A, Iseki H, Otani Y, Takeuchi H, Ichioka S, Kawai Y, Shinozuka N and Koyama I (2006). Lymphatic mapping and lymphatic endothelial cell isolation in colorectal cancer patients. *Asian-Pacific J Clini Oncol* (in press).
- Ichioka S, Okabe K, Ohura N, Yokogawa H, Nakajima M, Nakatsuka T. Versatility of the Limberg flap and the V-Y Flap (based on a distal perforator) for covering sacral ulcers. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2007;41:65-9.
- Shibata M, Ohura N, Sekiya N, Ichioka S, Yamakoshi T, Yamakoshi K, Kamiya A. Compact capillaroscopy for human skin using CCD video-probe. *Microvascular Review and Communications*. (in press).
- Shibata M, Ichioka S, Togawa T, and Kamiya A. Arterioles contribution to oxygen supply to skeletal muscles at rest. *Eur J Appl Physiol* 2006;97:327-31.
- Kurita M, Ichioka S, Oshima Y, Harii K. Orthopaedic POSSUM scoring system: An assessment of the risk of debridement in patients with pressure sores. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2006;40(4):214-8.
- Shibata M, Qin K, Ichioka S, Kamiya A. Vascular wall energetics in arterioles during nitric oxide dependent and independent vasodilation. *J Appl Physiol* 2006; 100(6):1793-8.
- Ichioka S, Kouraba S, Sekiya N, Ohura N, and Nakatsuka T. Bone Marrow-Impregnated Collagen Matrix for Wound Healing: Experimental Evaluation in a Microcirculatory Model of Angiogenesis, and Clinical Experience. *Br J Plast Surg* 2005;58(8):1124-30.
- 時岡一幸, 市岡滋, 関谷直美, 工藤聡, 中塚貴志. ヒト塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)およびプロスタグランジンE1(PGE1)の局所持続投与法に関する実験的検討. *日本形成外科学会誌* 2005;25(9):583-9.
- Ohura N, Ichioka S, Sudo T, Nakagawa M, Kumaido K, Nakatsuka T. Dislocation of the bilateral mandibular condyle into the middle cranial fossa: review of the literature and clinical experience. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;64(7):401-4.
- Ohura N, Ichioka S, Nakatsuka T, Shibata M. Evaluating dressing materials for the prevention of shear force in the treatment of pressure ulcers. *Journal of Wound Care* 2005;14(9):401-4.
- 栗田昌和, 大島淑夫, 手島玲子, 白石知大, 市岡滋. 外傷治療における閉鎖吸引療法の有効性. *整形・災害外科* 2005;48(8):967-71.
- 栗田昌和, 大島淑夫, 市岡滋, 大和田愛, 青井則之. 褥瘡患者に対する観血的処置の全身状態に対する影響(POSSUMによる分析). *日本褥瘡学会誌* 2005;7(2):178-83.
- 渡辺裕美, 大浦紀彦, 市岡滋, 中塚貴志. 難治性潰瘍に対する局所陰圧療法の臨床経験. *日本形成外科学会誌* 2005;25(8):509-16.
- Ichioka S, Ohura N, Nakatsuka T. Benefits of surgical reconstruction in pressure ulcers with a nonadvancing edge and scar formation. *Journal of Wound Care* 2005; 14(7):301-5.
- Shibata M, Ichioka S, Ando J, Togawa T, Kamiya A. Non-linear regulation of capillary perfusion in relation to tissue pO₂ changes in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2005;94(3):352-5.
- Tsuji S, Ichioka S, Sekiya N, Nakatsuka T. Analysis of Ischemia-Reperfusion Injury in a Microcirculatory Model of Pressure Ulcers. *Wound Repair Regen* 2005; 13(2):209-15.
- Ichioka S, Ohura N, Nakatsuka T. The positive experience using a growth factor product on deep wounds with bone exposure. *Journal of Wound Care* 2005;14(3):105-9.
- Asano Y, Ichioka S, Shibata M, Ando J, Nakatsuka T. Sprouting from arteriovenous shunt vessels with increased blood flow. *Med Biol Eng Comput* 2005;43:126-30.
- Shibata M, Ichioka S, Kamiya A. Estimating oxygen consumption rates of arteriolar walls under physiological conditions in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(1):H295-300.

報告書

平成16年度 丸木記念特別奨学研究費A 研究実績報告書

時計遺伝子によるPPARのプロモーターへのコアクチベーター CBP/p300
およびSRC-1を介する作用究明

受賞者 井上 郁夫 (埼玉医科大学 内科学 内分泌・糖尿病内科部門)

共同研究者 中村 浩一¹⁾, 池田 正明²⁾

はじめに

ペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)はステロイド/甲状腺ホルモン受容体スーパーファミリーのひとつで, ペルオキシゾームが増殖する際の主要な転写因子として作用し, さまざまな遺伝子を調節する。加えて, PPARは, 最近注目されているメタボリックシンドロームとの関連性に興味をもたれている核内受容体でもある。特に, 齧歯動物, ヒト, 両生類において, 3種類のPPAR, PPAR α , PPAR β またはPPAR δ , PPAR γ が確認されている。PPAR α は, 肝臓内で最も大量に発現され, ミトコンドリアとペルオキシゾームの β 酸化と関係している。PPAR β/δ は広く発現されるが, その機能的役割の解明は今後の課題となっている。PPAR α の活性化は, 脂肪酸の β 酸化を介して細胞中の脂肪酸含有量を減少させるが, PPAR γ の活性化は脂肪組織に選択的に発現される転写因子であり, 脂肪細胞の分化と関係しているものと思われる。

PPARは, デキサメタゾン等のステロイドホルモンによっても調節されていると言われ, ステロイドの日内変動の影響を受けることはよく知られている。さらに, 最近の成績によれば, 光刺激とは関係なく, 摂食周期が末梢時計を調節する可能性があることも示唆されている。相互に作用する正と負の転写・翻訳フィードバックループが, ショウジョウバエと哺乳動物の両方における概日発振を形成していることも報告されている。マウスにおける最も特徴的なフィードバックループには, 3つのPeriod 遺伝子 (mPER1-3)と2つのcryptochrome 遺伝子 (mCRY1, 2)が含まれていて, 現在では, mPERとmCRYの転写は, 交互にコンセンサス配列であるEボックス配列と結合するCLOCK/

BMAL1のヘテロ二量体を蓄積することによって形成されると考えられている。

最近, Peter McNamaraらは, レチノイド受容体であるレチノールX受容体 (RXR)とRARが時計遺伝子であるMOP4およびCLOCKと相互作用することを報告した。RXRはPPARと結合し, ペルオキシゾーム増殖因子応答配列 (PPRE)と結合するヘテロ二量体を形成する転写因子である。そこで, 我々は, PPREを有する, acyl-CoAオキシダーゼのプロモーター遺伝子, 細胞内レチノール結合蛋白質II (CRBPII)のプロモーター遺伝子, 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-補酵素A (HMG-CoA)シンターゼのプロモーター遺伝子などが, CLOCK/BMAL1によって, それらの転写活性がどのように調節されるかどうか, さらに, 逆に, PPAR/RXRによる, Period 遺伝子のプロモーター領域に存在するEボックス配列への作用を, それぞれ検討した。

材料と方法

DNA配列決定

自動シーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Perkin Elmer, Foster City, CA)を使用し, PCR産物の直接配列決定を行った。全DNA配列は, 両DNA鎖を読み取って確認した。

ウエスタンブロッティング

蛋白発現量はウエスタンブロッティングにて評価した。特異的免疫活性は, Amersham ECLキットで測定し, その後に, 処理済みサンプルを10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)にアプライし, セミドライブロッティングによってニトロセルロース膜 (Millipore)にトランスファーした。ヒト時計遺伝子 (PER1, PER2, CYR1, CRY2)の蛋白質に対する抗体は, Santa Cruzから入手し, ニトロセルロース膜は, TBS-Tween/5%ドライミルクで一晩処理し, ヒトPER1, PER2, CRY1, CRY2抗体に対するヤギ抗蛋白質

1) 埼玉医科大学 生化学教室, 2) 埼玉医科大学 生理学教室

で1時間にわたってインキュベートした。ニトロセルロース膜は、洗浄後、ペルオキシダーゼと conjugated した家兎抗ヤギモノクロナール抗体でインキュベートし評価した。

全長ヒト PPAR α , PPAR γ 1, RXR α , CLOCK, BMAL1のサブクローニング

全長ヒト PPAR α (Genebank L-02932), PPAR γ 1 (Genebank L-40904), RXR α (Genebank X-52773) cDNAの特異的DNAフラグメントは、骨格筋(#9514, 宝酒造株式会社)または肝臓(#9505, 宝酒造株式会社)から pCI-neo哺乳類動物発現ベクター (pCI-neo) (Promega, WI, USA)にサブクローニングし、自動シーケンサーで配列決定を行った。PPAR α については、1407 bp *Sal* I/*Not* Iフラグメントを pCI-neoの *Sal* I/*Not* I部位にサブクローニングし、ベクターを pCI-PPAR α と命名した。PPAR γ 1もベクターの *Sal* I/*Not* I部位にサブクローニングしベクターを pCI-PPAR γ 1と命名した。RXR α もベクターの *Xho* I/*Not* I部位にサブクローニングしベクターを pCI-RXR α と命名した。CLOCKと BMAL1については、フラグメントを pcDNA3 (Invitrogen)の *Sal* I/*Not* I部位にサブクローニングし、ベクターを pc-CLOCKおよび pc-BMAL1とそれぞれ命名した。

コアクチベーターのクローニング

PPARのコアクチベーターである cAMP response element binding protein (CREB) binding protein (CBP/p300)および steroid receptor coactivator-1 (SRC-1)に加えて、SRC-2, SRC-3, peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1) α , PGC-1 β の cDNA 全長の特異的DNA断片は、肝臓 (CLONTECH)の cDNAライブラリーから、pCI-哺乳類発現ベクター (Promega, 米国ウィスコンシン州)をサブクローニングし作成した。上記で得られた遺伝子断片は、*Sal* I/*Not* I断片として生成し、pCI-neoの *Sal* I/*Not* Iサイトにサブクローニングし、それぞれ pCI-CBP, pCI-SRC-1, pCI-SRC-2, pCI-SRC-3, pCI-PGC-1 α , pCI-PGC-1 β とした。

PPARs/RXR α 活性と CLCK/BMAL1のレポーターアッセイ

プロトコールに従い、TfxTM-50 試薬 (Promega)を用いてレポーターアッセイのための一時的なトランスフェクションを行った。トランスフェクション効率が低い、ヒト腎臓 293T細胞 (293T cells), CV-1サル腎臓細胞 (CV-1 cells), NIH3T3細胞, COS-1細胞を使用した。

我々は、まず、PPREとEボックスの間にクロストークが存在するかどうかを検討するため、PPARs/RXR α またはCLOCK/BMAL1による標的遺伝子のPPREの転写活性を最初に測定した。次に、我々は、acyl-CoAオキシダーゼのプロモーター遺伝子、CRBPIIのプロモーター遺伝子、HMG-CoAシンターゼのプロモーターを使用した。これらの遺伝子はルシフェラー

ゼ遺伝子の上流のpGL3-Basic (pGL3-Basic) (Promega)の *Kpn* I/*Nco* I部位に連結させ、それぞれ pAOX-Luc, pCRBPII-Luc, pHMG-Lucと命名した。さらに、我々は、CRBPIIのプロモーター遺伝子を使用し、Renillaルシフェラーゼ遺伝子の上流の phRG-B (Promega)の *Kpn* I/*Nco* I部位にも挿入し pCRBPII-R-Lucと命名した。

さらに、我々は、PPARs/RXR α またはCLOCK/BMAL1によるEボックスのための転写活性化を測定するため、ルシフェラーゼ遺伝子の上流のpGL3-Basic (pGL3-Basic) (Promega)の *Kpn* I/*Nco* I部位に、これらの遺伝子をクローニングし、pPER-Lucと命名した。次にマウスPER1のプロモーター領域を使用し、それらの転写活性を検討した。なお、マウスPER1のためのプロモーター領域 (約2,000個の塩基対)には、3つのEボックス配列 (5'-CACGTG-3')が存在する。以上で得られたそれぞれのコンストラクト pPPRE-Luc, pCRBPII-Luc, pHMG-Lucまたは pPER-Lucと pRL-TKは、pCI-PPAR α , pCI-PPAR γ 1, pCI-RXR α , pcDNA-CLOCKまたは pcDNA-BMAL1の存在下あるいは非存在下において、細胞に同時トランスフェクトさせ、24ウェルプレートで培養させ実験に使用した。トランスフェクトしたDNAの合計量 (0.6 μ g)は、キャリアDNA (pCI-neoまたは pcDNA3)で標準化し、24時間後、PPARsリガンド/アクチベーターで細胞に刺激を加え、この状態を24時間継続した。最後に、pAOX-Luc, pCRBPII-Luc, pHMG-Lucまたは pPER-Lucに対するルシフェラーゼ活性を Renillaルシフェラーゼ活性に対して標準化した。

一時トランスフェクション/同時トランスフェクション

pCI-PPAR α (3 μ g), pCI-PPAR γ 1 (3 μ g), pCI-RXR α (3 μ g), pcDNA (3 μ g)または pcDNA-BMAL1 (3 μ g)の一時トランスフェクションは、TfxTM-50 試薬 (Promega)をプロトコールに従って使用し、100 mmディッシュ中の細胞 (1×10^6)に対して実施した。24時間後、試験薬で細胞を刺激し、この状態を24時間継続した。その後、ウエスタンブロッティングでも分析した。

CRBPII-Lucプラスミドの欠失 (図1)

CRBPIIのプロモーターは、4つの反復配列を有している (5'-AG(G/T)TCA-3') (5'-gtgtcccactctgtctcacAGGTCACAGGTCACAGGTCACAGTTCAtttctctgtctctgtc-3', -670 ~ +63)ので、CRBPII-Lucプラスミド (-670 ~ +63)に、PCR法または Exo/Mung Bean Deletionキット (Stratagene)を使用して、CRBPII-Lucの欠失させたプラスミドは、図1のように作成した。del-0-CRBPII-Lucプラスミドは、反復配列 (5'-AG(G/T)TCA-3')が含まれていないコンストラクトで、del-1-CRBPII-Lucプラスミドは1つの反復配列 (5'-AG(G/T)TCA-3')が含まれ、del-2-CRBPII-Lucプラスミドは2つの反復配列 (5'-AG(G/T)TCA-3')が含まれ、さらに、del-3-CRBPII-

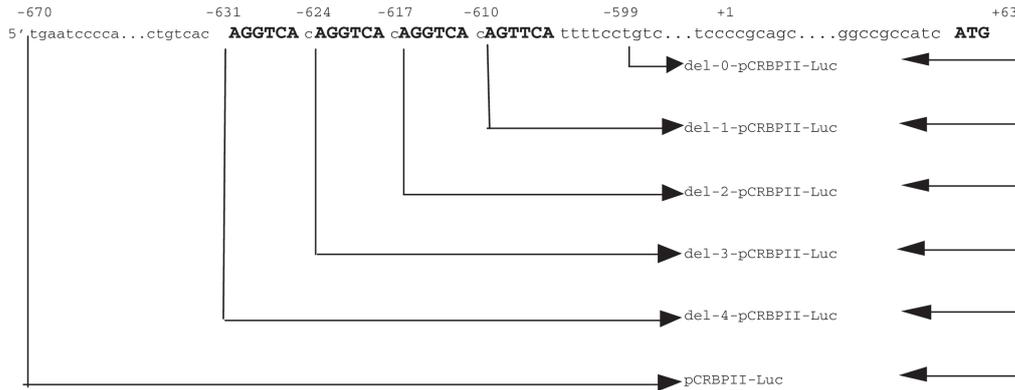


図1. CRBPPII-Lucプラスミドの欠失.

Lucプラスミドは3つの反復配列 (5'-AG(G/T)TCA-3') が含まれている. また, del-4-CRBPPII-Lucプラスミドは4つの反復配列 (5'-AG (G/T)TCA-3')が含まれているコンストラクトである.

統計解析

3回の実験に加え, 単独実験を4回実施した. パラメーターデータは, 平均±SDで表示し, 群間差はScheffeのF検定で評価した.

結果と考察

293T細胞におけるレポーター遺伝子アッセイにより, fenofibric acid (図2A) およびトログリタゾン (図2B) がacyl-CoAオキシダーゼの転写活性を用量依存性に増加させ, 50 ng のCLOCK/BMAL1 遺伝子の同時トランスフェクションによって, その活性が有意に減少した(図2A, 2B).

また, acyl-CoAオキシダーゼのPPREを介する転写活性が, 活性炭未処理培地において, CLOCK/BMAL1 遺伝子導入によって減少し, 50 ng のCLOCK/BMAL1 遺伝子量で最低値となった(図3A-C). さらに, CLOCK/BMAL1 遺伝子のトランスフェクトする遺伝子量をさらに増大させると, CLOCK/BMAL1 遺伝子によるacyl-CoAオキシダーゼのPPREを介する転写活性が再び増大し, 80 ngのCLOCK/BMAL1でピーク値に達した(図3A-C). そしてその転写活性は, PPAR α /RXR α 遺伝子(図3B), PPAR α リガンド/アクチベーターであるfenofibric acid (図3C)を加えることにより増大した. なお, 使用した培地を活性炭(Charcoal/Dextran Treated FBS, HyCLone)で処理することで, 培地から内因性PPARs/RXR α リガンド/アクチベーターを完全に除去することが可能となるが, 培地から内因性PPARs/RXR α リガンド/アクチベーターを完全に除去した場合, その転写活性の最高値と最低値となるCLOCK/BMAL1 遺伝子量がそれぞれ

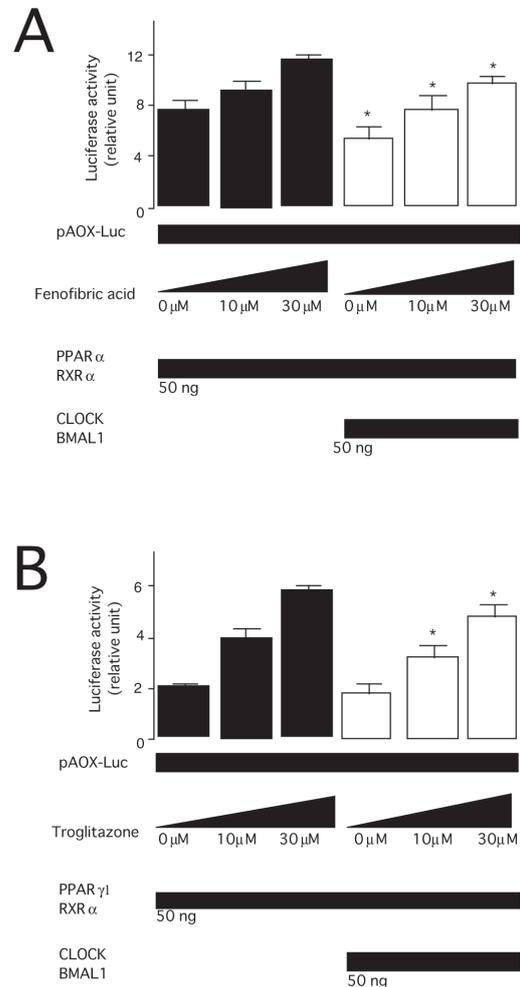


図2. ヒト腎臓293T細胞におけるCLOCK/BMAL1 遺伝子によるacyl-CoAオキシダーゼのPPAR α /RXR α を介する転写活性の抑制(A)とPPAR γ 1/RXR α を介する転写活性の抑制(B). pAOX-Lucのルシフェラーゼ活性はpRL-TKのルシフェラーゼ活性に対して標準化した. 3回の実験に加え, 4回の単独実験を実施した. 全てのデータは, 平均±SDで表示した. CLOCK/BMAL1 遺伝子によって処理されていない細胞と比較し, 0.05未満を有意とした(*p<0.05).

れ, 30 ng (最高値), 80~90 ng (最低値)と変化した(図3D-F). さらに, これらの変動は, CBP, SRC-1, SRC-2, SRC-3, PGC-1 α , PGC-1 β などの様々なコアクチベーターの種類により, 大きく変化することも明らかになった(データ未発表).

以上の我々の成績から, PPAR α /RXR α 遺伝子あるいはPPAR α リガンド/アクチベーターの両方または一方が, CLOCK/BMAL1 遺伝子によるPPREの転写活性に作用していることを示している. さらに, それらの変動が, 再び減少するという, 新たな制御機構の存在の可能性が示唆された. また, 結果に示していないが, 各量のCLOCK/BMAL1 遺伝子でトランスフェクトした293T細胞でのヒト時計遺伝子(PER1, PER2, CYR1, CRY2)の蛋白発現分析を行ったところ, 実際, それらの蛋白発現変動が明らかに認められ, CLOCK/BMAL1 遺伝子によるPPREの転写活性への作用の機序に, これらの時計遺伝子の蛋白発現変動がそれぞれ関与している可能性が考えられた.

次に, CLOCK/BMAL1 遺伝子のmPERの転写対

する作用が, PPAR α /RXR α によって, 変動するかどうかを検討するため, 239T細胞, COS-1細胞, NIH33細胞において, PER 遺伝子の転写に対するCLOCK/BMAL1 遺伝子の作用を評価した. mPER1 遺伝子の転写活性は, CLOCK/BMAL1 遺伝子によって, 添加したCLOCK/BMAL1 遺伝子量に依存して活性化され(図4), PPAR α /RXR α を添加すると, mPERの転写活性が有意に低下する結果が得られた(図4).

結論として, 本研究の結果から, CLOCK/BMAL1 遺伝子とPPAR群/RXR α による, PPREとEボックスとの間にクロストークが存在するという, 新たな調節機序の存在が示唆された. また, それらのCLOCK/BMAL1 遺伝子によるPPREの転写活性は, PPAR群/RXR α 遺伝子およびそれらのリガンド/アクチベーターの両方または一方によって調節されている可能性も示された(図5). 今後, メタボリックシンドロームと時計遺伝子がどのように関り, 最近, 我々が注目している腸管粘膜での脂質代謝にも, 時計遺伝子がどのように関与するか, さらに検討を加える予定である.

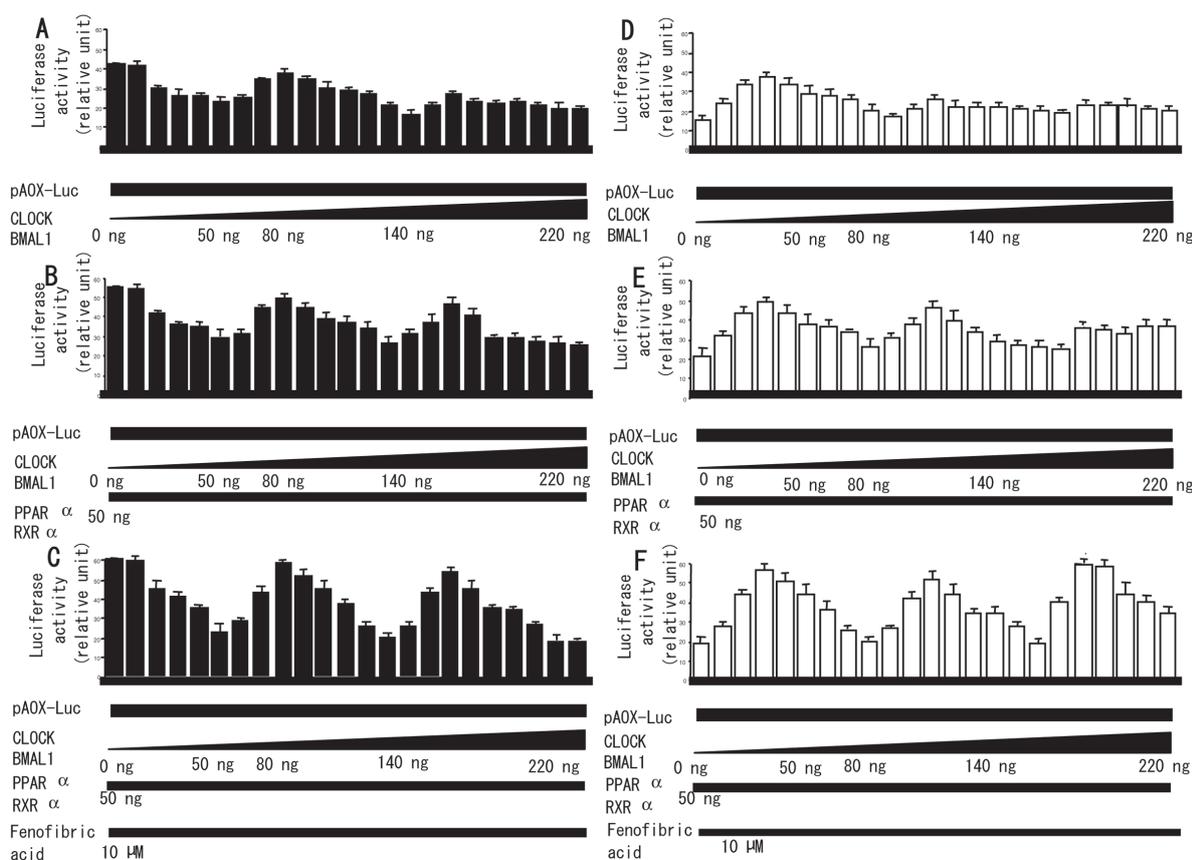


図3. ヒト腎臓293T細胞における用量依存性CLOCK/BMAL1 遺伝子(0~220 ng)によるacyl-CoAオキシダーゼ(AOX)のPPAR α /RXR α を介する転写活性の変動. 活性炭未処理培地(A~C)と活性炭処理培地(D~F)における結果. pAOX-Lucのルシフェラーゼ活性は, pRL-TKのルシフェラーゼ活性に対して標準化した. 測定は3回実施し, 4回の単独実験を実施し, 全てのデータは, 平均 \pm SDで表示した.

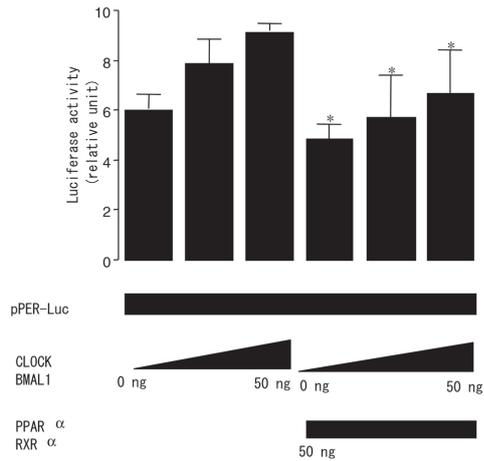


図4. ヒト腎臓293TにおけるPPAR α /RXR α 遺伝子の、CLOCK/BMAL1遺伝子によるPeriodic (PER)プロモーターの活性化の抑制作用. pPER-Lucのルシフェラーゼ活性は、pRL-TKのルシフェラーゼ活性に対して標準化した. 測定は3回実施し、4回の単独実験を実施し、全てのデータは、平均±SDで表示した. PPAR α /RXR α 遺伝子によって処理されていない細胞と比較し、0.05未満を有意とした(*p<0.05).

参考文献

- 1) Kunishima C, Inoue I, Oikawa T, et al. Activating effect of Benzbromarone, a uricosuric drug, on peroxisome proliferator-activated receptors. PPAR Res (in press).
- 2) Nakano T, Inoue I, Koyama I, et al. Disruption of the murine intestinal alkaline phosphatase gene Akp3 impairs lipid transcytosis and induces visceral fat accumulation and hepatic steatosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007;292:G1439-49.
- 3) Kanazawa K, Inoue I, Katayama S. Angiotensin type I receptor blocker: Olmesartan, induces transcription of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) mRNA through the promoter of PPAR γ . The 21th Scientific Meeting the International Society of Hypertension (ISH 2006). (Young Investigator's Award).
- 4) Nagasaka H, Inoue I, Inui A, et al. Relationship between oxidative stress and antioxidant systems

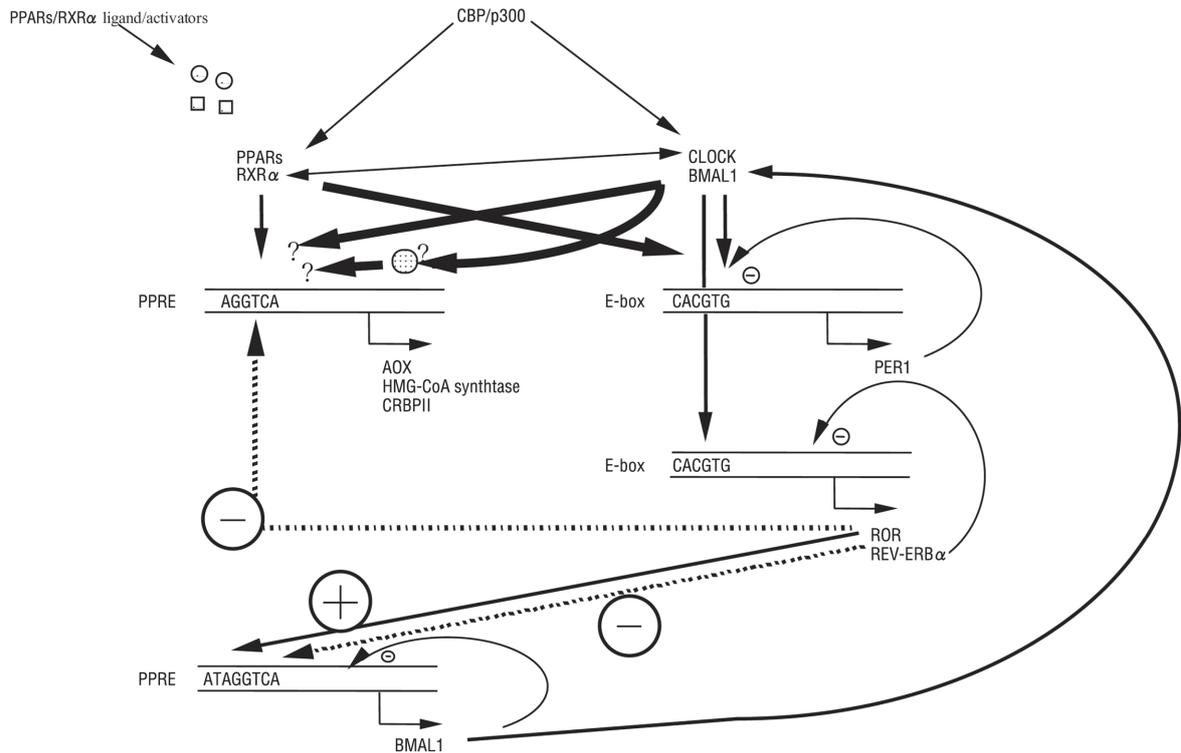


図5. PPREとEボックス間のクロストークの予想モデル.

- RXR: レチノイドX受容体
- CBP: CREB結合蛋白質
- CREB: cAMP応答配列結合蛋白質
- PPRE: PPARの応答配列
- ROR α : レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 α
- : RXRのリガンド
- : PPARsのリガンド

- in the liver of patients with Wilson disease: hepatic manifestation in Wilson disease as a consequence of augmented oxidative stress. *Pediatr Res* 2006;60: 472-7.
- 5) Inoue I, Shinoda Y, Nakano T, et al. Acarbose ameliorates atherogenicity of low-density lipoprotein in patients with impaired glucose tolerance. *Metabolism* 2006;55:946-52.
- 6) Shinoda Y, Inoue I, Nakano T, et al. Acarbose improves fibrinolytic activity in patients with impaired glucose tolerance. *Metabolism*. 2006;55: 935-9.
- 7) Nakano T, Miyazaki S, Shinoda Y, Inoue I, et al. Proposed reference material for human free immunoglobulin light chain measurement. *J Immunoassay Immunochem* 2006;27:129-37.
- 8) Nakano T, Shimanuki T, Matsushita M, Koyama I, Inoue I, et al. Involvement of intestinal alkaline phosphatase in serum apolipoprotein B-48 level and its association with ABO and secretor blood group types. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341: 33-8.
- 9) Inoue I. Hyperlipidemia and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-regulation of the PPAR α gene by CLOCK: BMAL1 *Nippon Rinsho* 2005;63: 643-56. Review.
- 10) Inoue I, Shinoda Y, Ikeda M, et al. CLOCK/BMAL1 is involved in lipid metabolism via transactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) response element. *J Atheroscler Thromb* 2005;12:169-74.
- 11) Shimazu T, Inoue I, Araki N, et al. A peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist reduces infarct size in transient but not in permanent ischemia. *Stroke* 2005;36:353-9.
- 12) Nakajima T, Matsunaga T, Kawai S, Hokari S, Inoue I, et al. Characterization of the epitopes specific for the monoclonal antibody 9F5-3a and quantification of oxidized HDL in human plasma. *Ann Clin Biochem* 2004;41(Pt 4):309-15.
- 13) Inoue I, Katayama S. The possible therapeutic actions of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) agonists, PPAR γ agonists, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and calcium (Ca)-antagonists on vascular endothelial cells. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2004;4:35-52. Review.

報告書

平成16年度 丸木記念特別奨学研究費A 研究実績報告書

膵β細胞の分化の分子機構の解明と再生医療による糖尿病治療

受賞者 松本 征仁 (埼玉医科大学 分子生物学)

共同研究者 中野 慈子¹⁾, 石川 桃太郎²⁾, 茅野 秀一³⁾久武 幸司¹⁾, 谷口 英樹²⁾, 禾 泰壽¹⁾

1. はじめに

高等生物の器官形成は細胞外シグナルを介して幹細胞/前駆細胞 (progenitor) から特定系列への細胞分化を規定する決定的な転写因子による遺伝子発現調節をうけて成熟細胞へと系統的に分化する。膵発生において膵内分泌前駆細胞内に一過性に発現する neurogenin (ngn) 3は、膵内分泌細胞分化を決定づける master 転写制御因子として機能したのち速やかに消失する。しかしながら、ngn3 発現制御の詳細な分子機構は不明な点が多く、ngn3 の misexpression が膵形成不全を引き起こすため正常な膵発生に必須となる ngn3 の機能とその詳細な役割についての理解は膵β細胞を用いた糖尿病治療の再生医学的アプローチを実施する上で重要である。

2. 研究成果

再生医療による糖尿病治療を行うには膵β細胞の分化を試験管内でコントロールし、効率良く増やす手法を確立すること、ならびに膵内分泌細胞の分化の分子機構を理解する必要がある。我々はこれらの問題に対して発生工学的アプローチにより、ngn3 遺伝子の制御下にEGFPを発現するトランスジェニックマウス (ngn3-GFP) を作製し progenitor の単離を試みた。さらに progenitor から特定の細胞系列への細胞分化の経時的变化をリアルタイムで観察するため、膵β細胞を分化モデルとしてラットインスリンプロモータ制御下にDsRed2を発現するTgマウス (ins-DsR) を作製し、ngn3-GFPマウスとの交配により2重蛍光標識Tgマウスを作出した。解析の結果、GFP陽性細胞が胎仔および新生仔の内胚葉系に由来する胃・腸管・膵の一部に観察され、ngn3発現と一致することを確認した。ngn3-

GFP/Ins-DsR2重蛍光標識トランスジェニックマウス (DTg) の胎仔膵よりGFP陽性 progenitor を細胞分離装置 (FACS) により選択的かつ効率的に分離し試験管内共培養を行ったところ、progenitor からGFP陽性細胞の減少に伴いDsRed2陽性細胞の増加を認めた。培養8日目で全生存細胞の約3分の1の細胞がDsRed2陽性であり、それらの細胞はインスリン陽性であった。またGFP陽性 progenitor はインスリン陽性細胞のみならずグルカゴン、ソマトスタチン陽性細胞への多分化能を有することから多分化能を有していることが示された。興味深いことにこれらのβ細胞分化は細胞増殖を伴わないこと、さらにβ細胞への分化にはGFP陰性分画の細胞に由来する液性因子のβ細胞分化誘導因子の存在が明らかとなった。スクリーニングの結果、我々はβ細胞分化を促進する因子を同定した。

次に膵内分泌 progenitor に対するβ細胞分化誘導因子の作用を調べるため、ngn3 遺伝子の制御下に緑色蛍光タンパク質 (GFP) と不死化遺伝子 SV40 ラージ T 抗原 (SVT) を発現するトランスジェニックマウス作製し、SVT で不死化した GFP/ngn3 陽性膵新生腫瘍より未分化な球状 Tec-3p 細胞株を樹立した。Tec-3p 細胞株をレチノイン酸刺激により付着細胞に形態的に変化した細胞株 Tec-3 を用いてレポーター遺伝子解析を行った結果、β細胞分化誘導因子が ngn3 遺伝子の発現を抑制することを見出した。ngn3 遺伝子発現の抑制機構について解析を行った結果、Notch シグナルのメディエーター Hes1、転写抑制に関わる共役因子 Grg、ヒストン脱アセチル化酵素 Hdac が相互に結合し、これら形成された複合体が ngn3 遺伝子の転写抑制に寄与していることを見出した。さらに膵内分泌前駆細胞をEGFPで標識した ngn3-EGFP 胎仔マウスに Notch シグナル阻害剤 DBZ を投与した結果、野生型に比較して E17.5 胎仔膵内の GFP 陽性細胞の有意な増加を認めた。従って以上の結果より、Notch シグナルを

1) 埼玉医科大学 分子生物学, 2) 横浜市立大学 医・臓器再生
3) 埼玉医科大学 病理学

介した *ngn3* のネガティブフィードバック機構によるクロマチン再構成が膵内分泌前駆細胞数をコントロールして正常な内分泌細胞分化に寄与していると考えられる。

3. おわりに

糖尿病は発症すると治療が困難であり、網膜症・腎症・神経障害などの合併症を引き起こす重篤な慢性的生活習慣病である。国内の糖尿病患者数は予備群を含めると1,000万人以上に達し、糖尿病に関連する医療費は1兆1,155億円(平成12年度推計)と今後も糖尿病人口とその医療費が増加すると予測されている。しかしながら、現在の食餌療法・抗糖尿病薬やインスリン投与等では合併症の併発の遅延効果を主体とした治療法であるため根本治療を目指した治療としては不十分である。また膵臓・膵島を用いたβ細胞の移植治療では必要な細胞数の確保が困難であることに加え組織適合性による拒絶反応など深刻な問題があり、同時に糖尿病の発症機序はもとより膵臓β細胞の発生・分化の詳細な分子機構については多くの不明な点が残されている。このため近年、新たな糖尿病の先端治療的アプローチとしてインスリンを分泌する膵β細胞を人為的に試験内で増幅させて利用しようとする再生医療による糖尿病治療の改善に大きな期待がよせられており、今後糖尿病モデルマウスを用いて本研究で同定したβ細胞分化誘導因子の糖尿病治療効果の検討ならびに *ngn3* による膵内分泌細胞分化の分子機構解明による糖尿病治療に有効な分子標的の探索により再生医学の臨床応用に有効な新たな糖尿病治療法の進展に役立つことが期待される。

謝 辞

本研究は平成16年度丸木記念特別奨学研究費A、平成14年度興和生命科学研究助成および平成15年度上原記念財団研究助成のサポートによって実施された。

研究発表

原著論文

- 1) Imazawa Y, Hisatake K, Mitsuzawa H, Matsumoto M, Tsukui T, Nkagawa K, Nakadai T, Shimada M, Ishihama A and Nogi Y. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 11467-74.
- 2) Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, Hisatake K, and Nogi Y. Essential role of p38 MAP Kinase in Cathepsin K Gene Expression during Osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. (2004) *J. Biol. Chem.* 279,45969-79.
- 3) Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Tsukui T,

Matsumoto M, Nogi Y, Meisternt M, and Hisatake K. A transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates a high level of transcription activation by GAL4-VP16. (2004) *Mol. Cell. Biol.* 24, 6525-35

学会発表

- 1) 松本征仁. 2重蛍光標識マウスを用いた膵臓内分泌細胞の分化の分子機構 第143回日本獣医学会学術集会【招待講演】2007.
- 2) Matsumoto M, Kawashimo K, Hisatake K, Ishikawa M, Taniguchi H, Nogi Y. Development of pancreatic endocrine cells mediated by a negative feedback regulation of transcription factor *ngn3*. The 7th Annual Rachmiel Levine Diabetes and Obesity Symposium. 2006.
- 3) Matsumoto M, Ishikawa M, Taniguchi K, Nogi Y. Development of pancreatic endocrine cells mediated by a negative feedback regulation of *Ngng3*. The 19th Naito Conference 2006.
- 4) Matsumoto M, Kawashimo K, Ishikawa M, Hisatake K, Taniguchi H, Nogi Y. Development of pancreatic endocrine cells mediated by a negative feedback regulation of *Ngng3*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 2006.
- 5) 松本征仁, 中野滋子, 久武幸司, 石川桃太郎, 茅野秀一, 谷口英樹, 禾泰壽. 内胚葉系未分化細胞株 *Tec-3* の樹立と *ngn3* 遺伝子の制御機構 第49回日本糖尿病学会年次学術集会 2006.
- 6) Matsumoto M, Kawashimo K, Ishikawa M, Hisatake K, Taniguchi H, and Nogi Y. Identification of a factor that supports differentiation of pancreatic endocrine cells mediated by a negative feedback regulation of *Ngng3*. Keystone Symposia【招待講演】2006.
- 7) 松本征仁, 川下金明, 宮城有美, 久武幸司, 茅野秀一, 石川桃太郎, 谷口英樹, 禾泰壽. 内胚葉系前駆細胞から膵β細胞への分化制御システムと可塑性の検討 第48回日本糖尿病学会年次学術集会ワークショップ 2005.
- 8) 松本征仁, 久武幸司, 石川桃太郎, 茅野秀一, 谷口英樹, 禾泰壽. C57BL/6*ngn3*-svtマウスを用いた内胚葉系未分化細胞株 *Tec-3* の樹立と性質の検討 第28回日本分子生物学会年会 2005.
- 9) Matsumoto M, Kawashimo K, Hisatake K, Ishikawa M, Oshima Y, Taniguchi H and Nogi Y. Isolation and characterization of progenitors that differentiate into pancreatic endocrine cells. Keystone Symposia 2005.

- 10) 松本征仁, 川下金明, 宮城有美, 久武幸司, 茅野秀一, 石川桃太郎, 谷口英樹, 禾泰壽. 内胚葉系前駆細胞の単離による膵β細胞の分化制御システム第27回日本分子生物学会年会 2004.
- 11) 松本征仁, 久武幸司, 松本英子, 大島祐二, 茅野秀一, 谷口英樹, 禾泰壽. トランスジェニックマウスを用いた前駆細胞の単離と膵β細胞分化のリアルタイム検出系の開発 第47回日本糖尿病学会 2004.
- 12) 松本征仁, 甲川昌和, 久武幸司, 和田誠基, 高柳広, 片山茂裕, 禾泰壽. p38MAPKの標的因子NFATc1はPU.1と協調的にカテプシンK遺伝子の発現を誘導する 第22回日本骨代謝学会 2004.
- 13) 松本征仁, 甲川昌和, 和田誠基, 久武幸司, 片山茂裕, 禾泰壽. p38 MAPキナーゼを介した転写因子による破骨細胞の分化段階的制御 第77回日本生化学会大会 ワークショップ2004.
- 14) Matsumoto M, Hisatake K, Matsumoto H, Oshima Y, Kayano S, Taniguchi H and Nogi Y. Establishment of isolation of pancreatic endocrine precursor cells Keystone Symposia, Diabetes Mellitus 2004.

報告書

平成16年度 丸木記念特別奨学研究費A 研究実績報告書

造血幹細胞・前駆細胞から輸血用血液製剤を製造する培養システムの開発

受賞者 池淵 研二(埼玉医科大学 輸血・細胞移植部)

1. はじめに

献血時のスクリーニング検査が高感度化され、ウイルス感染症が輸血を介して伝播するリスクは極めて低くなってきた。しかし再興感染症や新興感染症、特に寄生虫や原虫疾患が今後輸血を介した感染症として注目されてくるであろう。また同種ドナー由来の血液製剤が輸血されることにより、同種抗原感作やアレルギー反応が生じる現象を回避することは未だ困難である。

そこで人工血液代替物開発が検討されているが、現状のような期限切れヒト赤血球から抽出したヘモグロビンをリポソームに内包する製剤では、ヘモグロビンのメト化が回避できず酸素運搬能を長く維持することは困難であり、かつ網内系による貪食が進み血管内寿命が短時間である課題をさらに改善するにも限界がある。(Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2006;34:1-10. Life Sci 2001;70:291-300. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2001;29:427-37. Life Sci 2001;69:2007-15. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2001;29:275-83. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2001;29:191-201.) そのため現在開発中の人工血液代替物は同種血輸血が実施可能になるまでのつなぎの輸液(酸素運搬体)として利用できることにとどまると推定される。欧米ではヘモグロビン分子を種々化学的に改変し酸素運搬体として開発した製剤が臨床試験されてきたが、いまだ治療薬として認可されたものはなく、種々の副作用も報告されている。別の製剤として有機化合物パーフルオロカーボンが高濃度に酸素を運搬できる化学物質として開発されたが、これも臨床試験段階で種々の合併症が発生し、開発が中断している。

そこで造血幹細胞および前駆細胞を培養系で増幅し、生体の骨髄内で産生されると同じ品質を持つ血球を生産して利用できないだろうか考えた。培養の出発材料になる細胞として、全国規模の臍帯血バンクが細胞数不足のために採用しない、つまり廃棄すること

になるヒト臍帯血が応用でき、ドナーの善意に報いることもできると考えた。スクリーニング検査を確実に実施すれば輸血感染症伝播のリスクをゼロにすることも可能である。出発材料の血液型を調べておけばABO血液型およびABO型以外でもメジャーな血液型を適合させた複数の製剤をあらかじめ造ることが可能であろう。また人工膜のリポソームではなく、生体膜を持つ血球が製造されるため、血管内寿命が長くできる可能性がある。

一方培養系であるため、無血清培地、増殖因子、器具など材料費がかさみ、コスト的には高価な製剤になるであろう。ただし将来的に新規技術が開発されコスト的に解決される可能性もある。またこうした挑戦をする過程で、造血幹細胞、造血前駆細胞あるいは臍帯血やサイトカインに関する科学的な新知見を見出すチャンスがあると期待できる。

2. 造血幹細胞および造血前駆細胞の増幅

造血幹細胞を体外で増幅するために種々のサイトカインの組み合わせが研究されてきた。ただしサイトカインのみでは期間および増幅率には限界があり、常時造血幹細胞を維持し増殖させることは難しい。造血幹細胞を長期間維持するため、ヒト骨髄由来のストロマ細胞を共存させた培養系を考案した(Cytotherapy 2002;4:109-18. Transfusion 2002;42:921-7. Exp Hematol 2001;29:174-82. Bone Marrow Transplant 2000;26:837-44.)。免疫不全モデルマウスNOD/SCIDをレシピエントとし、増幅したヒトCD34陽性細胞を移植することでヒト造血をマウス内でキメラ形成させることができた。このシステムを用いてヒト幹細胞自身が体外で約5倍程度増幅できていることを確認できた。ストロマ細胞を用いて培養する系を将来臨床応用することを念頭に、牛胎児血清を用いずヒト血清に置き換えることもでき、またサイトカインとしてbFGFを添加することで無血清培養が可能であることも示した。またヒト骨髄ストロマ細胞は一定の回数しか分裂できず利用回数が有限であるが、この細胞に

テロマラーゼ遺伝子を導入し不死化することが可能となり、造血支持能を保持したままの不死化ストロマ細胞が樹立できた (Blood 2003;101:532-40.)。臍帯血由来のCD34陽性細胞はテロマラーゼ遺伝子導入ストロマ細胞上で7週間以上も増幅を維持できた。総細胞数、CD34陽性細胞数としては約100万倍、コロニー前駆細胞数としては1000倍程度に増幅が可能であった。

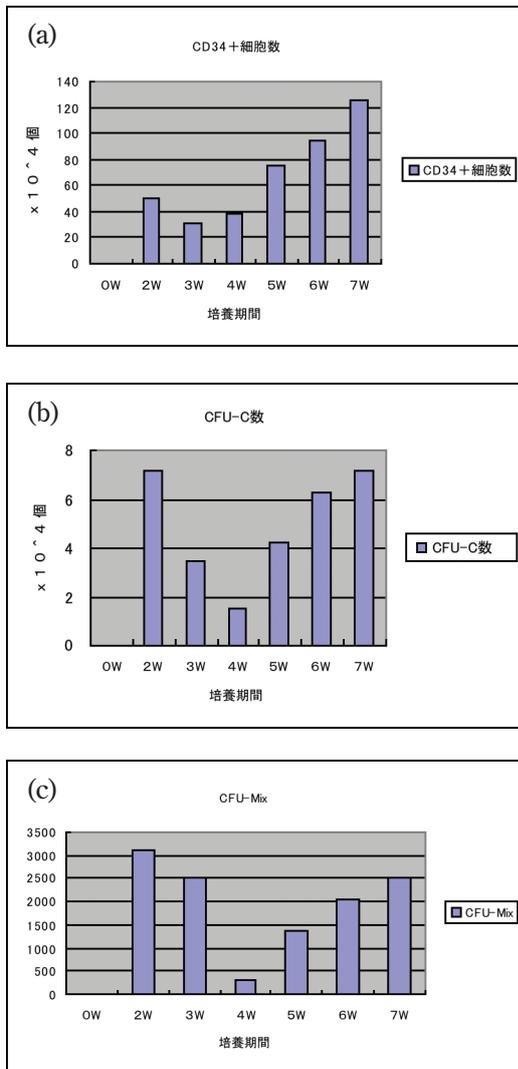


図1.

3. 造血幹細胞・前駆細胞から赤芽球および成熟赤血球の培養

不死化ストロマ細胞上でサイトカイン (SCF, TPO, Flk-2リガンド) 存在下に2週間造血幹細胞および前駆細胞を増幅し、次の2週間はストロマフリーでサイトカイン (SCF, IL-3, EPO) 存在下で培養し、赤芽球段階まで細胞を分化できた。次にマクロファージが共存することで赤芽球にアポトーシスが誘導され、かつ脱核した核をマクロファージが貪食して処理することが報告されているため、マクロファージを培養系で確保

することに着手した。赤芽球と同様に純化したCD34陽性細胞とストロマ細胞を2週間共培養し一定数の造血幹細胞/前駆細胞を増幅させ、ついでマクロファージへの分化を誘導するサイトカイン存在下で培養してマクロファージを得た。次に培養赤芽球と培養マクロファージを一緒にサイトカイン無しの条件で培養することで、ほぼ完全な赤血球を製造することができた。

In vitroで増殖できた赤血球の機能を判定するため、免疫不全マウスNOD / SCIDに培養細胞を輸血し、ヒト赤血球マーカーでマウス末梢血内を循環するヒト細胞を検出した。その結果、正常ヒト末梢血由来赤血球および赤血球保存液MAPに浮遊させた保存血液とほぼ同じパターンで免疫不全マウス末梢血中を循環することが判明した。経時的变化から推定すると血管内半減期は72~96時間であった。

(Stem Cells, submitted)

4. 培養顆粒球生成

造血幹細胞移植では往々にして移植初期から重症感染症を併発し、移植ドナーの造血幹細胞が生着し造血回復が認められる以前に死の転帰をたどる症例が存在する。一部の診療機関では、家族・親族あるいは同僚からドナーを募り、院内採血にて顆粒球を大量に採取し、これを患者に輸注することで一時的に顆粒球がゼロである危険な時期をしのぎ、ドナー由来の造血が回復するまでの期間を乗り越えることが実施されている。ただしドナーには顆粒球採血の効率を高めるため、顆粒球コロニー刺激因子とデキサメサゾンを投与すること、大量 (5~10 L) の循環血液を体外循環させ顆粒球分画を採取すること、体外循環を可能にするため抗凝固剤を持続点滴し一過性の低カルシウム血症を惹起する可能性があること、など慎重に実施されることが望まれる。

またドナーは患者の容態に合わせて病院に来て採取に応じてもらう必要があり、ドナーには無理を強いる場合がある。

そこで培養系でヒト顆粒球を生成することができれば、組織適合抗原が既知で、いつでも利用できる治療細胞を確保できることになる。ドナーへの負担もない。生成した顆粒球を長期保存する (凍結、冷蔵液状など) ことが可能となれば、治療材料としていつでも有効に応用できることになる。(ただし従来成績では顆粒球は凍結に脆弱な細胞であり、新規技術開発が必要とされる。)

臍帯血CD34陽性細胞をストロマフリーの条件でIL-3, SCFとG-CSFの組み合わせで14日間培養すると、骨髄球~桿状核白血球~分葉核白血球が増殖してくる。その増幅率は約1000倍である。顆粒球であることは塗沫標本のギムザ染色、アルカリフォスファターゼ染色、エラスターゼ染色などで確認できた。また蛍

光標識したビーズを貪食させ、これをフローサイトメトリー法で確認することで細胞の貪食能を確認できた。また顆粒球刺激剤 f MLP 存在下に顆粒球を処理すると活性酸素を産生する能力がある。

生成した顆粒球が実際に生体内で循環できるか確認する目的で、免疫不全モデルマウス SCID に培養顆粒球および新鮮ヒト末梢血から純化した顆粒球の2群を経尾静脈ルートで輸注して、一定時間ごとにマウス末梢血を少量採血し、中に含まれているヒト CD45 陽性ヒト由来白血球を追跡した。培養顆粒球の輸注量が少量であったため、輸注直後のピークは低かったものの半減期は両者とも約1時間であることが分かった。レシピエントを変更し、ヒト細胞の最適な投与対象動物を選択して更に今回の実験を再確認する必要があるものの、血管内半減期には新鮮ヒト顆粒球とは遜色ない成績がえられた。

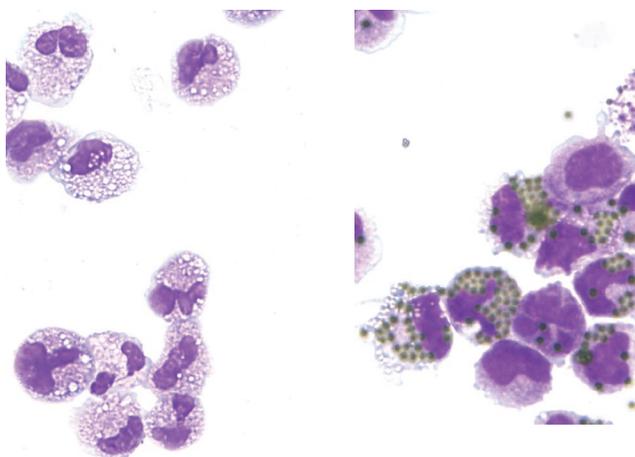


図2. 培養好中球. CD34 陽性細胞を IL-3/SCF/G-CSF の組み合わせで14日間無血清培養して得られた。

(in preparation)

5. 代替ストロマの開発

体外で培養した細胞を臨床に応用するためには、製造された細胞の品質を保証する必要がある。ヒトストロマ細胞を利用する系では、ストロマ細胞にテロメラゼ遺伝子が導入されており、この細胞が最終製造物に混入しては困る。増殖しないようにするにはヒトへの投与前に十分量の放射線照射を行うことで一応は大丈夫であるが、ストロマ細胞の組織適合抗原は使用する際にレシピエントに暴露される。そこでストロマ細胞が混入しないよう、ストロマ細胞を固定化する、あるいは人工物でストロマ細胞機能を代替えさせる系を考えた。

不死化ストロマ細胞をパラフォルムアルデヒドで固定する。この上に臍帯血 CD34 陽性細胞を共培養する。増幅過程をフローサイトメトリー解析、コロニー解析で検討する。生きたストロマ細胞に比して増殖支持活性は減少するものの、サイトカイン単独群に比べてストロマ細胞の機能を保持していた。

またストロマ細胞機能をストロマ細胞が産生するサイトカインおよび発現する接着因子で代替えさせるシステムを構築する。モデルとして EPO をプラスチック面へ固定し EPO 依存性細胞株を継代維持できるか否か検討する。EPO は光反応性ゼラチンに含有させプラスチック面に塗布し、紫外線照射にてプラスチック面に固定化できた。EPO 依存性細胞株は塗布した EPO 量の約 100 分の 1 レベルではあるが EPO 反応性を示した。(Biomaterials. 2004;25(12):2293-8.)

おわりに

臍帯血バンクが全国的に整備され、保存臍帯血細胞数基準が高く設定されたため、妊婦の善意でドネーションされた臍帯血の一部が廃棄される事態を起している。大変残念な現象であるが、造血幹細胞移植を受ける患者にとっては、細胞数の多い臍帯血は貴重であり、治療が安全に行えるためには必要な措置である。そこで廃棄予定となった臍帯血を他の目的に応用することは重要である。

現状では試験管内で実施可能な段階と臨床的に利用できることの間には大きなギャップがある。しかし近い将来にはこのギャップを埋める新しい技術開発が当然生まれるチャンスがある。そのため、現時点では試験内でどこまで生体内を流れている血球に近いものが製造できるかを極めておくことは重要であろう。

赤血球、血小板、顆粒球のうち今回は2つの血球について挑戦した。血小板についても血小板代替物の開発は進められているが、血小板機能の極く一部、つまり血管内皮細胞傷害部位への粘着機能だけでも代替できそうな製剤が目指されている。できるだけフルの機能を持った製剤を造りたいため、あえて造血幹細胞から生体膜を持ち機能を十分保持した培養血球を造ることを更に目指したい。

謝 辞

本研究は平成16年度丸木記念特別奨学研究費Aにより行われた。

文 献

- 1) Tanaka R, Ichioka S, Sekiya N, Ohura N, Uchino S, Ojima A, Itoh Y, Ishihara O, Nakatsuka T, Ikebuchi K. Elastic plasma protein film blended with platelet releasate accelerates healing of diabetic mouse skin wounds. Vox Sang 2007;93(1):49-56.

- 2) Nakazawa Y, Saito S, Hasegawa Y, Yanagisawa R, Sakashita K, Kamijo T, Miyazaki T, Sato S, Ikeda H, Ikebuchi K, Koike K. A possible role for the production of multiple HLA antibodies in fatal platelet transfusion refractoriness after peripheral blood progenitor cell transplantation from the mother in a patient with relapsed leukemia. *Transfusion* 2007;47(2):326-34.
- 3) Gojo S, Kyo S, Nishimura S, Komiyama N, Kawai N, Bessho M, Sato H, Asakura T, Nishimura M, Ikebuchi K. Cardiac resurrection after bone-marrow-derived mononuclear cell transplantation during left ventricular assist device support. *Ann Thorac Surg* 2007;83(2):661-2.
- 4) Tanaka T, Nagai Y, Miyazawa H, Koyama N, Matsuoka S, Sutani A, Huqun, Udagawa K, Murayama Y, Nagata M, Shimizu Y, Ikebuchi K, Kanazawa M, Kobayashi K, Hagiwara K. Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 2007; 98(2):246-52.
- 5) Abe H, Fujihara M, Azuma H, Ikeda H, Ikebuchi K, Takeoka S, Tsuchida E, Harashima H. Interaction of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, with human plasma: effects on coagulation, kallikrein-kinin, and complement systems. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2006;34(1):1-10.
- 6) Owada T, Matsubayashi K, Sakata H, Ihara H, Sato S, Ikebuchi K, Kato T, Azuma H, Ikeda H: Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry. *J Viral Hepat* 2006;13(1):11-8.
- 7) Ito Y, Hasuda H, Yamaguchi T, Komatsu N, Ikebuchi K. Immobilization of erythropoietin to culture erythropoietin-dependent human leukemia cell line. *Biomaterials* 2004;25(12):2293-8.