

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

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 …… 1
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 …… 12
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 …… 26
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 …… 37
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 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須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 …… 60
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 …… 66
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 …… 79
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 …… 92
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ーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
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 …… 105
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 …… 116
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 …… 126
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 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

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 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

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
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 ミクログリアの活性化は炎症性脳疾患の重篤化に深く関与する。新規の細胞培養系を基盤として、ミクログリアを指向する脳炎治療薬の開発に必要なスクリーニング系を開発した。また、薬剤の有効性を生体レベルで評価するための簡便な脳炎動物モデルを確立した。

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免疫細胞の移行さえも厳しく制限する。そのため、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系細胞であるミクログリアが中心的かつ多彩な役割を担っている。正常組織におけるミクログリアは細長い突起を周囲に張り巡らせた形態をとり、微小環境の変化を常に監視している。脳局所に異常が生じた場合、ミクログリアはアメーバ状の活性化型細胞へとトランスフォームすることで変性細胞を貪食する。また、サイトカインやケモカイン等の液性因子を分泌することで免疫応答を調節する。

近年、ミクログリアが脳の恒常性維持に必須である反面、慢性的かつ過剰な細胞応答は炎症反応による神経破壊を引き起こすことが知られている。ミクログリアの活性化が関与する疾患としては、アルツハイマー病やパーキンソン病、多発性硬化症、ウイルス性脳炎等が挙げられる。また、血管障害や頭部外傷における炎症においてもミクログリアの応答が深く関与することが知られている。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。

ミクログリアを指向する脳疾患治療薬の開発には、薬剤の作用機序を細胞レベルで解析するための培養系が必要となる。しかしながら、①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、②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、③初代培養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、等の制限から、必ずしもスクリーニング系の大規模化には至っていない。ミクログリアの培養における課題を解決するため、平成17年度までの本研究では、初代培養ミクログリアの性質を保持しながらも、自立増殖が可能な不死化細胞株(MG6-1細胞)の新規培養系を確立した。また、MG6-1細胞がToll様受容体3 (TLR3)リガンドである二本鎖RNA(dsRNA)に対して鋭敏に応答する性質を応用し、ミクログリアに対する抗炎症剤の影響を多面的に解析するための試験系を開発した。さらに、本試験系を用いて実際にミクログリアの活性化を抑制する化合物を特定し、その有用性を確認した。平成18年度では、弱毒化した向神経性ウイルスがマウス脳において効率的に炎症を誘導する性質を応用し、抗炎症剤の有効性を生体レベルで評価するための簡便な脳炎動物モデルを確立した。

B. 研究方法

1. 細胞培養：

マウス正常脳に由来するRa2細胞およびMG6-1細胞を用いた。Ra2細胞はGM-CSFを添加した培養液において増殖が可能な不死化ミクログリアである。MG6-1細胞は、初代培養ミクログリアに増殖能欠損型レトロウイルスベクターを用いて*c-myc*遺伝子を導入することで樹立した細胞株であり、一般的な培養条件下において自立増殖する。

2. 遺伝子発現様式の解析：

合成 dsRNA である Poly(I:C) (polyinosinic-poly

cytidylic acid)によって刺激した細胞からRNAを抽出し、逆転写反応によってcDNAを合成した。炎症関連遺伝子(サイトカイン、ケモカイン、接着分子、プロテアーゼ、一酸化窒素合成酵素等)の発現量を定量的PCRにより測定した。また、発現量が増大した遺伝子の産物量をELISAにより測定した。

3. 細胞内シグナル伝達機序の解析：

Poly(I:C)刺激した細胞から蛋白質を抽出した後、主要な細胞内シグナル伝達経路に関与する分子約20種類(STAT、JAK、Tyk2、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 、JNK、p38等)のリン酸化をウェスタンブロット法により解析した。

4. 細胞形態の解析：

MG6-1細胞を低血清条件下において培養し、伸長した突起、および縮小した細胞質をもつ非増殖性のミクログリアを誘導した。この突起伸長型細胞をPoly(I:C)刺激し、細胞形態を位相差顕微鏡にて観察した。

5. 細胞骨格構造の解析：

細胞をPoly(I:C)刺激した後、ホルムアルデヒドを用いて固定処理した。TRITC標識したファロイジンを用いてアクチン繊維を蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内分布を調べた。

6. ミクログリアの炎症応答に対する薬剤の作用機序の解析：

細胞をNF- κ B阻害剤、もしくはJNK阻害剤、p38阻害剤、ERK阻害剤、bafilomycin A1、monensin、celastrol等の存在下において前処理した後、Poly(I:C)刺激し、上記の解析に供した。

7. 炎症誘導物質の脳定位投与：

C57BL/6J系統のマウスを深麻酔処置し、脳定位固定装置に設置した。頭皮を切開した後、脳室内に微小カテーテルを挿入した。マイクロインジェクターを用いてPoly(I:C)溶液(10 $\mu\text{g}/2\mu\text{L}$)を微量投与した後、切開部を縫合した。投与から2日後に各群を安楽殺し解析に用いた。

8. ウイルスの調製：

脳炎マウスモデルの作製には、狂犬病ウイルス challenge virus standard-11(CVS-11)株を用いた。CVS-11株は病原性を減弱させた固定毒株であり、一般的なバイオハザード対策施設(レベル2)において取り扱いが可能である。安全性については「D. 考察」において詳述した。マウス神経芽種由来の培養細胞においてウイルスを増幅させた後、超遠心処理により精製し、接種に用いた。

9. ウイルスの接種：

上記のマウスを麻酔処置し、約50 LD₅₀のウイルスを大腿部筋肉内に接種した。接種直後から14日間、病態の観察を行った。また、経時的に各群4頭のマウスを安楽殺し、脳を採取した。

10. 脳の採取：

比較対照群およびウイルス接種群、もしくはPoly(I:C)投与群のマウスを深麻酔処置した後、胸部を切開し、血管内灌流による脱血処置を施した。全脳を摘出した後、大脳および間脳、脳幹、小脳を分離し、RNA抽出に供した。

11. 脳におけるウイルス伝播様式の測定：

脳の各部位から全RNAを抽出した後、ウイルスゲノムRNAに特異的なDNAプライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。ウイルスゲノムのcDNA量を、特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCRによって測定した。

12. 脳における遺伝子発現様式の解析：

脳の各部位から全RNAを抽出した後、cDNAを合成した。サイトカイン(IFN- β 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α)、およびケモカイン(CCL2、CCL3、CCL5、CXCL2、CXCL10)の遺伝子発現量を、特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCRにより測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、国立感染症研究所実験動物委員会において倫理面での審査を受け、承認を得ている。また、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守し、①飼育環境の維持、ならびに②適切な麻酔処置、③速やかな安楽殺等の動物愛護を最大限配慮した上で研究を実施した。

C. 研究結果

<平成16年度>

TLR3リガンド(合成dsRNA)に対するミクログリアの炎症応答を包括的に解析し、細胞活性化の指標となるマーカーを検索した。

1. dsRNA刺激に対するミクログリアの遺伝子発現応答：

ミクログリア細胞株(Ra2)を合成dsRNAであるPoly(I:C)にて刺激し、遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。dsRNA刺激したミクログリアでは炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6等)および

ケモカイン(CCL5、CXCL2、CXCL10等)の発現量が増大することが分かった。

2. dsRNA刺激に対するミクログリアの細胞内シグナリング：

Ra2細胞をPoly(I:C)刺激し、主要なシグナル伝達経路の活性化を調べた。dsRNA処理したミクログリアでは、NF- κ BおよびJNK、p38を介したシグナル経路が鋭敏に反応することが分かった。また、これらの経路はdsRNAに対する炎症関連遺伝子の発現誘導に関与することを示した。

3. ミクログリアがdsRNAを認識するメカニズムの解析：

TLRは細胞膜上、もしくは細胞内の液胞において病原体成分を認識することが知られている。Poly(I:C)に対するミクログリアの細胞応答には、液胞における認識過程が必要であることが分かった。また、この過程にはプロトンポンプ(H⁺-ATPase)を介した液胞の酸性化が関与することを示した。

<平成17年度>

ミクログリアの炎症応答プロファイル、ならびに新たに樹立された不死化細胞株MG6-1を用いて、細胞活性化に対する薬剤の影響を調べるための試験系を確立した。

4. MG6-1細胞の増殖特性と形態変化：

染色体に*c-myc*遺伝子発現ユニットを組み込んだミクログリア(MG6-1細胞)の増殖性を調べた。MG6-1細胞は一般的な血清添加培地においてマクローファージ様の形態を示し、約36時間で倍化した。また、初代培養細胞の場合と同様に、低栄養環境では増殖が停止し、突起伸長型のミクログリアへと変化することが分かった。

5. MG6-1細胞の炎症応答様式：

MG6-1細胞の炎症応答を体系的に解析した。突起伸長型のMG6-1細胞をPoly(I:C)刺激した場合、細胞骨格が再構築され、アメーバ型(活性化型)の形態へと変化した。また、炎症関連遺伝子の発現量が顕著に増加した。加えて、これらの応答にはNF- κ BおよびMAPKを介したシグナル経路が関与することを示した。

6. MG6-1細胞を基盤とした薬剤試験系の確立：

Poly(I:C)に対するMG6-1細胞の炎症応答を基盤として、ミクログリアに対する薬剤の作用を調べるための試験系を開発した。本試験系を用いたス

クリーニングの結果、ニシキギ科植物 *Celastrus scandens* に由来する celastrol が、ミクログリアにおける形態レベルおよび分子レベルの炎症応答を広い範囲に抑制することを明らかにした。また、これらの結果から本試験系がミクログリアを指向する薬剤探索において有用であることが分かった。

<平成18年度>

弱毒化した向神経性ウイルスがマウスの脳において効率的に炎症を誘導する性質を利用し、薬剤の有効性を評価するための簡便な脳炎動物モデルを確立した。

7. 刺激物質の脳内投与を主体とした脳炎動物モデルの課題：

免疫刺激物質をマウスの脳内に直接投与し、炎症応答を解析した。Poly(I:C)を投与した脳では、炎症関連遺伝子の発現レベルが増加した。しかしながら、他の多くの脳炎動物モデルの場合と同様に、①外科手術において煩雑かつ長時間の作業を要する、②炎症の範囲が限定される、③カテーテルの挿入や薬液の注入によって組織の損傷が生じる可能性がある、等の課題点から、試験系のハイスループット化は困難であることが分かった。

8. 弱毒化ウイルスを用いた脳炎マウスモデルの作製：

狂犬病ウイルス固定毒株は、野生型株を人為的に弱毒化させた実験室株であり、企業におけるワクチン製造においても使用されている。本ウイルスをマウスの末梢部位に接種し、脳への伝播様式および神経症状を調べた。大腿部筋肉内に接種したウイルスは、神経接続を介して接種3日後には脳幹に侵入し、5日後には脳的全領域へと効率よく伝播することが分かった。また、この時点において体重が減少し、7日以降には麻痺等の神経症状が生じることが分かった。

9. 弱毒化ウイルスを用いた脳炎マウスモデルの評価：

固定毒株を接種したマウスにおける脳の各部位(大脳ならびに間脳、脳幹、小脳)における炎症応答様式を包括的に解析した。ウイルスを接種したマウスでは、体重減少が生じる接種5日以降から脳的全領域においてサイトカイン(IFN- β 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α)、およびケモカイン(CCL2、CCL3、CCL5、CXCL2、CXCL10)の発現が顕著に増大することが分かった。また、ウイルス感染脳における炎症応答は、脳へのウイルス伝播や病態発現と同様のタイミングで生じることが分かった。

D. 考察

ミクログリアは単なる脳のマクロファージではなく、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という概念が定着しつつある。このことは脳炎治療薬開発におけるMicroglia-based assayの必要性を示唆する。研究開始当初、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Poly(I:C)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、研究が進展するにつれて、Poly(I:C)がミクログリアにおける多彩な炎症応答を効率的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、Poly(I:C)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刺激因子である、等を有しており、ミクログリアを標的とした創薬における有用性は高い。

また、本研究では新規の不活化細胞株MG6-1の性状解析を行い、薬剤探索への応用性を示した。通常、ミクログリアの調製には専門的な手技ならびに長期間の培養とするため、大量の細胞を用いた薬剤スクリーニングは困難である。MG6-1細胞は一般的な培養条件において活発に増殖するため、薬剤開発における大規模な細胞供給を可能にする。また、基質への細胞接着能も安定しており、高度に機械化した培養システムへの応用も容易である。さらに、本研究では、増殖型のMG6-1細胞に対して単純な処理(安価な低栄養培地への交換)を施すだけで、初代培養ミクログリアに類似した性質を持つ突起伸長型細胞へと変化することが分かった。この状態のMG6-1細胞を用いることで、従来の高度に腫瘍化したマクロファージ系細胞等では解析が困難であった、「より初代培養ミクログリアに近い薬剤反応性」を調べることが可能となった。

MG6-1細胞の炎症応答は、①細胞内シグナル伝達経路の活性化、②炎症関連遺伝子の発現、③細胞骨格の再構築、④アメーバ型細胞への形態変化、に大別される。これらの分子レベルおよび形態レベルの細胞応答は、ミクログリアの活性化を多面的に解析する上で有用なマーカーとなる。本研究では、これらの応答をより簡便に測定できるように条件を至適化し、薬剤試験系を構築した。本試験系を用いたスクリーニングでは、ミクログリアの活性化を抑制する化合物を選定するだけでなく、細胞機能に対する薬剤の「作用点」を明らかにすることができた。ミクログリアの多機能性を考慮した場合、薬剤によって細胞の働きをどの程度まで抑制するかは、脳疾患の種類に大きく依存する

と思われる。本試験系は、①ミクログリアの機能を維持するため、特定のシグナル経路や遺伝子発現のみを部分的に阻害する、もしくは②炎症局所における神経細胞への傷害を抑制するため、ミクログリアの組織内遊走に必要な形態変化のみを阻害する、③極度の脳炎が生じた場合に、ミクログリアの機能を広範囲に阻害する、等の脳疾患の種類に応じた創薬を可能にする。

ミクログリアに対する抑制作用が細胞レベルで確認された場合、その有効性を生体レベルで評価する必要がある。現在、炎症性脳疾患のモデルとなる様々な動物実験系が考案されており、個々の疾患を対象とした研究において高い有用性を発揮している。しかしながら、①煩雑な外科的手術を要する、②脳組織に損傷を生じるリスクがある、③炎症が特定部位に限局される、④遺伝的疾患動物の繁殖や維持には限界がある、等の理由から試験系の大規模化が困難である場合が多い。理想的には、末梢部位に投与するだけで脳全体に炎症が生じるようなモデルが望ましい。本研究では、向神経性ウイルスを末梢部位から脳全体へと伝播させ、炎症を誘導するモデル系を確立した。狂犬病ウイルス固定毒株は、野生型ウイルスを高度に継代することで弱毒化させた実験室株であり、一般的な感染実験室(BSL2)において作業が可能である。その高い再現性と簡便性から、企業等におけるワクチンの品質評価では、固定毒株を脳内に直接投与する攻撃試験が行われている。また、固定毒株によるヒトへの病原性は極めて低く、暴露前後のワクチン接種によって十分な安全対策を講じることができる。

本研究では、脳への損傷を避けるため、濃縮したウイルスを末梢部位(大腿部)に接種する方法を選択した。接種に要する時間は1頭当たり数十秒であり、薬剤評価のハイスループット化が期待できる。また、本ウイルスは神経接続を介して脳へと特異的に伝播するため、血液中へのウイルス放出や他臓器における炎症等の副次的な影響が生じない。さらに、他のウイルスと比較した場合、狂犬病ウイルスによる細胞毒性は極めて低く、感染組織における細胞溶解等はほとんど観察されない。これらの特長は、安定した薬剤評価系のための必要条件を充たす。加えて、本ウイルスを接種したマウス脳では、全領域において高いレベルの炎症応答が誘導される。そのため、大脳や小脳、脳幹といった脳の各部位に対する薬剤の効果を解析することができる。また、これらの応答は体重減少や麻痺といった症状と密接に連動しているため、脳の深部における分子レベルの炎症反応を容易に把握することが可能となる。今後の展開としては、

補液等の改善による生存期間の延長、ならびに炎症誘導後に脳から排除される変異ウイルス株の開発等を通じて、試験系の利便性の向上ならびに動物の負担軽減を目的としたモデルの改良を行う必要がある。

E. 結論

新たに確立された細胞培養系を基盤として、ミクログリアを指向する脳炎治療薬の開発に必要なスクリーニング技術を開発した。また、薬剤の有効性を生体レベルで評価するための簡便な脳炎動物モデルを確立した。

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-Ito M, 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.
- 3) Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I.
Suppressive effect of simvastatin on interferon- β -induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia.
Neuroscience Letters
(2006) 407(3):205-210.
- 4) Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I.
Roles of NF-kappaB and MAPK signaling pathways in morphological and cytoskeletal responses of microglia to double-stranded RNA.
Neuroscience Letters
(2007) 414(3):222-227.

2. 学会発表

- 1) 中道一生・齊木めぐみ・森本金次郎・倉根一郎.
狂犬病ウイルス感染によるミクログリアのMAPキナーゼ活性化とケモカイン発現誘導.
第52回日本ウイルス学会学術集会・総会.
2004年11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)
- 3) 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)
- 4) 中道一生・伊藤睦代・久保山有紀・齋木めぐみ・倉根一郎
狂犬病ウイルス侵襲に対する脳のケモカイン応答.
第54回日本ウイルス学会学術集会・総会.
2006年11月(愛知).

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18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成19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