

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬

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) 日本臓器製薬株式会社生物活性研究所 | 内木 充 |
| 2) 株式会社ツムラ中央研究所 | 溝口和臣 |
| 3) 信州大学医療技術短期大学部 | 高 昌星 |

要旨

新規蛋白 G-7 とノイロトロピンは自己免疫性脳炎惹起性 T 細胞にアポトーシスを誘導した。タイラーウイルス性自己免疫性脳炎には複雑な性ホルモンの関与が見られた。ストレスによる精神・神経障害を緩和するものとして、グリピカン1と漢方薬 TJ-12 を見出した。

1. 研究目的

神経系・免疫系と内分泌系は密接な関連を保ち、生体の恒常性を維持している。しかし強いストレスはその破綻を引き起こし、自己免疫疾患やうつ病その他の精神・神経疾患を引き起こす。本研究は自己免疫性脳炎をモデルとして神経系による免疫調節機構を中心に解析し、自己免疫性脳炎の制御方法を探索する。また、自己免疫疾患には性差が見られ、一般に女性に多い。その機序を探る為に、タイラーウイルス性自己免疫性脳炎の性差が起こる機序を明らかにする。さらに、内分泌系が神経系を障害する機構としてストレスによる神経機能障害、とくに神経細胞死の機構を解析し、その分子機構からこれを制御する方法を開発するとともに、漢方薬を中心に薬物のスクリーニングを行い、応用をはかることを目的とする。

2. 研究方法

1) 神経系由来免疫調節因子の解析

動物が自己免疫性脳炎から回復するとき浸潤 T 細胞の多くがアポトーシスに陥っている。そこで、インターフェロン γ でマウスアストロサイト株 G-26-24 を刺激し、刺激を受けないものとの間で differential display 法により発現誘導される遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定する。そのうち興味のあるものについて発現ベクターに組み込み、CHO 細胞に発現させて、自己免疫性脳炎惹起 T 細胞にアポトーシスを誘導するクローンを選択する。その遺伝子をレトロウイルスベクターを用いてミクログリア細胞株 Ra2 に発現させ、これを EAE 誘導操作を行ったマウスに注射して EAE の抑制作用があるかしらべる。

2) ノイロトロピンの左様機序に関する研究

ノイロトロピンは家兔由来ワクシニアウイルス誘発炎症組織の抽出物であり、鎮痛作用を有する。本研究者はノイロトロピンが EAE を抑制することをすでに見い出していた。その作用機序を明らかにする為に、ラットに EAE を誘導し、ノイロトロピンを投与、血中の NOx を測定した。さらにその NO が脳炎惹起 T 細胞にアポトーシスを誘導するか否かを Annexin-V を用いて検討した。

3) 自己免疫疾患に及ぼす性ホルモンの影響の研究

タイラーウイルスはマウスに自己免疫性脳炎を引き起こす。SJL/J マウスでは性差がみられず、雄雌共に高率に脳炎を引き起こす。しかし、C57BL6 マウスには性差が見られ、雄のほうが起こしやすい。そこで、ホルモンの影響をしらべるために、精巣摘出、あるいはエストロゲンの投与を行い、自己免疫性脳炎発症に対する影響をしらべた。

4) ストレスによる神経障害の研究

プレセニン1 (PS1) の変異遺伝子トランスジェニックマウスではストレスのときにしばしば見られる dark neuron が見られ、神経細胞死の促進が見られる。その理由はまだ確かでないが、細胞内 A β 42 の蓄積が関与していると推察される。A β の凝集体は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、それが高じると神経細胞死が誘発されると考えられる。しかし、生体とくに若年者ではこれを捕捉し酸化ストレスから防御する物質が存在すると考えられる。そこで、ヒト脳よりグアニジン塩酸、NP-40 で蛋白を抽出し、透析後、DEAE セファロース・陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより蛋白質を分画し、塩濃度勾配により溶出したものをドットプロットし、凝集 A β を作用させ、A β 抗体により A β と結合する蛋白を明らかにし、その局在、機能を解析する。

また、Wistar ラットに拘束水浸ストレスを慢性負荷し、血中コルチゾールを指標に dexamethasone (DEX) 抑制試験を行う。このとき責任病巣を明らかにする為に大脳局所に DEX を注射し、部位別にその影響をしらべる。また、慢性ストレスラットにおける前頭前野のシナプス機能の異常を薬理的に解析する為に、KCl 注入によるドパミン、セロトニンの放出効果をしらべ、この系を用いて漢方薬 TJ-12 の薬理作用を明らかにする。

(倫理的配慮) すべての動物実験はそれぞれの研究施設の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

研究成果

1) γ インターフェロン刺激により誘導されるマウスアストロサイト由来遺伝子を100個クローニングし塩基配列を明らかにした。この中には既知のもの、未知のものが含まれていた。その中から興味のあるもの50個を発現ベクターにいれ、CHO 細胞で発現させ、自己免疫性脳炎惹起 T 細胞にアポトーシスを誘導するものを探索した。その結果、PLP 反応性自己免疫性脳炎惹起 T 細胞に比較的アポトーシスを強く誘導するものが2個見いだされた。一つは既知の遺伝子 SPARK であった(図1)。もう一つは新規遺伝子 G-7 であった。両者とも CD4+ T 細胞のアポトーシスを最も良く誘導し、CD8+ T 細胞、B 細胞、OVA 反応性 CD4+ T 細胞に対しては弱かった。G-7 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いてミクログリア細胞株 Ra2 に発現させ、腹腔に注射した後、MOG ペプチドでマウスを感作して EAE を誘導する操作を行うと、からベクターを入れたものに比べ、G-7 を入れたものは EAE が抑制された。

2) ノイロトロピンを投与すると EAE の軽症化が見られた。そのラットでは対照に比し血中 NOx は高値を示した。脾臓由来マクロファージをノイロトロピンで刺激すると NO の産生が観察され、L-NAME で拮抗された。脾臓由来マクロファージと脳炎惹起 T 細胞を混合しノイロトロピンを作用させると T 細胞のアポトーシスが誘導され、これも L-NAME で拮抗された (図 2)。

3) C57BL6 マウスのタイラーウイルス性自己免疫性脳炎は雄でより高頻度に観察された。そこで、精巣摘出を行ったところ、脳炎はさらに高頻度となった。エストロゲン投与によりその頻度は低下した (図 3)。

4) ヒト脳由来蛋白質のドットプロット法により凝集 A β と結合するものを探索した。その結果、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の一つであるグリピカン 1 を見出した。グリピカン 1 はその糖鎖で A β を結合し、モノマーよりポリマーのほうがよく結合した。グリピカン 1 は A β の産生ドメインとされるラフトに局在し、A β 40、A β 42 のモノマー、ダイマー、ポリマーと一緒に回収された (図 4)。

5) ラットに慢性的に拘束水浸ストレスを加えると、うつ病に類似した行動異常、薬理的異常が認められた。即ち、DEX によるフィードバック機構は障害されていた。DEX を大脳局所に直接注入して血中コルチゾールの変化をみると、前頭前野ではフィードバック機構が障害されており、視床では保たれていた (図 5)。前頭前野に KCl を注入してドパミンとセロトニンの放出をみると、慢性ストレス負荷ラットではこれらニューロトランスマッターの著しい放出の低下が見られた。漢方薬 TJ-12 はこの低下を改善させた。

4. 考察

神経系・免疫系・内分泌系は相互に関連し生体の恒常性を維持している。強いストレスや感染症はしばしば自己免疫疾患の発症ないし再発を引き起こす。これは神経系が免疫系を調節しており、ストレスによりその機構に破たんをきたす為と考えられる。また、多発性硬化症やその動物モデルである EAE はよく回復するが、その回復着に神経系をしらべると浸潤 T 細胞の多くがアポトーシスに陥っていることが示されている。本研究者は神経系が炎症性サイトカインに反応し、T 細胞にアポトーシスを誘導する因子を放出することが脳炎からの回復に関与するのではないかとの仮説をたて、 γ インターフェロンにより誘導されるアストロサイト由来因子をスクリーニングしたところ、既知物質の SPARK と新規物質 G-7 を見出した。G-7 をミクログリアに発現させ脳に送り込むと EAE は抑制された。この物質は分泌蛋白であると思われる、それ自体あるいはそれを誘導する因子は自己免疫性脳炎の治療薬と成り得ると考えられる。また、ストレスを加えるとどのように変化するか興味をもたれる。

ノイロトロピンはワクシニアウイルスを家兔皮膚に接種し、その炎症組織から抽出した非蛋白性因子の混合物で、鎮痛薬として使用が許可されている。ノイロトロピンはオピオイド受容体に作用することで NK 細胞活性を調節し、EAE を抑制している一方、今回示したように、NO を介する抑制機序も明らかになった。ノイロトロピンは多面的な作用により自己免疫性脳炎を抑制すると考えられる。

アルツハイマー病の発症にストレスが関与していることを示す症例は稀ではない。また、戦争等のストレス体験の長さや海馬の萎縮の程度は比例するとの報告がある。これは一つには心理的ストレスによる内分泌を介するものであると思われる。もう一つは加齢とともに強くなる酸化ストレスが重要である。アルツハイマー病の中心的メカニズムにある A β は酸化ストレスを生じる一つの重要な因子であるとともに、小胞体ストレスも引き起こすことが分かっている。これまでは細胞の外からの作用が重視されてきたが、本研究者は細胞内の A β の蓄積が重要であると指摘してきた。今回、A β の産生部位とされるラフトに局在し、凝集 A β

を結合するグリピカン1を発見した。グリピカン1は凝集A β を捕捉し、細胞を酸化ストレスから保護しているのではないかと考えられる。今後更に研究し、その意義を明らかにしたい。

ラットの慢性ストレスはうつ状態を引き起こす。これは行動学的試験、薬理的試験により明らかである。これまでDEX抑制試験の欠如は視床下部・下垂体・副腎軸の障害と考えられたが、むしろ視床下部は正常に保たれ、前頭前野のレベルで起こっていることを初めて明らかにした。前頭前野ではKClによるドパミンやセロトニンの放出の低下が見られ、ストレスによる精神・神経障害の責任病巣は前頭前野である可能性が高くなってきた。抗うつ作用を示す漢方薬TJ-12はストレスによる前頭前野の障害を改善することが明らかになった。

5. 結論

- 1) 自己免疫性脳炎惹起T細胞にアポトーシスを誘導するアストロサイト由来新規物質を見出した。
- 2) ノイロトロピンはマクロファージのNO産生を介し、T細胞アポトーシスを誘導することでEAEを抑制することが分かった。
- 3) タイラーウイルス性自己免疫性脳炎には性差が見られ、内分泌系による複雑な監視機構が存在することが分かった。
- 4) 酸化ストレスを誘導し神経細胞死を引き起こす凝集A β を捕捉するHSPG、グリピカン1を見出した。
- 5) 慢性ストレスによるラットのうつ状態ではDEX抑制試験に欠如が見られ、それは前頭前野の異常によることが分かった。さらに、ストレス負荷ラットでは前頭前野のニューロトランスミッターの放出低下がみられ、漢方薬TJ-12はこれを改善することが明らかとなった。

6. 研究発表

- 1) Pal E, Tabira T, Kawano T, Taniguchi M, Miyake S, Yamamura T: Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V alpha 14 NK T cells. J Immunol. 2001;166:662-8.
- 2) Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Tabira T: Effect of chronic stress on cholinergic transmission in rat hippocampus. Brain Res. 2001;915(1):108-113.
- 3) Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Tabira T: Chronic stress impairs rotarod performance in rats: implications for depressive state. Pharmacol Biochem Behav. 2002;71(1-2):79-84.
- 4) 溝口和臣: ストレスと脳・内分泌の機能障害。神経研究の進歩 2001;45(6):917-23.
- 5) Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A, Koh CS, 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. 2001;166(3):2108-15.
- 6) Inaba Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, Kyogashima M, Sekiguchi Y, Nakamura S, Komiyama A,

Koh C: Plasma thrombin-antithrombin III complex is associated with the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurol Sci. 2001;185(2):89-93.

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし

図 1 .G-7, SPARKは脳炎惹起T細胞にアポトーシスを誘導
Apoptosis of PLP-reactive T cell lines

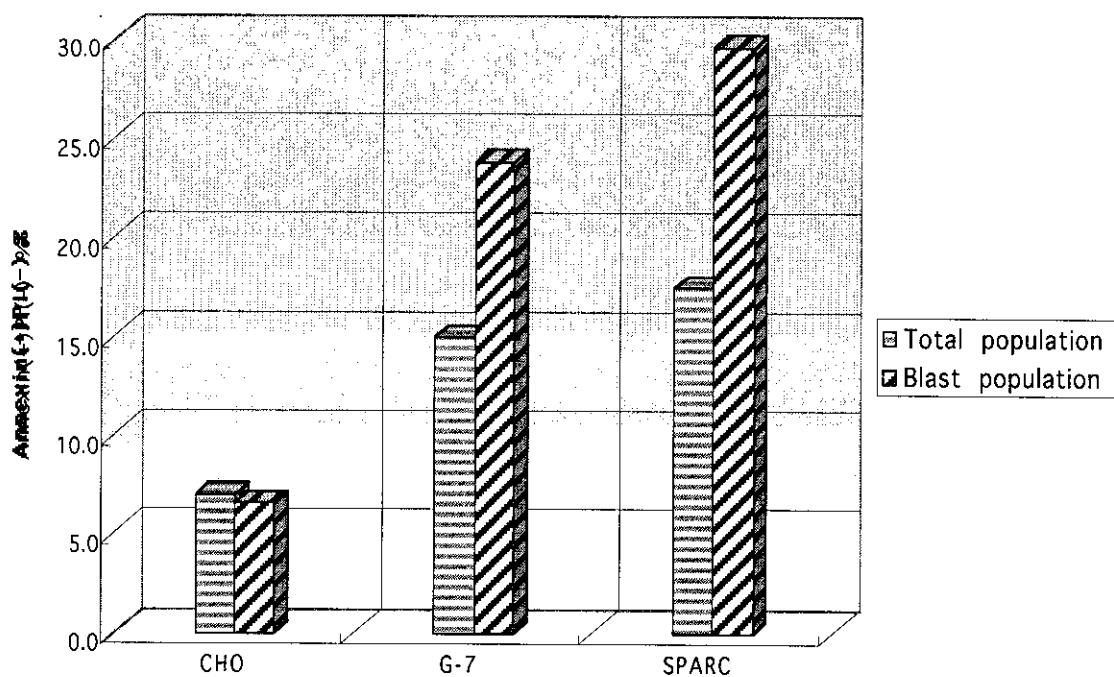


図2.マクロファージ産生NOによるT細胞のアポトーシス

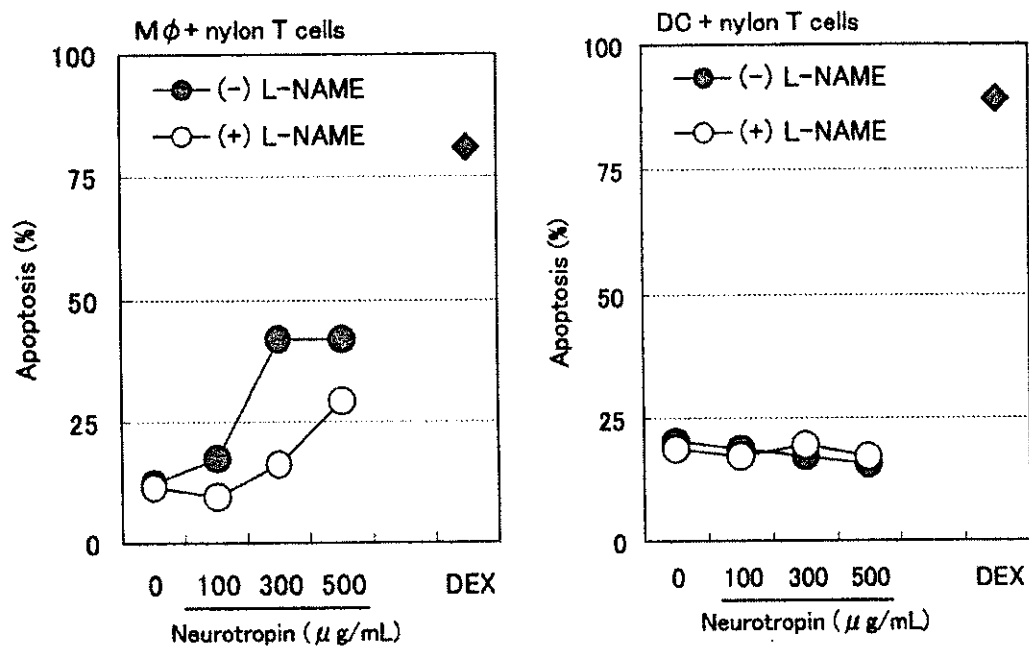


図3.精巣摘出はタイラーウイルス脳炎を増強し、エストロゲンはその増強効果を打ち消した。

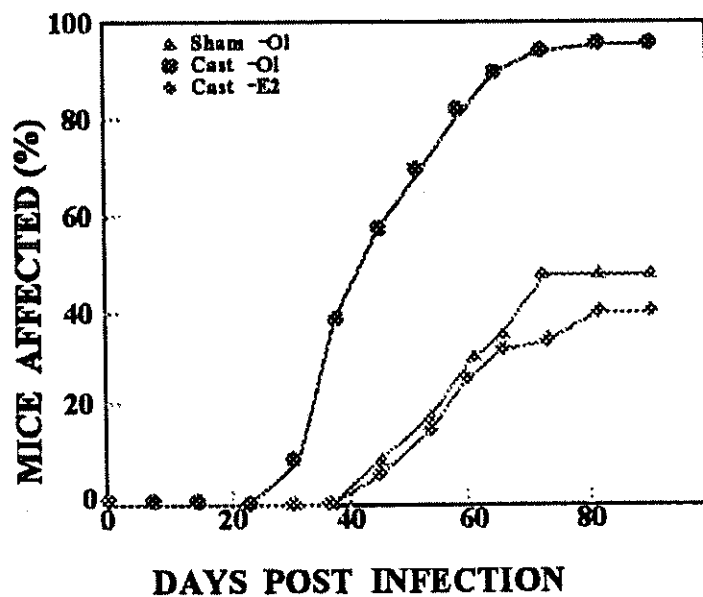


図4.グリピカン1, Aβ40, Aβ4はラフトに局在する

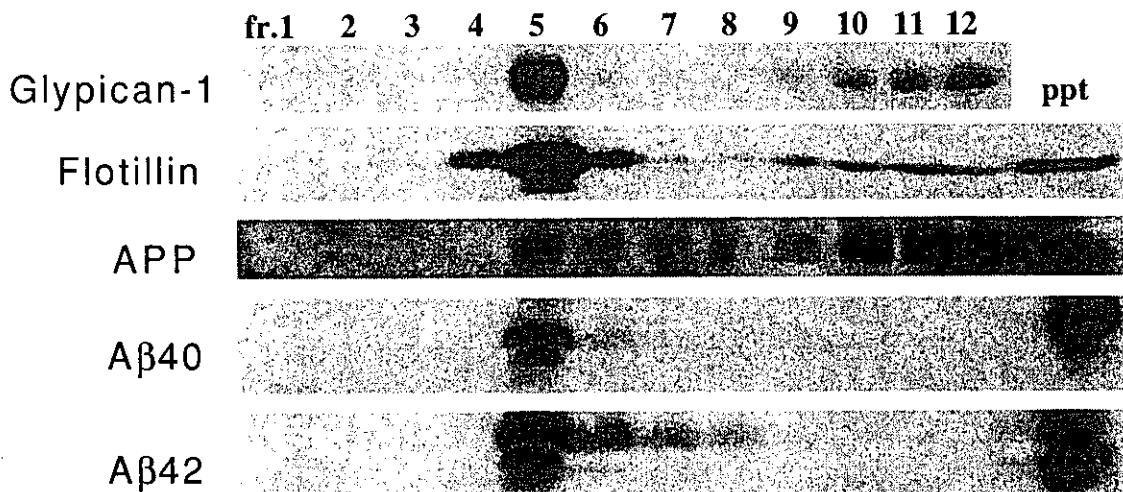
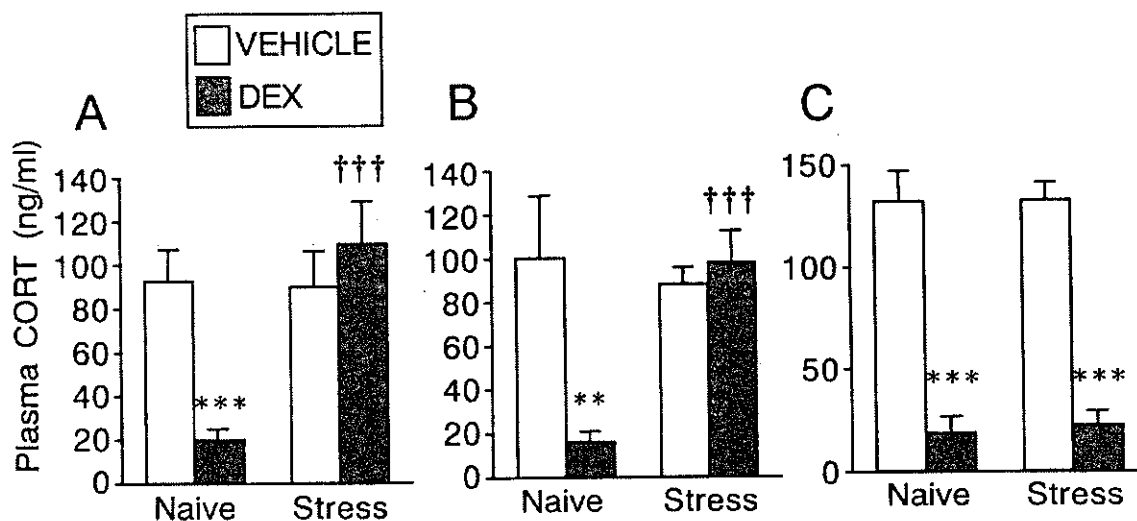


図5.DEXによるフィードバック機構はストレス負荷ラットの前頭前野(A), 海馬(B)で障害されており、視床下部(C)では保たれている。



平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10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