

平成15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

# 目 次

課題番号

<p>20030895A KH21009</p>	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
<p>896A KH21010</p>	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
<p>897A KH21011</p>	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19
<p>898A KH21012</p>	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
<p>899A KH21013</p>	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
<p>900A KH21014</p>	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 …… 39
<p>901A KH21015</p>	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
<p>902A KH21016</p>	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
<p>903A KH21017</p>	肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 …… 55
<p>904A KH21018</p>	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 …… 59
<p>905A KH21019</p>	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
<p>906A KH21020</p>	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
<p>907A KH21021</p>	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
<p>908A KH21022</p>	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
<p>909A KH21024</p>	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 …… 89
<p>910A KH21025</p>	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
<p>911A KH21026</p>	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 …… 104
<p>912A KH21027</p>	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 …… 111
<p>913A KH22071</p>	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
<p>914A KH22072</p>	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
<p>915A KH22073</p>	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 …… 125
<p>916A KH22082</p>	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

## 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 国立長寿医療センター研究所

研究者 田平 武

研究要旨 新規蛋白 AdIF のリコンビナント蛋白は自己免疫性脳炎惹起性 (EAE) を抑制した。ノイロトロピンはアストロサイトの IL-10 産生を増強し、慢性再発性 EAE を抑制した。アラキドン酸代謝物は自己免疫性脳炎の憎悪因子であることが分かった。ストレスによるうつ状態を漢方薬 TJ-12 はセロトニン再取込み阻害剤とは異なる機序で改善した。

### 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

### 1. 研究目的

神経系・免疫系と内分泌系は密接な関連をもち、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生物活性物質の中から探索する。また、神経・免疫・内分泌相関についてプロスタグランジンやアラキドン酸代謝物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、とくにうつ状態及び痴呆の発症機構を解析し、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 法により発現が増減す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たところ、新規物質が得られ、astrocyte-derived immune suppressor factor (AdIF) と命名した。この遺伝子を昆虫細胞発現ベクターに組み込み、シュナイダー細胞を用いて、リコンビナント蛋白を得、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。

#### 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非蛋白非核酸性抽出物であり、オピオイド受容体を介して鎮痛作用を有する。

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DAラットに慢性再発性EAEを誘導し、ノイロトロピンの効果を調べるとともに、アストロサイトのサイトカイン産生に及ぼすノイロトロピンの作用を調べる。

### 3) 自己免疫疾患に及ぼす炎症性メディエーターの影響の研究

Lewisラットをラット脊髄とフロイド完全アジュバントで感作しEAEを誘導する。そのマウスの中枢神経系を用いて、cyclooxygenase-1 (COX-1)、cyclooxygenase-2 (COX-2)、5-lipoxygenase (5-LOX)に特異的な抗体を用いてWestern blot法及び免疫組織化学的に調べ、病気との関係を明らかにする。また、COX、5-LOXに特異的な阻害剤phenidone 200 mg/kgを感作7日後から感作前日まで経口投与し、その効果を調べる。

### 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の蓄積によるストレスが関与していると推察される。本年度はPS1、PS2を強制発現する神経細胞株を樹立し、Western blot法により細胞内A $\beta$ 42を半定量的に測定する。

Wistarラットに拘束水浸ストレスを慢性負荷し、うつ状態を作成し、その機序を明らかにする。うつ病ではdexamethasone (DEX)による血中コルチゾンの抑制試験が起こらないことが知られているがその機序は十分明らかでない。昨年その責任病巣を明らかにする為に大脳局所にDEXを注射し、前頭前野に異常があること、それは細胞質のグルココルチコイド受容体の低下が関与すること、KCl注入によるドパミン、セロトニンの放出が不十分であることを見出した。本年度はこの系

を用いて漢方薬TJ-12の薬理作用を明らかにする。また、ストレスによるうつ状態発症の分子機序を明らかにし、バイオマーカーを探索する為に、ゲノミクス、プロテオミクス解析の系を立ち上げる。

(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。また、ヒトでの解析は施設の倫理委員会の承諾を得て行った。

## 3. 研究成果

1) 昆虫細胞で作ったリコンビナントマウスAdIF 100 $\mu$ gを感作7日後に1回だけ腹腔内及び静脈内に投与したところ、MOG感作によるEAEは有意に抑制された。また、脾細胞のサイトカインパターンを調べると、Th1からTh2へシフトしていた。

2) これまでの研究でノイロトロピンを投与するとLewisラットの急性EAEの軽症化が見られ、NOを介することが分かった。本年度はDAラットの慢性再発性EAEも抑制することを見出し、アストロサイトのIL-10産生増強を介することを明らかにした。

3) Lewisラットを脊髄で感作しEAEを誘導すると急性期中枢神経系でのCOX-1、COX-2、5-LOXの発現増強が観察された。回復期には減少した。phenidone投与ラットではEAEの軽症化が観察された。

4) 変異PS1、PS2を安定的に発現するSH-SY5Y細胞株は細胞内A $\beta$ 42の蓄積が2-9倍増加した。

5) ラットに慢性的に拘束水浸ストレスを加えると、うつ状態が惹起され、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、前頭前野のフィードバック機構が障害されていた。これは、細胞質内グルココルチコイド受容体の減少が関与していた。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 は前頭前野のグルココルチコイドの減少、DEX によるフィードバック、KC1 によるトランスミッターの放出のすべてを改善したが、トラゾドンは後 2 者のみ改善した。

6) 慢性ストレス負荷によりうつ状態を誘導したラット前頭前野より mRNA を抽出し、gene chip を用いて網羅的解析を開始した。また、ストレス負荷の大きい人を選択し、血液を用いて、対照との間で二次元電気泳動による比較を行い、バイオマーカーの探索を開始した。

#### 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、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 AdIF を見出した。そこで、昆虫細胞を用いてリコンビナント AdIF 蛋白を作成し投与したところ、自己免疫性脳炎は抑制された。また、脾細胞のサイトカイン産生パターンは Th1 から Th2 へシフトしていた。これは Th1 タイプ T 細胞がより強く AdIF によりアポトーシスを起こす為ではないかと思われる。今後、AdIF が EAE 発症後にも有効であるか否かを検討する必要がある。

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、鎮痛薬としてヒトでの使用が認可されている。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、急性 EAE を抑制することがこれまでの研究で分かっている。昨年は NO を介する抑制機序を明らかにした。今年度の研究で、慢性再発性 EAE も抑制することが分かり、多発性硬化症にも有効である可能性が見えてきた。その機序として、アストロサイトの IL-10 の産生増強が明らかになり、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。

ラット EAE の急性期には COX-1、COX-2、5-LOX の発現増強が見られ、phenidone 投与で EAE の軽症化が見られたことより、EAE 発症にこれらの炎症性メディエーターの関与があることが分かった。今後、多発性硬化症等の自己免疫性脳炎の治療薬となるか否かを検討する必要がある。

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 Aβ 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 Aβ42 の蓄積が重要であると指摘してきた。今回、変異プレセニリンが神経細胞内 Aβ42 の蓄積増加をひき起こし、酸化ストレスを生じる可能性があることが分かった。

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。実際慢性ストレス負荷ラットではうつ病患者に特徴とされる DEX 抑制試験が異常であった。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 KC1 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。三環系抗うつ薬及びセロトニン再取り込み阻害薬はニューロトランスミッター放出の改善を示したが、DEX 抑制試験は改善しなかった。これに対し、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すべて改善し、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、そのリコンビナント蛋白が EAE を抑制することを見出した。
- 2) ノイロトロピンは慢性再発性 EAE も抑制することが分かった。ノイロトロピンはアストロサイトの IL-10 を産生増強した。
- 3) 自己免疫性脳炎の病態形成にアラキドン酸代謝物が増悪因子として作用することが分かった。
- 4) PS1、PS2 の変異は細胞内 A $\beta$ 42 の蓄積を起こし、酸化ストレスを生じる可能性のあることが分かった。
- 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、それは前頭前野のグルココルチコイド受容体の低下によること、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ること、漢方薬 TJ-12 はこれらすべてを改善することが明らかとなった。

## 6. 研究発表

Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Aburada M, Tabira T. Saiko-ka-ryukotsu-borei-to, a herbal medicine, ameliorates chronic stress-induced depressive state in rotarod performance. *Pharmacol Biochem Behav* 75: 419-25, 2003.

Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119: 887-97, 2003.

Tabira T. Alzheimer's disease: mechanisms and development of therapeutic strategies. *Geriatrics and Gerontology International* 3: 175-188, 2003.

Takeda K, Wataru A, Tabira T: Enhanced generation of intracellular A $\beta$ 42 amyloid peptide by mutation of presenilins PS1 and PS2. *Eur J Neurosci* 19: 258-264, 2004.

Watanabe N, Araki W, Chui DH, Makifuchi T, Ihara Y, Tabira T. Glypican-1 as an A $\beta$  binding HSPG in the human brain: Its localization in DIG domains and possible roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2004 (in press)

Shin T, Ahn M, Moon C, Jee Y, Wie MB, Shin YG, Koh CS. An inhibitor of both cyclooxygenases and 5-lipoxygenase ameliorates rat paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing its target enzymes. *Mulr Scle*. 2004 (in press)

## 7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許 AdIF について出願予定

- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし

---

平成15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16年9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