

(第 41 回)
公益財団法人 篷庵社
研究助成発表会
講演要旨集

令和 4 年 7 月 15 日 (金)

於 ヒルトン大阪

プログラム

日時：令和4年7月15日（金） 10時30分から17時00分まで

場所：ヒルトン大阪 35階 ウィンドーズ

*所属は講演当時のもの

10:30-10:35 ご挨拶 公益財団法人篷庵社 理事長 武田 禮二

演題および演者（講演25分、討論10分）

座長

10:35- 1. オミックス解析による抗腫瘍薬の治療効果・有害事象発現を
予測するバイオマーカーの探索研究
前川 京子 先生
(同志社女子大学薬学部)
(篷庵社名誉理事)
佐藤 公道 先生

11:15- 2. 慢性腎臓病増悪因子としての細胞外マトリックスの役割
鳥羽 裕恵 先生
(京都薬科大学 病態薬科学系 臨床薬理学分野)
(篷庵社名誉理事)
宮崎 瑞夫 先生

11:50- 昼食休憩

12:45- 新規助成者ご紹介

13:05- 3. 電気生理技術を用いた難治性神経疾患の創薬標的分子の同定
井上 剛 先生
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)
(篷庵社理事)
桐野 豊 先生

13:45- 4. 胎盤関門透過の種差を生み出す機能分子の同定と
その機能調節機構の解明
登美 斉俊 先生
(慶應義塾大学薬学部)
(篷庵社元評議員)
寺崎 哲也 先生
代理
(篷庵社評議員)
玉井 郁巳 先生

14:25- 《特別研究助成》
5. 家族性高コレステロール血症におけるPCSK9の意義の解明
堀 美香 先生
(名古屋大学 環境医学研究所 内分泌代謝分野)
(塩野義製薬株
医薬研究本部)
雪岡 日出男 氏

15:00- 休憩・談話

15:30- 《特別研究助成》
6. 脳疾患に対する自己幹細胞由来免疫細胞を利用した
細胞性医薬品の開発
高田 和幸 先生
(京都薬科大学統合薬科学系)
(塩野義製薬株
創薬疾患研究所)
堀口 直剛 氏

16:10- 《特別研究助成》
7. 中枢疾患創薬を加速する全脳細胞解析による不安障害の
標的分子の探索
笠井 淳司 先生
(大阪大学大学院薬学研究科)
(塩野義製薬株
創薬疾患研究所)
小川 公一 氏

目 次

1. **前川 京子**
「オミックス解析による抗腫瘍薬の治療効果・有害事象発現を
予測するバイオマーカーの探索研究」 1
2. **鳥羽 裕恵**
「慢性腎臓病増悪因子としての細胞外マトリックスの役割」 11
3. **井上 剛**
「電気生理技術を用いた難治性神経疾患の創薬標的分子の同定」 21
4. **登美 齊俊**
「胎盤関門透過の種差を生み出す機能分子の同定と
その機能調節機構の解明」 31
5. **堀 美香**
「家族性高コレステロール血症におけるPCSK9の意義の解明」 41
6. **高田 和幸**
「脳疾患に対する自己幹細胞由来免疫細胞を利用した
細胞性医薬品の開発」 48
7. **笠井 淳司**
「中枢疾患創薬を加速する全脳細胞解析による
不安障害の標的分子の探索」 58

オミックス解析による抗腫瘍薬の治療効果・有害事象発現を予測する バイオマーカーの探索研究

同志社女子大学薬学部 前川 京子

1. はじめに

オミックス解析とは、生体内のあらゆる分子情報を、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどの様々な階層で、網羅的に計測して分析する研究領域である(図1)。オミックス解析により得られる情報は、疾患の診断を詳細化して未知の発症機序を解明したり、医薬品による副作用の発症や重篤度を事前に予測したりするツールとなり、新しい医療をもたらすものとして期待されている。オミックス解析により探索され、十分に検証されたバイオマーカーは、医薬品の有効性・安全性の指標となることから、バイオマーカーを利用した臨床試験は年々増加しており、実臨床においても、バイオマーカーが医薬品の有効性・安全性の予測に用いられつつある。例えば、ゲノム解析の結果として見出される、特定の患者における薬物応答性に関連する一塩基多型(SNP)等のゲノム情報はゲノムバイオマーカーと呼ばれ、がん治療薬の分野で開発が進んでいる。ゲノムバイオマーカーとして、抗がん剤イリノテカンの重篤な副作用である骨髄抑制や下痢の発現にグルクロン酸転移酵素UGT1A1の遺伝子多型が、抗がん剤アービタックス(一般名:セツキシマブ)の有効性の予測に、KRAS遺伝子の変異が挙げられる。

一方、多くの医薬品において、ゲノムバイオマーカーのみでは説明できない薬物応答性の個体差が認められており、これらは、食事・併用薬等の環境因子、さらには患者背景因子(肝機能や腎機能)により規定されうると考えられている。生体内の低分子代謝物の総体であるメタボロームは、セントラルドグマにおいてゲノムを

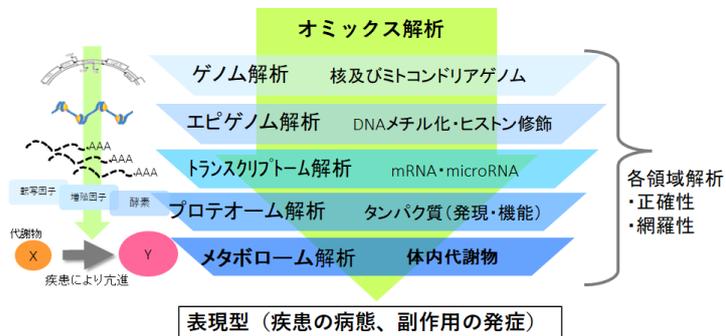


図1 オミックス解析
ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、及びメタボローム情報は、生命現象を包括的に理解するために極めて重要である。

始点とする生体内分子の最下流に位置し、最も表現型の発現に近いと考えられている(図1)。従って、メタボロームバイオマーカーは、環境因子による遺伝子発現誘導及び環境要因との相互作用を十分に加味した医薬品の有効性・安全性のバイオマーカーとなりうる。さらに、メタボロームは、種特異性が低いことから、非臨床から臨床まで適用可能な確度の高いバイオマーカーとなりうると期待されている。例えば、メタボロームバイオマーカーの臨床適用例である新生児マス・スクリーニング検査は新生児の先天性代謝異常の早期発見に極めて重要な検査となっている。しかし、メタボローム解析は、代謝物の多様な化学的性質とその不安定さのために一つの解析系で全ての代謝物を測定できない。よって、他のオミックス解析と比較して技術開発が遅れ、商業的に確立した系はなく、未だ未成熟の部分が多い。

私は、前任地である国立医薬品食品衛生研究所在任中に、薬剤応答性に関連するゲノムバイオマーカーの探索やメタボローム解析による創薬標的分子や早期診断分子の探索に従事してきた。同志社女子大学に着任後、4年間の研究助成をいただき、【1】消化管間質腫瘍患者のイマチニブ治療による副作用発現、及びトラフ値に関連するゲノムバイオマーカーの探索研究¹⁾、【2】メタボローム解析による多発性骨髄腫の治療効果・有害事象発現を予測するバイオマーカーの探索研究²⁾を行った。今回はこれらの成果について発表する。

2. 消化管間質腫瘍患者のイマチニブ治療による副作用発現、及びトラフ値に関連するゲノムバイオマーカーの探索研究

2-1) 日本人患者の副作用発現プロファイル

メシル酸イマチニブ（商品名；グリベック）は、慢性骨髄性白血病（chronic myeloid leukemia：CML）や消化管間質腫瘍（gastrointestinal stromal tumor：GIST）等に用いられる選択的チロシンキナーゼ阻害薬である。GISTの治療としては、手術による腫瘍摘出が第一選択となるが、本薬は手術不能例、再発例に対する治療に用いられ、奏効率は47%、病勢コントロール率は100%とその効果は顕著である。しかし有害事象の発現頻度は高く、その発現には個体差が認められる³⁾。イマチニブのファーマコゲノミクス研究は、CML患者を対象に広く実施されており、有効性や副反応の発現と関連する遺伝子多型の存在が明らかになっている⁴⁾。一方で、GIST患者を対象としたファーマコゲノミクス研究は、世界でも報告が少なく、日本人を対象とした研究はなかった。本研究はイマチニブを反復投与された日本人GIST患者を対象に、本薬の体内動態に関連する遺伝子多型と、副作用の発現及び定常状態トラフ値（C_{trough}）との関連を解析し、イマチニブによる副作用発現の予測及び軽減のための方法を確立することを目的とした。

新潟大学医歯学総合病院もしくは川崎医科大学付属病院にてイマチニブ治療を受けた切除不能あるいは再発性のGIST患者で、患者本人から文書による同意を得られた65名（男性32名、女性33名）を対象とした。65

名の患者の副作用グレードの分布を表1に示した。グレード3（G3）以上の副作用に着目すると、発現率の高い順から、好中球／白血球減少（29%）、貧血（15%）、皮疹（11%）であり、G2以上に着目すると、好中球／白血球減少（63%）、浮腫（62%）が主要な副作用であった。全患者は、投与量は400 mg/dayより開始したが、うち35名は、G2以上の繰り返す非血液学的毒性、G3以上の血液

表1 日本人GIST患者におけるイマチニブ投与による副作用の発現

G3以上、及びG2以上で、高頻度の副作用をそれぞれ赤字、及び青字で示した。

Grade	0	1	2	3	4
Fatigue	35 (53.8%)	23 (35.4%)	7 (10.8%)	0 (0%)	0 (0%)
Nausea	30 (46.2%)	25 (38.5%)	9 (13.8%)	1 (1.5%)	0 (0%)
Dizziness	58 (89.2%)	7 (10.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Vomiting	50 (76.9%)	13 (20%)	2 (3.1%)	0 (0%)	0 (0%)
Anorexia	48 (73.8%)	12 (18.5%)	5 (7.7%)	0 (0%)	0 (0%)
Diarrhea	43 (66.2%)	19 (29.2%)	2 (3.1%)	1 (1.5%)	0 (0%)
Stomatitis	58 (89.2%)	4 (6.2%)	3 (4.6%)	0 (0%)	0 (0%)
Taste disturbance	59 (90.8%)	5 (7.7%)	1 (1.5%)	0 (0%)	0 (0%)
Edema	4 (6.2%)	21 (32.3%)	37 (56.9%)	3 (4.6%)	0 (0%)
Pleural effusion	60 (92.3%)	2 (3.1%)	2 (3.1%)	1 (1.5%)	0 (0%)
Alopecia	54 (83.1%)	9 (13.8%)	2 (3.1%)	0 (0%)	0 (0%)
Eye disorders	43 (66.2%)	22 (33.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Rash	41 (63.1%)	6 (9.2%)	11 (16.9%)	7 (10.8%)	0 (0%)
Herpes-Zoster	62 (95.4%)	1 (1.5%)	2 (3.1%)	0 (0%)	0 (0%)
Muscle cramps	45 (69.2%)	17 (26.2%)	2 (3.1%)	1 (1.5%)	0 (0%)
Somnolence	64 (98.5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.5%)	0 (0%)
GI Hemorrhage	63 (96.9%)	0 (0%)	1 (1.5%)	1 (1.5%)	0 (0%)
Anemia	15 (23.1%)	19 (29.2%)	21 (32.3%)	10 (15.4%)	0 (0%)
Neutropenia/leukopenia	18 (27.7%)	6 (9.2%)	22 (33.8%)	16 (24.6%)	3 (4.6%)
Thrombocytopenia	30 (46.2%)	28 (43.1%)	6 (9.2%)	1 (1.5%)	0 (0%)

学的毒性、または G3 以上の非血液学的毒性のため 300 mg/day 以下に減薬した。

2-2) イマチニブ治療による副作用発現と薬物動態関連分子の遺伝子多型との関連

イマチニブによる副作用発現機序の一つに、体内薬物動態異常が挙げられる。イマチニブの体内動態に関与する薬物トランスポーターとしては、図 2 に示すように消化管吸収に OATP1A2 (遺伝子名 *SLCO1A2*)、及び OCTN2 (*SLC22A5*)が、肝取り込みに OCT1 (*SLC22A1*)、OCTN2 (*SLC22A5*)、及び OATP1B3 (*SLCO1B3*)が、消化管・肝からの排出に ABCB1 (*ABCB1*)、及び ABCG2 (*ABCG2*) が知られている⁵⁾。代謝には薬物代謝酵素 CYP3A4、CYP3A5 が関与することが確認されており、主要な代謝物である *N*-デスメチルイマチニブはイマチニブと同様のキナーゼ阻害活性を有する。

血液検体より抽出したゲノム DNA を用い、薬物代謝酵素及び薬物トランスポーター13種の 35 SNPs を、直接シーケンス法・一塩基プライマー伸長法・TaqMan 法によりタイピングし、フォローアップ期間中の副作用の最悪グレードと遺伝子多型との関連性を解析した。

G3 以上で 5%以上、もしくは G2 以上で 10%以上の頻度を認めた副作用に着目し、SNP との関連性を解析した結果、G3 以上、及び G2 以上の皮疹の発現と *ABCG2* の多型 (421C>A, Q141K) が有意に関連し、野生型 (421CC)、ヘテロザイゴット (421CA)、ホモザイゴット

(421AA) の順に皮疹の発現率は増加した (表 2)。皮疹以外の有害事象の発現率は、いずれの SNP とも関連しなかった。*ABCG2* 421C>A(Q141K) は、イマチニブの消化管及び胆汁排泄に関与する *ABCG2* に存在し、本 SNP は *ABCG2* の発現低下を引き起こすとされている⁶⁾。よって、*ABCG2* の消化管及び胆管での発現が低下し、イマチニブの暴露量が増えたことが皮疹の発現の要因と考えられた。本 SNP の頻度はアジア人で高く (0.289–0.357)、欧米人 (0.045–0.117) やアフリカ系アメリカ人 (0–0.023) では低いことから、アジア人の GIST 患者の皮疹の発症の予測因子となる可能性がある。

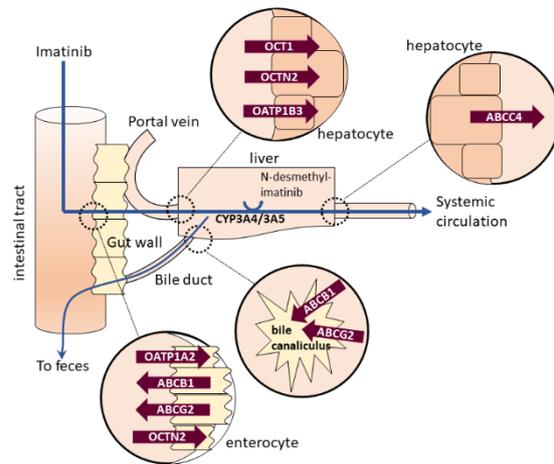


図2 イマチニブの体内動態に関するトランスポーター・代謝酵素

表2 皮疹の発症と *ABCG2* 421C>A との関連

Gene	Genotype 421C>A (Q141K)	Number of patients	Rash ^a (grade 3)		Rash ^a (grade 2 & 3)	
			NO	YES	NO	YES
<i>ABCG2</i>	C/C	31	31 (100%)	0 (0.0%)	28 (90.3%)	3 (9.7%)
	C/A	27	23 (85.2%)	4 (14.8%)	16 (59.3%)	11 (40.7%)
	A/A	7	4 (57.1%)	3 (42.9%)	3 (42.9%)	4 (57.1%)
<i>p</i> value ^b (corrected <i>p</i>)			0.0008 (0.026)		0.0015 (0.048)	

^aPercentage of the patient number in each diplotype is indicated in parentheses.

^bCochran-Armitage trend test.

2-3) 薬物動態関連分子の遺伝子多型が定常状態 C_{trough} に与える影響

イマチニブの定常状態トラフ値 (C_{trough}) は有効性の指標となると共に、副作用の発現と相関

することが報告されている⁷⁾。同意が得られた38名を対象に、投与量で調整した C_{trough} (dose-adjusted C_{trough}) と各 SNP との関連を解析した結果、5種の SNP と dose-adjusted C_{trough} が有意に関連した (図3)。

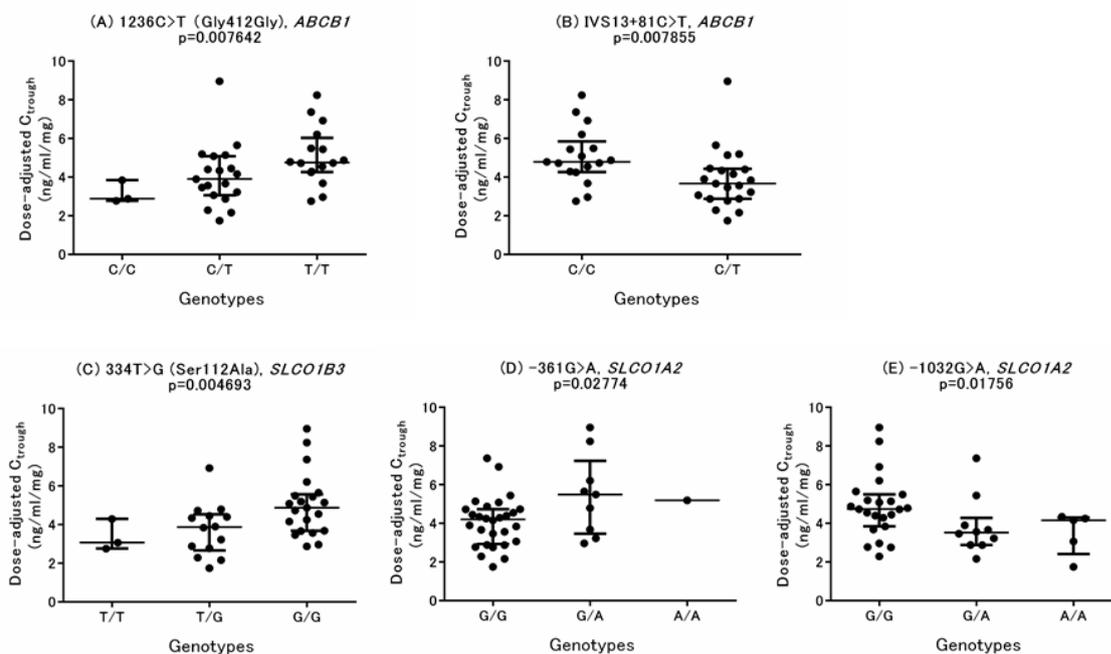


図3 5種のSNPとdose-adjusted C_{trough} との関連

各シンボルは個々の患者を示し、ラインは四分位範囲付きの中央値を示す。統計解析はJonckheere-Terpstra trend testにより実施した。

これらの5種のSNPのうち、*ABCB1* 1236C>T(Gly412Gly)は、*ABCG2*と同様にイマチニブの消化管及び胆汁排泄に関与しており、CML患者ではイマチニブ治療抵抗性との関連が報告されている⁴⁾。*SLCO1B3* 334T>G (Ser112Ala)は、イマチニブの肝取り込みを担うOATP1B3に存在しており、イマチニブの消失に関与すると考えられる。本SNPにより、テストステロンの取り込み活性の低下が報告されており⁸⁾、イマチニブの肝取り込み活性にも影響を与えている可能性がある。OATP1A2は主にイマチニブの消化管吸収に関与すると考えられるが、プロモーター領域に存在する*SLCO1A2*-1032G>Aの機能変化は不明である。今後、両SNPについてイマチニブを基質とした機能解析により、 C_{trough} への影響のメカニズムが明らかになると期待される。

さらに年齢、性別、体表面積、イマチニブ投与量、及びdose-adjusted C_{trough} と相関した5種のSNPsを説明因子として、重回帰解析により対数変換 C_{trough} を説明する回帰式を推定した。 C_{trough} に有意に影響する

表3 C_{trough} 値の重回帰分析^{a)}

Variable	Coefficient	F-value	P-value	R ²	Intercept	N
				0.378407	6.592258	38
imatinib dose ^{b)}	0.0017533	4.237	0.0473			
334T>G (Ser112Ala), <i>SLCO1B3</i>	-0.159785	10.9776	0.0022			
-1032G>A, <i>SLCO1A2</i>	0.1159572	5.5132	0.0248			

^{a)}The values after logarithmic conversion were used as an objective variable.

^{b)}The dose (mg) at the trough measurement.

The final model to predict log transformed trough Plasma Concentrations is as follows

Natural logarithm transformed trough Plasma Concentrations =

6.592

+0.001753*imatinib dose (mg/day)

-0.1598 (for 334T/T and 334T/G) or +0.1598 (for 334G/G)

+0.1158 (for -1032G/G) or -0.1158 (for -1032G/A and -1032A/A)

因子は、投与量と共に、*SLCO1B3*334T>G 及び *SLCO1A2*-1032G>A であった。(表3)。

2-4) まとめ

候補遺伝子アプローチにより、*ABCG2*421C>A が日本人の GIST 患者における皮疹の発症と有意に関連していること、*SLCO1B3*334T>G および *SLCO1A2*-1032G>A がイマチニブ C_{trough} の予測に寄与することを示した。一方で、*ABCG2*421C>A と C_{trough} の間、及び C_{trough} と皮疹の発症の間にはいずれも有意な関連が認められず、*ABCG2*421C>A の変異により血液中のイマチニブ濃度が上昇し、皮疹の発現につながるという仮説では説明できなかった。これは、C_{trough} の測定検体数が少ないことや皮疹の発現と C_{trough} の測定にはタイムラグがあることが原因と考えられる。一方で、*ABCG2* はヒト皮膚において表皮基底層と真皮血管内皮細胞に発現しているという報告⁹⁾と併せて、皮疹の発現には、皮膚局所におけるイマチニブ濃度が重要であったり、代謝物である *N*-デスメチルイマチニブが関与したりする可能性も考えられ、さらなる検討が必要である。

3. メタボローム解析による多発性骨髄腫の治療効果・有害事象発現を予測するバイオマーカーの探索研究

3-1) ボルテゾミブ・デキサメタゾン療法の奏効性・神経障害の発症

多発性骨髄腫 (MM) は、血液細胞の一種である形質細胞のがん化により引き起こされ、造血能の低下、血液・尿中の M 蛋白の増加、破骨細胞の活性化等の症状を呈する。プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブ (BTZ) は、MM の治療に広く使用され、新たに診断された MM だけでなく、再発患者や他の治療に抵抗性のある患者でも、部分奏効 (PR) と完全奏効 (CR) の両方で優れた奏効をもたらす。一方で、一部の患者では本剤の治療効果が認められず、本剤の有効性は予測できない。さらに、BTZ では、副作用として末梢神経障害 (Bortezomib-induced peripheral neuropathy, BiPN) が、患者の 40~60% で発生し、そのうち 15~40% が重度の BiPN (G2 以上) を発症する。効果的な予防的治療が利用できないため、BiPN の発症により一部の患者での BTZ の使用が制限される。よって、潜在的な薬剤耐性または BiPN を発症するリスクが高い患者を特定することは重

要な課題である。骨髄腫細胞は、タンパク・脂肪酸合成が盛んであり、脂質代謝酵素群が活性化していることから、脂質代謝産物の解析が重要と考えられる。本研究では、BTZ と低用量デキサメタゾンによる Bd 療法を受けた MM 患者の治療前血清を分析し、脂質メタボロミクス解析により、Bd 療法の奏効性と BiPN 重症度の予測バイオマーカーを特定することを目的とした (図4)。

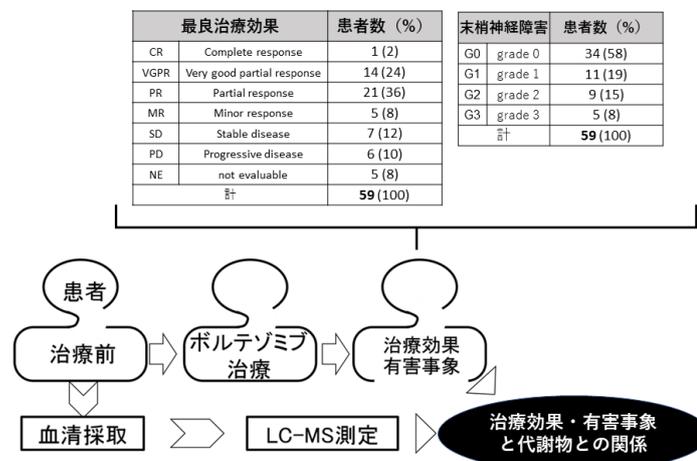


図4 ボルテゾミブ・デキサメタゾン療法の奏効性・神経障害の発症と試験デザイン

名古屋市立大学病院においてインフォームドコンセントが得られた計 59 名の MM 患者を対象とした。International Myeloma Working Group (IMWG) の基準に従い最良治療効果により分類すると、不変 (SD) が 12%、及び増悪 (PD) が 10%であった (図 4)。レスポナー (CR, VGPR, PR, MR) とノンレスポナー (SD, PD) 間で、総コレステロール値、トリグリセリド値、ヘモグロビン濃度、血清アルブミン、Body Mass Index (BMI) 等の患者背景因子に有意な差はなかった ($p > 0.005$)。Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) ver4.0 に従い、BiPN グレード G2 以上が 24%、G3 以上が 8%であった (図 4)。患者の背景因子のうち、BiPN 重症者 (G2, G3) は、軽症者 (G0, G1) と比較して前治療の経験者の割合が有意に高かった ($p < 0.005$)。

3-2) Bd 療法の奏効性と関連する脂質メタボローム探索

Bd 療法の開始前に、14 時間絶食後に採血し、2 時間以内に血清を分離した。採取した血清から、Bligh & Dyer 法により総脂質を抽出した。さらに固相抽出カラムを用いて酸化脂肪酸を抽出した。リン脂質・スフィンゴ脂質の測定には、高速液体クロマトグラフ (HPLC) による分離後に飛行時間型質量分析計

(TOFMS、定量) とフーリエ変換型質量分析計 (Orbitrap、構造解析) を組み合わせた測定法、または超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) による分離後に三連四重極型質量分析計 (QqQ-MS) による測定法を用いた。酸化脂肪酸の測定は HPLC による分離後に QqQ-MS を用いた (図 5)。

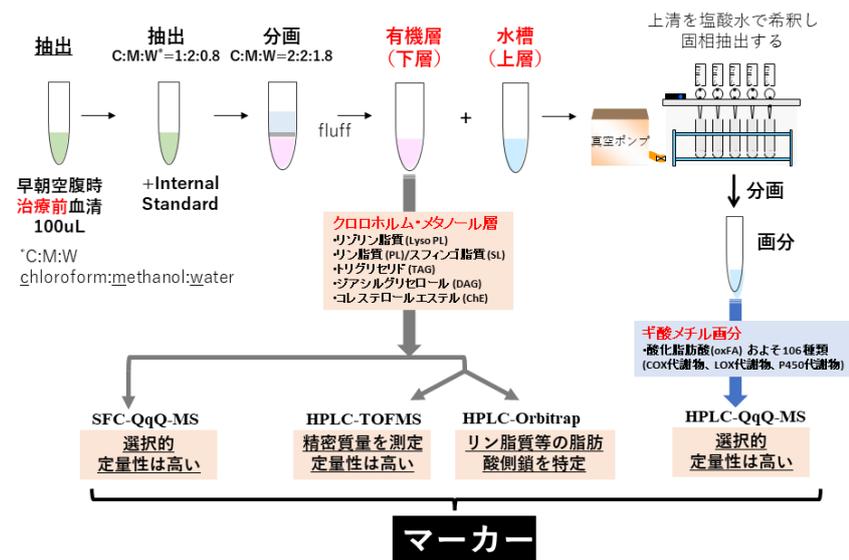


図5 Bd含有療法の治療前の血清を用いたメタボロミクス解析の流れ

患者の BTZ 治療前血清より 387 種の脂質分子種を同定した。まず、Bd 療法への奏効性に関連する脂質代謝物を特定するために、治療前血清中の各脂質代謝物のレベルを奏効性が異なる 3 群 (SD+PD 群、MR+PR 群、VGPR+CR 群) 間で比較した。9 種の ether-type phosphatidylethanolamine (ePE または pPE)、2 種の cholesterol ester (ChE)、2 種の phosphatidylcholine (PC)、及び 1 種の sphingomyelin (SM) のレベルが、PD+SD 群から MR+PR 群、VGPR+CR 群の順で有意に漸増した。これらのうち、代表的な脂分子種について、奏効性との関連性を図 6 に示した。

奏効性の高い患者ほど治療前血清中の ePE のレベルが有意に高値を示す傾向が認められた。ePE は、グリセロール骨格の sn-1 位の脂肪酸鎖がエーテル結合したベルオキシソーム由来のグリセロリン脂質である。本脂質分子種は、シグナル伝達に関与するコレステロールに富む膜領域

である脂質ラフトの形成と安定性に関与する他、内因性抗酸化剤として機能したり、膜融合プロセスを促進したりすることが報告されている¹⁰⁾。また、本脂質分子種の代謝経路は ether-type phosphatidylcholine (ePC) の生合成にも関与しており、ePC は、ヒト骨髄に存在する炎症性リン脂質である血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF) の生合成に利用される。PAF は、骨髄腫患者に由来する形質細胞株から免疫グロブリン分泌を刺激することが報告されており¹¹⁾、BTZ 応答性との関連が示唆される。

奏効性の高い患者ほど治療前血清中の ChE レベルが有意に高値を示す傾向が認められた。MM 患者における低コレステロール血症は、骨髄腫細胞による低密度リポタンパク質 (LDL) クリアランスの亢進、脂質及びコレステロール利用の増加を反映している¹²⁾。Łuczak らは、プロテオミクス解析により、難治性/再発性 MM 患者の治療前血清中のアポリポタンパク質 C1 の存在量が多いほど、BTZ 含有療法に対する反応が良好であるとする正の相関を報告している¹³⁾。ChE はアポリポタンパク質 C1 と共に、LDL の主成分であることから、我々の結果は Łuczak らの結果と一致する。また、細胞内に取り込まれたコレステロールは acyl-CoA: cholesterol acyltransferase 1 (ACAT 1) による再エステル化部位である小胞体へ輸送され、脂肪滴に貯蔵されるが、この小胞体輸送に ePE が関与することが報告されている¹⁴⁾。In vitro 機能解析等を用いたさらなる検討を要するが、血清中の ePE や ChE は、Bd 療法の奏効性を予測するためのバイオマーカー候補となる可能性がある。

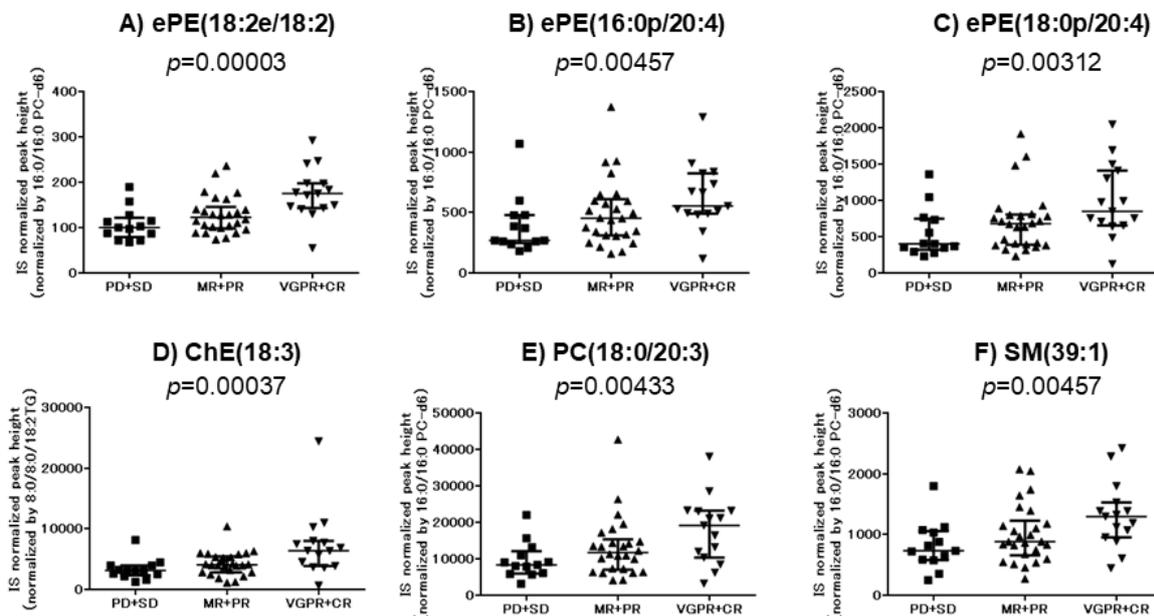


図6 多発性骨髄腫患者の治療前血清中の脂質代謝物レベルがBd療法に対する奏効率に与える影響
各シンボルは個々の患者を示し、ラインは四分位範囲付きの中央値を示す。統計解析はJonckheere-Terpstra trend testにより実施し、 $p < 0.005$ を有意と判定した。

3-3) Bd療法によるBiPNのグレードと関連する脂質メタボローム探索

BiPNグレード (G0~G3) で患者を4群に分類し、BiPNグレードと関連する脂質代謝物を探索した。BiPNのグレードと有意に関連した脂質分子種は、21種であり、その内訳は、ether-type lysoPC (eLPC) 1種、LPC4種、PC1種、phosphatidylinositol (PI) 2種、ceramide

(Cer) 1種、diacylglycerol (DG) 2種、triacylglycerol (TAG) 1種、および oxidative fatty acids (oxFAs) 9種であった。代表的な分子種について、BiPN のグレードとの関連を図7に示した。

BiPN グレードが高い患者ほど、LPC(16:0e)を含む LPC 分子種の治療前血清中のレベルが有意に高値を示す傾向が認められた (図7)。LPC は、生理活性脂質として、多くの細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させ、LPC 誘発性の脱髄と軸索変性を引き起こすことが報告されている¹⁵⁾。また、LPC は、後根神経節で神経型 NO 合成酵素の増加を通じて神経障害性疼痛を引き起こすことが知られており¹⁶⁾、BiPN との関連性が示唆される。

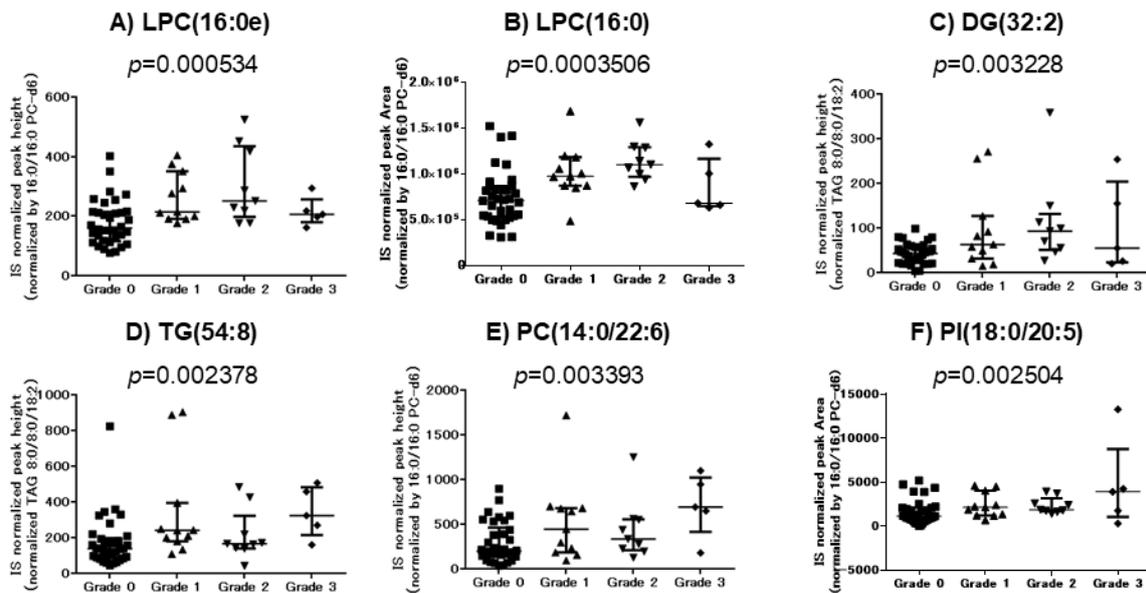


図7 多発性骨髄腫患者の治療前血清中の脂質代謝物レベルがBD療法による神経障害の重篤度と与える影響
各シンボルは個々の患者を示し、ラインは四分位範囲付きの中央値を示す。統計解析はJonckheere-Terpstra trend testにより実施し、 $p < 0.005$ を有意と判定した。

シトクロム P450 (P450) と可溶性エポキシドヒドロラーゼ (sEH) のよる代謝物3種が BiPN グレードと関連した (図8)。このうち、BiPN のグレードが高い患者ほど、BD 療法前血清中の 14,15 - epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EpETrE)、及び 14,15 - dihydroxyeicosatetraenoic acid (14,15-diHETE) のレベルが高く、8,9 - dihydroxyeicosatrienoic acid (8,9-diHETrE) のレベルが低かった。内在性シグナル伝達分子として、EpETrE は、血管拡張、イオンチャネル調節、抗炎症効果、血管新生など生体内で多様な効果を引き起こし、これらは、sEH による diHETrE への変換後に減衰することが知られている。arachidonic acid (AA) から生成される 8,9-EpETrE は、calcium channel transient receptor potential vanilloid - 4 (TRPV4) の天然アゴニストであり、8,9-diHETrE は 8,9-EpETrE の分解産物である¹⁷⁾。TRPV4 は、感覚ニューロンに発現しており、末梢神経障害性の痛みのシグナル伝達に重要な役割を果たすことが知られており、TRPV4 阻害は、前臨床モデルにおけるパクリタキセル誘発性の神経障害を防ぐことが知られている^{18,19)}。対照的に、AA 及び eicosapentaenoic acid (EPA) からそれぞれ生成される 14,15-EpETrE、及び 14,15 - epoxyeicosatetraenoic acid (14,15-EpETE) は、抗炎症、抗高血圧、鎮痛などのシグナル伝達に関与する²⁰⁾。エポキシ体である

8,9-EpETrE と 14,15-EpETE は、その不安定性のために患者の血清中では検出できなかったが、分解生成物である 8,9-diHETrE と 14,15-diHETE がそれぞれ BiPN 重症者の血清中に低値及び高値で存在していることが明らかになり、BiPN の重症度との関連性が示唆される。

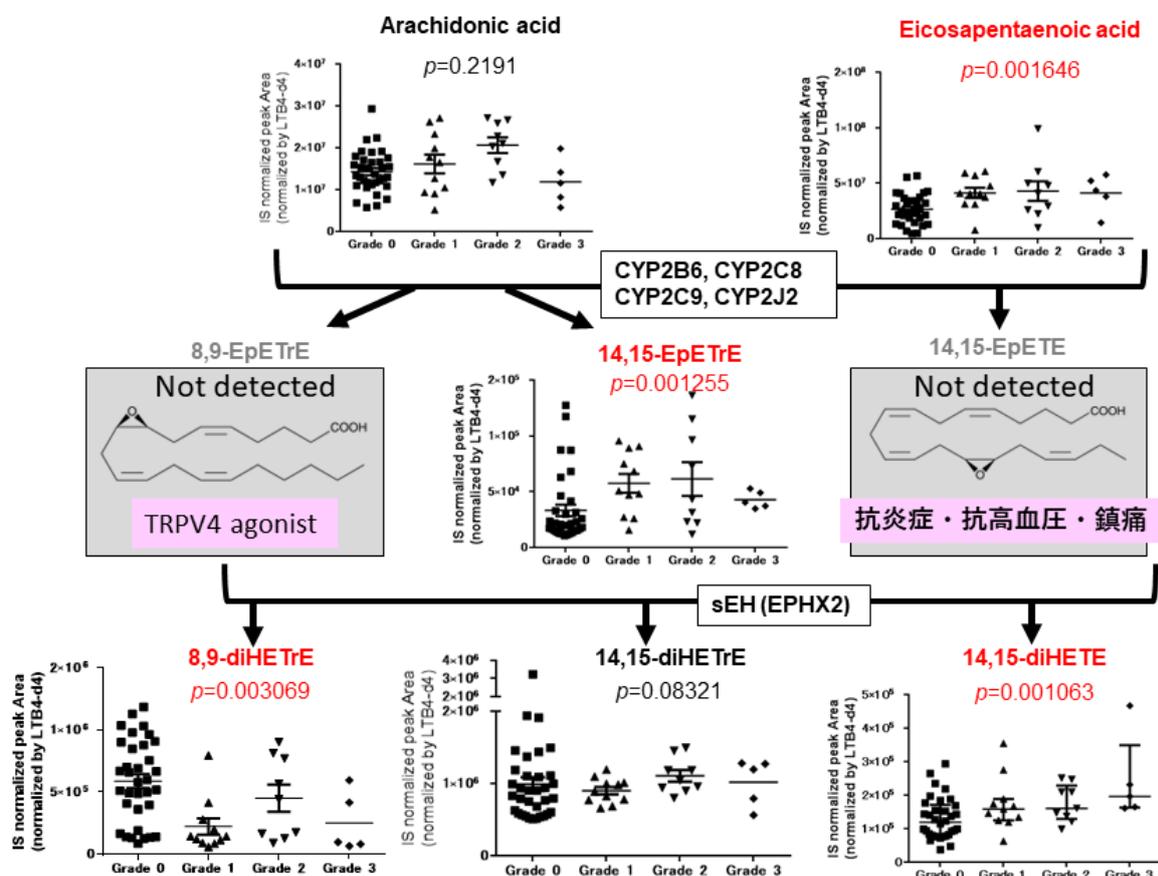


図8 多発性骨髄腫患者の治療前血清中の酸化脂肪酸レベルがBd療法による神経障害の重篤度と与える影響
神経障害発症と関連した酸化脂肪酸代謝物3種は、シトクロムP450 (P450) と可溶性エポキシヒドロラーゼ (sEH) による生理活性脂質の合成経路上に存在した。

3-4) まとめ

Bd 療法の奏効性のバイオマーカー候補として、治療前の血清中の ePE 類や ChE 類が、神経障害発症重篤度のバイオマーカー候補として、LPC 類や高度不飽和脂肪酸の P450 代謝物である oxFAs が抽出された。探索研究で得られたバイオマーカー候補は、検証コホートにより、再現性の確認が必要であり Bd 療法を受けた患者の収集を進めている。また、ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞株とその親株のプロテオーム及びメタボローム解析を計画中であり、今回見出された脂質代謝物が薬剤耐性に影響を与える機序を *in vitro* で解明する。神経障害に関しては、初代培養シュワン細胞や後根神経節細胞を用いてボルテゾミブによる障害に対する脂質代謝物や合成酵素阻害剤等の影響を明らかにしていく予定である。

4. おわりに

本研究では、抗腫瘍薬の治療効果・有害事象発現を予測するバイオマーカー候補の同定を目的として、イマチニブのファーマコゲノミクス研究、及びボルテゾミブのファーマコメタボロミクス

ス研究を実施した。両研究ともに後ろ向きの探索研究であり、今回得られたバイオマーカー候補は、別群の患者検体を用いた検証が必要である。また、感度・特異度、適格性に関する検討も必要となる。メタボロミクス研究では、分析法の高感度化や網羅性の向上、さらにプロテオミクス等の多階層的オミックス研究により、代謝物パスウェイの全体像の把握が容易になると考える。これらの研究を通して、抗腫瘍薬の有効性を最大限に発揮し、副作用を未然に防止する個別化医療の提供や新たな治療薬の開発につなげたい。

5. 謝辞

本研究の一部は、公益財団法人蓬庵社から4年間にわたりいただいた研究助成によるものです。ご支援を賜りました関係各位の皆様には厚く御礼申し上げます。研究助成対象者としてご推薦を賜りました佐藤公道先生に心より感謝申し上げます。研究遂行に際し、ご指導・ご助言を下さいました国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 部長 斎藤嘉朗先生、元新潟大学医学部 教授 神田達夫先生、川崎医科大学 講師 山村真弘先生、名古屋市立大学医学部 教授 飯田真介先生、同 講師 李 政樹先生に心より御礼申し上げます。最後に、共同研究者として本研究に関わっていただいた研究者の皆様、同志社女子大学薬学部医薬品分析学研究室の学生らに深謝申し上げます。

6. 参考文献

1. Maekawa K et al., Drug Metab Pharmacokinet 2022, 43, 100441.
2. Maekawa K et al., Cancer Sci 2019, 110 (10), 3267-3274.
3. Nishida T et al., Int J Clin Oncol 2008, 13 (3), 244-251.
4. Ravegnini G et al., Expert Opin Drug Metab Toxicol 2016, 12 (7), 733-742.
5. Hu S et al., Clin Cancer Res 2008, 14 (10), 3141-3148.
6. Ieiri I et al., Drug Metab Pharmacokinet 2012, 27 (1), 85-105.
7. Qian Y et al., Front Pharmacol 2019, 10, 854.
8. Hamada A. et al., Clin Cancer Res 2008, 14 (11), 3312-3318.
9. Hashimoto N et al., J Control Release 2013, 165(1), 54-61.
10. Dean JM et al., Protein Cell 2018, 9 (2), 196-206.
11. Desplat V et al., Cancer Lett 2000, 149 (1-2), 7-13.
12. Yavasoglu I et al., Ann Hematol 2008, 87 (3), 223-228.
13. Łuczak M et al., Pol Arch Intern Med 2017, 127 (6), 392-400.
14. Munn NJ et al., J Lipid Res 2003, 44(1), 182-92.
15. Li XH et al., Neurosci Lett 2007, 424 (1), 22-26.
16. Wang HY et al., Pharmacol Biochem Behav 2013, 106, 47-56.
17. Spector AA et al., Am J Physiol Cell Physiol 2007, 292 (3), C996-1012.
18. Boehmerle W et al., Exp Neurol 2018, 306, 64-75.
19. Nazıroğlu M et al., Front Physiol 2017, 8, 1040.
20. Morisseau C et al., J Lipid Res 2010, 51 (12), 3481-3490.

慢性腎臓病増悪因子としての細胞外マトリックスの役割

京都薬科大学 病態薬科学系 臨床薬理学分野
鳥羽裕恵

はじめに

慢性腎臓病患者は我が国の成人の 8 人に 1 人存在し、いまや国民病と言われている。慢性腎臓病の原因は加齢、高血圧、糖尿病等、心血管疾患の危険因子と重複しており、心血管疾患と合併するリスクが高い。我が国に 4000 万人以上の患者が存在する高血圧症における腎障害発症予防、進展抑制は特に重要な課題である。また遠隔臓器でありながら、神経・内分泌・代謝・血行力学的変化、酸・塩基バランスの不均衡、貧血等を介して心血管疾患と腎臓病は悪影響を及ぼしあっているため、腎保護は心血管保護の観点からも必須の課題である。腎障害時の病態では炎症反応の亢進とその後の組織線維化が認められる。特に線維化は不可逆的な機能低下に繋がるが、腎線維化の機序は十分に解明されていない。

細胞間質である細胞外マトリックスは細胞間の足場となり組織の形態維持に寄与するのみならず、炎症性サイトカインや増殖因子の分泌調節や細胞間の接着調節を介して炎症反応において重要な役割を果たすとされる。炎症反応は線維形成性のサイトカインの産生を促すことから、細胞外マトリックスの線維化における役割は大きい。細胞外マトリックスの 1 つ secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) は発生や器官形成の段階で細胞の接着や分裂を調節するが、生理的な条件下ではその発現は低く一部の骨や腸管上皮細胞など細胞分裂が盛んな組織に局在している¹。しかし、リモデリングや線維化が進行している部位ではその発現増大が報告されている²。留学期間中、老化心において SPARC が pro-inflammatory な M1 マクロファージへの分化を促すことで炎症を亢進させること、また細胞外マトリックス分解酵素の 1 つ a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif (ADAMTS1) の産生を介してコラーゲン産生を促進させることを報告した^{3,4}。心老化は慢性炎症とそれに続く線維化により進展するが、進行速度や程度は異なるものの、これらの病態は腎障害や動脈硬化においても重要な役割を担っている⁵。そこで本研究では、高血圧性腎障害時における腎組織の炎症反応や線維化の亢進は SPARC や ADAMTS1 増大を介して発揮されることを明らかにすることを目的とし、検討を行った。

高血圧モデルラットの腎障害進展と SPARC、ADAMTS1 発現の関係

片腎 Wistar/ST ラットに deoxycorticosterone acetate (DOCA、40mg/kg/week、皮下投与) と 1%食塩水を負荷すると (図 1)、負荷 1 週で血圧が上昇し始め、2 週以降で急激かつ有意な高血圧を発症、3 週では 200mmHg を超えた。代

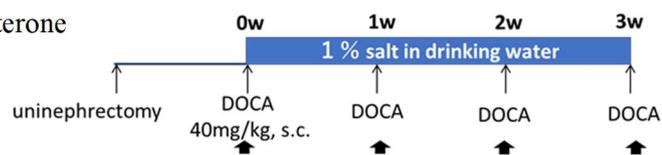


図 1 高血圧モデルラット作製とサンプリングのタイミング
右腎摘から回復後、DOCAと食塩水を負荷し、1週毎にテールカフ法による収縮期血圧測定、代謝ケージによる蓄尿を行った後、深麻酔下で腎臓を摘出し、各種検討に用いた (▲)。DOCA, deoxycorticosterone acetate; w, weeks.

謝ケージによる 24 時間蓄尿と血液サンプルを用いて尿中蛋白排泄量とクレアチニンクリアランスを測定したところ、有意な血圧上昇を認めた 2 週モデルと 3 週モデルで尿蛋白が増加し、3 週モデルでクレアチニンクリアランスが低下したことから、経時的な腎障害を確認できた (表 1)。

これらの高血圧性腎症モデルラットから摘出した腎臓において、酸化ストレスマーカーである脂質過酸化は 2 週で増加し、酸化ストレスの

主たる産生源と報告されている NADPH oxidase の活性は 2 週より増加傾向を認め、3 週で有意に増加した (図 2)。

腎組織における浸潤マクロファージ数は 2 週と 3 週で顕著な増加し、単球走化性因子 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 発現も同様の発現変化を示した。炎症性サイトカ

インであり、炎症の程度に相関して増加することが報告されている osteopontin の発現は 3 週で増加した (図 3)。

炎症反応が亢進していた 2 週モデル、3 週モデルの腎臓において、糸球体硬化と尿細管間質の線維化が経時的に悪化していた。また、線維化の進行を担う中心的な増殖因子

である transforming growth factor- β (TGF- β) の発現も時間依存的な増加を示し、3 週モデルで有意な増加を示した (図 4)。

	0w	1w	2w	3w
体重 (g)	180 \pm 3.3	224 \pm 3.8*	237 \pm 16*	240 \pm 11*
収縮期血圧 (mmHg)	127 \pm 2.1	138 \pm 5.4	175 \pm 6.8*#	205 \pm 6.8*#†
心拍数 (bpm)	440 \pm 5.8	411 \pm 7.1	406 \pm 12.5	426 \pm 9.8
尿中蛋白排泄量 (mg/day)	2.6 \pm 0.3	42 \pm 13	361 \pm 51*#	250 \pm 39*#
クレアチニンクリアランス (mL/min)	1.47 \pm 0.27	1.32 \pm 0.13	0.79 \pm 0.10	0.70 \pm 0.15*

表 1 DOCAと食塩水負荷から1週毎の体重、血圧、心拍数、尿中蛋白排泄量、クレアチニンクリアランスの変化

Values are means \pm S.E.M. (収縮期血圧、心拍数, n = 10–16/group;尿中蛋白排泄量, n = 9–11/group;クレアチニンクリアランス, n = 6–11/group) . *p < 0.05 vs. 0w, #p < 0.05 vs. 1w, †p < 0.05 vs. 2w.

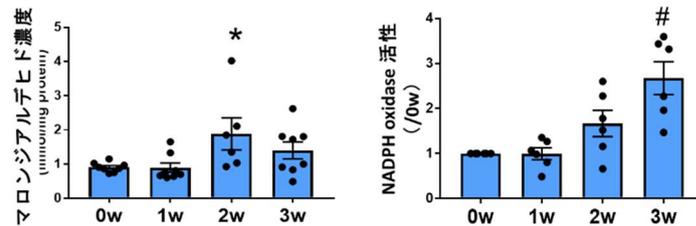


図 2 DOCA食塩負荷高血圧性腎症モデルラットの腎臓における酸化ストレスレベル。マロンジアルデヒド濃度はthiobarbituric acid reactive substances assayにより測定し (左図、n=6-8/group)、NADPH oxidase活性はルシゲニン化学発光法で測定した (右図、n=6)。Values are means \pm S.E.M. *p < 0.05 vs. 0w and 1w, #p < 0.05 vs. others.

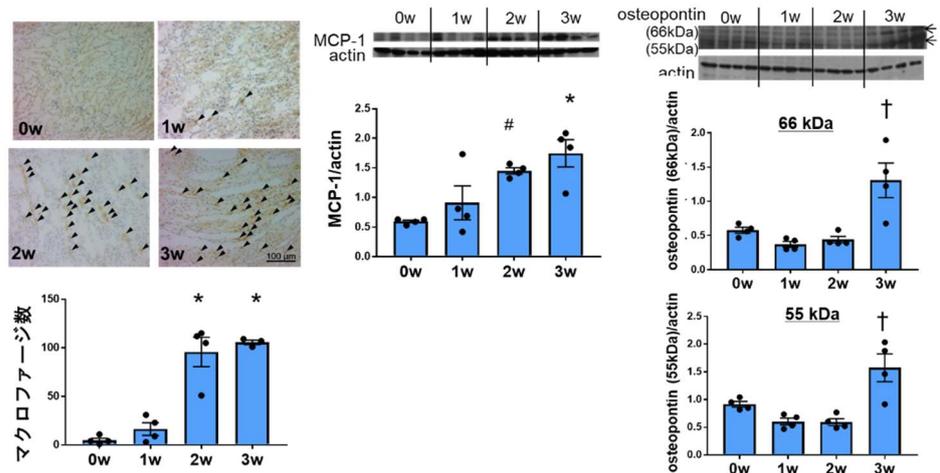


図 3 DOCA食塩負荷高血圧性腎症モデルラットの腎臓における炎症反応。免疫組織化学染色によりマクロファージを検出し、任意な 5 視野において陽性細胞を数えた (左図、n=3-4/group)。ウェスタンブロッティング法により炎症性サイトカイン monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1、中央図、n=4/group) と osteopontin (右図、n=4) のタンパク発現検討した。Values are means \pm S.E.M. *p < 0.05 vs. 0w and 1w, #p < 0.05 vs. 0w, †p < 0.05 vs. others.

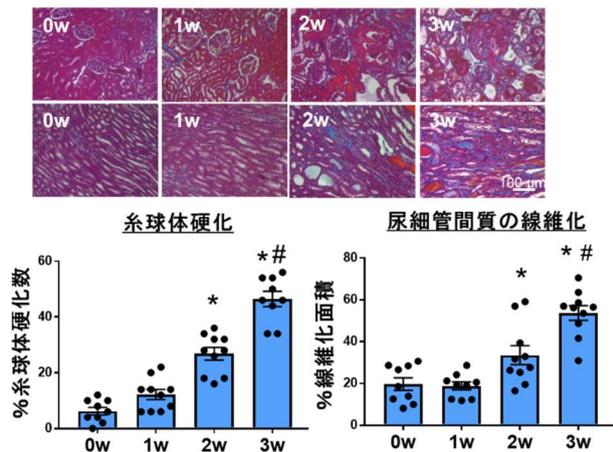


図4 DOCA食塩負荷高血圧性腎症モデルラットにおける腎線維化
マッソン・トリクロム染色にて糸球体硬化と尿管間質の線維化の(左図、n=9-10/group)、
ウェスタンブロッティング法にてtransforming growth factor-β (TGF-β) タンパク発現の(右図、
n=4/group)、経時的な変化を検討した。Values are means ± S.E.M. *p < 0.05 vs. 0w and 1w,
#p < 0.05 vs. 2w.

腎機能低下と線維化の進展に伴う SPARC と ADAMTS1 の腎臓における発現変化を検討したところ、単量体 (35kDa) の SPARC は 1 週から増加傾向を認め、2 週でピークを迎えた。二量体 (70kDa) では

3 週で有意な増加を認めた。ADAMTS1 は 110kDa の前駆体として合成された後、一部が切断されて生理活性を持つ 87kDa、さらに 65kDa の活性型へと分解される⁶。前駆型

(110kDa)、活性型 (87kDa、65kDa) とともに 0 週に比べ 2 週以降有意に増加し、3 週では 1 週モデルとも有意差を認めた

(図 5)。

これらの結果より、SPARC と ADAMTS1 は高血圧モデルラットの腎臓において、腎機能低下と炎症、線維化の進展に相関して時間依存的に発現が増加することが明らかとなった。

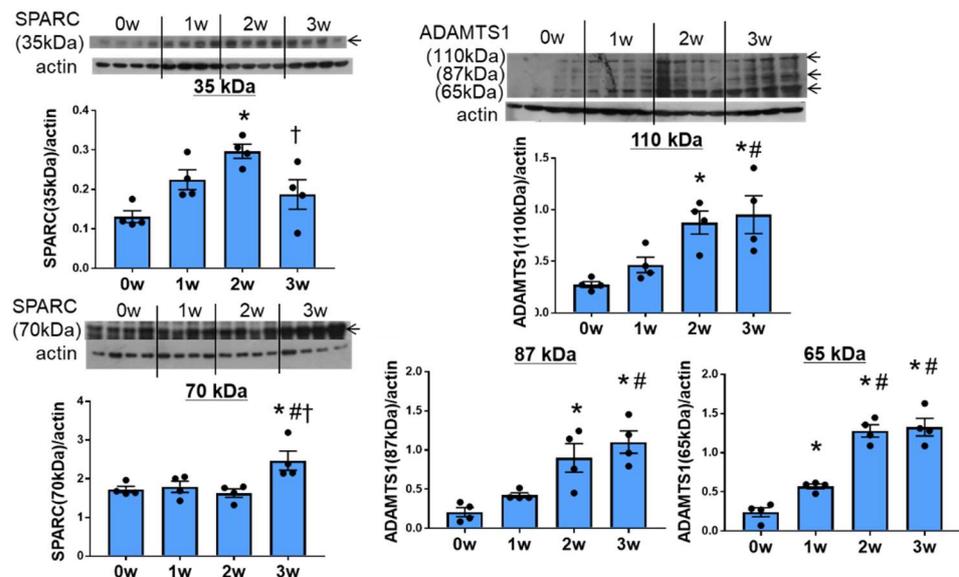


図5 DOCA食塩負荷高血圧性腎症モデルラットの腎臓におけるSecreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) と a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS1) の発現変化
ウェスタンブロッティング法にてSPARC (左図) とADAMTS1 (右図) タンパク発現を検討した。
Values are means ± S.E.M. *p < 0.05 vs. 0w, #p < 0.05 vs. 1w, †p < 0.05 vs. 2w.

腎組織レニン・アンジオテンシン系による SPARC と ADAMTS1 の発現調節

組織レニン・アンジオテンシン系は臓器障害の中心的な増悪因子であり、腎障害時にも線維化の促進をはじめ病態悪化に重要な役割を担っている⁷。今回用いた DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットの腎臓においても、アンジオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme、ACE) の活性と発現が 2 週より増加し、angiotensin II 発現が 1 週より増加し始め、3 週で有意

に増加することを確認した (図6)。

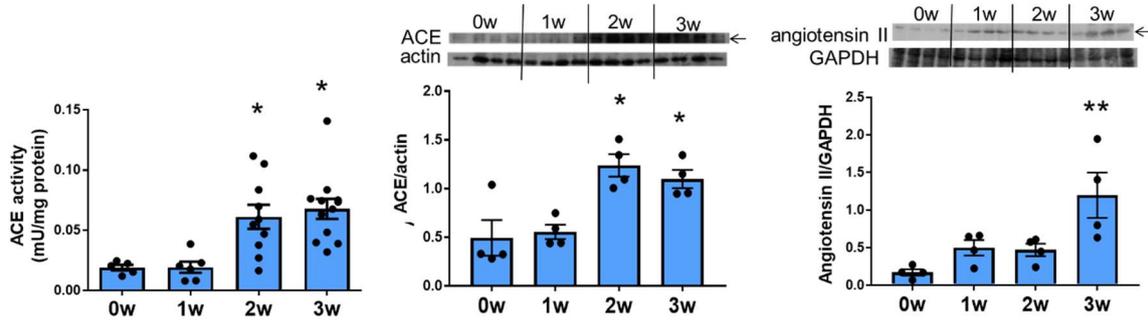


図6 DOCA食塩負荷高血圧性腎症モデルラットの腎臓におけるレニン・アンジオテンシン系の亢進
アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin converting enzyme, ACE) の活性 (左図, n=5-12/group) とタンパク発現 (中央図, n=4/group)。Angiotensin IIタンパク発現 (右図, n=4/group) とACEタンパク発現はウェスタンブロット法により検討した。
Values are means \pm S.E.M. *p < 0.05 vs. 0w and 1w, **p < 0.05 vs. others..

腎レニン・アンジオテンシン系の SPARC、ADAMTS1 発現への影響を検討するため、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体拮抗薬のロサルタン (30 mg/kg/day、経口投与) を 2 週、3 週の高血圧モデルラットに投与した。ロサルタン投与群では、高血圧時の SPARC と ADAMTS1 の過剰発現が抑制されたことから、腎レニン・アンジオテンシン系がこれらの発現を誘導していることが示唆された (図7)。

レニン・ア
ンジオテン
シン系が SPARC
と ADAMTS1
誘導の上流に
位置すること
を裏付けるた
め、ラット腎
線維芽細胞
NRK-49F を用
いて
angiotensin II
(10^{-6} mol/L)
負荷時の

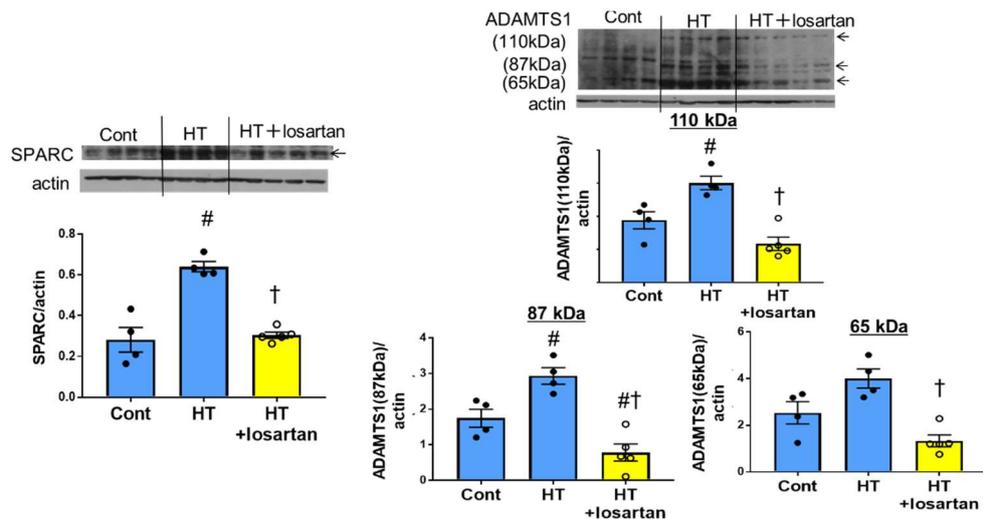


図7 アンジオテンシンIIタイプ1受容体拮抗薬投与時の腎臓におけるSPARC、ADAMTS1の発現
正常血圧コントロール群 (Cont)、高血圧群 (HT)、高血圧+ロサルタン投与群 (HT+losartan) における
SPARC (左図) とADAMTS1 (右図) のタンパク発現をウェスタンブロット法にて検討した。
Values are means \pm S.E.M. #p < 0.05 vs. Cont, †p < 0.05 vs. HT.

SPARC と ADAMTS1 発現を検討した。Angiotensin II を 24 時間負荷すると collagen I 産生の増加とともに、SPARC と前駆型 (110kDa) の ADAMTS1 発現が誘導され、活性型 ADAMTS1 (87kDa、65kDa) の発現も増加傾向にあった (図8)。

これらの結果は、高血圧性腎症の病態時にレニン・アンジオテンシン系によって引き起こされるコラーゲン線維の蓄積に、SPARC と ADAMTS1 が関与していることを示している。

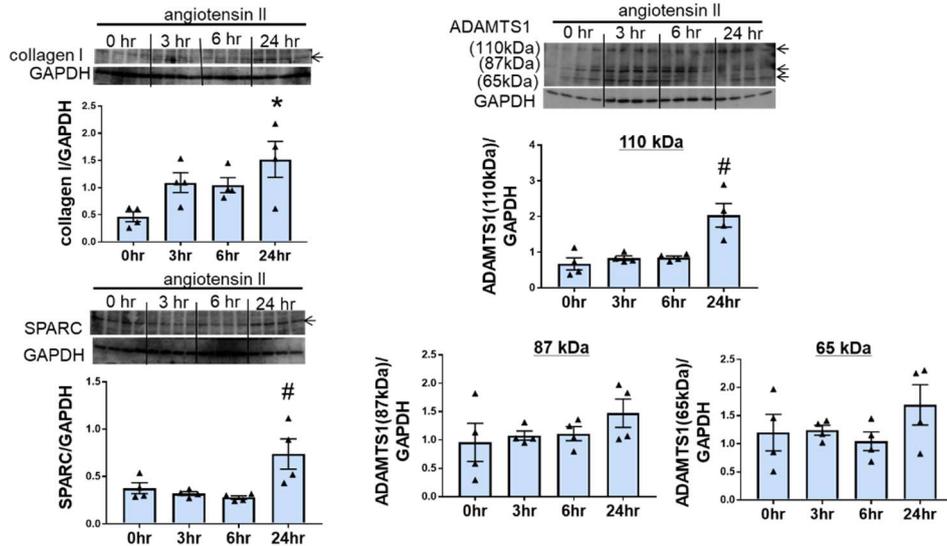


図8 Angiotensin II負荷培養ラット腎線維芽細胞におけるSPARC、ADAMTS1発現
培養ラット腎線維芽細胞にangiotensin II (10^{-6} mol/L) を0、3、6、24時間 (hr) 負荷した後、collagen I、SPARC、ADAMTS1の発現をウェスタンブロットング法で検討した。Values are means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs. 0hr, # $p < 0.05$ vs. others.

SPARCによる腎線維化の機序としてのADAMTS1の役割

SPARCが線維化の原因であることを証明するため、small interfering RNA (siRNA) を用いて SPARC 遺伝子を90%以上ノックダウンしたラット腎線維芽細胞 NRK-49F を用いて検討を行った (図9)。SPARC 遺伝子をノックダウンすると、腎線維芽細胞からの collagen I の産生が抑制された (図10)。腎線維病変を呈する患者では血清 SPARC 濃度が高値を示すことや、SPARC 遺伝子を欠損すると angiotensin II 誘発高血圧モデルや streptozotocin 誘発糖尿病モデル動物の腎臓における線維化が軽減することが報告されており^{8,9}、今回の結果は腎線維化の治療ターゲットとしての SPARC の可能性を示すものである。

心線維芽細胞では SPARC 刺激により ADAMTS1 とコラーゲンの産生が誘導されること、また、ADAMTS1 中和抗体併用時には SPARC 刺激によるコラーゲン産生が抑制されることを報告している⁴。腎線維芽細胞においても SPARC によるコラーゲン産生

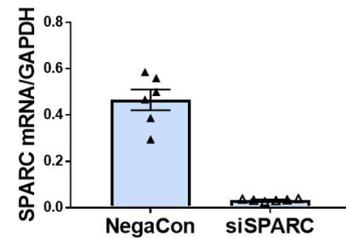


図9 Small interfering RNA (siRNA) の SPARC 遺伝子ノックダウン効率
培養腎線維芽細胞にネガティブコントロール (NegaCon) と SPARC siRNA (siSPARC) を導入した際の SPARC mRNA 発現を RT-PCR 法にて測定した。Values are means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs. NegaCon.

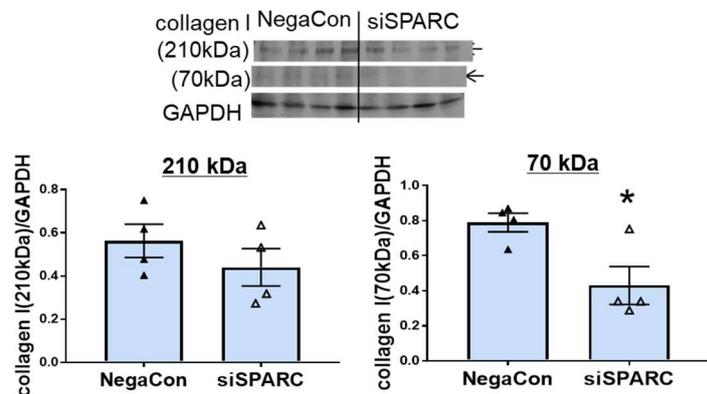


図10 SPARC 遺伝子ノックダウン時の腎線維芽細胞からのコラーゲン産生
培養腎線維芽細胞にネガティブコントロール (NegaCon) と SPARC siRNA (siSPARC) を導入した際の collagen I 産生をウェスタンブロットング法により検討した。Values are means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs. NegaCon.

機序に ADAMTS1 増加が寄与していると推察し、SPARC 遺伝子ノックダウン時の ADAMTS1 産生を検討したところ、予測通り、顕著な低下を認めた (図 1 1)。

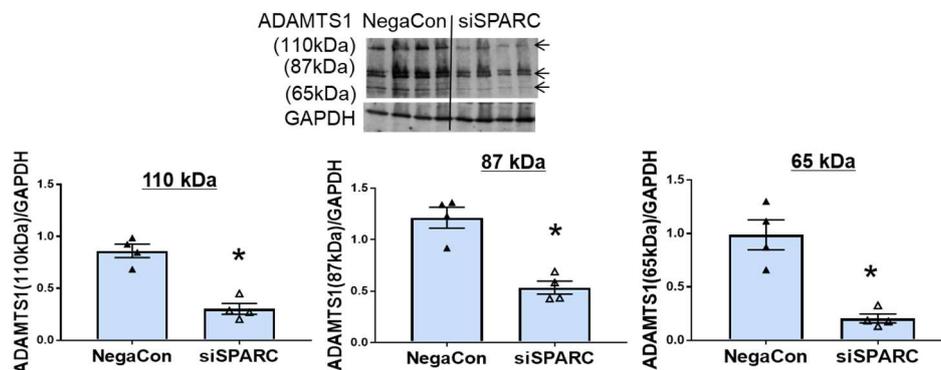


図 1 1 SPARC 遺伝子ノックダウン時の腎線維芽細胞における ADAMTS1 発現
培養腎線維芽細胞にネガティブコントロール (NegaCon) と SPARC siRNA (siSPARC) を導入した際の ADAMTS1 発現をウェスタンブロッティング法により検討した。Values are means \pm S.E.M. *p < 0.05 vs. NegaCon.

以上の DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットと培養腎線維芽細胞を用いた検討から、高血圧の病態時に亢進する腎組織レニン・アンジオテンシン系が SPARC 発現を誘導し、ADAMTS1 の産生と活性を介してコラーゲン産生を促進することが明らかとなった¹⁰。ADAMTS1 は細胞外マトリックス分解酵素の 1 つとして知られている一方、肝星細胞では TGF- β シグナルを活性化すること、その作用は酵素活性とは独立した作用であることが報告されている¹¹。また、TGF- β は SPARC 発現を誘導することが報告されているため¹²、SPARC 発現へのポジティブ・フィードバックにより線維化への悪循環を引き起こすと考えられる (図 1 2)。

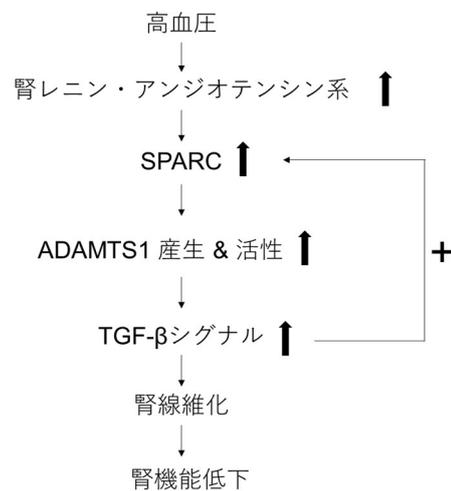


図 1 2 高血圧時の腎線維化進展における SPARC の役割

SPARC が ADAMTS1 を誘導する機序の検討にまでは至らなかったが、SPARC の受容体として知られている vascular cell adhesion molecule-1、stabilin-1、integrin- β 1 のうち α v β 1-integrin ブロックが腎臓の線維化に有効であることが報告されており¹³、integrin- β 1 の関与が推察される。

マクロファージ等の炎症細胞からは活性酸素種やサイトカイン、成長因子が放出されるため、炎症反応の慢性化はコラーゲンをはじめとする線維性の細胞外マトリックスの過剰蓄積に繋がる。SPARC 遺伝子欠損マウスでは大腸炎の軽減や足蹠腫脹反応の低下が認められるという報告は^{14,15}、本検討において SPARC による炎症惹起作用も腎線維化に寄与していたことを示唆している。マクロファージも ADAMTS1 を産生すること、ADAMTS1 を過剰発現すると細胞外マトリックスの過度の分解が進行し、細胞間隙への炎症性細胞浸潤が進行することが報告されており¹⁶、SPARC による炎症惹起機序にも ADAMTS1 を介しているか否かを検討することは、今後の必須の課題である。

おわりに

慢性腎臓病、特に高血圧に起因する腎障害の増悪因子として、細胞外マトリックス SPARC が重要な役割を担っていること、その機序は細胞外マトリックス分解酵素として知られる ADAMTS1 産生増大を介した線維化の促進であることを明らかとなり、慢性腎臓病治療ターゲットとしての SPARC の可能性を示すことができた。また、SPARC の上流には組織レニン・アンジオテンシン系の活性化が存在しており、ACE 阻害薬やアンジオテンシン II タイプ 1 受容体拮抗薬による臓器保護の機序の 1 つを提示した研究成果でもある。さらなる検討を続けることで包括的な慢性腎臓病治療ターゲット発見の一助となると考えている。

謝辞

本研究の一部は公益財団法人篷庵社の研究助成によるものです。ここに厚く御礼申し上げます。また、ご推薦を賜りました大阪医科大学名誉教授・清恵会医療専門学院学院長 宮崎瑞夫先生に心より御礼申し上げます。

本研究は京都薬科大学病態薬科学系臨床薬理学分野で行われたものです。ご指導いただきました京都薬科大学教授 中田徹男先生に深謝申し上げます。本研究の成果は当研究室の小原幸准教授の協力および学生の献身的な努力により得られたものであり、この場をお借りして心より感謝申し上げます。多くのご助言をいただきました共同研究者の産業技術総合研究所 池本光志先生に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Brekken R. A. and Sage E. H., *Matrix Biol*, 19 (7), 569-80, (2000)
- 2) Pichler R. H., Hugo C., Shankland S. J., Reed M. J., Bassuk J. A., Andoh T. F., Lombardi D. M., Schwartz S. M., Bennett W. M., Alpers C. E., Sage E. H., Johnson R. J. and Couser W. G., *Kidney Int*, 50 (6), 1978-89, (1996)
- 3) Toba H., de Castro Bras L. E., Baicu C. F., Zile M. R., Lindsey M. L. and Bradshaw A. D., *Am J Physiol Cell Physiol*, 308 (12), C972-82, (2015)
- 4) Toba H., de Castro Bras L. E., Baicu C. F., Zile M. R., Lindsey M. L. and Bradshaw A. D., *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 310 (11), E1027-35, (2016)
- 5) Toba H. and Lindsey M. L., *Pharmacol Ther*, 193 99-120, (2019)
- 6) Rodriguez-Manzaneque J. C., Milchanowski A. B., Dufour E. K., Leduc R. and Iruela-Arispe M. L., *J Biol Chem*, 275 (43), 33471-9, (2000)
- 7) Miyazaki M. and Takai S., *Nihon Rinsho*, 60 (10), 1904-10, (2002)
- 8) Taneda S., Pippin J. W., Sage E. H., Hudkins K. L., Takeuchi Y., Couser W. G. and Alpers C. E., *J Am Soc Nephrol*, 14 (4), 968-80, (2003)
- 9) Socha M. J., Manhiani M., Said N., Imig J. D. and Motamed K., *Am J Pathol*, 171 (4), 1104-12, (2007)
- 10) Toba H., Ikemoto M. J., Kobara M. and Nakata T., *Eur J Pharmacol*, 914 174681, (2022)
- 11) Bourd-Boittin K., Bonnier D., Leyme A., Mari B., Tuffery P., Samson M., Ezan F., Baffet G. and Theret N., *Hepatology*, 54 (6), 2173-84, (2011)
- 12) Carvalheiro T., Malvar Fernandez B., Ottria A., Giovannone B., Marut W., Reedquist K. A., Garcia S. and Radstake T. R., *Rheumatology (Oxford)*, 59 (9), 2258-2263, (2020)
- 13) Chang Y., Lau W. L., Jo H., Tsujino K., Gewin L., Reed N. I., Atakilit A., Nunes A. C. F., DeGrado W. F. and Sheppard D., *J Am Soc Nephrol*, 28 (7), 1998-2005, (2017)
- 14) Rempel S. A., Hawley R. C., Gutierrez J. A., Mouzon E., Bobbitt K. R., Lemke N., Schultz C. R., Schultz L. R., Golembieski W., Koblinski J., VanOsdol S. and Miller C. G., *Genes Immun*, 8 (3), 262-74, (2007)
- 15) Ng Y. L., Klopovic B., Lloyd F., Forrest C., Greene W. and Lawrance I. C., *PLoS One*, 8 (10), e77575, (2013)
- 16) Jonsson-Rylander A. C., Nilsson T., Fritsche-Danielson R., Hammarstrom A., Behrendt M., Andersson J. O., Lindgren K., Andersson A. K., Wallbrandt P., Rosengren B., Brodin P., Thelin A., Westin A., Hurt-Camejo E. and Lee-Sogaard C. H., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (1), 180-5, (2005)

文献 5 と 10 は本研究課題により得られた成果である。

電気生理技術を用いた難治性神経疾患の創薬標的分子の同定

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

井上 剛

胎盤関門透過の種差を生み出す機能分子の同定とその機能調節機構の解明

慶應義塾大学薬学部

登美 齊俊

1. はじめに

妊婦への薬物治療は総じて抑制的である。しかし、薬物は本来、合併症妊娠（精神障害や糖尿病等の疾患を有する女性の妊娠）や妊娠合併症（妊娠高血圧症候群や妊娠糖尿病など妊婦特有の疾患）に対して高い治療効果を発揮できる。さらに、近年の胎内診断技術の向上は、胎児不整脈など胎児疾患を検出可能としており、母体に加えて胎児を標的とする薬物治療のニーズは今後高まっていく。そのため、胎児を含む妊婦はアンメット・メディカル・ニーズの高い患者層といえ、薬物治療拡大への積極的な取り組みが必要である。

妊婦への薬物治療を抑制している最大の要因は、胎児における薬物動態・安全性が不透明であることであり、胎児血中薬物濃度の予測技術を確認する必要がある。胎児移行性の主な情報源を表1に示す。Aのヒト臍帯血中濃度は実測値として信頼できるが、妊婦での安全性が既に明確な薬物での情報に限られ、妊婦に適用可能な薬物を拡大するための研究には直接利用しにくい。一方、B、C、Dについても表1に示す短所から、ヒト胎児移行性の定量予測にはあまり活用されていない現状がある。このうちCは、新薬開発時に生殖発生毒性評価がラットなどの実験動物を用いて行われていることから、情報は豊富にあり、また胎児曝露量と毒性との関連を評価できる点で優れている。ただし、これまでは実験動物で生殖発生毒性が示された場合、その投与量にかかわらずヒト妊婦への適用を外す傾向が強く、胎児曝露量と毒性との関連について定量的な視点での評価は十分にされてこなかった。これに対し、2021年に発出された「医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン」では、「最大推奨臨床用量における曝露量の25倍を超える曝露量のみで生じる影響は、医薬品の臨床使用において懸念は小さい」と定義された。本ガイドラインは25倍の曝露マージンを置いたことで、胎児曝露量と毒性との関連について定量的な評価を可能とした点で画期的である。

表1 薬物胎児移行性の評価手法

	手法	(現状における) 短所
A	ヒト <i>in vivo</i> (臍帯血)	評価可能な薬物に乏しい
B	ヒト <i>ex vivo</i> (胎盤灌流)	一部に <i>in vivo</i> 定常状態との不一致
C	ラット <i>in vivo</i> (非臨床)	種差 (ラットで移行性が低い傾向)
D	<i>In silico</i>	拡散透過薬物に限定

一方、ラット・ヒト間種差を踏まえ、ラットにおける高用量投与時の胎児毒性が、ヒト妊婦での薬物治療を抑制させる現状は依然として大きく変わっていない。そのため、薬物の胎児移行性を規定する胎盤関門のラット・ヒト間種差を生み出す分子を同定し、動物での胎児移行性からヒト胎児移行性への外挿精度を高めることには大きな意義がある。しかし、薬物の胎盤透過性における種差に着目した研究はほとんどないのが現状である。

薬物の胎児移行は胎盤関門が制御している。ラットとヒトいずれにおいても、胎盤栄養膜細胞が細胞融合し、合胞体栄養膜細胞となることで細胞間隙を消失させ、物質の自由の透過を制限している。薬物が胎盤関門を透過するには、血漿タンパクなどに結合していない薬物が、母体側および胎児側細胞膜を介して透過する必要がある。ただし、細胞膜透過における種差を考える場合、受動拡散による透過そのものは、種差の原因になりにくいと考えられる一方、トランスポーターの発現量や局在部位に種差がある場合は薬物の胎児移行性の種差につながりやすい。特に、合胞体栄養膜細胞はヒトで単層なのに対し、げっ歯類では2層になっているため、この差がトランスポーター局在の種差を生み出す可能性が高い。本研究は、血漿タンパク濃度における種差、トランスポーターの局在および発現量種差を分子レベルで明らかにし、薬物の胎児移行性種差との関連を明らかにすることを目指した。

2. 母胎間アルブミン濃度比

薬物の胎児移行性は通常、胎児/母体血漿中濃度比 (F:M ratio)で評価される。しかし、実際に薬理作用の発現に関与するのはタンパク質などと結合していない遊離形 (unbound) 薬物であり、薬効や安全性の評価を行う場合は、F:M ratio に遊離形分率(f_p)の比を乗じた unbound F:M ratio で評価する方が望ましい。

$$\text{Unbound F: M ratio} = \text{F: M ratio} \times \frac{f_{p,\text{fetus}}}{f_{p,\text{mother}}}$$

ただし、遊離形分率が母胎血漿間で同程度であれば、F:M ratio と unbound F:M ratio は同じとなるため、両者の差を考慮する必要はない。多くの薬物が結合する血漿アルブミンについて、薬物の臍帯血中濃度が測定される妊娠満期において、ヒト胎児血漿中アルブミン濃度は母体血漿中の 1.2 倍であるとされる^{1,2}。そのため、アルブミンの母胎間差が unbound F:M ratio と F:M ratio の差に与える影響は大きくない。一方、妊娠末期のラットにおいて、胎児血漿中アルブミン濃度は母体血漿中の半分であり、アルブミン結合薬物の多くは $f_{p,\text{fetus}}$ が $f_{p,\text{mother}}$ と比較して大きい可能性が高い。この場合、ラット F:M ratio は unbound F:M ratio と比べて低値となる (図 1)。そのため、unbound F:M ratio を基準とした実際の胎児移行性に

ラット・ヒト間種差がなかったとしても、F:M ratio ではラットのほうがヒトよりも低値となるため、胎児移行性を見かけ上低く見積もる可能性があり、安全性評価において問題である。

ヒトとラットにおいて胎児移行性が報告されている薬物について、F:M ratio の報告値（ラットにおいては一部胎仔組織/母体血漿中濃度比を含む）を比較したところ、ラットの方が低い薬物が大部分

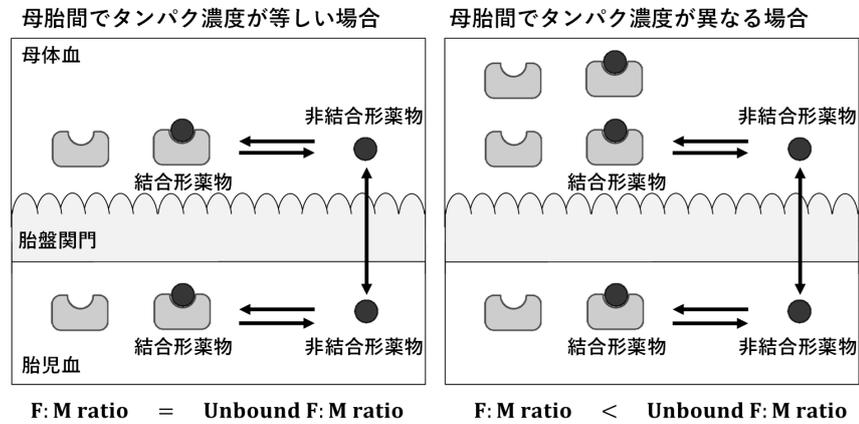


図1 血漿タンパク質濃度の母胎間比が、薬物の F:M ratio に与える影響

であった。この原因として、少なくとも一部は母胎間アルブミン濃度比の種差に起因する可能性がある。しかし、ラットにおいて $f_{p,fetus}$ を評価した報告は皆無であり、母胎間アルブミン濃度比種差の影響は明確ではない。

そこで、本研究では、ヒトにおける F:M ratio、 $f_{p,mother}$ 、および $f_{p,fetus}$ が報告されている薬物のうち、digoxin、indomethacin、lopinavir、nitrazepam、phenobarbital、および propranolol の 6 種を抽出し、ラットにおいて母体血と胎児血での遊離形分率および定常状態での胎児移行性を測定し、母胎間のアルブミン濃度差が与える影響を考察した。抽出した薬物のうち、ヒトでアルブミンに結合することが報告されており、かつヒト母胎間での遊離形分率の差が $\pm 20\%$ 以内である薬物は、digoxin、indomethacin、nitrazepam、および phenobarbital であった。一方、これら 4 種のラットにおける $f_{p,fetus}$ は、 $f_{p,mother}$ と比較して digoxin で 2.6 倍、indomethacin で 3.9 倍高値であり、これは胎児血におけるアルブミン濃度の低さに起因していると考えられた。一方、nitrazepam および phenobarbital については、 $f_{p,fetus}$ が $f_{p,mother}$ とほぼ同程度であった。Phenobarbital の $f_{p,mother}$ は 0.85 と高く、アルブミンとの結合性が低いために母胎間のアルブミン濃度の差の影響を受けにくいと考えられた。一方、nitrazepam については、ラット母体血ではアルブミンへの nitrazepam のタンパク結合を阻害する遊離脂肪酸が母体血において胎児血の約 30 倍高いことが報告されており、遊離脂肪酸により結合阻害が $f_{p,mother}$ を押し上げた結果、 $f_{p,fetus}$ との差は小さかった可能性がある。

ラットにおいて胎児移行性を評価した結果、 $f_{p,fetus}$ が $f_{p,mother}$ と比較して大きい digoxin および indomethacin のラット F:M ratio は、いずれもヒトの約 40% となり、見かけの種差が示

された (図 2)。しかし、unbound F:M ratio で評価することでラットとヒトはほぼ同程度となり、ラット母胎間の非結合分率の差を考慮することで種差を解消できることが示された (図 3)。Phenobarbital は $f_{p,fetus}$ が $f_{p,mother}$ と同程度であり、F:M ratio と unbound F:M ratio はいずれもラットとヒトで同程度であることが示され、胎児移行性における種差が小さい薬物といえる。一方、lopinavir、nitrazepam、および propranolol については、unbound F:M ratio で比較した場合、ヒトと比較してラットの方が小さく、タンパク結合以外の因子が胎児移行性の種差に関与していると考えられる。

以上の結果、アルブミンに結合する薬物のうち少なくとも一部について、ラットでの胎児移行性を F:M ratio ではなく、unbound F:M ratio で評価することで、ヒトへの外挿精度を高めることができた。母胎間アルブミン濃度比の種差を考慮してラットからヒトの胎児移行性を外挿することは、その精度を高めることで有効であることが実証された。

3. 排出トランスポータータンパクの局在種差

胎盤関門には抗がん剤など様々な薬物を母体側に汲み出す輸送体として multidrug resistance protein 1 (MDR1) および breast cancer resistance protein (BCRP) が発現する。ヒト胎盤関門において MDR1 と BCRP は、胎盤関門の実体である合胞体栄養膜細胞層 (SynT) 単層の刷子縁膜 (MVM) に発現している。この構造は MDR1 と BCRP が循環血に接して発現している点で、血液脳関門など他の組織関門とも共通する一般的構造である。一方、齧歯類胎盤では MDR1 や BCRP の局在が特殊であり、MDR1 と BCRP は循環血に接していない。齧歯類において胎盤迷路部に位置する SynT 層は、母体血に接する SynT-I と胎児血に接する SynT-II の二層で存在し、MDR1 と BCRP は SynT-II の apical 膜に発現している³ (図 4)。

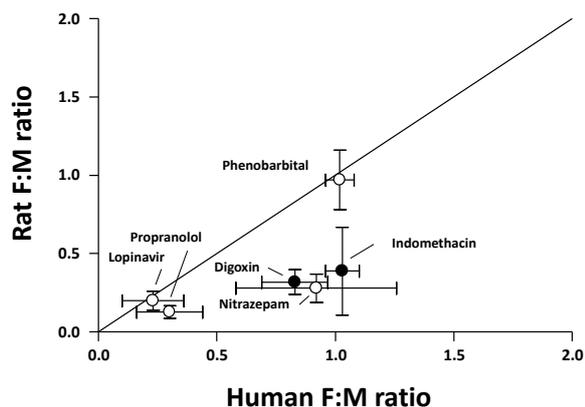


図 2 F:M ratio のヒト・ラット間比較

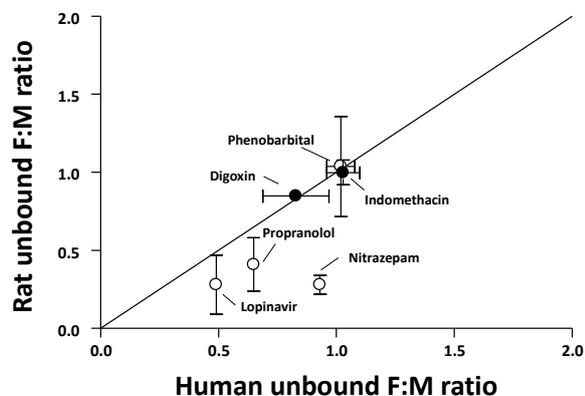


図 3 Unbound F:M ratio のヒト・ラット間比較

齧歯類胎盤の SynT-I と SynT-II は connexin26 で構成された gap 結合にて結びつき、最小内径が 1.4 nm の細胞間チャンネルを形成している⁴。したがって、SynT-I と SynT-II 間での物質の授受は細胞膜および gap 結合を介した経路が存在し、薬物によっては gap 結合チャンネルを透過することで MDR1 や BCRP による排出機構を迂回することが想定される。

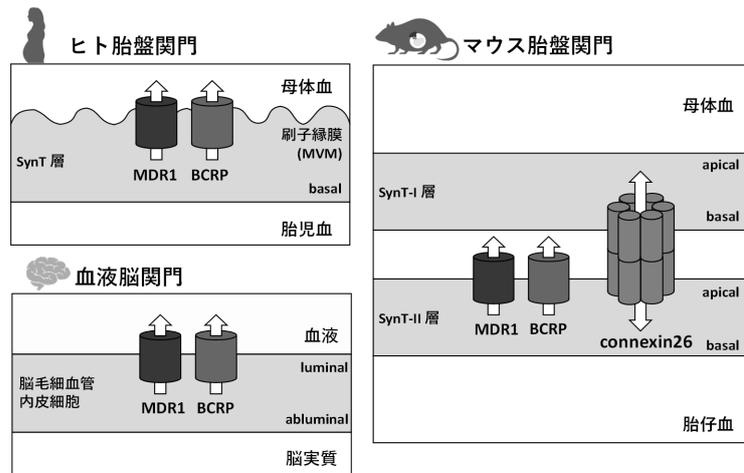


図 4 胎盤関門における MDR1 および BCRP タンパク局在のラット・マウス間種差

MDR1 および BCRP の発現量とその輸送活性は相関することが報告されている。血液脳関門において、マウスとカニクイザルの脳毛細血管内皮細胞における MDR1 の発現量をそれぞれ算出することで、MDR1 基質薬物のマウス脳移行性からカニクイザル脳移行性の予測が可能であることが報告されている⁵。そのため、胎盤関門においても血液脳関門同様に MDR1 および BCRP の発現分子数を算出することで種差の定量的評価が可能であるように思われる。しかし、齧歯類胎盤において MDR1 と BCRP の局在はヒト胎盤とは異なるため、MDR1 と BCRP 発現量の種差と基質薬物の胎児移行抑制活性の種差が相関しない可能性がある。そこで本研究では、齧歯類胎盤における MDR1 と BCRP 局在の独自性が胎児薬物分布抑制活性に与える影響を定量的に評価した。具体的には、マウス血液脳関門とマウス胎盤関門における MDR1 と BCRP の組織薬物分布抑制機能を定量的に比較することで、MDR1 と BCRP の局在の違いが基質薬物の胎児移行抑制における MDR1 と BCRP 寄与に与える影響を明らかにすることを目指した。

組織間での MDR1 と BCRP の機能比較を行うためには各組織での MDR1 と BCRP のタンパク質発現量情報が必須である。本研究ではまず、LC-MS/MS を用い、マウス胎盤関門における MDR1 と BCRP 発現量を定量した。マウス胎盤迷路部細胞膜画分での GD13.5 と 15.5 における MDR1A と MDR1B のタンパク質発現分子数は同程度であり、いずれも 0.5 fmol/ μg _protein 前後であった。しかし、出産 1 日前の GD17.5 において、MDR1A 発現分子数が 0.65 fmol/ μg _protein であった一方、MDR1B 発現は 0.16 fmol/ μg _protein に減少した。マウス胎盤迷路部における MDR1A と MDR1B を合計した MDR1 の総発現分子数は GD13.5、

15.5、17.5 でそれぞれ 0.93、1.25、0.82 fmol/ μg _protein であった。マウス胎盤迷路部での BCRP 発現分子数は GD13.5、15.5、17.5 でそれぞれ 0.76、2.53、0.65 fmol/ μg _protein であり、GD15.5 が最大となるように妊娠進行に伴って一過性の発現変動を示した。マウス胎盤迷路部は主に 4 種の細胞が層を形成しているため、その細胞膜画分のうち 1/8 が SynT-II の apical 膜であると仮定した場合、妊娠 15.5 日目のマウス胎盤 SynT-II の apical 膜での MDR1 発現分子数はマウス血液脳関門の luminal 膜における発現分子数（報告値⁶⁾ の約 25%であると推定される（図 5）。一方、妊娠 15.5 日目のマウス胎盤関門での BCRP 発現分子数は、血液脳関門と同程度であると推定された。

続いて MDR1 と BCRP の機能を胎盤と脳で比較した。MDR1 の基質薬物である paclitaxel の *Mdr1a/b* 欠損マウスにおける F:M ratio は野生型マウスに比べて GD15.5 で 3.2 倍に、GD17.5 で 7.5 倍に増加し、母体における脳/血漿薬物濃度比 ($K_{p,\text{brain}}$) は

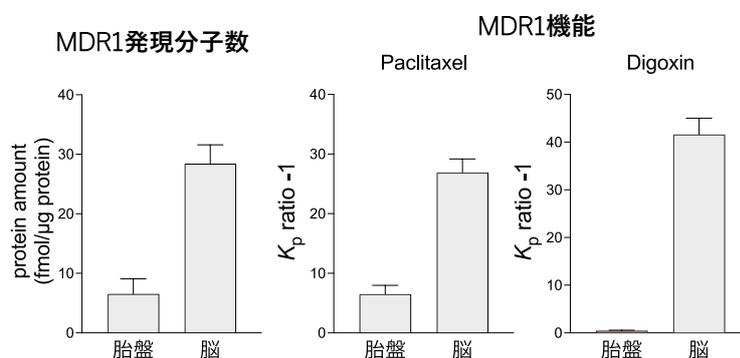


図 5 MDR1 発現分子数と MDR1 機能における胎盤関門と血液脳関門間比較

28 倍であった。MDR1 タンパク発現分子数と比較すると、胎盤関門 MDR1 タンパク 1 分子当たりの paclitaxel の胎児移行抑制能は、血液脳関門のそれと大きく変わらないことがされた。一方、*Mdr1a/b* 欠損マウスにおける digoxin の $K_{p,\text{brain}}$ は野生型マウスに比べて 43 倍であるのに対し、F:M ratio は 1.4 倍とほとんど変化しなかった（図 5）。*Bcrp* 欠損妊娠マウスにおける genistein の F:M ratio は GD15.5 では野生型に比べ 2 倍、GD17.5 では 1.5 倍であった一方、genistein の $K_{p,\text{brain}}$ は、野生型に比べ 6 倍であった。Dantrolene では、*Bcrp* 欠損妊娠マウスの $K_{p,\text{brain}}$ は野生型に比べて 5.7 倍に上昇した一方で、F:M ratio は *Bcrp* の有無による差は認められず、dantrolene 胎児分布への胎盤 BCRP の寄与は検出されなかった。以上から、マウス胎盤関門において MDR1 あるいは BCRP は、血液脳関門と比較し、少なくとも digoxin、genistein、および dantrolene の排出ポンプとしては強く機能しないことが明らかとなった。

マウス胎盤関門における MDR1 または BCRP 基質薬物の経胎盤透過速度論モデルを構築すると（図 6）、 $K_{p,\text{fp}}$ および $K_{p,\text{brain}}$ の欠損型/野生型比 (K_p ratio) は以下の式で表される。

$$K_{p,\text{brain}} \text{ ratio} - 1 = \frac{PS_{\text{MDR1 or BCRP, BBB}}}{PS_{\text{l, eff}}}$$

$$K_{p,fp} \text{ ratio} - 1 = \frac{PS_{MDR1 \text{ or } BCRP, PB}}{PS_{AP2, eff} + PS_{GJ} \times \left(1 + \frac{PS_{AP2, inf}}{PS_{BM1, inf}}\right)}$$

$PS_{MDR1 \text{ or } BCRP, BBB}$ と $PS_{MDR1 \text{ or } BCRP, PB}$ は、それぞれ脳と胎盤での MDR1 または BCRP による排出輸送、 $PS_{l, eff}$ と $PS_{AP2, eff}$ はそれぞれ脳毛細血管内皮細胞 luminal 膜と胎盤 SynT-II apical 膜での MDR1 または BCRP 以外による排出輸送、 PS_{GJ} は gap 結合を介した透過、 $PS_{AP2, inf}$ と $PS_{BM1, inf}$ はそれぞれ胎盤 SynT-II apical 膜と SynT-I basal 膜での取込み輸送のクリアランスを表す。

さらに、胎盤関門に対する胎盤関門の MDR1 と BCRP 寄与比 ($R_{P/B}$) は下式に基づいて算出できる。

$$\begin{aligned} R_{P/B} &= \frac{(K_{p,fp} \text{ ratio} - 1) / \text{胎盤関門での MDR1 or BCRP 発現分子数}}{(K_{p,brain} \text{ ratio} - 1) / \text{脳関門での MDR1 or BCRP 発現分子数}} \\ &= \frac{P_{l, eff}}{P_{AP2, eff} + P_{GJ} \times \left(1 + \frac{P_{AP2, inf}}{P_{BM1, inf}}\right)} \end{aligned}$$

本式のうち、 $P_{l, eff}$ 、 $P_{AP2, eff}$ 、 $P_{AP2, inf}$ 、 $P_{BM1, inf}$ が専ら単純拡散 (P_{diff}) によると仮定する。このとき、

$$R_{P/B} = \frac{P_{diff}}{P_{diff} + 2P_{GJ}}$$

となり、 $R_{P/B}$ は connexin26 による gap 結合を介した透過性 (P_{GJ}) と単純拡散 (P_{diff}) のみで表すことができ、 $R_{P/B}$ は P_{GJ}/P_{diff} と逆相関する。つまり、 $R_{P/B}$ が 1 を大きく下回る場合、 P_{GJ}/P_{diff} は大きい値を示す。ヒト connexin26 による gap 結合チャンネルの結晶構造によると、6つのサブユニットのアミノ末端ヘリックスが細胞内孔の入り口に並んで漏斗様構造を形成しており、その最小内径は 1.4 nm である⁴。本研究で用いた薬物の投影像から求めた最小分子径は paclitaxel で 1.6 nm、digoxin で 1.3 nm、genistein で 0.9 nm、dantrolene で 0.8 nm であり、paclitaxel を除く 3つの

薬物で gap 結合の最小内径より小さい。そのため、paclitaxel と比較して digoxin や genistein、dantrolene の P_{GJ} は大きいことが想定される。細胞膜は脂質二重膜で構成されているため、脂溶性が高い薬物は細胞膜透過性が優れている。Paclitaxel の pH 7.4 での log D は 6.83 であり、digoxin、genistein、dantrolene の pH 7.4 での log D はそれぞれ 1.26 と 3.94、1.56 と比較して脂溶性が高い。実際に、pH 7.4 における parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA)

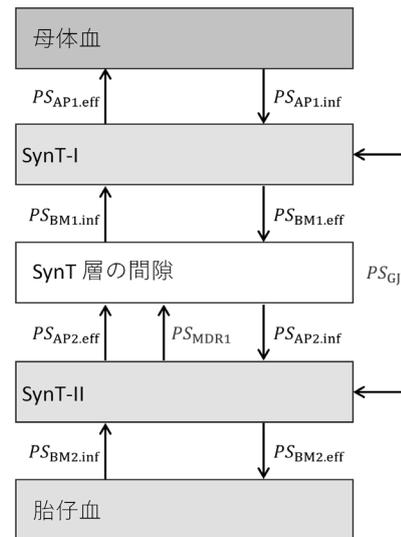


図6 マウス胎盤関門における MDR1 または BCRP 基質薬物の経胎盤透過速度論モデル

の単純拡散透過性は paclitaxel で 398 cm/s と報告されており、digoxin の 0.8 cm/s よりもはるかに大きい⁷。そのため、digoxin と genistein、dantrolene は paclitaxel に比べて P_{diff} が小さいことが想定される。以上より、digoxin や genistein、dantrolene は paclitaxel に比べ大きな P_{Gj}/P_{diff} を有していたため、結果として胎盤での MDR1 や BCRP が digoxin や genistein、dantrolene の胎児分布に与える影響は小さいと考えることができる。

これまで、MDR1 や BCRP 基質薬物の胎児移行性を齧歯類からヒトに外挿する際には、局在の差異は考慮されていなかった。しかし、本研究において経胎盤輸送速度論モデルを構築して検討を行った結果、分子径が 1.4 nm 未満で gap 結合による透過性が大きく、単純拡散による透過性が小さい基質では、齧歯類胎盤関門での MDR1 や BCRP の寄与が小さくなる可能性が示された⁸。これは、MDR1 と BCRP の胎児薬物分布制御における齧歯類とヒトとの種差を克服し、ヒトでの薬物の胎児移行性を定量的に評価する上で重要な知見である。

4. 有機イオントランスポーター発現量の種差

経口血糖降下薬の metformin は、本邦では妊婦に禁忌である。一方、海外では海外では妊娠糖尿病に使用可能であり、その有効性を示す報告も多い。Metformin は生理的 pH においてカチオンであり、受動拡散による胎盤関門の透過はほとんどない一方、胎盤関門 basal 膜に発現している organic cation transporter (OCT) 3 の基質であり、ヒトでの F:M ratio がほぼ 1 である⁹。本研究では、有機カチオン薬物の胎児移行における種差を解析するため、metformin のマウスおよびラットにおける胎児移行性を評価した。その結果、マウスにおける投与 2 時間後の F:M ratio は 1.4 であり、ヒトと大きく変わらなかった一方、ラットにおいては 72 時間持続投与した定常状態における F:M ratio が 0.04 となり、ほとんど胎児に移行していないことが明らかとなった。他の有機カチオンとして、1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) の胎児移行についても評価したところ、持続投与 1 時間後のラットの F:M ratio が 0.2 なのに対し、マウスでは 0.6 であることが示された。以上の結果から、有機カチオンの胎児移行性は、ラットにおいてヒトやマウスと比較して低く抑えられていることが示唆された。

有機カチオン薬物の尿細管分泌には OCT による取り込みに加えて、multidrug and toxin extrusion protein (MATE) による汲み出し輸送が関与していることが知られている¹⁰。ラット胎盤における MATE1 タンパク発現が報告されている一方、ヒトおよびマウス胎盤において MATE1 タンパク発現を解析した報告はない。mRNA レベルではヒトおよびマウスにおける発現量が低いとする報告はあるものの、直接比較されていない。そこでまず、マウスとラ

ットにおいて MATE1 mRNA の発現量を比較したところ、ラットの方が約 200 倍高いことが示された。さらに、LC-MS/MS を用い、胎盤迷路部細胞膜画分での MATE1 タンパク発現分子数を解析したところ、ラットでは MATE1 の発現が検出できたのに対し、マウスでは検出することができなかった。以上の結果から、ラットにおいてのみ MATE1 の発現量が高く、これにより有機カチオンが母体側に汲み出されることで、有機カチオンの胎仔移行性が抑えられている可能性が示された (図 7)。

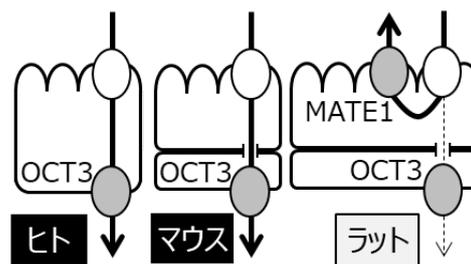


図 7 想定される胎盤関門における有機カチオン透過機構

Organic anion transporter (OAT) 4 は、ヒト胎盤関門の主に basal 膜に発現する輸送体であるが¹¹、その OAT4 のオーソログはげっ歯類には存在しない。ヒトではエストジオール合成が胎盤で行われるが、その前駆体の胎児血から胎盤への取り込みに OAT4 が関与している¹²。そのため、OAT4 の基質薬物の胎児移行性にも種差が存在する可能性が高い (図 8)。アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) である olmesartan は、胎盤を透過して胎児腎に作用することで羊水過少症の原因となるため妊婦禁忌である。我々は、ヒト胎盤ベシクルによる検討から、olmesartan のヒト胎盤関門 basal 膜における輸送に OAT4 が関与することを示唆する結果を得た。また、腎排泄される ARB のほとんどが OAT4 の基質であり、一部の基質の輸送が両方向性であることも明らかにしている。ヒト F:M ratio の情報が乏しく、胎仔移行性種差についての知見は得られていないが、OAT4 を介した輸送によって ARB のヒト胎児移行が促進され、胎児毒性を増強している可能性は十分にある。

5. おわりに

本研究の結果、齧歯類とヒトとの間における①母胎間アルブミン濃度比における種差、②トランスポーター (MDR1 および BCRP) タンパク局在における種差、③トランスポーター (MATE1) 発現量における種差が、それぞれ薬物の胎児移行性種差に結びついていることを示すことができた。いずれの種差についても、齧歯類での F:M ratio がヒトよりも低くなる原因となる点で共通し、多くの薬物において観察されてきた齧歯類での低 F:M ratio に対する機構論的説明として重要な知見である。ただし、それぞれが胎児曝露や胎児毒性評価に及ぼす影響は異なる。①母胎間アルブミン濃度比における種差は、F:M ratio における種差を実際の胎児曝露や胎児毒性評価においても反映させてしまった場合に、ヒトにおける胎児

曝露や胎児毒性を過剰に見積もることとなる。Unbound F:M ratio において種差があるのかどうか、見極める必要がある。一方、②トランスポーター (MDR1 および BCRP) タンパク局在における種差、③トランスポーター (MATE1) 発現量における種差は、胎児曝露や胎児毒性評価に胎児移行機構の種差を反映させなかった場合に、ヒトでの胎児曝露や胎児毒性を低く見誤ることになる。種差の原因となる機構毎に異なる対処が必要であるため、齧歯類での評価結果をヒトに外挿しようとする際には、その胎盤透過制御機構を踏まえたアプローチが望まれる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる援助を 4 年間にわたって賜りました公益財団法人篷庵社および財団関係者の皆様に深く感謝申し上げます。特に、ご推薦いただきました東フィンランド大学薬学部客員教授・東北大学名誉教授 寺崎哲也先生、および座長の労をとっていただきました金沢大学医薬保健研究域薬学系教授 玉井郁巳先生に厚く御礼申し上げます。本研究は、慶應義塾大学薬学部薬剤学講座において実施されたものであり、西村友宏准教授、野口幸希助教をはじめ、研究に携わった全ての大学院生・学生に感謝いたします。

参考文献

1. Stock, B., Dean, M. & Levy, G. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212, 264–268 (1980).
2. Dziegielewska, K. M. *et al. Dev. Biol.* 83, 193–200 (1981).
3. Akashi, T. *et al. Reprod. Toxicol.* 65, 375–381 (2016).
4. Maeda, S. *et al. Nature* 458, 597–602 (2009).
5. Uchida, Y. *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 350, 578–588 (2014).
6. Uchida, Y. *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 339, 579–588 (2011).
7. Tsinman, O., Tsinman, K., Sun, N. & Avdeef, A. *Pharm. Res.* 28, 337–363 (2011).
8. Fujita, A. *et al. Pharm. Res.* (2022). doi:10.1007/s11095-022-03165-6
9. Kurosawa, K. *et al. Drug Metab. Dispos.* 48, 1293–1302 (2020).
10. Ahmadimoghaddam, D. & Staud, F. *Reprod. Toxicol.* 39, 17–22 (2013).
11. Fokina, V. M. *et al. J. Pharm. Sci.* 111, 505–516 (2022).
12. Tomi, M. *et al. Endocrinology* 156, 2704–2712 (2015).

家族性高コレステロール血症における PCSK9 の意義の解明

名古屋大学 環境医学研究所
内分泌代謝分野
堀 美香

1. はじめに

家族性高コレステロール血症 (FH) は生下時より高 LDL-コレステロール (LDL-C) 血症を呈し、一般人口に比較して 15-20 年ほど早く冠動脈疾患を発症する遺伝性疾患である。国内では FH ヘテロ接合体 (ヘテロ FH) が 200-500 人に 1 人の割合で約 24-60 万人の患者が存在し、非常に頻度が高い。一方、FH ホモ接合体 (ホモ FH) 患者は 16-100 万人に 1 人の割合で、約 130-760 人の患者が存在する。FH は早期からの的確な治療により予後改善が確実に見込める疾患であり、FH の中でも冠動脈疾患発症の高リスク群を早期に同定し早期に治療を開始することが最も重要である。

FH の原因遺伝子として、血中の LDL を取り込む LDL 受容体 (*LDLR*) 遺伝子、*LDLR* のリガンドである *APOB* 遺伝子、*LDLR* の分解に関する *PCSK9* 遺伝子が報告されている。我々はこれまでに国立循環器病研究センターにて、FH・FH 疑い 1550 症例に対し、サンガー法により *LDLR*・*PCSK9* 遺伝子のコード領域について遺伝子解析を実施してきた。本邦のヘテロ FH 患者における原因遺伝子の割合は、*LDLR* 遺伝子変異が 57%、*PCSK9* 遺伝子変異が 7.8% であり、残り約 35% が原因不明である¹⁾。本邦の FH 患者においては、これまでに *APOB* 遺伝子変異を有する家系は報告されていなかった²⁾。最近、我々は *LDLR* 遺伝子変異及び *PCSK9* 遺伝子変異を認めない原因不明 FH 家系に対し、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、*APOB* 遺伝子変異を原因とする日本人初の FH 1 家系を発見した³⁾。このように本邦では *APOB* 遺伝子変異の頻度は非常に低い。*PCSK9* 遺伝子については本邦特有の変異が高頻度に検出される。本邦特有の *PCSK9* 遺伝子変異は、海外で報告されている *LDLR* 分解作用の強い *PCSK9* 遺伝子変異と異なり、FH の病態は mild であり、病態への寄与のメカニズムが十分には明らかになっていない。

近年、本邦では *LDLR* 遺伝子変異に *PCSK9* 遺伝子変異が重なる重症 FH が報告されている^{4), 5), 6)}。我々も *LDLR* 遺伝子変異に *PCSK9* 遺伝子変異が重なる FH 患者では、*LDLR* 遺伝子変異のみを有する患者に比較し、LDL-C 値の上昇とともに冠動脈疾患リスクが 40% 上昇することを報告した⁵⁾。そこで本研究では、本邦特有の *PCSK9* 遺伝子変異の FH の病態への寄与を明らかにするために、① *LDLR* 遺伝子変異に *PCSK9* 遺伝子変異が重なる FH 患者の予後解析、② *PCSK9* 変異体の培養肝細胞導入による機能解析、③ *LDLR* 遺伝子変異に *PCSK9* 遺伝子変異が重なる FH 患者を発端者とする家系からの肝細胞作製を行った。また、③の家系において、*PCSK9* 遺伝子変異以外の FH の新規原因/関連遺伝子の寄与の有無を調べるために、④既知の FH 原因遺伝子変異を認

めない家系について全ゲノム/エクソン解析を行い、新規 FH 原因/関連遺伝子を探索した。

2-1 LDLR 遺伝子変異に PCSK9 遺伝子変異の重なる FH 患者の予後解析

国立循環器病研究センターにて 2005 年から 2016 年までに FH 遺伝子解析を実施したヘテロ FH 発端者 232 名について、臨床情報を収集し予後解析を行った。ヘテロ FH 発端者 232 名のうち、80%において LDLR 遺伝子変異、14%に PCSK9 遺伝子変異を認めた。また、LDLR 遺伝子変異に PCSK9 遺伝子変異の重なる患者は 6% (n=14) であった。LDLR 遺伝子変異に PCSK9 遺伝子変異の重なる FH 患者は、LDLR 遺伝子変異のみを有する患者に比較して、未治療 LDL-C 値は有意に高かったが (316±75 mg/dL vs 273±72 mg/dL; p<0.04)、高用量スタチンや PCSK9 阻害剤を用いた強力な脂質低下療法が高頻度に使用されており、治療後の LDL-C 値は他の FH 症例に比較して低値であった。LDLR 遺伝子変異に PCSK9 遺伝子変異の重なる患者は LDL-C 値はコントロールされているにもかかわらず、心筋梗塞のリスクが高いことを明らかにした (hazard ratio, 4.62; 95% CI, 1.66-11.0; p=0.003 vs LDLR 遺伝子変異を有する患者、図 1)⁷⁾。

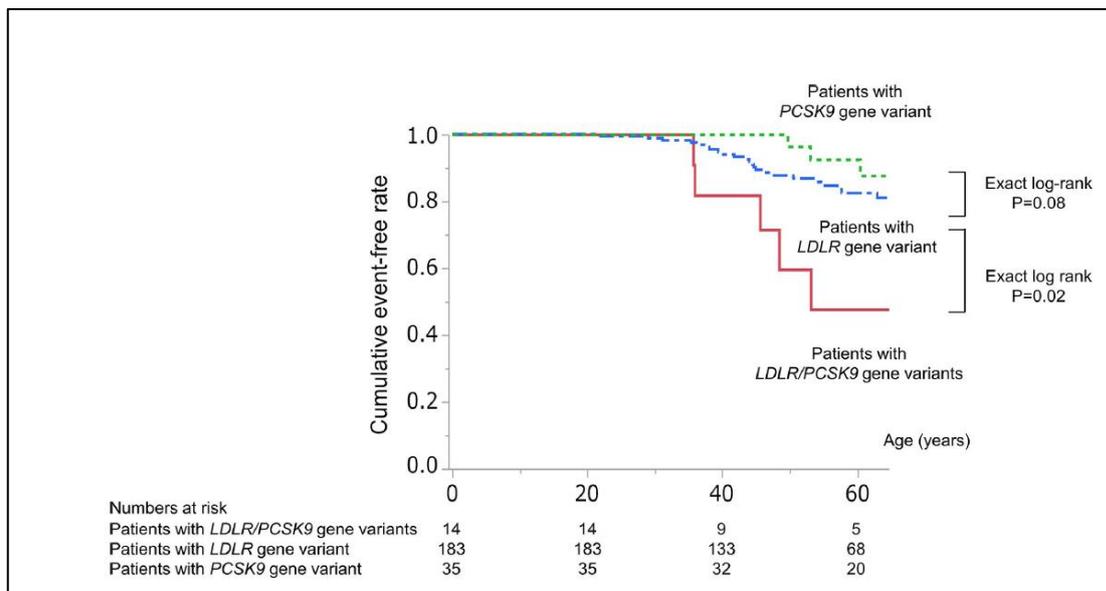


図 1 LDLR 遺伝子変異に PCSK9 遺伝子変異が重なると予後不良である
(Doi, Hori (co-first author) et al. JAHA, 2021)

2-2 PCSK9 変異体の培養肝細胞導入による機能解析

PCSK9 遺伝子変異の機能解析のため、ヒト培養肝細胞株 HepG2 に PCSK9 遺伝子変異を有するプラスミドを一過性に導入し、LDLR の発現・活性、PCSK9 の発現・分泌量を調べたが、野生型 PCSK9 と差は認められなかった (図 2, Hori et al. in

preparation)。この実験系においては、*PCSK9* 遺伝子単独変異では LDLR 活性への寄与を認めなかった。また、*LDLR* 遺伝子は正常であり、*LDLR* 遺伝子変異を有する患者における *PCSK9* 遺伝子変異の病態への寄与は明らかにできなかった。

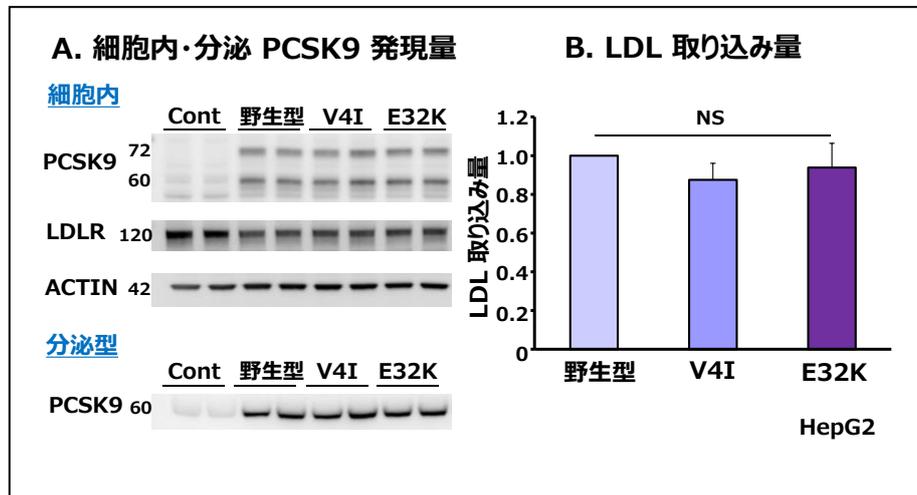


図 2 本邦特有 PCSK9 変異体は培養肝細胞の LDL 代謝において野生型 PCSK9 と差は認められなかった

2-3 *LDLR* 遺伝子変異に *PCSK9* 遺伝子変異の重なる FH 患者を発端者とする家系からの肝細胞の作製

LDLR 遺伝子変異に *PCSK9* 遺伝子変異の重なる FH 患者において、その病態の重症化機序を明らかにするために、国立循環器病研究センターに通院中の *LDLR* 遺伝子変異に *PCSK9* 遺伝子変異の重なる重症 FH 患者を発端者とする 1 家系について採血を行い、末梢血単核球を分離・培養し、患者由来 iPS 細胞を樹立した(図 3A)。

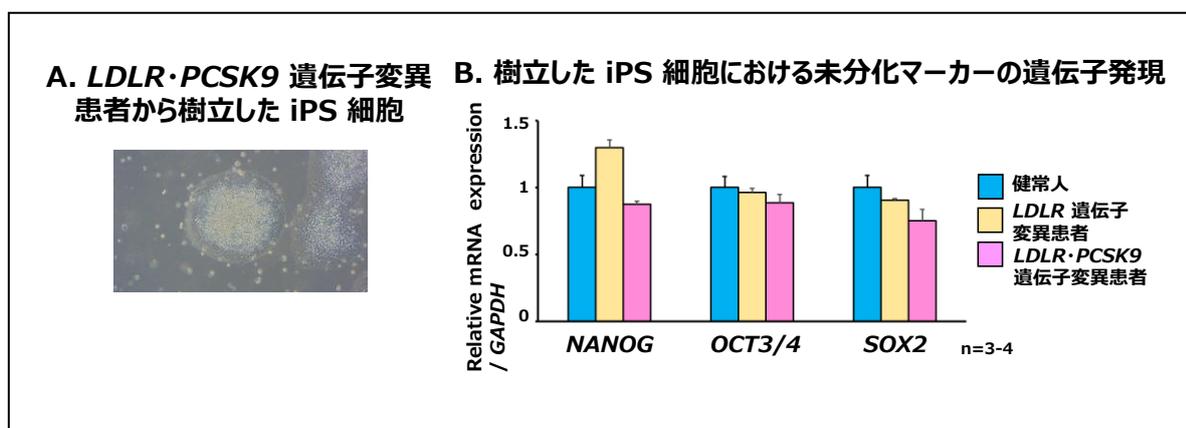


図 3 樹立した iPS 細胞の未分化マーカー遺伝子発現の確認

コントロールとして健常人由来 iPS 細胞を樹立した。樹立した各 iPS 細胞について、遺伝子発現解析から未分化マーカー遺伝子 (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*) の発現を確認した(図 3B)。

健常人由来 iPS 細胞について、内胚葉・肝前駆・肝細胞へと分化誘導を行い⁸⁾、肝細胞を作製した(図 4A)。肝細胞分化の指標であるアルブミン産生能及び LDLR、PCSK9 蛋白質の発現を確認し、この実験系で LDL 代謝の評価が可能であることを確認した(図 4B)。現在、FH 患者由来 iPS 細胞について肝細胞分化誘導を行っており、健常人 iPS 細胞由来肝細胞と LDL 代謝について比較する。

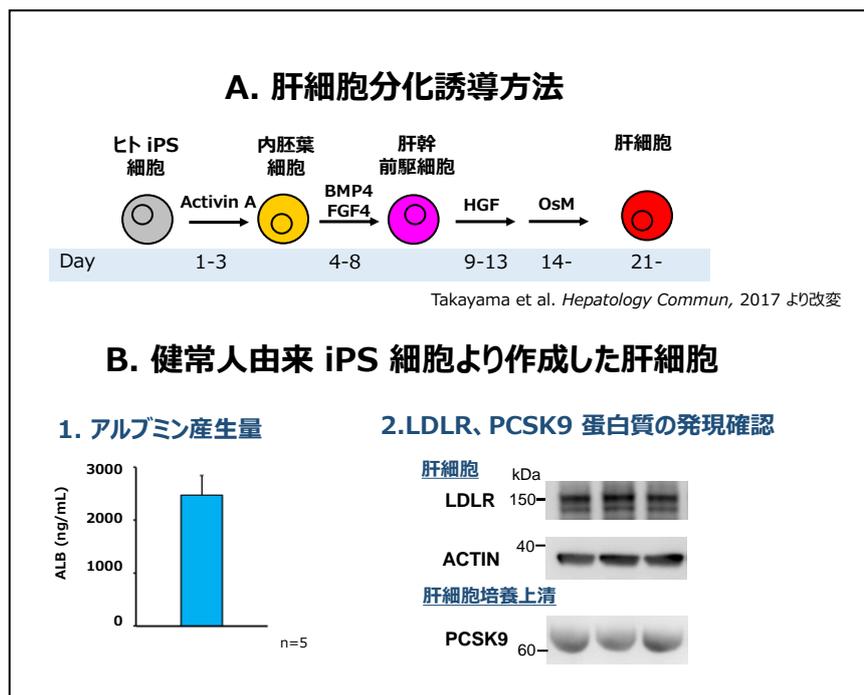


図 4 健常人 iPS 細胞由来肝細胞のアルブミン産生能及び LDLR、PCSK9 蛋白質の発現確認

2-4 全ゲノム/エクソン解析による FH 新規原因/関連遺伝子の探索

2-3 の家系において、*PCSK9* 遺伝子変異以外の新しい FH 原因/関連遺伝子の病態への寄与の有無について検討するため、*LDLR*・*PCSK9* 遺伝子に変異を認めない原因不明の FH 122 家系において次世代シーケンサーを用いて全エクソン解析を実施し、新しい FH 候補遺伝子 X の変異を同定した(図 5, Hori et al. submitted)。また、発端者の兄弟 7 名全員が心筋梗塞を発症した原因不明の大家系 22 名については全ゲノム解析を行い、新規の *LDLR* 遺伝子重複変異をゲノム上の位置を含めて正確に同定した⁹⁾(図 5)。2-3 の *LDLR* 遺伝子に *PCSK9* 遺伝子変異の重なる FH 家系については遺伝子 X の変異は認められなかった。

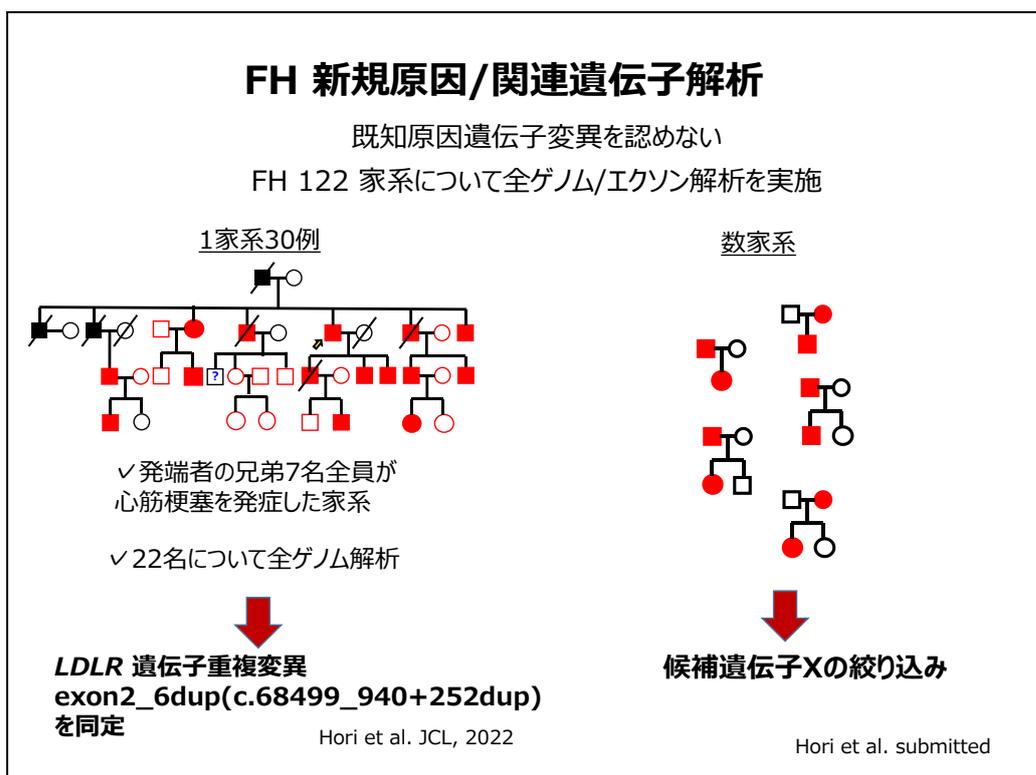


図5 FH 新規原因/関連遺伝子解析

3. おわりに

LDLR 遺伝子変異に PCSK9 遺伝子変異の重なる FH 患者は、LDLR 遺伝子変異のみを有する患者に比較して予後が悪いことが明らかになった。LDLR 遺伝子変異に PCSK9 遺伝子変異の重なる重症 FH 患者を発端者とする 1 家系において、末梢血単核球細胞より iPS 細胞を樹立した。健常人の末梢血から樹立した iPS 細胞が肝細胞に分化誘導可能であったことから、現在、FH 患者の肝細胞分化誘導を行っており、健常人や家系内で LDL 代謝について比較する。しかしながら、肝細胞の分化特性についてはドナーの遺伝的な違いの影響を受ける可能性もあり¹⁰⁾、ゲノム編集による原因遺伝子変異修復についても検討していく。

謝辞

本研究は国立循環器病研究センター研究所病態代謝部及び名古屋大学環境医学研究所内分泌代謝分野(2020年7月より)にて実施されたものです。共同研究者の先生方、研究室の皆様は厚くお礼申し上げます。2020年7月に名古屋大学に異動しましたが、新規の研究室の所属となり、研究室及び培養室の立ち上げから始めることとなりました。本研究助成のご支援を受け、なんとか研究を進めることができました。公益社団法人蓬庵社及び関係者の皆様は心からお礼申し上げます。

参考文献：

- (1) Hori M* (corresponding author), Ohta N, Takahashi A, Masuda H, Isoda R, Yamamoto S, Son C, Ogura M, Hosoda K, Miyamoto Y, Harada-Shiba M*: Impact of LDLR and PCSK9 pathogenic variants in Japanese heterozygous familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis*, 2019;289: 101-108.
- (2) Tada H, Kawashiri MA, Nohara A, Inazu A, Mabuchi H, Yamagishi M: Impact of clinical signs and genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia on the prevalence of coronary artery disease in patients with severe hypercholesterolaemia, *Eur Heart J*, 2017;38:1573-1579.
- (3) Hori M (corresponding author), Takahashi A, Son C, Ogura M, Harada-Shiba M: The first Japanese cases of familial hypercholesterolemia due to a known pathogenic APOB gene variant, c.10580G>A: p.(Arg3527Gln). *J Clin Lipidol*. 2020;14: 482-486.
- (4) Mabuchi H, Nohara A, Noguchi T, Kobayashi J, Kawashiri M, Inoue T, Mori M, Tada H, Nakanishi C, Yagi K, Yamagishi M, Ueda K, Takegoshi T, Miyamoto S, Inazu A, Koizumi J, Hokuriku FH Study Group. Genotypic and phenotypic features in homozygous familial hypercholesterolemia caused by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gain-of-function mutation. *Atherosclerosis*. 2014 Sep;236(1):54-61
- (5) Ohta N*, Hori M* †, Takahashi A, Ogura M, Makino H, Tamanaha T, Fujiyama H, Miyamoto Y, Harada-Shiba M † (*equal contribution, † corresponding author): Proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) V4I variant with LDLR mutations modifies the phenotype of familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*. 2016; 10:547-555.
- (6) Nohara A, Tada H, Ogura M, Okazaki S, Ono K, Shimano H, Daida H, Dobashi K, Hayashi T, Hori M, Matsuki K, Minamino T, Yokoyama S, Harada-Shiba M: Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*. 2021;28:665-678.
- (7) Doi T*, Hori M* (*equal contribution), Harada-Shiba M, Kataoka Y, Onozuka D, Nishimura K, Nishikawa R, Tsuda, K, Ogura M, Son M, Miyamoto Y, Noguchi T, Shimokawa H, Yasuda S: Patients with LDLR and PCSK9 Gene Variants Experienced Higher Incidence of Cardiovascular Outcomes in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *J Am Heart Assoc*, 2021;10: e018263.
- (8) Takayama K, Akita N, Mimura N, Akahira R, Taniguchi Y, Ikeda M, Sakurai F, Ohara O, Morio T, Sekiguchi K, Mizuguchi H: Generation of safe and therapeutically effective human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells for regenerative medicine. *Hepatol Commun*.

2017, 12:1058-1069

(9) Hori M*(corresponding author), Takahashi A*, Hosoda K, Harada-Shiba M: Identification of a novel large duplication (exon2_6dup): copy number variation in the LDLR gene in a large family with familial hypercholesterolemia by whole-genome sequencing. *J Clin Lipidol.*, 2022; 16: 167-172.

(10) Kajiwara M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, Endo H, Eto K, Toguchida J, Uemoto S, Yamanaka S: Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012;109: 12538-12543.

1. はじめに

超少子高齢化が進む日本において、加齢を最大の危険因子とするアルツハイマー病の一刻も早い発症機序に根差した根本的治療法の開発が必要である。アルツハイマー病の代表的な脳の病理学的変化は、細胞外でのアミロイドβタンパク質(Aβ)の蓄積による老人斑の形成、神経細胞内での過剰にリン酸化されたタウタンパクの蓄積による神経原線維変化の出現、さらには神経シナプスの消失や顕著な神経細胞死誘導されて脳が委縮する。個々の病理学的変化が引き起こされる分子メカニズムの解明が進むなか、相互関係、すなわち、どのような順番でそれぞれの病理学的変化が相互作用し合い、神経シナプスの消失や神経細胞死といった認知機能低下に直結する病変に繋がるのかなど、そのカスケードについては未だに不明である。しかしながら、家族性アルツハイマー病患者で見つかった原因遺伝子がAβの産生増加や凝集促進に働くことがわかっている。また、21番染色体のトリソミーが原因で発症するダウン症候群では、その患者はアミロイドβ前駆体タンパク質遺伝子を1.5倍量保有しており、そのほとんどが老人斑を含むアルツハイマー病脳と同じ脳病理を示して認知症状を発症する。このような事実から、Aβの脳内での蓄積がアルツハイマー病病態形成の引き金であるとする「アミロイドカスケード仮説」が提唱され、世界的にも指示されてきた(1)。

ミクログリアは、脳の組織マクローファージであり脳実質における唯一の免疫細胞である。ミクログリアはアルツハイマー病脳内ではAβ蓄積部位(Aβプラーク)に活性化して集積しており、その食食機能により脳内Aβの除去に働く細胞として認識されている。ミクログリアの前駆細胞は胎生期に一過性に生み出され、出生後において脳に生着するミクログリアは自己増殖によりそのポピュレーションを維持する。すなわち、生後における幹細胞からのミクログリアの新たな供給はなく、エピジェネティックな修飾を蓄積させながら年齢とともに脳内で老化していく細胞と考えられる。このミクログリアの老化がAβのクリアランスを低下させる根本的な原因であり、「アミロイドカスケード仮説」の上流に位置する病因である可能性が考えられる。さらに近年では、ダウン症モデルマウス胎生期において、ミクログリアを含む脳マクローファージ数の減少が検出されており、ミクログリアの異常が胎生期から老齢期に至るまで、様々な脳疾患の発症と深く関与することが示唆されている(2)。

これまでに我々は、マウス骨髄幹細胞や末梢血造血幹細胞より新たにミクログリア様細胞を作り出し、アルツハイマー病モデルマウス脳の海馬に移植すると、認知機能が回復することを見出してきた(3,4)。本研究では、その治療メカニズムについてより深く解析した(5)。一方、自己多能性幹細胞の応用方法の一つとして、病態モデル系構築への利用がある。本研究では自己幹細胞として利用可能な細胞の一つとしてヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)に着目し、アルツハイマー病ほか、脳疾患の病態形成機序の解明や細胞治療法の開発にも応用できる*in vitro* 3D脳オルガノイドのような研究リソースの開発に取り組んだ(6,7)。

2. 骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清による初代培養ミクログリアの A β 貪食機能の促進

これまでに我々は、マウス骨髄由来ミクログリア様細胞の移植による認知機能回復メカニズムに関して、移植した骨髄由来ミクログリア様細胞が脳内の A β プラークに集積し、A β を貪食してクリアランスに働くことを見出してきた(3, 4)。しかしながら、骨髄由来ミクログリア様細胞は免疫細胞として様々な液性因子を放出する可能性があり、その液性因子が脳内免疫環境、特に内在性ミクログリアの機能に影響を及ぼすことが予想される。骨髄由来ミクログリア様細胞移植のさらなる治療メカニズムを解析するために、マウス骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清をマウス新生仔脳から初代培養したミクログリアに処置し、初代培養ミクログリアの A β 貪食機能の変化を解析した。その結果、免疫蛍光細胞化学的解析により、初代培養ミクログリア内の A β の免疫反応性の増加傾向がみとめられた (図 1 A)。そこで、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によって、定量的解析を実施した。コントロールとして骨髄由来ミクログリア様細胞を培養するフレッシュな培地を用い、比較群としてヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y 細胞の培養上清を用いた。また、骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清は、最初に播種する骨髄由来ミクログリア様細胞の数を変化 (播種細胞数 $3.0 \times 10^5 - 3.0 \times 10^6$) させて回収した。その結果、コントロール培地と比べ、SH-SY5Y 細胞の培養上清を処置しても初代培養ミクログリアの A β 貪食量に変化はなかった (図 1 B)。一方、骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清を処置すると初代培養ミクログリアの A β 貪食量は有意に増加し、また、その増加は骨髄由来ミクログリア様細胞の最初の播種数に比例した (図 1 B)。骨髄由来ミクログリア様細胞は初代培養ミクログリアの A β を促進する液性因子を産生していることが示唆された。

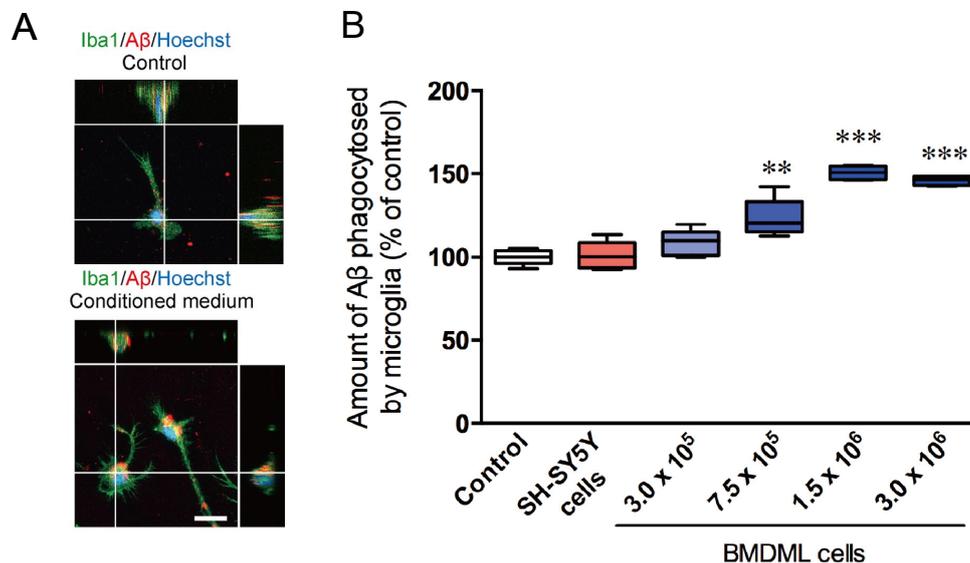


図 1 骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清による初代培養ミクログリアの A β 貪食機能の促進
初代培養マウスミクログリアに A β と同時にヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y 細胞の培養上清やマウス骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清 (播種細胞数 $3.0 \times 10^5 - 3.0 \times 10^6$) を添加して貪食量を免疫蛍光細胞化学的解析 (A) および (B) ELISA により解析した。Iba1: ミクログリアマーカー。Scale bars = 25 μ m. 箱ひげ図は確率を表す。各群 5 検体から 25%、50% (中央値)、75% (箱)、10-90% (ひげ) を算出した。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. コントロール, Bonferroni/Dunn test.

3. 骨髄由来ミクログリア様細胞が分泌する液性因子の同定

BMDM 細胞から分泌される初代培養ミクログリアに作用する液性因子を同定するために、ELISA ベースのサイトカインアレイを実施した。その結果、骨髄由来ミクログリア様細胞から transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) が多量に分泌されていることが分かった (図 2 A)。また、骨髄由来ミクログリア様細胞における TGF- β 1 の mRNA 発現量を qPCR で解析して分化誘導前の骨髄 (BM) 細胞の発現量と比較したところ、骨髄由来ミクログリア様細胞において顕著な発現量の増加が確認できた (図 2 B)。

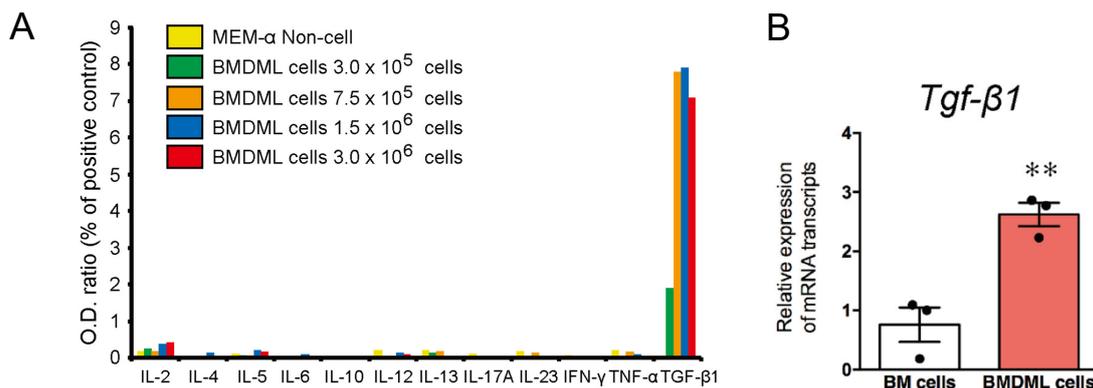


図2 骨髄由来ミクログリア様細胞が分泌するサイトカインの解析

(A) マウス骨髄由来ミクログリア様細胞 (播種細胞数 3.0×10^5 – 3.0×10^6) の培養上清に含まれるサイトカインを ELISA-based cytokine array により解析した。(B) *Tgf- β 1* mRNA 量を qPCR で半定量した。データは、平均値 \pm 標準誤差で表示した。** $P < 0.01$ vs. BM cells, Student's t-test. BM cells: 骨髄細胞, BMDML cells: 骨髄由来ミクログリア様細胞。

4. 骨髄由来ミクログリア様細胞培養上清処置によるミクログリアの TGF- β 1 シグナルと食食機能への影響

骨髄由来ミクログリア様細胞が多量の TGF- β 1 を分泌することがわかったため、初代培養培ミクログリアにおける TGF- β 1 の受容体である TGF- β receptor 1 (TGF- β R1) の発現について解析した。免疫蛍光細胞化学的解析により、初代培養ミクログリアの膜表面や細胞質に TGF- β R1 の免疫反応性が見られた (図 3 A)。そこで、TGF- β R1 の阻害薬である SB525334 を骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清に混合し、初代培養ミクログリアに処置したところ、培養上清処置による A β 食食機能の促進が抑制された (図 3 B)。

TGF- β R1 が TGF- β 1 により刺激されると、細胞内シグナリングとして Smad2/3 タンパク質のリン酸化が亢進することが知られている。そこで、細胞内シグナル伝達について Western blotting にて解析したところ、骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清の処置により Smad2/3 のタンパク質量の変化はなかったが、リン酸化 Smad2/3 の発現量は有意に増加した (図 3 C)。以上より、骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清は、初代培養ミクログリアの TGF- β R1 を刺激して細胞内の Smad2/3 のリン酸化を促進し、その結果、初代培養ミクログリアの A β 食食機能が促進されることが分かった。

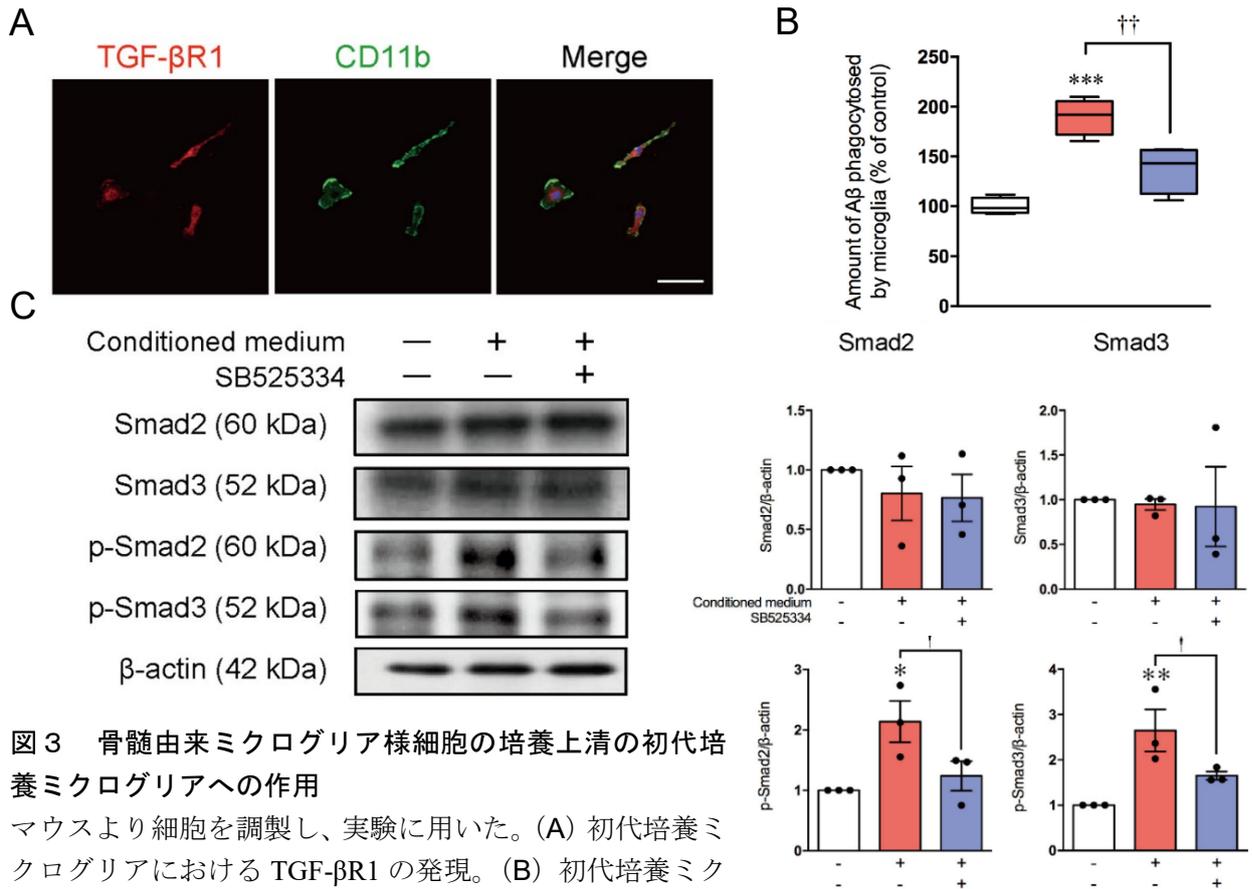


図3 骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清の初代培養ミクログリアへの作用

マウスより細胞を調製し、実験に用いた。(A) 初代培養ミクログリアにおける TGF-βR1 の発現。(B) 初代培養ミクログリアの Aβ 貪食機能の解析。箱ひげ図は確率を表す。

1 群 4 検体から 25%、50% (中央値)、75% (箱)、10-90% (ひげ) を算出した。*** $P < 0.001$ vs. コントロール, †† $P < 0.01$, Bonferroni/Dunn test. SB525334 : TGF-βR1 阻害薬。(C) 初代培養ミクログリアの Smad2/3 ならびにリン酸化 (p-) Smad2/3 タンパク質の発現量を Western blotting により解析した。データは、平均値±標準誤差で表示した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs. control, † $P < 0.05$, Fisher's PLSD. BM cells : 骨髄細胞, BMDML cells : 骨髄由来ミクログリア様細胞。

5. リコンビナント TGF-β1 を用いた初代培養ミクログリアの細胞応答性の検証

上記の結果にの検証のため、リコンビナント TGF-β1 を用いて初代培養ミクログリアの細胞内シグナルの活性化と Aβ 貪食機能について解析した。リコンビナント TGF-β1 をミクログリアに処置すると、濃度依存的に初代培養ミクログリアの Aβ 貪食機能が促進されることが ELISA の解析から明らかとなった (図 4 A)。また、TGF-βR1 の阻害薬である SB525334 をリコンビナント TGF-β1 とともに処置すると、リコンビナント TGF-β1 処置による Aβ 貪食機能の促進が抑制された (図 4 B)。Western blotting の解析から、リコンビナント TGF-β1 処置により Smad2/3 のタンパク質の発現量は変化しなかったが、リン酸化 Smad2/3 の発現量は有意に増加した (図 4 C)。以上より、骨髄由来ミクログリア様細胞の培養上清の処置による初代培養ミクログリアの Aβ 貪食機能の促進の一部は、骨髄由来ミクログリア様細胞から分泌される TGF-β1 によりもたらされることが確認できた。

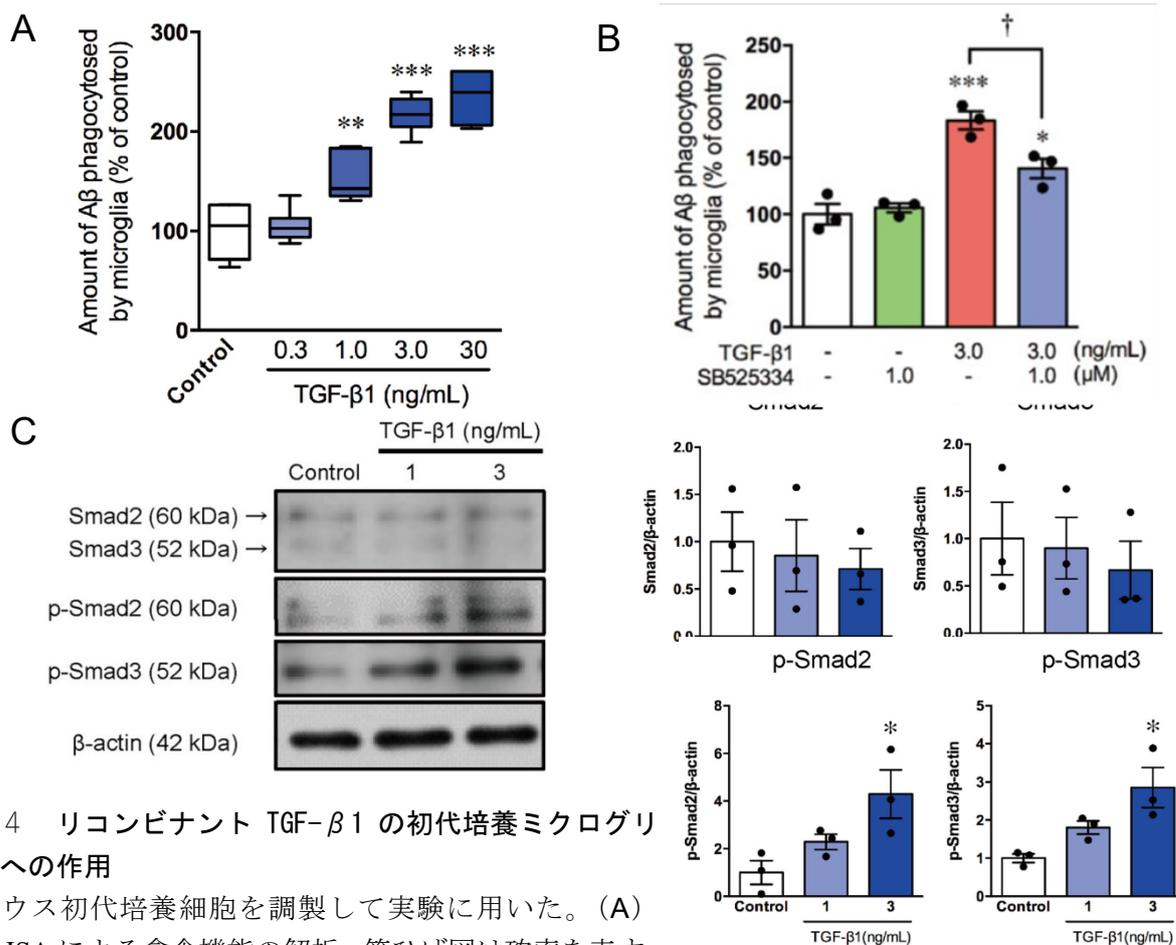


図4 リコンビナント TGF-β1 の初代培養ミクログリアへの作用

マウス初代培養細胞を調製して実験に用いた。(A) ELISA による貪食機能の解析。箱ひげ図は確率を表す。

各群 6 検体から 25%、50% (中央値)、75% (箱)、10-90% (ひげ) を算出した。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. コントロール, Bonferroni/Dunn test. (B) 画像解析による Aβ 貪食機能の解析。平均値±標準誤差で表示した。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. コントロール, † $P < 0.05$, Bonferroni/Dunn test. SB525334: TGF-βR1 阻害薬。(C) Smad2/3 ならびにリン酸化 (p-) Smad2/3 タンパク質の発現量を Western blotting により解析した。平均値±標準誤差で表示した。* $P < 0.05$ vs. control, Bonferroni/Dunn test.

6. アルツハイマー病モデルマウスへの骨髄由来ミクログリア様細胞移植による TGF-β1 シグナルの関与

SB525334 の存在または非存在下にアルツハイマー病モデルマウスの海馬内に骨髄由来ミクログリア様細胞を移植し、脳内の TGF-β1 量を ELISA で測定した結果、骨髄由来ミクログリア様細胞を移植により脳海馬での TGF-β1 量が有意に増加した (図 5 A)。この増加は TGF-βR1 の阻害剤である SB525334 の影響を受けなかった。一方、内在性の脳ミクログリアの TGF-βR1 発現について、免疫蛍光組織学的解析を実施したところ、内在性の脳ミクログリアは TGF-βR1 を発現しており、また、骨髄由来ミクログリア様細胞の脳内移植によりその発現が有意に増加した (図 5 B)。また、この発現上昇は TGF-βR1 の阻害剤である SB525334 の存在下で抑制されることがわかった。このように、骨髄由来ミクログリア様細胞から分泌される TGF-β1 は、パラクラインに作用して内在性ミクログリアの TGF-βR1 発現を促進させるが TGF-β1 の分泌には影響しなかった。脳内の Aβ 量をステレオロジーで解析したところ、骨髄由来ミクログリア様細胞の脳内移植により脳内の

A β 貪食量は有意に減少したが、TGF- β R1 阻害剤の存在下ではその減少が抑制された (図 5 C)。以上より、脳内に移植した骨髄由来ミクログリア様細胞は、みずから A β を貪食するのみならず、TGF- β 1 を分泌して内在性のミクログリアの貪食促進によっても脳内の A β のクリアランスに貢献すること示唆された。

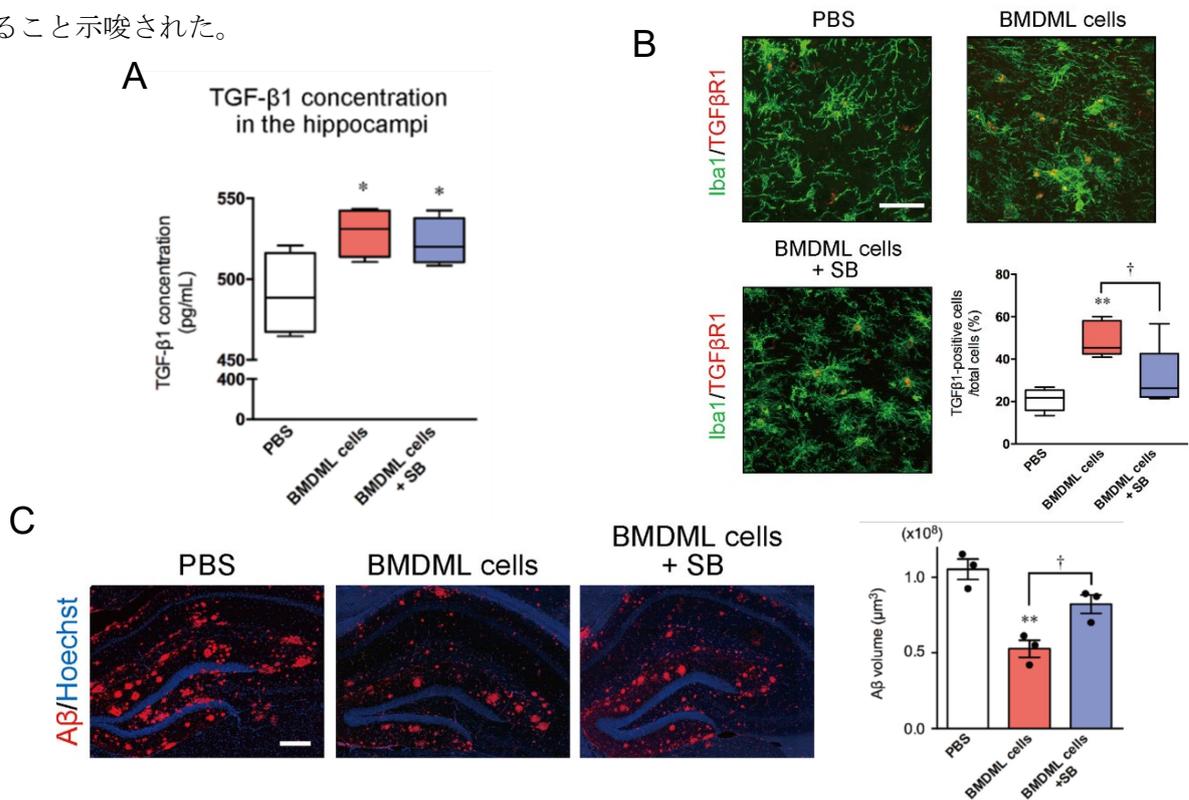


図 5 アルツハイマー病モデルマウス海馬への骨髄由来ミクログリア様細胞の移植

(A) 海馬内 TGF- β 1 量の ELISA による解析。箱ひげ図は確率を表す。各群 4 検体から 25%、50% (中央値)、75% (箱)、10-90% (ひげ) を算出した。* P <0.05 vs. PBS injection, Fisher's PLSD. (B) 内在性ミクログリアにおける TGF- β R1 の発現。Iba1: ミクログリアマーカー, Scale bar = 10 μm . 画像解析により半定量した。箱ひげ図は確率を表す: 1 群 3 検体から 25%、50% (中央値)、75% 百分位 (箱) および 10-90% (ひげ) を算出した。** P <0.01 vs. PBS injection. † P <0.05, Bonferroni/Dunn test. (C) 脳内 A β 量のステレオロジー解析。Scale bar = 200 μm . 平均値 \pm 標準誤差で表示した。** P <0.01 vs. PBS injection, † P <0.05, Bonferroni/Dunn test. BMDML cells: 骨髄由来ミクログリア様細胞。SB (S25334): TGF- β R1 阻害薬。

7. 脳疾患の病態解明や治療法開発に向けた *in vitro* 脳モデルの開発

自己を含む多能性幹細胞の応用方法の一つとして、モデル系構築への応用がある。本研究では自己幹細胞として利用可能な細胞の一つとして、hiPSC に着目し、アルツハイマー病ほか、脳疾患の病態形成機序の解明や細胞治療法の開発にも応用できる *in vitro* 3D 脳オルガノイドなどのリソースの開発にも取り組んだ。

7-1. hiPSC からの線条体ニューロスフィアの作製

線条体は随意運動の調節に関与し、線条体神経の大部分は γ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性の中棘神経細胞 (MSN) であり、脳発生において外側基底核原基 (LGE) から生み出される。脳疾

患との関りとしては、ハンチントン病では MSN の脱落が、パーキンソン病では線条体へのドパミン神経入力の喪失が病態の特徴であり、アルツハイマー病においても線条体神経の顕著な脱落が知られている(7)。このように、様々なヒト脳疾患に深く関わる線条体を簡便に解析可能な *in vitro* モデルの有用性は高い。本研究では、低分子化合物を用いて hiPSC から MSN を含む線条体ニューロスフィアを生成するための簡便かつ安定なプロトコルの作製に取り組んだ。Purmorphamine による SHH シグナル活性化、XAV939 による WNT 阻害、LDN193189 と A83-01 によるデュアル SMAD 阻害といったシグナル制御を三次元培養に適用したところ、明確な LGE 由来の細胞層構造（脳室帯や脳室下帯）や、DARPP32 陽性の MSN 神経を含む線条体ニューロスフィアの作製に成功した(6)（図 7）。

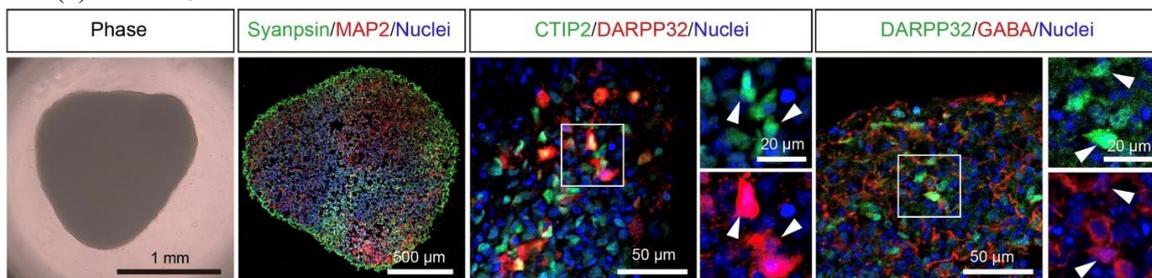


図 7 ヒト人工多能性幹細胞からの線条体ニューロスフィアの作製

Synapsin: 神経シナプスマーカー, MAP2: 樹状突起マーカー, CTIP2: 大脳神経マーカー, DARPP32: 線条体中棘神経細胞マーカー, GABA: γ -アミノ酪酸, Nuclei (核) は Hoechst33342 で蛍光染色した。

7-2. hiPSC からのダイレクトコンバージョンによるドパミン神経の作製

パーキンソン病患者への hiPSC 由来ドパミン神経移植の臨床試験が開始されている。多能性幹細胞からドパミン神経を誘導するには長期間（60 日<）を要する。本研究では、ASCL1 および LMX1A 遺伝子を導入し、hiPSC から直接ドパミン神経へ変換が可能な誘導性 hiPSC 株を作製し、迅速な分化誘導法の開発に取り組んだ。ドキシサイクリン処置による ASCL1 と LMX1A の過剰発現誘導により、hiPSC は誘導 28 日目までにドパミン神経細胞のマーカーであるチロシン水酸化酵素（TH）や FOXA2、EN1 などの中脳マーカーさらにはシナプスマーカー Synapsin の発現を示し、多電極アレイ（MEA）で記録される電気生理学的特徴を示した。このように、簡便かつ迅速に hiPSC からドパミン神経を作製する方法の開発に成功した(7)（図 8）。

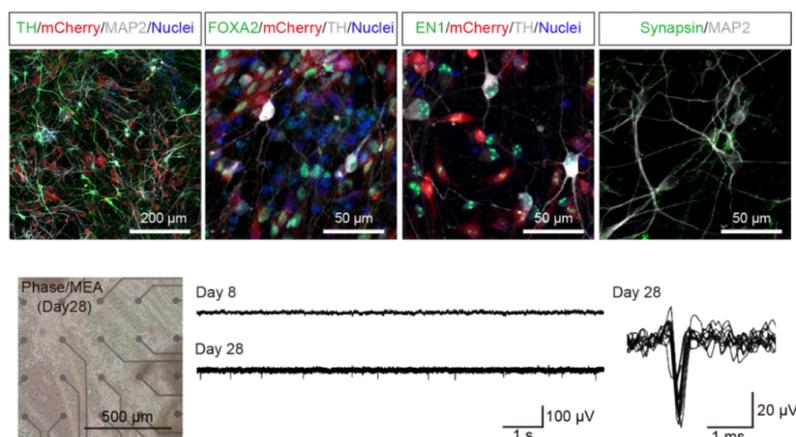


図8 hiPSCからのダイレクトリプログラミングによるドパミン神経の作製

ドキシサイクリン処置による ASCL1 と LMX1A の過剰発現 hiPSC 株を樹立し、ドパミン神経への分化誘導を解析した。TH: チロシン水酸化酵素 (ドパミン神経マーカー), MAP2: 樹状突起マーカー, FOXA2 および EN1: 中脳腹側マーカー, Synapsin: 神経シナプスマーカー, mCherry: ASCL1 および LMX1A 遺伝子導入 hiPSC 細胞株マーカー, Nuclei (核) は Hoechst33342 で蛍光染色した。MEA: 多電極アレイ。

7-3. hiPSCからのミクログリアを含む大脳皮質脳オルガノイドの作製

多能性幹細胞から外胚葉系への分化誘導法を三次元培養に適用し、脳オルガノイドを作製する技術が開発されている(9)が、本法のみでは内胚葉由来のミクログリアを含有する脳オルガノイドを作製することはできない。本研究では、これまでに開発されている分化誘導法(10)を用いて hiPSC 由来ミクログリア前駆細胞 (hiMacs) を作製し、それを添加することで脳免疫環境を再現できる脳オルガノイドの作製に取り組んだ。三次元大脳皮質神経細胞オルガノイドの作製は SFEBq 法(11)を用いた。作製したオルガノイドは分化誘導から 33 日目までに、*in vivo* での大脳皮質発生初期に見られる PAX6、TBR1 や CTIP2 などのマーカーで形成される層構造を形成しており、また、60 日前後において神経シナプスに発現する SYNAPSIN や大脳皮質神経に発現する VGLUT などの機能性タンパク質を発現した (図 9 A)。大脳皮質神経オルガノイドに hiMacs を加えて 1 週間培養したところ、大脳皮質神経オルガノイド内に hiMacs が侵入して生着した (図 9 B)。次にアルツハイマー病脳病態を再現するために Aβ を処置したところ、オルガノイド表面への接着のみならず、内部で Aβ プラークの形成が見られた (図 9 C)。また、hiMacs 非存在下において、Aβ 処置により、オルガノイド内の神経マーカー (MAP2) の免疫反応性は低下し (図 9 D)、WST-8 assay により神経細胞生存率の有意な減少が確認できた (図 9 E)。一方、hiMacs を添加すると、脳オルガノイド内部の hiMacs が Aβ を貪食し、添加した hiMacs 細胞数依存的に神経細胞生存率が回復した (図 9 E)。大脳皮質オルガノイドの Aβ 神経細胞障害を hiMacs が抑制することが示唆された。このように、脳免疫環境を再現できるミクログリアを含有する簡便な脳オルガノイドモデルの作製にも成功した (投稿準備中)。

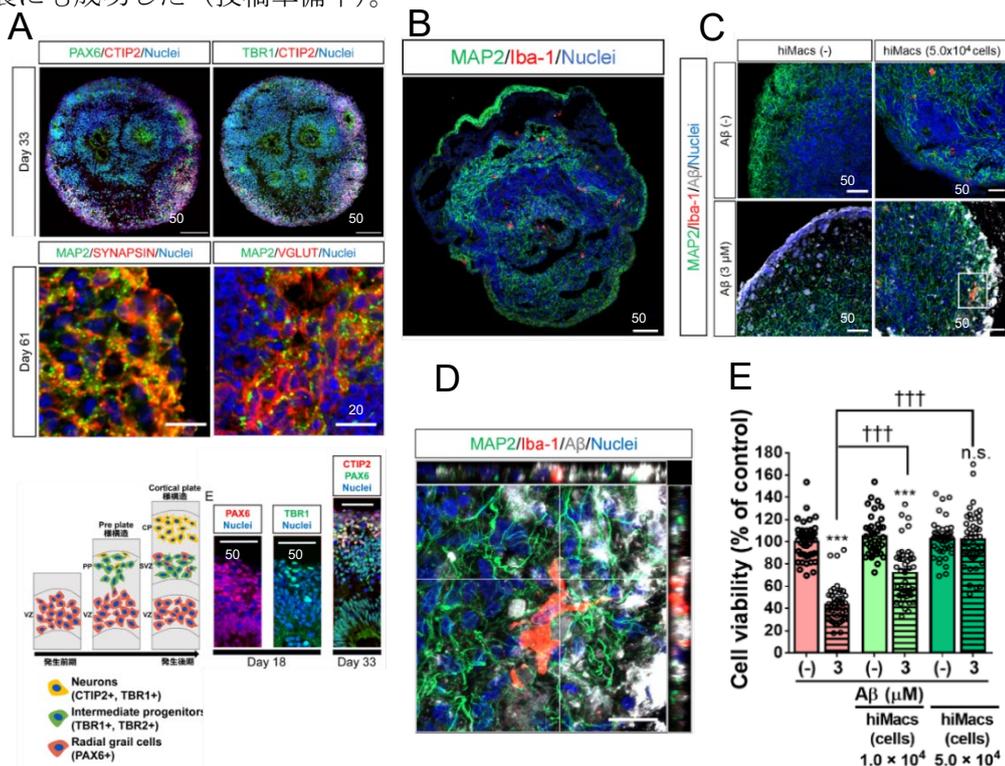


図9 hiPSCからのミクログリアを含む大脳皮質脳オルガノイドの作製

大脳皮質脳オルガノイドを作製し (A)、別途作製した hiMacs を添加して共培した (B)。A β を処置してアルツハイマー病病態を再現した (C, D)。PAX6, TRB1, CTIP2, VGLUT : 大脳皮質神経細胞マーカー, MAP2 : 樹状突起マーカー, Synapsin: 神経シナプスマーカー, Iba-1 : ミクログリアマーカー, Nuclei (核) は Hoechst33342 で蛍光染色した。(E) 神経細胞の細胞生存率を WST-8 assay で解析した。1 群 45 検体のデータを平均値±標準誤差で示した。*** $P < 0.001$ vs. A β (-), ††† $P < 0.001$, ns: not significant, Bonferroni/Dunn test.

8. おわりに

本研究において、自己幹細胞からも作製できる骨髄由来ミクログリア様細胞をアルツハイマー病病態の脳に移植すると、骨髄由来ミクログリア様細胞による A β 貪食機能のみならず、骨髄由来ミクログリア様細胞は TGF- β 1 を多量に分泌し、内在性ミクログリアの A β 貪食機能をも促進して脳内 A β クリアランスに働くことが示唆された。このことから細胞性医薬品として骨髄由来ミクログリア様細胞を想定した場合、TGF- β 1 のパラクライン作用を介した周囲の脳細胞への影響を踏まえた治療効果が得られる可能性が示唆された(5)。また、脳疾患の病態解明や細胞性治療薬の開発を含む治療法の開発にも貢献できる脳オルガノイドをはじめとする研究リソースの開発にも成功した(6, 7)。上記研究成果を含め、本研究の一部としてアルツハイマー病の治療ターゲットとしてのミクログリアの多様性やイメージングについて、さらには幹細胞を用いた神経疾患に対するより有益な再生医療について総説にまとめた(12-14)。また、ダウン症モデルマウスにおける胎生期のミクログリア数の減少という異変に対しても、治療に向けたミクログリアの細胞移植という新しいアプローチが考えられ、現在研究を進めている。再生医療や細胞性医薬品の開発は今後ますます加速することが予想される。我々の研究成果がその一助となることが期待される。

謝辞

本研究の成果は、札幌医科大学 下濱 俊教授、滋賀医科大学 遠山育夫教授、柳沢大治郎准教授、京都薬科大学 西村周泰助教 (現同志社大学准教授)、芦原英司教授、木村寛之准教授、統合薬科学系の学生諸子、立命館大学 北村佳久教授、Singapore Immunology Network (SIgN), Agency for Science, Technology and Research (A*STAR) の Florent Ginhoux 主任研究員ほかとの共同研究により得られたものであり、ここに深く感謝いたします。最後に、研究室の立ち上げにおいて研究資金が必要な中、本研究に対して多大な助成をいただいた公益社団法人蓬庵社武田禮二理事長をはじめ、関係者各位に心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 2016;8(6):595-608.
2. Ishihara K, Shimizu R, Takata K, Kawashita E, Amano K, Shimohata A, et al. Perturbation of the immune cells and prenatal neurogenesis by the triplication of the *Erg* gene in mouse models of Down syndrome. *Brain Pathol.* 2020;30(1):75-91.
3. Kawanishi S, Takata K, Itezono S, Nagayama H, Konoya S, Chisaki Y, et al. Bone-Marrow-Derived Microglia-Like Cells Ameliorate Brain Amyloid Pathology and Cognitive Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;64(2):563-85.
4. Kuroda E, Takata K, Nishimura K, Oka H, Sueyoshi M, Aitani M, et al. Peripheral Blood-Derived Microglia-Like Cells Decrease Amyloid-beta Burden and Ameliorate Cognitive Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2020;73(1):413-29.
5. Kuroda E, Nishimura K, Kawanishi S, Sueyoshi M, Ueno F, Toji Y, et al. Mouse Bone Marrow-derived Microglia-like Cells Secrete Transforming Growth Factor-beta1 and Promote Microglial Abeta Phagocytosis and Reduction of Brain Abeta. *Neuroscience.* 2020;438:217-28.
6. Amimoto N, Nishimura K, Shimohama S, Takata K. Generation of striatal neurons from human induced pluripotent stem cells by controlling extrinsic signals with small molecules. *Stem Cell Research.* 2021;55:102486.
7. Nishimura K, Nitta T, Doi K, Takata K. Rapid Conversion of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Dopaminergic Neurons by Inducible Expression of Two Transcription Factors, *Stem Cells Dev.* in press.
8. Oyanagi K, Takahashi H, Wakabayashi K, Ikuta F. Selective involvement of large neurons in the neostriatum of Alzheimer's disease and senile dementia: a morphometric investigation. *Brain Res.* 1987;411(2):205-11.
9. Lancaster MA, Renner M, Martin C-A, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013;501(7467):373-9.
10. Takata K, Kozaki T, Lee CZW, Thion MS, Otsuka M, Lim S, et al. Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modeling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function. *Immunity.* 2017;47(1):183-98 e6.
11. Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, et al. Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell.* 2008;3(5):519-32.
12. Takata K, Kimura H, Yanagisawa D, Harada K, Nishimura K, Kitamura Y, et al. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Microglia as Therapeutic and Imaging Targets in Alzheimer's Disease. *Molecules.* 2022;27(9).
13. Takata K, Ginhoux F, Shimohama S. Roles of microglia in Alzheimer's disease and impact of new findings on microglial heterogeneity as a target for therapeutic intervention. *Biochem Pharmacol.* 2021;192:114754.
14. Nishimura K, Takata K. Combination of Drugs and Cell Transplantation: More Beneficial Stem Cell-Based Regenerative Therapies Targeting Neurological Disorders. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16).

中枢疾患創薬を加速する全脳細胞解析による不安障害の標的分子の探索

大阪大学 大学院薬学研究科

笠井 淳司

公益財団法人 篷庵社

Hoansha Foundation

大阪市中央区道修町3丁目1番8号

電話：06-6231-9180