

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第 1 分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）

所 属 国立長寿医療センター研究所

研究者 田平 武

研究期間 平成16年4月～平成18年3月

研究要旨 慢性ストレスによるうつ病様病態に関わると思われる遺伝子を10数個に絞込み、タンパク質の網羅的解析法を確立した。前頭前野特異的にグルココルチコイド受容体をノックダウンする系を確立した。慢性ストレスはウイルス性脱髄性脳炎のTh1シフトを起こした。

分担研究者

- (1) 国立長寿医療センター研究所老年病研究部
溝口和臣
- (2) 信州大学医学部 高 昌星
- (3) 株式会社ツムラ研究開発本部中央研究所
譲原光利

A. 研究目的

ストレス社会と言われる今日において、うつ病に代表される精神神経疾患が年々増加している。既にある抗うつ薬はうつ病の治療に一定の成果を収めているが、難治性うつ病の問題や高率に発生する再発の問題は未だ解決されていない。

難治性うつ病患者や再発を繰り返す患者の多くに、視床下部-下垂体-副腎皮質系（HPA axis）の脱抑制（グルココルチコイドによるネガティブフィードバック反応の減弱）が観察され、これがうつ病の本質的原因を表現している可能性が疑われている。しかし、HPA axisの脱抑制を直接改善する抗うつ薬はない。一方、うつ症状の脳内責任部位に関しては、脳内で意欲や集中力、認知機能に重要な役割を担う前頭前野の機能低下が注目されている。

これまでに我々は、慢性ストレス負荷動物のうつ病様病態に対する一連の解析結果から、「慢性ストレス負荷により、前頭前野や海馬におけるグルココルチコイド受容体（GR）を介した反応が減弱し、その結果として、HPA axisの脱抑制状態が発生すると共に、前頭前野に関してはドーパミンやセロトニン神経の機能が低下する。そして、この機能低下に基づいて作業記憶障害や抑うつ状態が発生する」という新たな仮説を提唱するに至った。さらにこの仮説は、漢方方剤の一つである柴胡加竜骨牡蛎湯（TJ-12）を用いた検討から、薬理的に裏付けられると共に、TJ-12の新規抗うつ作用が明らかとなった。

以上の成果を踏まえ我々は、慢性ストレスによるうつ病様病態発生機構とTJ-12の作用機構を分子レベルで解明することを計画した。即ち、前頭前野において、以下の条件を満たす遺伝子がうつ病様病態発生機構に関与している可能性を考えた。①慢性ストレス負荷により発現が増加あるいは減少する、②副腎摘出（ADX）により内因性グルココルチコイドを除去し、GR以降の反応を遮断しても、慢性ストレス負荷の場合と同様の挙動を示す、③ADXによ

る発現の増減は、生理学的範囲内のコルチコステロン (CORT) 投与によりノーマライズされる、④慢性ストレス負荷による発現の増減は TJ-12 によりノーマライズされる。本研究の目的の一つは、慢性ストレスによるうつ病様病態発生病機構を分子レベルで解明すべく、上記①～④の条件を満たす遺伝子を見出すことにある。この目的のために、DNA チップを用いて遺伝子の発現を網羅的に解析し、上記の条件を満たす遺伝子の単離を試みた。また、上述した仮説の検証のために、前頭前野に依存した認知機能や意欲における GR の役割を明確にすることも目的に加えた。

また、タンパクレベルからのアプローチとして、TOF-MS およびナノ LC-MS/MS 解析システムの確立を試み、ストレスのバイオマーカー探索を目指した。

これら神経-内分泌連関の研究をさらに発展させることを目的として、新たに免疫系に着目し、神経-免疫-内分泌連関の研究も以下のごとく実施した。タイラー脳脊髄炎ウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus: TMEV) 誘導による脱髄疾患 (TMEV-IDD) は中枢神経系の炎症性脱髄疾患であり、慢性進行性多発性硬化症 (MS) の動物実験モデルとしてよく知られている。また、MS においては種々のストレスが MS の増悪、再発の危険因子 (リスクファクター) になることがよく知られている。肉体的または精神心理的ストレスは MS 患者の臨床症状を増悪させ、障害の程度を悪化させ、認知機能を増悪し、脳病変の重症度を増大させると考えられている。ストレスが免疫系に及ぼす効果はストレスのタイプとその期間に依存している。今回、我々は拘束性ストレスが及ぼす TMEV-IDD に及ぼす効果をサイトカインおよび副腎皮質ステロイドホルモンの二面から検討した。

B. 研究方法

1. 慢性ストレス負荷、ADX、および漢方薬の投与
Wistar 系雄性ラット (日本クレア、300~350 g) に 1 日 2 時間の水浸拘束ストレスを 4 週間連続的

に負荷することにより慢性ストレスとした。別の動物に両側副腎摘出 (ADX) を施し、3 週間飼育した。一部の ADX 動物には背部皮下に CORT ペレット (100 mg) を埋め込んだ。TJ-12 (1000 mg/kg) はストレス負荷期間中 1 日 1 回経口投与した。

2. 遺伝子解析

上述した全ての処置終了後、前頭前野と海馬より total RNA を抽出し、DNA チップ解析に用いた。DNA チップには、CodeLink UniSet Rat1 と Agilent rat cDNA microarray を用いた。得られた結果から、目的の項で述べた条件を満たす遺伝子を絞り込んだ。その後、それぞれの遺伝子について特異的なプライマーを作製し、real time RT-PCR を行い、mRNA の発現量を定量した。

3. 前頭前野 GR の siRNA によるノックダウン

ラット GR に特異的な siRNA を 3 種デザインし、これらの siRNA を発現するアデノウイルスベクターを作製した。ノックダウン効果のチェックは C6 glioma を使って in vitro で行った。GR 量の変化は Western blot 法にて解析した。また、レポーター遺伝子として β -galactosidase をさらに接続したアデノウイルスベクターも作製した。

ラットの頭部前野に 3 種のアデノウイルスベクターを注入した。その後、ノックダウン効果が認められたものについて、経日変化を解析した。

4. プロテオーム解析系の構築

髄液を二次元電気泳動法により分離し、その後の TOF-MS 解析が可能な銀染色の条件を検討した。さらに、より高感度な系としてナノ LC-MS/MS 解析を検討した。

5. タイラー脳脊髄炎ウイルスによる脱髄の惹起と慢性ストレス負荷

5~6 週齢の雌 SJL/J マウス脳内に BeAN8386 株のタイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) を右脳内に接種し、TMEV-IDD を作成した。タイラーウイルス接種後、換気環境が良好な内径 2.7cm、長さ 14cm のプラスチックチューブに毎日 8 時間、週 5 日間、4 週間安置した。接種後、毎日臨床症状を観察しスコ

ア一化した。また、タイラーウイルス接種前後で経時的に血清中のサイトカインおよび CORT 濃度を測定した。

6. 倫理面への配慮

全ての動物実験は、国立長寿医療センターあるいは信州大学の動物実験倫理委員会の承認を得て、動物愛護の精神に則り、行なわれた。ヒト髄液は倫理委員会の承認を得てインフォームドコンセントをとって収集されるものを用いた。

C. 研究成果

1. 前頭前野および海馬における遺伝子発現

前頭前野あるいは海馬（以下の括弧内の数字）における遺伝子発現を解析した結果、正常動物と比較して、慢性ストレスにより増加した遺伝子数は 1124 個（1759 個）、減少は 4225 個（5466 個）であった。これらの内、ADX 動物と同じ挙動を示した遺伝子はそれぞれ 464 個（766 個）、2999 個（3215 個）であり、CORT の補充により発現の増減がノーマライズされた遺伝子は 153 個（368 個）、537 個（908 個）であった。さらにこれらの内、TJ-12 投与によりノーマライズされた遺伝子はそれぞれ 95 個（211 個）、243 個（357 個）であった。

前頭前野において絞り込まれた遺伝子発現の増減を real time RT-PCR 法にて解析した結果、現時点で 10 数種類の遺伝子発現の変化を確認した。

2. 前頭前野の GR ノックダウン系

ラット GR に対する 3 種の siRNA を発現するアデノウイルスベクターをラットの前頭前野内に接種し、その後 1 週間で GR のタンパク量を Western blot 法にて解析した結果、2 種の siRNA でおおよそ 60% のノックダウン効果が認められた。ノックダウン効果はおおよそ 2 週間持続した。また、 β -galactosidase は前頭前野に局限して発現していた。

3. プロテオーム解析系の確立

主たるタンパク質を TOF-MS 解析をするための銀染色の条件が確立出来た。しかし、微量タンパク質やペプチドでは別の条件設定が必要となった。

め、より高感度のナノ LC-MS/MS 解析を行った。この方法により、1 回に 10,000 個以上のタンパク質が半定量的に同定できるようになったが、nM オーダーのタンパク質の検出は出来なかった。

4. TMEV-IDD に及ぼす拘束ストレスの影響と血中サイトカインおよび CORT レベル

拘束性ストレス群では対象群に比し、TMEV-IDD の発症率が増加し、その臨床症状も重症化する傾向がみられた。Th1 系のサイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α 、interferon- γ および interleukin (IL)-4 は拘束性ストレス群では対照群に比し血清中で増加傾向を示したが、Th2 系サイトカインである IL-10 は拘束性ストレス群では低下傾向を示した。血清中の CORT は拘束性ストレス群では拘束期間中を通じて対照群に比し有意 (** $p < 0.01$) に増加した。また拘束終了後、拘束性ストレス群の上昇した CORT は対照群マウスと同レベルまで低下した。

D. 考察

うつ病などの精神神経疾患に対する原因遺伝子の単離は、幾つかの大変興味深い報告はあるものの、未だ成功していない。それだけ、うつ病は複雑であることを物語っていると思われるが、今後、DNA チップ法等を用い、原因遺伝子が単離される期待も高まっている。ただしそのためには、明確な病態発生理論が重要となる。

今回、DNA チップを用いた網羅的解析結果を、目的の項で述べたユニークな理論に則って絞り込んだ結果、前頭前野で発現が増減していた遺伝子数は 338 個、海馬では 568 個のうち病関連候補遺伝子がピックアップされた。その後、RT-PCR 法を用いて解析したところ、5-HT₂ 受容体や glucose transporter を含めた 10 数種類の遺伝子が見出された。5-HT₂ 受容体に関する結果は、うつ病患者の脳においても 5-HT₂ 受容体が増加しているとの臨床報告、あるいは、本慢性ストレス負荷ラットの抑うつ状態が、5-HT₂ 受容体アンタゴニスト作用を持つ抗うつ

薬 (trazodone) により改善されるという以前の研究結果とよく一致する。

Glucose transporter は細胞内にエネルギー源を供給するという重要な役割を果たす。特に脳は、glucose 要求性が他臓器と比べて格段に高く、神経細胞における glucose 利用率の低下は様々な神経機能の低下ばかりでなく、器質障害の原因にもなる可能性が指摘されている。事実、うつ病患者の前頭前野において glucose の利用率が低下していることが報告されており、器質障害が発生していることが疑われている。これらの知見と今回の結果を考えると、うつ病の発症機構には glucose 由来のエネルギー不足に基づく細胞機能低下が関与し、TJ-12 はそのエネルギー不足を改善することにより機能低下を改善する可能性が考えられた。

今回見出された遺伝子は、HPA axis の脱抑制と関連している可能性が考えられる。HPA axis の脱抑制がうつ病の本質的原因を表現している可能性が指摘されていることから、今回の遺伝子はうつ病の本質的原因に迫れる可能性を秘めている。

また一方で、本研究では siRNA を発現するアデノウイルスベクターにより前頭前野に局限して GR をノックダウンすることに成功した。今後はこの GR ノックダウン動物の認知機能や抑うつ状態などの行動学的解析に加え、神経内分泌学および神経化学的解析を行う予定である。なお、このノックダウン系は上述した遺伝子の機能解析にも応用可能な優れた技術であるため、今後応用を図る。

タンパクレベルからのアプローチに関しては、極微量タンパク質解析のためには更なる高感度化が必要であったが、多数の主要タンパク質を一度に同定できる解析系を確立することに成功した。この方法は応用範囲が広いため、様々な用途に使用可能となった。

また我々は、研究をさらに発展させるために免疫系に着目し、慢性ストレスが神経-免疫-内分泌関連に及ぼす影響を解明することも試みた。そのため

に、TMEV-IDD モデルを確立し、解析に用いた結果、

TMEV-IDD は拘束性ストレス群では対照群に比し増加し、その臨床症状も重症化する傾向にあることを見出した。この機構は、拘束性ストレスにより Th1 系サイトカインが増強され、Th2 系サイトカインが抑制されることであると示唆された。また血中 CORT は、拘束期間中は著明に増加したが、拘束期間終了後は元のレベルにまで低下した。以上より慢性拘束性ストレスは TMEV 誘導による TMEV-IDD を増悪させることが明らかとなった。このことは慢性拘束性ストレスのようなストレスが MS を再発・増悪させる危険因子であることを示唆するものと考えられる。

E. 結論

慢性ストレスによるうつ病様病態の発生に関わると思われる 10 数種類の候補遺伝子を見出すことに成功した。また、siRNA を用いて、前頭前野の GR をノックダウンする系の開発に成功した。タンパクレベルからのアプローチとして、プロテオーム解析方法を確立した。さらに、慢性拘束性ストレスは、TMEV 誘導による TMEV-IDD を増悪させる因子であり、サイトカインの Th1 シフトが起こることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizoguchi K, Ishige A, Takeda S, Aburada M, Tabira T. Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. *J. Neurosci.* 24, 5492-5499, 2004.
- 2) Moon C, Ahn M, Jee Y, Heo S, Kim S, Kim H, Sim KB, Koh CS, Shin YG, Shin T. Sodium salicylate-induced amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is associated with the suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenases. *Neurosci. Lett.* 356, 123-126, 2004.

- 3) Shin T, Koh CS. Immunohistochemical detection of osteopontin in the spinal cords of mice with Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *Neurosci. Lett.* 356, 72-74, 2004.
 - 4) Ahn M, Moon C, Lee Y, Koh CS, Kohyama K, Tanuma N, Matsumoto Y, Kim HM, Kim SR, Shin T. Activation of extracellular signal-regulated kinases in the sciatic nerves of rats with experimental autoimmune neuritis. *Neurosci. Lett.* 372, 57-61, 2004.
 - 5) Ahn M, Lee Y, Moon C, Jin JK, Matsumoto Y, Koh CS, Kim HM, Shin T. Upregulation of osteopontin in Schwann cells of the sciatic nerves of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis. *Neurosci. Lett.* 372, 137-141, 2004.
 - 6) Nakayama K, Nagase K, Tokutake K, Koh CS, Hiratochi M, Ohkawara T, Nakayama N. POU-binding motifs, recognized by tissue-specific nuclear factors, are important for Dll1 gene expression in neural stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 991-996, 2004.
 - 7) Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 163: 24-30, 2005.
 - 8) Moon C, Ahn M, Wie MB, Kim HM, Koh CS, Hong SC, Kim MD, Tanuma N, Matsumoto Y, Shin T. Phenidone, a dual inhibitor of cyclooxygenases and lipoxygenases, ameliorates rat paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing its target enzymes. *Brain Res.* 103, 206-210, 2005.
 - 9) Moon C, Ahn M, Kim HM, Lee Y, Koh CS, Matsumoto Y, Shin T. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the early and peak phases of autoimmune neuritis in rat sciatic nerves. *Brain Res.* 1040, 208-213, 2005.
 - 10) Mirshafiey A, Rehm B, Cuzzocrea S, Matsuo H, Mazzon E, Nakane S, Koh C-S, Miyoshi S. M2000, Foundation of a New Generation Among NSAIDs. *Letters in Drug Design & Discovery*, Volume 2, Number 5, August 2005, pp. 412-423(12)
 - 11) Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh C-S, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential role of MDA5 and RIG-I in the recognition of RNA viruses. *Nature* (in press)
 - 12) Kim H, Ahn M, Lee J, Moon C, Matsumoto Y, Koh C-S, Shin T. Increased phosphorylation of caveolin-1 in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett*, (in press)
 - 13) 溝口和臣. 慢性ストレスによるうつ病様病態の分子メカニズムと漢方. *Dementia Japan* 18, 245-251, 2004.
 - 14) 溝口和臣. 脳・内分泌連関に見出された漢方方剤の抗うつ作用. *心身医学* 44 (Suppl.), 77, 2004.
2. 学会発表
- 1) 第45回日本心身医学会総会 溝口和臣 トピックス 平成16年6月 福岡
 - 2) 第25回富山医科薬科大学和漢薬研究所特別セミナー 溝口和臣 平成16年10月 富山
 - 3) 第9回神経伝達物質研究会 溝口和臣 平成17年9月10日 東京
 - 4) 千里ライフサイエンスセミナーブレインサイエンスシリーズ第18回 溝口和臣 平成17年10月 大阪
- G. 知的所有権の出願・登録状況
なし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31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