

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	網脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御

所属 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部
研究者 田平 武

分担研究者

- | | |
|-------------------------|------|
| (1) (株) ツムラ中央研究所 | 譲原光利 |
| (2) 日本臓器製薬(株) 生物活性科学研究所 | 内木 充 |
| (3) 信州大学医学部 | 高 昌星 |

要 旨

NK, NKT 細胞、性ホルモンは自己免疫性脳炎を制御し、CG 配列を有する ODN はこれを増強した。ノイロトロピンはラット EAE を制御し、 β -エンドルフィンの増強を介した。慢性ストレスによるうつ状態は前頭前野のグルココルチコイド受容体 (GR) の強い抑制と関連し、TJ-12 はこれを解除した。

1. 研究目的

神経系、免疫系、内分泌系は相互に密接な関係を有し (神経・免疫・内分泌相関)、生体防御に強く関わっている。強いストレスはその破綻をきたし、うつ病や自己免疫疾患の発症あるいは再発を引き起こす。本研究は自己免疫性脳炎 (EAE) をモデルに免疫系が神経系を損傷する機構、神経系・内分泌系が免疫系を制御する機構、及びストレス (内分泌系) による神経系の傷害機構を明らかにし、その制御方法を開発することを目的とする。

2. 研究方法

SJL/J マウスの EAE は PLP ペプチド 136-151 で、B6 マウスの EAE は MOG ペプチド 35-55 で、Lewis ラット EAE は MBP ペプチド 68-84 で誘導した。NK 細胞の除去は NK1.1 抗体によった。CG モチーフを有する合成オリゴヌクレオチド (ODN) の配列は GCATGACGTTGAGCT (CpG) であり、コントロールとして CG モチーフの C がメチル化されたもの (ZpG) を用いた。NKT 細胞の活性化には APC 存在下に α -galactosyl ceramide (α -gal-cer) で刺激して行った。また、接着分子の影響をみる為に B-7.1、B-7.2 抗体を用いた。ノイロトロピンは 100mg/kg/day をラット腹腔内に連日注射し、ナルトレキソンは 10, 20mg/kg/day をラット背部皮下に連日注射した。タイラーウィルス (TMEV) による脳脊髄炎は TMEV を BALB/C マウスの脳内に接種し誘導し、性ホルモンの影響をみるために精巢の摘出を行い、テストステロンを皮下注射した。

ストレス実験は Wistar ラットに 1日2時間の拘束水浸ストレスを毎日2時間行い、一部の動物はその後10日間の回復期間をおいた。グルココルチコイド受容体 (GR) は細胞質画分と核画分に分けて免疫沈降ウェスタンブロット法によった。薬物は TJ-12 100, 300, 1000mg/kg, デシプラミン 3mg/kg, トラゾドン 3mg/kg の経口投与を行った。

3. 研究成果

NK1.1 抗体 0.5mg を SJL/J マウスに注射すると脾臓の NK 細胞は 25%に減少した。B6 マウスと異なり、2週後に回復傾向が見られたので、14日後にもう一度 NK1.1 抗体を同量注射した。この条件下で、PLP による EAE は対照に比し著しい悪化が見られた (図1)。

NKT 細胞を α -gal-cer で刺激し B6 マウスに移入しその効果を調べたが、何ら EAE の経過、重症度に影響を与えなかった。しかし、B-7.2 抗体存在下に α -gal-cer で刺激した NKT 細胞は EAE を著明に

制御した。

CpG ODN は SJL/J マウスの EAE を悪化させ、主として Th1 タイプサイトカインの増強が見られた。しかし、IL-10 の増強も見られたので、T 細胞と B 細胞に分離してその影響を調べた。その結果、CD5⁺B 細胞が主たる IL-10 産生細胞であり、CD5⁺B 細胞は CpG ODN 刺激で EAE を制御した (図 2)。

ノイロトロピンは Lewis ラット EAE を抑制した。対照ラットでは発症前下垂体の β -エンドルフィンが低下したが、ノイロトロピンはその低下を解除した (図 3)。

TMEV 脳炎は精巣摘出により著明に悪化し、テストステロンはこれを制御した (図 4)。

慢性ストレスラットでは前頭前野及び海馬の細胞質 GR が著明に低下し、核内 GR が増加していた。TJ-12 は細胞質 GR の低下を解除したが、デシプラミン、トラゾドン は解除しなかった (図 5)。

4. 考 察

本研究者らは以前に NK 細胞が B6 マウスの EAE を制御することを見出し報告した。しかし、B6 マウスは EAE を起こしにくく、経過も長い為、1 回の実験に 50 日以上を要し、制御メカニズムの解析が困難であった。今回、SJL/J マウスでも同様の結果が得られた。SJL/J マウスは EAE を起こしやすく、20 日で結果が出る為、今後解析が促進されよう。

本研究者らは NKT 細胞も EAE の調節性細胞であることを以前に報告した。しかし、その活性化リガンドである α -gal-cer を注射しても EAE の経過に影響を与えなかった。しかし、今回 B-7.2 抗体存在下に α -gal-cer で活性化すると、EAE の制御効果が強く現れることが分かった。

自己免疫疾患はしばしば感染症後に発症ないし再発し、細胞やウイルスの関与が指摘されてきた。最近、その機序として、細菌やウイルス DNA に含まれる CG 配列が注目されている。実際 CpG ODN は EAE を悪化させた。今回、CD5⁺B 細胞は CpG ODN で Th2 サイトカインである IL-10 の産生が増強されることを見出した。最近 CG モチーフ ODN の受容体として TLR-9 が発見された。今後これら受容体発現と differential regulation の関係を明らかにする必要がある。

ノイロトロピンはワクチニアウイルス接種ウサギ皮膚より抽出・精製した非蛋白性生物活性物質であり、我国ではある種の痛みの治療薬として承認されている。その薬理作用はまだ十分明らかでないが、 β -エンドルフィンの増強作用が関与していると思われる。今回、ラット EAE においてその制御作用が明らかにされ、 β -エンドルフィン増強作用が関与する可能性を指摘した。 β -エンドルフィン はオピオイド受容体を介して交感神経系にシグナルを送り、EAE を調節していると考えられる。

自己免疫疾患の大半は性差が認められ、多発性硬化症や SLE では女性が多い。今回 TMEV による自己免疫性脱髄脳炎も性ホルモンの影響を受け、テストステロンがこれを抑制していることが分かった。これにより性ホルモン (内分泌系) による免疫調節機構の解明によりモデルが確立された。

慢性ストレスはうつ病を引き起こす。うつ病患者ではデキサメサゾン抑制試験で抑制がかからないことはよく知られている。今回、前頭前野や海馬の GR が著明に downregulate されていることが分かり、これがデキサメサゾン脱抑制に絡むことが分かった。興味あることに、TJ-12 はその脱抑制を解除し、デシプラミンやトラゾドンは解除しなかった。従って同じ抗うつ剤でも薬理作用点が異なり、漢方薬 TJ-12 (柴胡加竜骨牡蛎湯) は視床下部、下垂体、副腎軸 (HPA axis) に作用し抗うつ効果を発揮することが分かった。

5. 結 論

- 1) NK 細胞は SJL/J マウスでも EAE の調節性細胞になっていることが分かった。
- 2) CpG ODN は T 細胞、マクロファージ系には Th1 系サイトカイン産生を、CD5⁺B 細胞には Th2 系サイトカイン産生を促進していることが分かった。
- 3) ノイロトロピンは EAE を抑制し、 β -エンドルフィンを介することが分かった。
- 4) TMEV 脳炎においても性ホルモンの関与が見られること証明した。
- 5) TJ-12 は慢性ストレスによるうつ状態を改善し、前頭前野の細胞質 GR の downregulation を解除することによると考えられた。

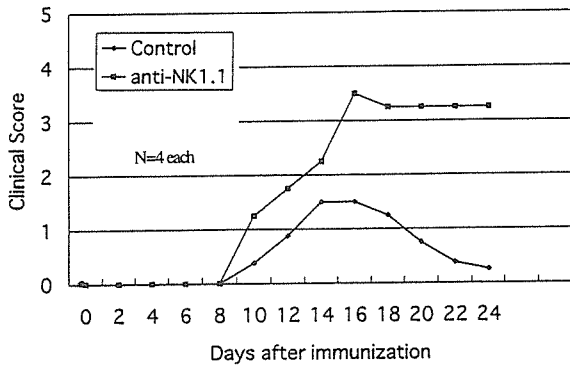


Fig. 1 NK cell deletion enhances EAE in SJL/J mice.

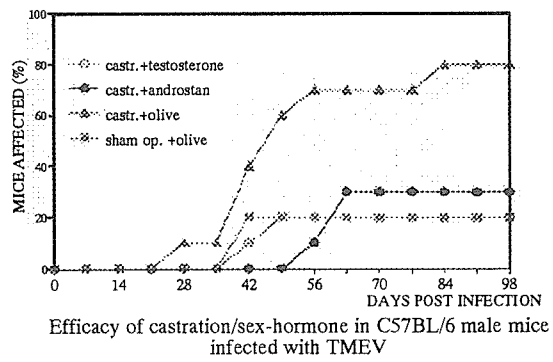


Fig. 4 Castration enhances TMEV-induced encephalomyelitis.

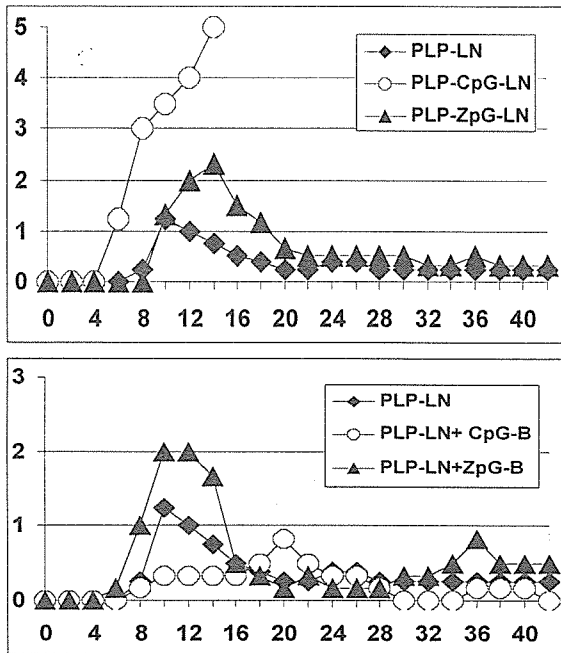


Fig. 2 CpG ODN enhances EAE (top), but B cells stimulated with CpG ODN suppress passive EAE.

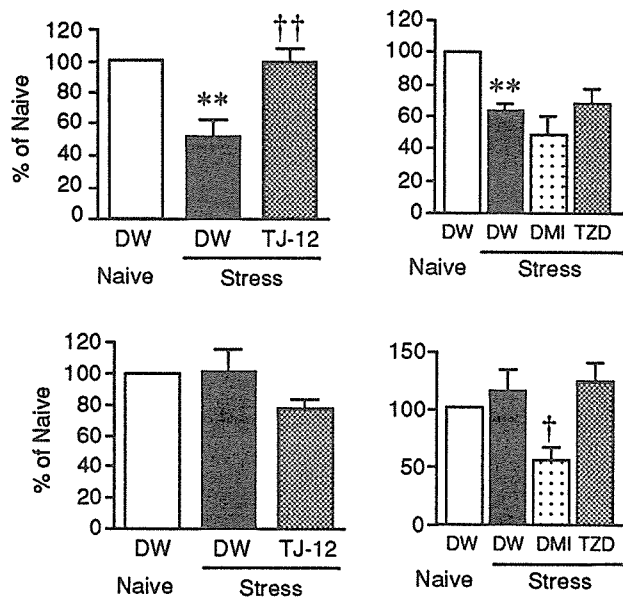


Fig. 5 Stress-induced downregulation of glucocorticoid receptors in prefrontal cortex was prevented by TJ-12 but not by desipramine (DMI) and tetrazodone (TZD). Top; cytosol; bottom: nucleus

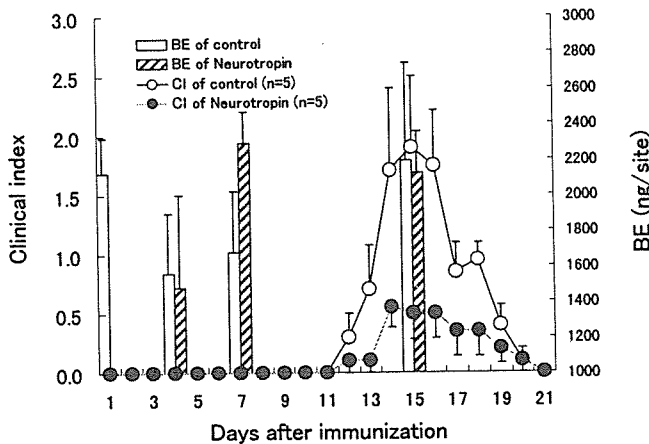


Fig. 3 Neurotropin suppresses EAE by augmenting β -endorphin in the pituitary gland.

6. 研究発表

1. Xu Wen, Gyorgy Fazekas, Hideo Hara, Takeshi Tabira. Regulatory role of natural killer (NK) cells in experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *Neuroimmunol.* 9: 64-65, 2001.
2. Fazekas Gyorgy, Hideo Hara, Takeshi Tabira. Characteristics of CpG-oligonucleotide stimulation on lymphocyte subpopulations and on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunol.* 9: 62-63, 2001.
3. Pal E, Tabira T, Kawano T, Taniguchi M, Miyake S, Yamamura T. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of valpha14 NK T cells. *J Immunol.* 2001 Jan 1;166(1):662-8.
4. Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A, Koh C-S, Ohshima H, Yagita H, Mizuno Y, Okumura K: Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: A critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. *J Immunol* 166: 2108-2115, 2001
5. Ichikawa M, Koh C-S, Inoue A, Tsuyusaki J, Yamazaki M, Inaba Y, Sekiguchi Y, Itoh M, Yagita H, Komiyama A: Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of multiple sclerosis like demyelinating disease in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. *J Neuroimmunol* 102: 56-66, 2000
6. Koh C-S, Inoue A, Yamazaki M, Kim BS: High-dose mouse immunoglobulin G administration suppresses Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J Neuroimmunol*, 108: 22-28, 2000
7. Sekiguchi Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, Koh C-S :Brain-derived gangliosides suppress the chronic relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. *J Neuroimmunol* (in press)
8. Inaba Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, Kyogashima M, Sekiguchi Y, Nakamura S, Komiyama A, Koh C-S : Plasma thrombin-antithrombin III complex associated with the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* (in press)
9. Kim BS, Palma JP, Inoue A, Koh C-S : Pathogenetic immunity in Theiler's virus-induced demyelinating disease: a viral model for multiple sclerosis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (in press)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社