

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

HS研究

第1分野

課題番号

KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告）	西田基宏	……	1
KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（平成17年度報告）	西田基宏	……	6
KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二	……	10

第2分野

KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先	……	15
KH23304	Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生	……	22
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦	……	27
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇	……	34
KH23331	寄生性原虫の生育に必要な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子	……	39

第3分野

KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太	……	47
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル	……	55
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一	……	60
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディの基礎的および応用的研究	川上浩司	……	65

第5分野

KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳	……	69
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴	……	74
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介	……	84

KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 89
KH53333	治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 94
エイズ研究		
第1分野		
KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明	藤室雅弘 …… 99

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用

所属 国立感染症研究所 ウイルス第一部
研究者 中道 一生

研究要旨 新たに確立したミクログリア培養系を基盤として、炎症応答(シグナル伝達と遺伝子発現、細胞骨格の再構築、形態変化)を多面的に解析するための試験系を確立した。この試験系がミクログリアを指向する脳炎治療薬の大規模探索において有用であることを示した。

A. 研究目的

血液脳関門は病原体や有害物質に対する物理的防壁として機能するだけでなく、末梢から脳実質への細胞遊走をも遮断する。多種類の白血球が混在する末梢組織とは対照的に、脳特有の閉鎖環境における免疫システムでは、常在型のマクロファージ様細胞であるミクログリアが中心的かつ多彩な役割を担う。健康な組織において、ミクログリアは突起を張り巡らせた形態をとり、脳局所での異常や病原体感染を監視するセンサーとして機能する。脳に損傷や疾患、ウイルス感染等が生じた場合、ミクログリアはアメーバ状の活性型細胞へとトランスフォームすることで変性細胞を食食するほか、表面抗原やサイトカイン、酵素、神経保護因子等を高発現する。

近年、ミクログリアが脳の恒常性維持や防御免疫において必須の存在である一方、慢性的かつ過剰な活性化は神経細胞等のダメージを誘発し、様々な神経疾患を引き起こすことが報告されている。これらの知見は、ミクログリアの活性化を一時的に抑制する薬剤が脳疾患治療薬として有効であることを意味する。以上の背景から、本研究は「ミクログリアの炎症応答の分子メカニズムを基盤として、細胞活性化を迅速かつ簡便に測定するための試験系を確立し、脳炎治療薬の探索技術として応用すること」を目的とする。

大規模薬剤探索を目的としたミクログリア活性化試験系を確立する上での課題として、①安価でロット差がなく、しかも脳内において実際にミクログリアを活性化する物質が限られている、②脳からミクログリアを分離する作業には時間と労力を要し、得られる細胞数にも限界がある、③単独では細胞増殖がみられず、維持にはフィーダー細胞やサイトカインを要する、④正常ミクログリアの性質を再現する株化細胞モデルが少ない、等

が挙げられる。本研究では上記①を充たす活性化物質として二本鎖RNA [dsRNA：ウイルス感染において産生される普遍的分子構造であり、Toll様受容体3(TLR3)を介して細胞を強力に活性化する]を用いた。また、ミクログリア培養における上記②から④の課題を解決するため、新たに樹立したミクログリア細胞株の性状解析を行った。平成17年度では、前年度の研究で得られたミクログリアの活性化プロファイルを基盤としてMG6細胞(大規模培養が可能な新規ミクログリア細胞株)の性状解析を行い、抗炎症剤の探索ツールとしての有用性を調べた。

B. 研究方法

1. 細胞：

マウス正常脳に由来するミクログリア細胞株MG6を用いた。MG6細胞は増殖能欠損型レトロウイルスベクターを用いてc-myc遺伝子を重複導入することで樹立した細胞株であり、一般的な細胞培養条件下において自立的に増殖する。これまでの研究の結果、MG6細胞は初代培養ミクログリアと類似した食食能や抗原発現パターンを示すことが分かっている。

2. 細胞の形態観察：

MG6細胞を低栄養培地にて12時間培養した後、合成dsRNAである polyinosinic-poly cytidylic acid [poly(I:C)]を用いて刺激した。位相差顕微鏡を用いて細胞形態を経時的に観察した。

3. 細胞骨格構造の観察：

低栄養培地にて培養したMG6細胞を poly(I:C)刺激し、ホルムアルデヒドを用いて固定処理した。蛍光ファロイジンを用いてア

クチン繊維を標識し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内分布を調べた。

4. 遺伝子発現応答の解析：

MG6細胞をpoly(I:C)処理した後、経時的に細胞を回収し全RNAを抽出した。常法に従って相補DNA(cDNA)を合成し、炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6)およびCCケモカイン(CCL3/MIP-1 α 、CCL5/RANTES)、CXCケモカイン(CXCL2/MIP-2、CXCL10/IP-10)遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法により測定した。

5. 細胞内シグナル伝達経路の解析：

Poly(I:C)処理したMG6細胞を経時的に回収し、界面活性剤および蛋白質分解酵素阻害剤、脱リン酸化酵素阻害剤を含む緩衝液に浮遊させた後、超音波破碎処理をおこなった。得られた蛋白質をSDS-PAGEにより分離した後、シグナル分子[Inhibitory NF- κ B α (I κ B α)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38]の活性化を、リン酸化蛋白質特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により調べた。

6. シグナル経路活性化阻害実験：

MG6細胞をNF- κ B阻害剤(BAY 11-7082)およびJNK阻害剤(SP600125)、p38阻害剤(SB202190)、もしくはcelastrolの存在下にて前処理した後、poly(I:C)処理を行った。細胞を回収し、上記の手法を用いて細胞の活性化を調べた。

7. MG6細胞のサイトカイン応答：

MG6細胞をIFN- β およびTNF- α の存在下において培養し、遺伝子発現量をリアルタイムPCR法により測定した。また、蛋白質産生量をELISA法により測定した。サイトカイン処理した細胞から蛋白質を抽出し、シグナル分子[signal transducer and activator of transcription (STAT)、Janus kinase (JAK)、tyrosine kinase 2 (Tyk2)、I κ B α 、JNK]の活性化を、リン酸化蛋白質特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により調べた。また、細胞をsimvastatinの存在下において培養した後、サイトカインにより刺激し同様の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本年度の研究においては倫理面で特に配慮する実験は含まれていない。

C. 研究結果

1. dsRNA刺激によるミクログリア細胞株(MG6)の形態変化：

初代培養ミクログリアの場合と異なり、MG6細胞の増殖にはフィーダー細胞からの栄養供給やサイトカインの添加等を必要としない。この特長はミクログリア培養系の大規模化と低コスト化を実現する。平成17年度の本研究では、前年度に得られたミクログリア活性化プロファイルを基盤として、MG6細胞のdsRNA応答パターンを把握するとともに抗炎症物質探索技術への応用性を調べた。MG6細胞は、通常の培養条件(血清含有DMEM培地)において株化マクロファージ様の形態をとり、約36時間で倍化した。また、栄養因子を低減させた試験培地においては細胞増殖が停止し、細胞質の縮小と突起の伸長が観察された。この状態の細胞をpoly(I:C)の存在下において数時間培養することでアメーバ状細胞へと形態変化することが分かった。

2. dsRNAによるミクログリア活性化と細胞骨格構造の再構築：

ミクログリアの活性化に伴う形態変化を詳しく調べるため、低栄養培地の存在下において突起伸長型のMG6細胞を誘導した後、poly(I:C)処理し、細胞骨格(アクチン繊維)の構造を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。刺激前のMG6細胞ではアクチンが突起の先端および突起と反対側の細胞質に点在した。一方、poly(I:C)処理によって活性化したMG6細胞では、アクチンの網状構造が形成されること、また細胞質の広範囲においてアクチン繊維が凝集することが分かった。

3. dsRNAに対するミクログリアの炎症性遺伝子発現応答：

前年度(平成16年度)に実施した遺伝子発現プロファイリングの結果、dsRNAはミクログリアの炎症性遺伝子発現を選択的に誘導することが分かっている。本年度では、これら特定の遺伝子に焦点を絞り、MG6細胞の活性化に伴う発現量の変動パターンを解析した。poly(I:C)処理したMG6細胞では、①CXCケモカイン(CXCL2、CXCL10)の遺伝子発現が刺激直後(1時間以内)から顕著に増大すること、②炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6)およびCCケモカイン(CCL3、CCL5)の発現は刺激後約2時間から4時間にかけて累増することが分かった。

4. dsRNAによるミクログリアの細胞内シグナル経路の活性化：

前年度の本研究から、ミクログリアは液胞を介してdsRNA構造を認識し、NF-κBおよびストレス応答性MAPキナーゼ (MAPK) を基幹とする細胞内シグナル伝達経路を活性化させることが明らかとなっている。MG6細胞においても同様の細胞内シグナリングが生じるか否かを解析した。突起伸長型のMG6細胞をpoly(I:C)処理し、IκBα (NF-κB活性化に必要な上流シグナル分子)、ならびにJNKとp38(共にストレス応答性のMAPK)のリン酸化を調べた。MG6細胞では、poly(I:C)刺激に対してNF-κBおよびJNK、p38を介したシグナル経路が迅速(刺激後15分以内)に反応することが分かった。

5. ミクログリアのdsRNA応答におけるシグナル伝達経路の役割：

上記の実験結果から、MG6細胞はdsRNA構造を認識することで、細胞内シグナリングや遺伝子発現、細胞骨格再構築や形態変化といった多様な炎症応答を示すことが分かった。この実験モデルを基盤としてミクログリアの炎症応答におけるNF-κBおよびストレス応答性MAPK経路の役割を調べた。各シグナル経路に対する阻害剤の存在下において突起伸長型MG6細胞を培養した後、poly(I:C)処理し、遺伝子発現量とアクチン繊維構造、細胞形態を包括的に調べた。実験結果の概要を図1に示す。

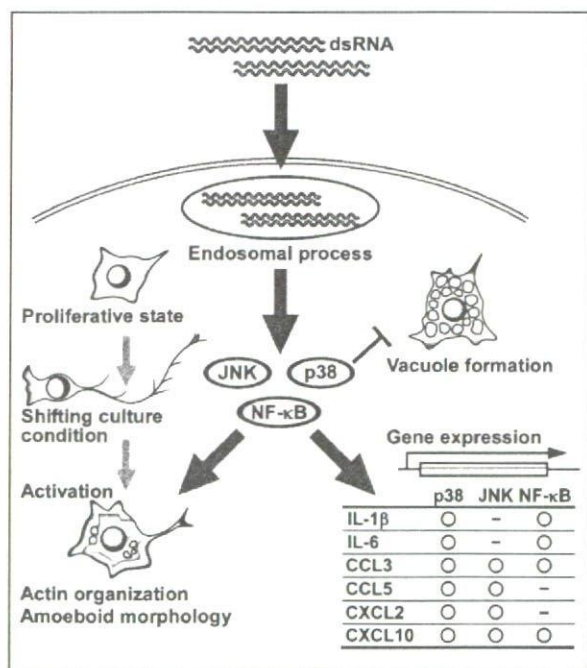


図1：二本鎖RNA(dsRNA)に対するミクログリア細胞株MG6の炎症応答

ミクログリア細胞株MG6は低栄養培地にて培養することで突起伸長型細胞へと変化する。この状態の細胞を合成dsRNAであるpoly(I:C)によって刺激した場合、細胞骨格構造が再構築されることでアメーバ型ミクログリアへと変換し、組織内での遊走能や細胞障害性を獲得する。この過程では、①JNKおよびp38シグナリングが中心的な役割を担うこと、②NF-κB経路はアクチンの重合を促進するために必要であることが分かった。また、dsRNA構造の認識による炎症性サイトカインおよびケモカインの発現誘導には、③p38の活性化が必須であること、④JNKおよびNF-κB経路は標的遺伝子の種類に応じて選択的に発現を誘導することが分かった。さらに、p38の活性化は液胞形成制御に必要であることが分かった。

6. ミクログリアのdsRNA応答を基盤とした脳炎治療候補物質探索系の確立とその評価：

MG6細胞をdsRNA刺激することで誘導される様々な炎症応答(細胞内シグナル伝達や遺伝子発現、細胞骨格構造、形態変化)は、ミクログリア活性化を多面的に解析するためのマーカーとして用いることができる。そこで、MG6細胞のdsRNA応答を基盤とした薬剤探索系を確立し、その有用性を評価した。脳炎治療候補物質のモデルとして3種類の抗炎症剤を用いたが、本報告書ではニシキギ科ツルウメモドキ属の植物*Celastrus scandens*に由来するcelastrolについてのみ記載する。

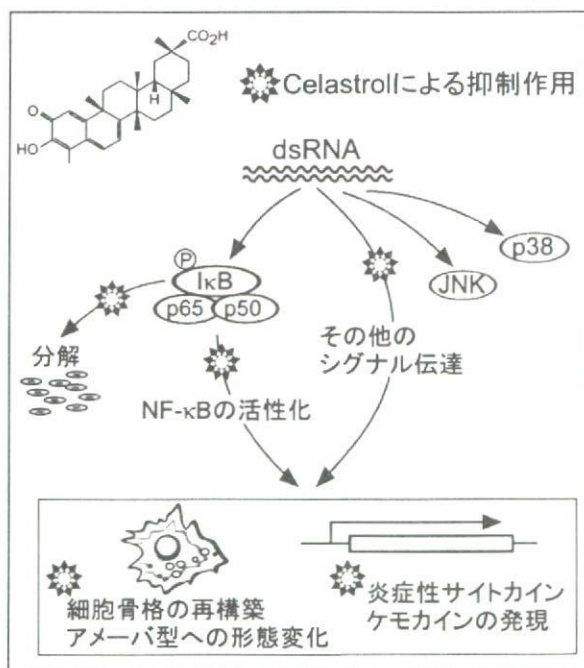


図2：ミクログリアの活性化に対する植物由来物質(celastrol)の作用機序

細胞膜透過性のジエノン-フェノール性トリテルペン化合物であるcelastrolは炎症抑制効果や細胞保護作用を示すことが知られているが、脳内炎症反応やミクログリア活性化に対する作用機序の詳細は不明である。本研究結果を図2に示す。Celastrolはミクログリア活性化における①アクチン繊維の再構築、②アメーバ型細胞への形態変化、③炎症性遺伝子の発現、④NF- κ Bの活性化に必要なI κ Bの分解、等を広範囲に抑制するが、JNKやp38シグナル経路に対しては作用しないことが分かった。また、celastrolはNF- κ B以外のシグナル経路に作用することで①から③の炎症応答を抑制する可能性も示唆された。

7. MG6細胞のサイトカイン応答と創薬技術への応用：

上記実験6.の結果から、MG6細胞のdsRNA応答を用いたミクログリア活性化モデルは抗炎症剤の評価において有用であることが示された。次に、本モデルにおいて刺激因子をdsRNA以外の物質に変更した場合の細胞応答、ならびに創薬への応用性を調べた。IFN- β およびTNF- α を用いて刺激したMG6細胞では、それぞれSTAT経路ならびにNF- κ B経路が活性化した。また、IFN- β のTNF- α の共在によって両者の経路を同時に刺激した場合、炎症性遺伝子の発現は相乗的に増大した。IFN- β /TNF- α 誘導性のミクログリア活性化に対する阻害物質を探索した結果、高脂血症治療薬として用いられているHMG-CoA還元酵素阻害剤(simvastatin)がJAK/STAT経路を介した遺伝子発現を顕著に抑制すること、またNF- κ Bシグナリングには影響を及ぼさないことが分かった。

D. 考察

正常脳組織におけるミクログリアはマクローファージ様のエフェクター作用を示さないだけでなく、長い突起を張り巡らせたユニークな形態をとる。この突起は優れた機動性を有することが知られており、神経細胞やグリア細胞、血管内皮細胞に接着することで周囲の微小環境をリアルタイムで監視している。静止期ミクログリアの特異的な性状、ならびにアメーバ型細胞への華麗な形態変化はミクログリアが単なる脳のマクローファージではなく、中枢神経系の恒常性維持のために特殊化した細胞であることを明示する。

ミクログリアを指向する脳疾患治療薬の開発には、薬剤候補物質の作用機序を解析するためのcell-based assay系の構築が必要不可欠である。

しかしながら、開発コストや技術面での問題ならびに倫理的な配慮から、大量の初代培養ミクログリアを用いた薬剤スクリーニングは不可能に近い。したがって、ミクログリアの性質を保持しながらも自立増殖が可能な細胞株の樹立が強く望まれる。本研究では、新規のミクログリア細胞株MG6を用いたミクログリア活性化モデルを確立し、薬剤探索技術への応用性を示した。初代培養ミクログリアおよび数種類の株化ミクログリアの場合と異なり、MG6細胞の増殖にはフィーダー細胞からの栄養供給やサイトカインの添加等を必要としない。さらに、低栄養環境へと培養条件をシフトさせることで非活性化ミクログリアを誘導することができる。これらの特質はミクログリアを標的とした薬剤探索のハイスループット化と低コスト化を実現する。

本研究ではミクログリアを活性化させるための刺激としてTLR3リガンドである合成dsRNAを用いた。研究当初、TLR3はウイルス感染を認識する受容体であるため、そのリガンドである合成dsRNAを用いたミクログリア活性化試験系の用途はウイルス性脳炎治療薬の探索に限定されるかと思われた。しかしながら、研究が進捗しデータが蓄積するにつれて、合成dsRNAがミクログリアにおける多様な炎症応答を同時にかつ迅速に誘導する物質であることが分かってきた。その他の特長として、合成dsRNAは①安価でありロット差が少ない、②水溶性で調製が容易であり、ストック液を長期に保存できる、③LPSと比較して細胞毒性が低く、汚染のリスクが少ない、④脳内における潜在的なミクログリア刺激因子である、⑤脳内投与することで生体レベルでの炎症応答を誘導することができる、等を有しており、ミクログリア活性化因子としてのdsRNAの有用性は極めて高い。

脳炎治療薬の候補物質としてcelastrolを用いた研究では、複数の炎症応答マーカー(細胞内シグナリングや炎症性遺伝子の発現、細胞骨格構造の再構築、形態変化)を用いることで、ミクログリアの活性化に対する薬剤の「作用点」を解析した。これらのマーカーは、①ミクログリアの細胞内シグナル伝達や遺伝子発現を選択的かつに阻害することで他の神経系細胞への影響を回避する、②アメーバ型細胞への形態変化をブロックすることで組織内の遊走や細胞傷害を阻止する、③ミクログリア活性化全体を一時的に停止させることで急性脳炎を抑止する等、目的に応じた薬剤設計を可能にする。また、dsRNAの代わりにサイトカインを用いて細胞応答を解析した研究では、MG6細胞を基盤としたミクログリア培養系の汎用性を確認することができた。次年度では、ミクログリア活性化モデルを用いて多種類の抗炎症剤の作用機序を明ら

かにするとともに、候補薬剤を脳炎モデルマウスに投与し、脳炎治療薬としての効果を評価する。

E. 結論

研究目的を達成するために、dsRNAに対するミクログリア活性化の全体像を明らかとし、炎症応答の指標となるマーカーを特定した。これらのマーカーがミクログリアを指向する脳炎治療薬の探索や作用機序の解明において有用であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamichi K, Saiki M, Sawada M, Yamamuro Y, Morimoto K, Kurane I.

Double-stranded RNA stimulates chemokine expression in microglia through vacuolar pH-dependent activation of intracellular signaling pathways.

Journal of Neurochemistry

(2005) 95(1):273-283.

- 2) Nakamichi K, Saiki M, Sawada M, Takayama IM, Yamamuro Y, Morimoto K, Kurane I.

Rabies virus-induced activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways regulates expression of CXC and CC chemokine ligands in microglia.

Journal of Virology

(2005) 79(18):11801-11812.

2. 学会発表

- 1) 齊木めぐみ・澤田誠・森本金次郎・山室裕・倉根一郎・中道一生.

Induction of chemokine expression in microglia through recognition of TLR3 ligand.

第28回日本神経科学大会. 2005年7月(横浜)

- 2) 中道一生・齊木めぐみ・澤田誠・森本金次郎・山室裕・倉根一郎.

Chemokine response of microglia against neurotropic virus infection via activation of signal-transducing molecules.

第28回日本神経科学大会. 2005年7月(横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

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