

分化・増殖・情報伝達に關与する因子並びに分子の安全性・生体影響評価に 關する研究 (平成21～23年度)

Evaluation of safety and functional effect of factors or molecules which are concerning development, differentiation and signal transduction

世話人 栗原正明

I. 事業目的

生命科学の急速な進歩により、分化や増殖といった生命の根幹に關わる問題が解明されつつある。一方で、国民の健康や安全・安心な社会に対する希望は強く、がんに対する画期的新薬、生活習慣病（メタボリックシンドローム）の克服や再生医療に關する医薬品開発が期待されているところである。そのためには最新の科学の進歩の成果を一般市民の生活に還元する必要がある。分化・増殖のプロセスで機能する情報伝達系に作用する新たな分子の開発や、情報伝達系の分子メカニズムの解明が一層求められているところである。一方、現代工業社会は実に多様な化合物を生み出しており、これらの化合物の中には、予期せず分化・増殖のプロセスに作用しヒトに影響を与える危険がある物質も存在しうる。一旦この種の化学物質が環境に放出されると、健康影響を被る対象は極めて多数に及ぶ。化学物質の事前の安全性評価が極めて大切である。本研究においては、分化・増殖やその情報伝達プロセスに關与する因子及び分子に着目し、その機能を検討することにより、発生・増殖のメカニズムを解明するとともに、新規開発される医薬品の評価、あるいは化学物質の安全性の確立に資することを目的とする。

II. 事業概要

分化・増殖のプロセスで作用する分子あるいはそれらのプロセスに關与する情報伝達系に作用する因子及び分子（医薬品・医薬品候補化合物・化学物質）の作用メカニズムを解析する。同時に生体・細胞側の標的の特性を解析することにより、分化・増殖に機能する医薬品・化学物質の評価手法を開発する。事業は所内10部（遺伝子細胞医薬部、生活衛生化学部、代謝生化学部、病理部、薬理部、有機化学部、機能生化学部、変異遺伝部、医療機器部、総合評価研究室）が分担して遂行した。

なお、動物実験は動物実験指針等を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切の不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたイン

フォームドコンセントのもとに採取された試料を使用するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適切な倫理委員会等による審査・承認を得た上で研究を実施した。

III. 分担研究

(1) 白血球細胞の分化・増殖に係る分子の研究

遺伝子細胞医薬部 押澤 正, 鈴木和博

1-1 研究要旨：カルシウム結合タンパク質S100A8が、前骨髄性白血病細胞株HL-60の増殖抑制に關与することを明らかにした。

1-2 研究目的：HL-60を好中球様細胞へ分化誘導する系を用いて、HL-60細胞の分化・増殖に關与するタンパク質を探索する。

1-3 研究方法：HL-60細胞にDMSOを添加して好中球様細胞へ分化誘導し、添加2日目に抗体標識磁気ビーズを用いてトランスフェリン受容体 (Tfr-R) 陽性 (増殖型)、陰性細胞 (分化型) を分離し、発現タンパク質を二次元電気泳動法で解析した。

1-4 研究成果：11kのタンパク質は、Tfr-R陰性細胞で陽性細胞よりも強く発現していて、分化誘導後2日以降発現量が急激に増えていた。この11kタンパク質は、質量分析等を用いて分析した結果、カルシウム結合タンパク質S100A8であることが明らかになった。HL-60細胞の分化・増殖能に対するS100A8の寄与を調べるため、siRNAによるS100A8の発現抑制を行ったところ、発現抑制されたHL-60細胞では、その細胞増殖が促進され、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) インヒビター p21^{Cip1}の発現が低下していた。Tfr-R陽性、陰性細胞の比較でも、増殖型でS100A8発現量の少ないTfr-R陽性細胞では、Tfr-R陰性細胞と比較してp21^{Cip1}の発現量が少なかった。

また、HL-60とその亜株でHL-60よりも高い増殖性を示すHL-60RGとで発現タンパク質を二次元電気泳動法により分離して比較解析を行ったところ、カルシウム結合タンパク質S100A8は、増殖性の低い株で発現が高くなっていた。

1-5 考察：分化誘導に伴って発現が増えるカルシウム結合タンパク質S100A8は、CDKインヒビター p21^{Cip1}の発現を介してHL-60細胞の増殖抑制に關与していることが

示唆された。

(2) 発痛に関する神経細胞イオンチャネルに対する環境化学物質の影響

生活衛生化学部 神野透人, 香川(田中)聡子,
西村哲治, 大河原 晋

2-1 研究要旨: 神経細胞に発現する侵害受容イオンチャネルTransient Receptor Potential (TRP) チャネルを標的として疼痛や神経原性炎症を惹起する室内環境化学物質を明らかにする目的で, TRPV1及びTRPA1安定発現細胞株を用いてHigh-throughputスクリーニングを実施した。

2-2 研究目的: 室内環境中の化学物質が病因あるいは増悪因子となる疾病として, シックハウス症候群, 化学物質過敏症, 喘息, 慢性閉塞性肺疾患などが知られている。それらの発症機序は十分に解明されているわけではないが, 末梢神経の侵害受容イオンチャネルTRPV1やTRPA1を介する気道刺激が重要な役割を担うことが明らかにされつつある。そこで, 本研究ではTRPチャネルを活性化する室内環境化学物質のスクリーニングを実施し, 化学構造との関連性について考察を行った。

2-3 研究方法: ヒト後根神経節cDNAからクローニングしたTRPV1またはTRPA1を安定的に発現するFlp-in 293細胞株(それぞれHEK293/TRPV1, HEK293/TRPA1)を樹立した。リガンド刺激による細胞内Ca²⁺濃度の増加を指標としてTRPチャネルの活性化を評価した。Ca²⁺濃度の測定にはFLIPR Calcium 4 Assay Kitを用い, 蛍光強度の経時変化をFlexStationで記録した。

2-4 研究成果: 室内環境においてもアロマセラピーなどの目的で利用されることの多い精油に着目し, 31種のケモタイプ精油によるTRPV1チャネルの活性化について検討を行った。その結果, Thyme Geraniol, Tolu Balsam, Palmarosa及びRoseの4種の精油でTRPV1活性化が認められ, EC50値で比較するとRose ($1 \times 10^{-3}\%$) < Palmarosa ($2 \times 10^{-3}\%$) < Thyme Geraniol ($3 \times 10^{-3}\%$) < Tolu Balsam ($5 \times 10^{-3}\%$) の順であった。これらの精油の主要な構成成分では, Citronellol及びGeraniol, 次いで程度は弱いもののBenzyl cinnamateにもTRPV1活性化能が認められた。

次に, 日本産の植物を起原とするいわゆる和精油13種についてTRPA1活性化能を評価した結果, 薄荷精油の活性化能が最も高く (EC50, $6 \times 10^{-4}\%$), ヒバ, ヒノキ, 紫蘇, 杉(木部)及び柚子(压榨法)由来の和精油にも濃度依存的なTRPA1イオンチャネルの活性化がみられた。水道水中の消毒副生成物, 特に揮発性の高い化合物は室内空気中でも頻りに検出されることから, 主要な消毒副生成物についてTRPチャネル活性化能を検討した。

BromoformなどによるTRPV1活性化は高い濃度範囲 (> 100 μM) のみで観察されたのに対し, 1,3-Dichloro-2-

propanoneなどのハロケトン類は比較的低濃度でもTRPA1を活性化することが明らかとなった (EC50 10-20 μM)。

2-5 考察: 本研究により室内空気中からも検出されるテルペン類や消毒副生成物など, 多様な化学物質が侵害受容イオンチャネルを活性化することが明らかとなった。TRPA1はCysteine残基が共有結合修飾されることによっても活性化することが報告されており, SH基との高い反応性が予想されるハロケトン類の場合も同様な活性化機構によるものであると考えられる。今後, TRPチャネルという作用点を共有する一群の化学物質の複合的な影響を明らかにすることによって, 室内環境に起因する様々な疾病においてTRPチャネルが関与する可能性を明確にできるものと考えられる。

(3) 発生・増殖・情報伝達に関する因子並びに分子の安全性・生体影響評価に関する研究

代謝生化学部 安達玲子, 中村 厚, 手島玲子

3-1 研究要旨: 食品素材の1種であるプロポリスの成分が, 骨芽細胞分化促進・破骨細胞分化阻害作用を有することを明らかにし, プロポリスが骨粗鬆症に対する予防・治療効果を有する可能性を示した。

3-2 研究目的: 骨においてはその強度と形態を保つため, 常に骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が起きており, このバランスが崩れ骨吸収過多になった場合は骨粗鬆症等の疾患につながる。本研究ではプロポリス(ミツバチが植物の新芽等から滲出物を集め自身のロウを加えて固形化したもの)を取り上げ, *in vitro*における骨芽細胞及び破骨細胞に対する効果について検討した。

3-3 研究方法: プロポリス5種の水抽出物, エタノール抽出物, 及び10種類のプロポリス含有成分精製品を検討対象とした。マウス由来骨芽細胞様細胞株であるMC3T3-E1細胞の骨芽細胞への分化誘導系, 及びマウス由来マクロファージ様細胞株であるRAW264.7細胞の破骨細胞への分化誘導系に上記のプロポリス検体を共存させ, 細胞分化に対する影響を検討した。

3-4 研究成果: プロポリスのエタノール抽出物, 及び精製成分2種が骨芽細胞分化促進作用を有することを示した。この時, 骨芽細胞分化に重要なBMPシグナル経路だけでなく, 発生時に重要な役割を果たすことが知られているWntシグナル経路の因子の発現も変化するという興味深い結果が得られた。一方, エタノール抽出物, 水抽出物, 及び4種の精製成分が破骨細胞分化抑制作用を有することを示した。

3-5 考察: 本研究では食品素材の1種であるプロポリスに着目し, プロポリス成分が骨代謝系に対して骨芽細胞

分化促進・破骨細胞分化阻害作用を有することを明らかにした。この結果から、プロポリスが骨粗鬆症に対する予防・治療効果を有する可能性が示唆された。

(4) 臭素化難燃剤decabromodiphenyl etherのラット乳幼児期投与による甲状腺発がん感受性の検討

病理部 小川久美子, 曹 永晩, 高見成昭¹⁾
 安全性生物試験研究センター長 西川秋佳¹⁾
 21年度まで, 現(財)食品農医薬品安全性
 評価センター

4-1 研究要旨: *N*-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) 誘発ラット甲状腺発がんにおける臭素化難燃剤である decabromodiphenyl ether (DBDE) の乳幼児期暴露の影響を検討した結果, 雌のDBDE 100 ppm以上混餌投与群において甲状腺濾胞腺癌の発生頻度が有意に減少した。本実験条件下における甲状腺発がん感受性低下の機序には, 複数の甲状腺関連ホルモンおよび肝薬物代謝酵素の変動が複雑に関与しており, 生体での制御機構についてさらなる理解が必要と考えられた。

4-2 研究目的: ラットへの30日間反復投与による甲状腺濾胞上皮過形成と, マウス甲状腺での発がん性が報告されているDBDEの乳幼児期暴露によるラットDHPN誘発甲状腺発がんに対する影響を検討した。

4-3 研究方法: 妊娠F344ラットが仔ラットを出産した直後から, DBDEの0, 10, 100, 2500または25000 ppm混餌食を自由摂取させ, 3週での離乳までは経ミルク的に, さらに離乳後2週間は仔の直接の摂餌によって摂取させ, 1週間の休薬後, DHPNの飲料水投与と, 雌にはさらに乳腺を標的臓器とした7,12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) の強制経口投与を行い, 雄は40週目, 雌は46週目にて屠殺剖検し, 甲状腺を中心に検索した。また, 同様に妊娠F344ラットが仔ラットを出産した直後から3週での離乳を経て6週目まで25000 ppmのDBDEを混餌投与し, 6週後とさらに1週間の休薬後に屠殺剖検し, 血清中のホルモン濃度や肝臓の各種薬物代謝酵素のmRNA発現をreal-time RT-PCRで検討した。

4-4 研究成果: 甲状腺の濾胞腺癌の発生率は雄では減少傾向を, 雌では100 ppm以上の群で有意な減少を示した。また, 薬物代謝酵素のmRNAについては, CYP1A1/2, CYP1B1およびUGT2B1は雌雄ともDBDE投与直後のみならず休薬1週後も有意な発現増加を示し, CYP2B1/2およびCYP3A1/2は雌雄ともDBDE投与直後は有意な発現増加がみられたが, 休薬1週間には雄ではほぼコントロールレベルに戻り, 雌ではDBDE非投与対照群に比べ有意な増加が残ったものの, 休薬前からの減少はCYP1A1/2, CYP1B1およびUGT2B1に比べ高度であった。

4-5 考察: 難燃剤の成分であるDBDEは, ラットの甲状腺腫大を誘発することが知られているが, 乳幼児期暴露モデルにおいてDHPNによるラット甲状腺発がんは促進しなかった。その機序として, DBDEにより, 肝臓からのUGT2B誘導によるT3の排泄促進とそれに続くT4からT3への変換促進を一因として血清TSHの増加が起こったものの, 肝臓ではCYP2B/3Aが第I相酵素としてDHPNの活性化を促す一方で, 休薬後も発現が高く残るUGT2BはDHPNの抱合および排泄の促進にも作用した結果, 総合的には甲状腺癌発生が抑制されたと考えられた。

(5) 間葉系幹細胞の脂肪分化を規定する因子の解明

薬理部 諫田泰成

5-1 研究要旨: ラット骨髄由来間葉系幹細胞を用いて活性酸素関連化合物の影響を検討した結果, 抗酸化剤である*N*-アセチルシステイン (NAC) が脂肪分化を抑制することを見出した。NACはヒト間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化も抑制したことから, 脂肪分化の過程に活性酸素が関与していることを明らかにした。

5-2 研究目的: 脂肪分化に細胞内活性酸素を介する伝達経路が関与するという仮説をラット及びヒトの間葉系幹細胞を用いて検証する。

5-3 研究方法: ラット大腿骨から間葉系幹細胞を単離培養し, 脂肪分化に対する活性酸素関連化合物の影響を検討した。脂肪分化はオイルレッド染色により解析した。活性酸素の産生は, 蛍光プローブH₂DCFにより解析した。また, ヒト間葉系幹細胞においてもラットと同様の情報伝達経路が関与するのかが検討した。

5-4 研究成果: ラット骨髄由来間葉系幹細胞の脂肪分化は, 抗酸化剤NACの処理によりほぼ完全に抑制された。脂肪分化に伴ってH₂DCFの蛍光強度の増加が認められNAC処理により抑制されたことから, 分化に伴い細胞内に活性酸素が産生されることを確認した。次に, NACの作用を確認するために, 活性酸素分解酵素であるペルオキシレドキシニンIIの影響を検討した。ラット間葉系幹細胞にペルオキシレドキシニンIIを過剰発現させたところ, 脂肪分化は抑制されたが, 細胞増殖には影響を与えなかった。さらに, NACはヒト間葉系幹細胞の脂肪分化に対しても抑制作用を示した。

5-5 考察: 間葉系幹細胞において, 分化誘導に伴って産生される活性酸素が脂肪分化を制御していることが示唆された。また, 活性酸素は分化に関与するが増殖には関係しなかったことから, 活性酸素は増殖・分化のスイッチの機能を果たしている可能性が考えられる。以上の結果から, 活性酸素は新たな肥満治療薬の標的分子となりうると思われる。

6) 細胞の分化に関わる核内受容体リガンドの創製

有機化学部 栗原正明

6-1 研究要旨：活性型ビタミンD₃は、ビタミンD受容体（VDR）と特異的に結合し標的遺伝子群を転写レベルで制御しており、その生理活性は、細胞の分化誘導作用をはじめカルシウム調節、免疫調節作用など多岐にわたる。よってビタミンD₃誘導体などのセコステロイド型VDRリガンドは、抗ガン剤、骨粗鬆症、免疫調節薬などの医薬品開発のターゲット分子となっている。セコステロイド骨格を持たないノンセコステロイド型の新規なリガンドYR335の開発に成功した。YR335は活性型ビタミンD₃と同程度の強力な転写活性を有していた。また、ratVDRリガンド結合ドメイン（VDR-LBD）との共結晶X線構造解析に成功し、リガンドと受容体の結合様式を明らかにした。

6-2 研究目的：セコステロイド骨格を持たないノンセコステロイド型の新規なリガンドを創製することを目的とした。

6-3 研究方法：VDRの6つのアミノ酸残基と水素結合を形成するように、コンピュータシミュレーションを用いてリガンドの分子設計を行った。デザインした数種のリガンドを合成し、活性型ビタミンD₃依存遺伝子（ヒトオステオカルシン、骨芽細胞）の転写活性を評価した。さらにratVDRリガンド結合ドメイン（VDR-LBD）との共結晶X線構造解析を行った。

6-4 研究成果：新規なノンセコステロイド型リガンドYR335の開発に成功した。YR335は活性型ビタミンD₃と同程度の強力なアゴニスト活性を有していた。また、ratVDRリガンド結合ドメイン（VDR-LBD）との共結晶X線構造解析に成功した。

6-5 考察：以前開発したYR301のVDRとの共結晶X線構造解析から、強い転写活性を有しているにも関わらず、2つのアミノ酸残基（Tyr143, Ser278）と水素結合していなかったが、YR335は活性型ビタミンD₃と同様に、6つのアミノ酸残基と水素結合していることが明らかとなった。コンピュータシミュレーションでデザインしたように、6つのアミノ酸残基と水素結合していたことより、コンピュータシミュレーションの有用性が証明できた。

7) 細胞死ならびに細胞分化の情報伝達に作用する因子に関する研究

機能生化学部 内藤幹彦, 最上（西巻）知子

7-1 研究要旨：細胞死増強作用を示すメチルベスタチン（MeBS）は細胞死阻害タンパク質cIAP1を特異的に減少させ、TNF α 刺激による細胞死誘導においてRIP1のユビキチン化を抑制する事により細胞死情報伝達を制御する事を明らかにした。またAMPキナーゼ（AMPK）活性

化剤が転写制御因子HNF4 α の発現を介して肝特異的遺伝子の発現を低下することを見出した。

7-2 研究目的：①アミノペプチダーゼ阻害活性と免疫増強作用を持つベスタチンは白血病の治療に使用されているが、その誘導体メチルベスタチン（MeBS）は細胞死増強作用を示す。本研究では細胞死の情報伝達におけるベスタチン及びMeBSの作用を明らかにする事を目的とした。②転写制御因子HNF4 α は肝実質細胞の分化に決定的な役割を持つことが知られる。本研究では、HNF4 α 発現への影響を介して肝特異的遺伝子発現を制御する化合物を探索した。

7-3 研究方法：①ヒト白血病細胞U937及びヒト繊維肉腫細胞HT1080をTNF α で処理し、アポトーシスの誘導、Death Inducing Signaling Complex（DISC）形成、カスパーゼ活性化等に及ぼすベスタチン及びMeBSの作用を解析した。②肝がん由来細胞HepG2（ヒト）およびMcARH7777（ラット）を各種化合物で処理し、HNF4 α ならびに肝特異的遺伝子の発現への影響を解析した。

7-4 研究成果：①U937細胞はTNF α 処理により細胞死を起こすが、MeBSを同時に処理すると細胞死が著しく増強された。一方ベスタチンの細胞死増強作用はMeBSの作用に比べ非常に弱かった。同様の細胞死増強作用はHT1080細胞においても観察され、MeBSが多数のがん細胞においてTNF α による細胞死情報伝達系に作用している事が示唆された。細胞死情報伝達に関与する各種タンパク質の発現を調べた結果、MeBS処理により細胞死阻害タンパク質のcIAP1が特異的に減少している事がわかった。タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドはMeBSと同様に細胞死を増強したが、FLIP-Lの発現量を低下させMeBSとはその作用機序が異なることが示唆された。

TNF受容体にはcIAP1, RIP1が結合しており、cIAP1はRIP1をユビキチン化することが知られている。そこでTNF α 誘導細胞死の情報伝達におけるRIP1の機能を調べるために、siRNA処理によりRIP1発現量を低下させた細胞をTNF α 及びMeBSで処理すると、MeBSによる細胞死増強は強く抑制された。次にRIP1のDISCとの結合及びユビキチン化を検討した結果、RIP1はTNF α 処理5分後にTNF受容体と結合すること、このRIP1は高度にマルチユビキチン化されていること、TNF α 処理2時間後にはRIP1の結合及びユビキチン化はほぼ元のレベルに戻ることがわかった。MeBS処理によりcIAP1を減少させると、RIP1のTNF受容体への結合及びRIP1ユビキチン化は強く抑制された。一方カスパーゼ8と結合したRIP1はTNF α 処理2時間後に認められるようになったが、このRIP1は全くユビキチン化を受けておらず、MeBSによりcIAP1を減少させた細胞ではカスパーゼ8と結合したRIP1が増加していた。

②肝由来細胞のHNF4 α 発現への各種化合物の影響を調べ、5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) にHNF4 α タンパクの低下作用を見出した。AICARはAMPKの活性化剤として知られる。McARH7777細胞においてAICARはHNF4 α のSerine 304のリン酸化を亢進し、HNF4 α タンパクの分解を増加していた。またHNF4 α の低下に伴い、肝に特徴的な遺伝子であるアポBならびにアポA-Iのタンパク発現量、microsome triglyceride transfer protein (MTP) のmRNA発現量が低下した。これら3つの遺伝子発現は、siRNA処理によりHNF4 α 発現量を低下させた場合にも抑制された。

7-5 考察：①TNF α がTNF受容体に結合すると、数分後にはRIP1、cIAP1を含む多くのタンパク質がTNF受容体に結合しDISCを形成する。このDISCにおいてRIP1はcIAP1により一過性にユビキチン化され、カスパーゼ活性化を抑制すると考えられる。ユビキチン化を受けないRIP1はその後カスパーゼ8と結合し、その活性化を促進すると推測される。従ってMeBSの細胞死情報伝達における作用は、cIAP1を減少させRIP1を介してカスパーゼ活性化を制御することによると考えられた。

②HNF4 α は若年発症成人型糖尿病1の原因遺伝子であるとともに、肝細胞の分化や肝特異的遺伝子発現の維持に決定的な役割を持つ。本研究ではHNF4 α 発現を低下する化合物としてAICARを同定するとともに、肝細胞において、細胞内エネルギー低下センサーであるAMPKがHNF4 α のリン酸化とタンパク分解を介して標的遺伝子の発現を低下することを示した。このことから、エネルギー代謝とリポタンパク代謝がHNF4 α を介して関連する可能性が示された。

(8) 情報伝達阻害化学物質の遺伝毒性評価

変異遺伝部 本間正充

8-1 研究要旨：Bcr-Ablチロシンキナーゼ活性を選択的に阻害し、慢性骨髄性白血病に効果があるイマチニブのDNA損傷性、染色体異常誘発性、突然変異誘発性を、ヒトリンパ芽球細胞を用いて検討した。いずれにおいても有意な陽性反応は観察されなかったことから、イマチニブはin vitroでは遺伝毒性を有しないと結論づけられた。

8-2 研究目的：イマチニブ (imatinib) は、フィラデルフィア染色体の遺伝子産物Bcr-Ablを標的とした分子標的治療薬として開発された抗悪性腫瘍剤である。遺伝毒性に関しては標準的な試験法で安全性評価が実施されているが、情報伝達阻害作用によるヒト細胞への特異的遺伝的不安定化作用の検討はされていない。本研究では、ヒトリンパ芽球細胞を用いて、イマチニブのDNA損傷性、染色体異常誘発性、突然変異誘発性を検討した。

8-3 研究方法：イマチニブ (Imatinib mesylate) を生理食塩水で調整し、ヒトリンパ芽球細胞株TK6に0, 25, 50, 100, 200, 400ug/mLの濃度で、酵素誘導されたラット肝S9の存在下、および非存在下で4時間処理した。その後、定法に従い、アルカリコメット試験、in vitro小核試験、及びTK遺伝子突然変異試験を実施した。

8-4 研究成果：1) コメット試験：S9非存在下では、陰性対照と比較して、最高用量の%Tail intensity値のわずかな増加がみられたが、S9存在下ではほとんど変わらなかった。

2) 小核試験：S9非存在下では、小核を有する単核細胞数は、陰性対照と比較して最高用量で約3倍の上昇が見られたが、S9存在下ではほとんど変わらなかった。

3) TK遺伝子突然変異試験：S9非存在、存在下ともに、最高用量では高い毒性のため計測不能であった。200ug/mL用量においてのみ変異体コロニー数のわずかな増加が観察された。S9非存在下では最大突然変異頻度は 6.3×10^{-6} 、陰性対照 (3.5×10^{-6}) と比較して約2倍の増加であり、S9存在下では最大突然変異頻度は 4.9×10^{-6} 、陰性対照 (2.3×10^{-6}) と比較して約2倍の増加だった。いずれも統計学的な有意差は認められなかった。

8-5 考察：細胞毒性の指標としてコロニー形成率 (RS)、細胞増殖率 (RSG) を用いた。両者ともS9の存在にかかわらず、最高用量 (400ug/mL) では高い細胞毒性 (> 90%) を示し、ここでの陽性反応は遺伝毒性とは関係のない非特異的な反応と判断された。研究結果より、イマチニブ (imatinib mesylate) のヒトリンパ芽球細胞 (TK6) に対する遺伝毒性は無いものと結論づけられた。一方、イマチニブはチャイニーズハムスター細胞 (CHO) 細胞を用いた染色体異常試験では代謝活性化系存在下で染色体異常を誘発することが報告されている。ラットを用いた経口投与小核試験では陰性であったことから生体にとって問題となる遺伝毒性はないものと考えられるが、ヒト (細胞) での遺伝毒性プロファイルの検討が必要かもしれない。

(9) 間質細胞の免疫調節 (抑制) 効果に関する研究

医療機器部 加藤玲子

9-1 研究要旨：間葉系幹細胞 (MSC) の免疫調節効果がMSCに特有の性質なのか、もしくはそれ以外の細胞も有する性質なのかを検討した結果、MSC以外の細胞でも免疫調節効果を有する細胞があることが分かった。

9-2 研究目的：MSCは数々の報告から、免疫原性が低く、免疫細胞 (T細胞, B細胞, NK細胞, 樹状細胞) の活性化や成熟を抑制する効果があることが示されている。実際、白血病の治療において骨髄幹細胞の移植時に懸念される副作用である移植片対宿主病 (GVHD) の治

療に、その免疫抑制効果を期待してMSCが用いられている。しかしながら、免疫調節効果がMSCに固有の性質であるかの詳細な報告はない。そこで、本研究では検討対象をさまざまな間質細胞として免疫調節効果の有無を検討した。

9-3 研究方法：混合リンパ球培養反応（MLR）の系に各細胞を共培養し、それぞれの細胞が活性化リンパ球に与える影響を細胞増殖の観点から検討した。マウスリンパ球はBALB/c (H-2^d) の脾臓から採取した。マウス骨髄由来樹状細胞（BMDC）はC3H (H-2^k) から骨髄細胞を回収し、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子含有培地で一週間培養後、リポ多糖を添加して一晚培養後洗浄した細胞を使用した。BMDC及び各細胞は共培養する前にガンマー線処理し細胞増殖を抑制した。リンパ球増殖測定日に培養系に5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) を加え8時間培養した後、リンパ球のDNA合成中のBrdU取り込み量を測定し、細胞増殖を評価した。MLR単独での細胞増殖率を100%とし、各細胞と共培養した時の増殖率を算出した。検討細胞としてはマウス・ヒト・ウサギ軟骨細胞、ヒト皮膚線維芽細胞（成人由来、新生時由来）、ヒト胎児腎細胞由来細胞株（HEK293）およびチャイニーズハムスター肺由来細胞株（CHL）を用いた。

9-4 研究成果：まず、用いたリンパ球と同種であるマウス軟骨細胞で検討したところ、活性化リンパ球の増殖率を2%以下まで低下させていた（表1）。一方、MSCは異種のリンパ球の活性化抑制効果を有するとの報告があり、我々もマウスMLRをヒトMSCが抑制することを確認できている。そこで軟骨細胞でも異種リンパ球の活性化を制御可能であるかを検討した結果、マウスMLRをヒトおよびウサギの軟骨細胞が抑制出来ることが分かった（表1）。さらにヒト皮膚線維芽細胞、HEK293、CHLで検討したところ、ドナー間で差はあったがマウスMLRを抑制していた（表1）。それに対して、HEK293、CHLはマウスMLRを抑制することは出来なかった（表1）。

9-5 考察：今回の結果から免疫調節（抑制）効果はMSC特有の性質ではなく、軟骨細胞や繊維芽細胞も同

様の性質を有していることが分かった。それに対してHEK293、CHLは少なくとも異種の活性化リンパ球の増殖を抑制することは出来ないことが判明した。今後、抑制効果を有する細胞群と抑制効果を示さない細胞群の間で、サイトカインを含む液性因子や細胞表面分子などの発現を比較検討することで、免疫抑制メカニズムを解明する一助になると思われる。

(10) 受容体反応に起因する新生児特異的健康影響のリスク評価法の確立に関する基礎的研究

総合評価研究室 平田睦子, 小野 敦, 広瀬明彦
機能生化学部 最上知子

10-1 研究要旨：新生児期を対象とした化学物質のリスク評価法を確立するための基礎的知見の集積を目的として、若齢期以降のラットでは顕著な性差が認められるが、離乳前時期には性差が認められない、2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl) benzotriazole (HDBB) の毒性及び年齢差のメカニズムに関する検討を行った。HDBBを投与したラットの肝臓の遺伝子発現解析を行った結果、PPAR α アゴニストを投与したラットの肝臓と類似した遺伝子発現プロファイルが得られた。そこで、新生児期から若齢期の雌雄ラットの肝臓におけるPPAR α 発現量を調べた結果、雌雄で異なる発達の変化が認められた。これらの結果から、HDBBの毒性に認められる性差や年齢差には、肝臓のPPAR α の発現レベルの違いが関与している可能性が示唆された。

10-2 研究目的：新生児は化学物質に対して成人とは異なる感受性を示すことが知られている。本研究では、新生児期を対象とした化学物質のリスク評価法を確立するための基礎的知見の集積を目的として、ラットの若齢期と離乳前時期とで異なる反応性が認められるHDBBの各種核内受容体との反応性の解析を行うと共に、HDBBをラットに投与して遺伝子発現解析を行った。これらの結果からHDBBの毒性発現に関連すると考えられる核内受容体について、新生児期から若齢期の発達の変化を調べた。

10-3 研究方法：毒性発現への関与が予測された各種核内受容体に対するHDBBのリガンド活性を調べるために、核内受容体リガンド結合部位-Gal4融合タンパクを用いたone-hybridアッセイ及び完全長のPPAR/RXRヘテロダイマーとPPAR応答性ベクターを用いたレポーターアッセイを行った。HDBBはDMSOに溶解しないため、BSAに結合させて可溶化した。次に、CrI:CDラット（雄、5週齢）に0.5もしくは2.5mg/kg bwのHDBBを単回強制経口投与し、24時間後に肝臓組織からRNAを抽出して遺伝子発現解析を行った。さらに、7日齢、22日齢、28日齢、35日齢及び50日齢の雌雄ラット[CrI:CD (SD), 未投与]

表 1 各細胞が MLR における細胞増殖におよぼす影響

細胞	リンパ球増殖値 ^a
マウス軟骨細胞	1.2±0.2*
ヒト軟骨細胞	5.7±0.5*
ウサギ軟骨細胞	2.7±0.3*
ヒト皮膚線維芽細胞 - 成人由来	6.2±2.5*
ヒト皮膚線維芽細胞 - 新生児由来	16.5±6.5*
HEK293	150.3±15.1*
CHL	96.4±1.2*

^aMLRにおけるリンパ球増殖率100%とした時の換算値

から肝臓を採取し、PPAR α の発現量を解析した。35及び50日齢のラットから採取した肝臓については、PPAR α の蛋白質の定量も行った。

10-4 研究成果：One-hybridアッセイでは、HDBBは、最高濃度である5 μ Mでもヒト及びラットのPPAR α 、 β 、 γ へのリガンド活性を示さなかった。PPAR/RXRレポーターアッセイでは、100 μ Mの濃度まで試験を行った結果、HDBBはヒトPPAR α 及びPPAR δ への弱いリガンド活性を示した。HDBBを投与したラットの肝臓では、ペルオキシソーム蛋白及び β 酸化関連遺伝子の発現増加がみられ、PPAR α アゴニストであるclofibrate、WY-14643やgemfibrozilを投与したラットの肝臓と類似した遺伝子発現プロファイルが得られた。そこで、PPAR α について、その発現量の発達的变化を調べた結果、雌では、7日齢時の発現レベルが最も高く、その後、急激な発現量の低下が認められた。28～50日齢時にはPPAR α 発現量に大きな変動は見られなかった。雄では、7、22及び50日齢時の発現量は雌ラットと同等であったが、35日齢時に発現量の急激な増加が見られた。28及び35日齢時の雄ラットの肝臓のPPAR α 発現レベルは、同齢の雌ラットと比較して有意に高かった。PPAR α タンパク量についても同様な結果が得られた。

10-5 考察：HDBBは、5～6週齢のラットを用いた反復投与毒性試験において、主として肝臓に毒性影響を引き起こし、その毒性には顕著な種差(雄>雌)が認められている。我々は、これまでの研究で、HDBBの性差が去勢により減少し、また、離乳前ラットへの投与では性差が全く認められないことを示した。さらに、若齢ラットの肝臓ではHDBBがほとんど代謝されないこと、また、HDBBを経口投与した若齢ラットの血中HDBBレベルには性差が認められないことを明らかにしている。

本研究では、各種核内受容体に対するHDBBのリガンド活性を調べた結果、レセプターへのリガンド結合を検出するone-hybridアッセイではPPARへのリガンド活性を検出することができなかったが、より高濃度のHDBBを細胞に暴露し、レセプターの高次構造を保持したPPAR/RXRレポーターアッセイでは、ヒトPPAR α とPPAR δ の活性化が認められた。ラットの肝臓遺伝子発現解析を行った結果、HDBBの肝毒性にはPPAR α が関与していることが示された。28及び35日齢時の雄ラットの肝臓のPPAR α 発現量は、雌と比較して顕著に高く、離乳前ラットの肝臓のPPAR α 発現量には性差は認められなかったことから、HDBBの毒性性差及び年齢差にはPPAR α 発現量の違いが関与している可能性が考えられる。一方、50日齢のラットでは、性差は見られず、これまでの報告[*Endocrinology*, **144**, 101-109 (2003)]とは異なる結果が得られた。今後は、核内受容体発現量の性差や発達的变化

についてさらなる詳細な検討を行う必要がある。

IV. 研究発表

(1) 論文発表

1. Ohkawara, S., Tanaka-Kagawa, T., Furukawa, Y., Nishimura, T., Jinno, H.: Activation of the human transient receptor potential vanilloid subtype 1 by essential oils
Biol. Pharm. Bull., **33**, 1434-1437 (2010)
2. 安達玲子, 中村 厚: in vitroにおける骨代謝系細胞の分化・機能解析法
ぶんせき, **431**, 591-595 (2010)
3. Kanda, Y., Hinata, T., Kang, S.W., Watanabe, Y.: Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells
Life Sciences, **89**, 250-258 (2011)
4. Suzuki, N., Suzuki, T., Ota, Y., Nakano, T., Kurihara, M., Okuda, H., Yamori, T., Tsumoto, H., Nakagawa, H., Miyata, N.: Design, Synthesis, and Biological Activity of Boronic acid-Based Histone Deacetylase Inhibitors
J. Med. Chem., **52**, 2909-2922 (2009)
5. Hakamata, W., Kurihara, M., Okuda, H., Nishio, T., Oku, T.: Design and screening strategies for α -glucosidase inhibitors based on enzymological information
Curr. Top Med. Chem., **9**, 3-12 (2009)
6. Demizu, Y., Takahashi, T., Kaneko, F., Sato, Y., Okuda, H., Ochiai, E., Horie, K., Takagi, K., Kakuda, S., Takimoto-Kamimura, M., Kurihara, M.: Design, synthesis and X-ray crystallographic study of new nonsecosteroidal vitamin D receptor ligands
Bioorg. Med. Chem. Lett., **21**, 6104-6107 (2011)
7. Sugiyama, T., Imamura, Y., Demizu, Y., Kurihara, M., Takano, M., Kittaka, A.: β -PNA: Peptide nucleic acid (PNA) with a chiral center at the β -position of the PNA backbone
Bioorg. Med. Chem. Lett., **21**, 7317-7320 (2011)
8. Demizu, Y., Okuhira, K., Motoi, H., Ohno, A., Shoda, T., Fukuhara, K., Okuda, H., Naito, M., Kurihara, M.: Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy
Bioorg. Med. Chem. Lett., **22**, 1793-1796 (2012)
9. Honma, M., Hayashi, M.: Comparison of in vitro micro-nucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells
Environ. Mol. Mutagen., **52**, 373-384 (2011)
10. Honma, M.: Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test

Mutat. Res., **724**, 86-87 (2011)

11. Hirata-Koizumi, M., Matsuno, K., Kawabata, M., Yajima, K., Matsuyama, T., Hirose, A., Kamata, E., Ema, M.: Gender-related difference in the toxicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole in rats: relationship to the plasma concentration, in vitro hepatic metabolism, and effects on hepatic metabolizing enzyme activity

Drug Chem. Toxicol., **32**, 204-214 (2009)

12. Hirata-Koizumi, M., Matsuyama, T., Imai, T., Hirose, A., Kamata, E., Ema, M.: Disappearance of gender-related difference in the toxicity of benzotriazole ultraviolet absorber in juvenile rats

Congenit. Anom. (Kyoto), **49**, 247-252 (2009)

(2) 学会発表

1. 押澤 正, 豊田淑江, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 山口照英, 鈴木和博: カルシウム結合タンパク質 S100A8によるHL-60細胞の増殖抑制

第11回Pharmaco-Hematologyシンポジウム (2010.6)

2. 押澤 正, 豊田淑江, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 山口照英, 鈴木和博: カルシウム結合タンパク質 S100A8はHL-60細胞の好中球様分化において増殖・分化に重要な働きをする (その3)

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (2010.12)

3. 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 古川容子, 小俣知世, 安藤正典, 神野透人, 西村哲治: 和精油によるヒト冷刺激/侵害刺激受容体TRPA1の活性化

日本薬学会第129年会 (2009.3)

4. 香川 (田中) 聡子, 古川容子, 大田悠紀子, 大河原晋, 西村哲治, 神野透人: 消毒副生成物によるヒト侵害刺激受容体TRPA1及びTRPV1の活性化

日本薬学会第130年会 (2010.3)

5. 神野透人, 古川容子, 大河原 晋, 西村哲治, 香川 (田中) 聡子: ハロアセトニトリル類によるヒト侵害刺激受容体TRPA1及びTRPV1の活性化

第37回トキシコロジー学会学術年会 (2010.6)

6. 香川 (田中) 聡子, 古川容子, 大河原 晋, 西村哲治, 神野透人: 室内環境化学物質によるTRPイオンチャネルの活性化

第19回日本臨床環境医学会学術集会 (2010.7)

7. 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 西村哲治, 神野透人: 気道刺激性を有する室内環境化学物質の探索-TRPイオンチャネルの活性化を指標としたスクリーニング

平成23年度室内環境学会学術大会 (2011.12)

8. 中村 厚, 安達玲子, 太田象三, 市原賢二, 三島敏, 手島玲子: プロボリスは骨芽細胞分化を促進する

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (2010.12)

9. 中村 厚, 安達玲子, 太田象三, 市原賢二, 手島玲子: プロボリスの骨芽細胞分化促進作用に関する研究

日本食品化学学会第17回総会・学術大会 (2011.5)

10. 安達玲子, 中村 厚, 太田象三, 市原賢二, 手島玲子: プロボリスの破骨細胞分化及び骨密度低下に対する抑制効果

日本薬学会第132年会 (2012.3)

11. Kanda, Y.: Role of Nox4 in adipocyte differentiation from mesenchymal stem cells

Keystone Symposia (B4) (2010.2)

12. Kanda, Y.: Role of NADPH oxidase in adipocyte differentiation and obesity

EMBO Conference on Cellular Signaling & Molecular Medicine 2nd. (2010.5)

13. Kakuda, S., Takagi, K., Chida, T., Okada, K., Eguchi, H., Takenouchi, K., Hakamata, W., Kurihara, M., Takimoto-Kamimura, M., Harada, Y., Azuma, Y.: In vitro and In vivo Characterization of Nonsecosteroidal Vitamin D3 Analogue YR301 and its Crystal Structure Complexed with the Rat VDR

ASBMR 31th Annual Meeting (2009.9)

14. 出水庸介, 金子文也, 岩井すみれ, 高橋健男, 佐藤由紀子, 奥田晴宏, 栗原正明, 落合鋭士, 堀江恭平, 角田真二, 上村みどり: ノンセコステロイド型VDRリガンドのデノボ設計

第35回反応と合成の進歩シンポジウム (2009.11)

15. 出水庸介, 金子文也, 岩井すみれ, 高橋健男, 佐藤由紀子, 落合鋭士, 堀江恭平, 角田真二, 上村みどり, 奥田晴宏, 栗原正明: ノンセコステロイド型VDRリガンドの設計と合成

第28回メディシナルケミストリーシンポジウム (2009.11)

16. 高橋健男, 出水庸介, 佐藤由紀子, 落合鋭士, 堀江恭平, 角田真二, 上村みどり, 奥田晴宏, 栗原正明: 水素結合救済型ノンセコVDRリガンドの設計と合成

日本薬学会第130年会 (2010.3)

17. 中津亜紀, 出水庸介, 佐藤由紀子, 奥田晴宏, 栗原正明: ノンセコステロイド型VDRリガンドYR301の簡便合成

日本薬学会第130年会 (2010.3)

18. 出水庸介, 佐藤由紀子, 竹内由起, 落合鋭士, 堀江恭平, 角田真二, 上村みどり, 奥田晴宏, 栗原正明: 新たな水素結合ネットワークを指向したVDRリガンド
日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会 (2010.5)
 19. Demizu, Y., Sato, Y., Ochiai, E., Horie, K., Kakua, S., Takimoto-Kamimura, M., Okuda, H., Kurihara, M.: Development of non-secosteroidal VDR ligands
The 21st French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry (2010.5)
 20. 栗原正明: ノンセコ型VDRリガンドの創製
第6回VD3研究会 (2010.6)
 21. Honzawa, S., Takahashi, N., Yamashi, A., Saito, N., Kishimoto, S., Sugiura, T., Arai, M., Kato, S., Kurihara, M., Kittaka, A.: Synthesis of vitamin D analogs as ligands for mutant human vitamin D receptor (Arg274Leu)
240th American Chemical Society National Meeting & Exposition (2010.8)
 22. 本澤 忍, 高橋尚志, 山本康弘, 荒井 緑, 高野真史, 澤田大介, 山下 純, 杉浦隆之, 橘高敦史, 角田真二, 齋藤 博, 高木健一郎, 上村みどり, 石塚誠一, 竹之内一弥, 榊 利之, 加藤茂明, 栗原正明: 変異VDR (Arg274Leu) に対するセコステロイドリガンドの設計と合成
第329回脂溶性ビタミン総合研究委員会 (2010.9)
 23. 山縣奈々子, 出水庸介, 佐藤由紀子, 長澤和夫, 土井光暢, 田中正一, 奥田晴宏, 栗原正明: タンパク質間相互作用を制御する安定化ヘリカルペプチドの創製
第54回日本薬学会関東支部大会 (2010.10)
 24. 出水庸介, 佐藤由紀子, 落合鋭士, 堀江恭平, 高木健一郎, 角田真二, 上村みどり, 奥田晴宏, 栗原正明: ノンセコVDRリガンドの創製と結合様式の解析
第29回 メディシナルケミストリーシンポジウム (2010.11)
 25. Kittaka, A., Sawada, D., Takano, M., Honzawa, S., Arai, A.M., Saito, N., Kakuda, S., Saito, H., Takagi, K., Takimoto-Kamimura, M., Takenouchi, K., Kurihara, M., Chen, C.T., Sakaki, T.: Synthesis of a series of vitamin D analogs as ligands for human vitamin D receptor: super agonists, antagonists, and studies on metabolism
The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (2010.12)
 26. 竹内由起, 野島萌子, 出水庸介, 佐藤由紀子, 井上英史, 奥田晴宏, 栗原正明, 落合鋭士, 堀江恭平, 高木健一郎, 角田真二, 上村みどり: ノンセコVDRリガンドの創製とVDRとの相互作用解析
日本薬学会第131年会 (2011.3)
 27. 出水庸介, 佐藤由紀子, 堀江恭平, 高木健一郎, 角田真二, 上村みどり, 奥田晴宏, 栗原正明: ノンセコ型VDRリガンドの創製およびVDRとの相互作用解析
日本ケミカルバイオロジー学会第6回年会 (2011.5)
 28. Demizu, Y., Sato, Y., Horie, K., Takagi, K., Kakuda, S., Takimoto-Kamimura, M., Okuda, H., Kurihara, M.: Design of non-secosteroidal VDR ligands and binding mode to VDR-LBD
4th European Conference on Chemistry for Life Sciences (2011.8)
 29. Demizu, Y., Motoi, H., Okuhira, K., Fukuhara, K., Okuda, H., Naito, M., Kurihara, M.: Design and Synthesis of ER Degradation Inducer for Protein Knockdown Strategy
AIMECS11 (2011.11)
 30. Kurihara, M., Demizu, Y., Kurashima, M., Sato, Y., Horie, K., Takagi, K., Kakuda, S., Kamimura, M., Okuda, H.: Design of Non-secosteroidal VDR Ligands and Hydrogen-Bond Network in VDR-LBD
AIMECS11 (2011.11)
 31. 倉島恵愛, 出水庸介, 佐藤由紀子, 野尻久雄, 橘高敦史, 栗原正明: 長鎖アルキル基を持つノンセコステロイド型VDRリガンドの創製
日本薬学会第132年会 (2012.3)
 32. 元井宏美, 出水庸介, 佐藤由紀子, 奥平桂一郎, 内藤幹彦, 栗原正明: プロテインノックダウン法を利用したエストロゲン受容体分解誘導剤の開発
日本薬学会第132年会 (2012.3)
 33. 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 持田譲治, 松岡厚子: *in vitro*における培養軟骨細胞の免疫応答におよぼす影響
第24回日本軟骨代謝学会 (2011.3)
 34. Ono, A., Hirose, A., Hirata-Koizumi, M., Matsuno, K., Kawabata, M., Yajima, K., Matsuyama, T., Kamata, E., Ema, M.: Gender-related differences of the hepatic enzyme activities in relation to the toxicity of benzotriazole ultraviolet absorber in rats
XII International congress of toxicology (2010.7)
- (3) その他の発表, 施策への貢献, ガイドライン, マニュアル等の作成
1. 本間正充 第9章 ほ乳類培養細胞を用いた遺伝毒性試験とその実験手技 「最新 動物実験代替法の技法ノウハウ」技術情報協会 (小島 肇監修) (2011)