

## 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 国立療養所中部病院長寿医療研究センター  
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) 信州大学医学部           | 高 昌星 |

### 要 旨

新規蛋白 AdIF 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。造血器型プロスタグランジン D は自己免疫性脳炎の憎悪因子であることが分かった。ストレスによる精神・神経障害を緩和する漢方薬 TJ-12 の作用機序を明らかにした。

#### 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、神経・免疫・内分泌相関についてプロスタグランジンが深く関わっていることはよく知られているが、自己免疫性脳炎にどのように関わるかよく分かっていないので、この点を明らかにする。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 (EAE) 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 $\gamma$ 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し AdIF と命名した。こ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調べる。また、昆虫細胞を用いたリコンビナント蛋白を作成し、EAE 抑制作用を調べる。

## 2) ノイロトロピンの作用機序に関する研究

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出し、昨年の研究でNOを介する抑制機序を明らかにした。本年はラットにEAEを誘導し、腹腔マクロファージのサイトカイン産生に及ぼすノイロトロピンの作用、神経成長因子(NGF)に及ぼす影響を調べる。

## 3) 自己免疫疾患に及ぼすプロスタグランジンの影響の研究

NODマウスをミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質(MOG)で感作しEAEを誘導する。そのマウスの中枢神経系を用いて、リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(L-PGDS)及び造血器型プロスタグランジンD合成酵素(H-PGDS)について免疫組織学的に調べ、病気との関係を明らかにする。

## 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 $\beta$ 42の蓄積が関与していると推察される。A $\beta$ 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、それが高じるとカスパーゼが活性化され、神経細胞死が誘発されることが考えられる。そこで、カスパーゼにより切断されるアミロイド前駆体蛋白(APP)の遺伝子を構築し、その強発現細胞におけるAPPプロセッシングの変化、さらにA $\beta$ 分子種の同定を行い、神経細胞死との関連を明らかにする。

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調べる。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調べ、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。

## 3. 研究成果

1)  $\gamma$ インターフェロン刺激により誘導され、自己免疫性脳炎誘発性T細胞にアポトーシスを誘導するマウスアストロサイト由来遺伝子をdifferential display法により調べ、新規遺伝子を見出し、astrocyte-derived immune suppressor factor(AdIF)と命名した。AdIFは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。AdIF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、からのベクターを入れたものに比べ、AdIFを入れたものはEAEが抑制された。また、リコンビナント蛋白はPLP反応性T細胞の抗原特異的増殖反応を抑制し、アポトーシスを誘導した。

2) ノイロトロピンを投与するとEAEの軽症化が見られ、NOを介することが分かった。さらに腹腔由来マクロファージをノイロトロピンで刺激するとIFN- $\gamma$ 産生に影響を与えなかったが、IL-10産生を用量依存的に増強した。

さらに、ノイロトロピン投与ラット脊髄では対照に比し NGF の量が有意に高く、また、ノイロトロピンはアストロサイトからの NGF 産生を直接高める作用があることが分かった。

3) NOD マウスに MOG で EAE を誘導すると中枢神経系での L-PGDS、H-PGDS の発現は増強された。特に H-PGDS は病巣部で特に強く発現しており、ミクログリア/マクロファージが産生すると考えられた。

4) APP $\Delta$ C31 を安定的に発現する SH-SY5Y は分泌型 APP が増加した。A $\beta$  の分子種を調べると、A $\beta$  5-40/42 という新種の A $\beta$  が産生されていた。A $\beta$  5-40/42 は血管アミロイドに一致して沈着が見られた。

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ミ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、その回復期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。本研究者ら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、 $\gamma$ 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 AdIP を見出した。AdIP をミクログリア細胞株 Ra2 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、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。そこで、昆虫細胞を用いてリコンビナント蛋白を作成したところ、自己免疫性脳炎誘発 T 細胞の抗原特異的増殖反応は抑制された。今後、これが *in vivo* で EAE を抑制するか否かを調べる予定である。

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非核酸性因子の混合物で、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。又、昨年は NO を介する抑制機序を明らかにし、今年度の研究で、IL-10 の産生増強、NGF の産生増強作用が明らかになり、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 $\beta$  は酸化ストレスを生じる一つの重要な因子である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、本研究者らは細胞内の A $\beta$ 42 の蓄積が重要であると指摘してきた。今回、カスパーゼが活性化されるときに生じる APP $\Delta$ C31 から A $\beta$  5-40/42 という新種の A $\beta$  が産生され血管アミロイドーシスを生じることが明らかになった。従

って ER ストレスの関与も加わることになる。

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従来の抗うつ薬とは異なる作用点で改善することが明らかになった。

## 5. まとめ

- 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 AdIF を見出し、*in vitro*、*in vivo* でその作用を確認した。
- 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。また、IL-10 の産生増強、NGF の産生増強による作用も明らかとなった。
- 3) 自己免疫性脳炎の病態形成に造血器型プロスタグランジン D2 が憎悪因子として作用することが分かった。
- 4) カスパーゼの活性化は新種の A $\beta$  を産生し、アミロイドアンジオパシーを生じることが分かった。
- 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

Tabira T, Chui DH, Kuroda S. Significance of intracellular Abeta42 accumulation in Alzheimer's disease. *Front Biosci.* 7: a44-9, 2002

Tabira T, Chui de H, Nakayama H, Kuroda S, Shibuya M. Alzheimer's disease with spastic paresis and cotton wool type plaques. *J Neurosci Res.* 70: 367-72, 2002 Review

Pal E, Tabira T. Autonomic regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: the role of interferon-gamma. *Neuroimmunomodulation.* 2002-2003;10 (2) :80-4

Mizoguchi K, Yuzurihara M, Nagata M, Ishige A, Sasaki H, Tabira T. Dopamine-receptor stimulation in the prefrontal cortex ameliorates stress-induced rotarod impairment. *Pharmacol Biochem Behav.* 72: 723-8, 2002

Mizoguchi K, Yuzurihara M, Nagata M, Ishige A, Sasaki H, Tabira T. Saiko-ka-ryukotsu-borei-to, an herbal medicine, prevents chronic stress-induced disruption of glucocorticoid negative feedback in rats. *Life Sci.* 72: 67-77, 2002

Mizoguchi K, Yuzurihara M, Nagata M, Ishige A, Sasaki H, Tabira T. Chronic stress impairs rotarod performance in rats: implications for depressive state. *Pharmacol Biochem Behav.*

71: 79-84, 2002

Kim BS, Fuller AC, Koh CS: Cytokines, chemokines and adhesion molecules in TMEV-IDD. Chapter 7, pp 1-13, "Multiple Sclerosis" 2002

Okumura N, Terasawa F, Fujita K, Fujihara N, Tozuka M, Koh CS. Evidence that heterodimers exist in the fibrinogen Matsumoto II (gamma308N-->K) proband and participate in fibrin fiber formation. Thromb Res. 107: 157-62, 2002

Shin T, Ahn M, Moon C, Jee Y, Wie MB, Shin YG, and Koh CS. An inhibitor of both cyclooxygenases and 5-lipoxygenase ameliorates rat paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing its target enzymes. Mult Scler. 2003 (in press)

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