

## 4-2-8 薬剤治療研究部（分子薬理研究室、実験薬理研究室）

### 1. 研究プロジェクト

- 1.1 疾患関連因子の探索および薬物療法の開発
- 1.2 遺伝子改変動物を用いた疾患関連因子および薬物受容体の機能解析ならびに創薬への応用
- 1.3 胎児および小児における薬物代謝・毒性試験の開発ならびに創薬への応用

### 2. 研究の概要

小児難治性疾患には、遺伝性疾患を含む数多くの難治性疾患があり、原因が不明のものや原因が明らかになっていても有効な治療法が確立されていないものなど多数残されている。近年のゲノムプロジェクトの進展に伴い、新たな疾患関連遺伝子や薬物標的因子も明らかになりつつあり、小児難治性疾患に関連した蛋白質や薬物標的因子の解明も期待されている。このような背景のもと、薬剤治療研究部では、成育医療における新規治療薬標的分子の探索、生体物質および薬物の受容体と細胞シグナル伝達機構の解明ならびにゲノム創薬への応用を図っている。研究手法として、分子生物学的手法・細胞生物学的手法・遺伝子工学的手法を用い、その分子レベルから個体レベルにおける機能解析を図り、小児難治性疾患の病因の解明と薬物療法の開発を目指し、最終的には治療に貢献することを目指している。当研究部では、前記の研究法・研究分野を通して成育医療における薬物療法の研究を推進している。特に、ファーマコジェノミクスを用いた薬物標的因子の探索・解析ならびにゲノム創薬への応用は、数年にわたり研究を進めてきている。この研究テーマでは新規薬物療法の開発を目的に、遺伝子改変動物を用いて薬物受容体の分子レベルから個体レベルでの機能解析・薬物評価を行っている。

### 3. 研究成果

#### 3.1 疾患関連因子の探索および治療方法の開発

##### A) 末梢神経脱ミエリン病発症機構の解明とその治療薬の開発

Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病では、シュワン細胞の機能不全が起こるとミエリンの形成異常が生じ、早期の場合4歳児からの下半身麻痺症状にはじまる四肢の神経伝達障害が引き起こされる。一方で、病気の進行が比較的遅いケースもあり、致死的ではないこともある。これらの疾患に関する治療法は、まだ根本的治療方法は確立されておらず対症療法のみである。本年度はこの疾患を解明する目的で、特に、通常のみエリン形成段階を詳細に解析するプロジェクトに着手した。ミエリン形成過程は、Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病で最もその症状が現れる座骨神経を例にとり、発生・形態学的に分類すると、3期（神経軸索上でのシュワン細胞の増殖・遊走期（胎児中期～生後）、シュワン細胞の伸長期（胎児後期～生後）、軸索を幾重にも取り囲むミエリン形成期（生後から開始される））に分けられる。結果として、座骨神経形成過程において、(1) マウスやラットの座骨神経への神経栄養因子の直接インジェクションや、神経栄養因子受容体の遺伝子組み替えマウスを用いた *in vivo* の実験とグリア-神経細胞共培養系の *in vitro* の実験の両面から、ミエリン形成過程が DRG 神経細胞からの放出される異なった2種類の液性の神経栄養因子（神経栄養因子-3 (NT3) と脳由来神経栄養因子 (BDNF)）により制御されていること、及び、(2) これらの因子が異なった時期に放出され互いに逆の作用を示すこと、を明らかにした。(3) さらに、その下流のシグナル伝達機構を明らかにし、神経栄養因子の関係と類似した相反するきわめてユニークな薬剤標的となりうる低分子量 GTP 結合蛋白質を介する経路を見出した(4) 現在、薬剤標的と考えられる遺伝子が脱ミエリン疾患に関与するかどうか生体レベルで明らかにする実験を行っている。特に、網羅的に関与する遺伝子の機能を明らかにするためにノックダウンマウス作成の技術開発を進めている。

## B) 中枢神経の回路網形成異常の解明とその治療薬の開発

中枢神経の発達過程の回路網形成を観察できるグリア-ニューロン共培養系を用い、基礎的なミエリン-神経回路形成のメカニズムを明らかにし、次に、そこから得られる知見をもとに中枢神経疾患の治療に応用していくことを目的として研究を行っている。試験管内共培養系は、生体内から細胞を分離した状態での開放系であるため、ニューロンの突起伸長から回路網の形成、そしてミエリンの形成、言い換えれば、神経系の形成をその初期からさまざまな神経機能を有する成熟期まで、随時観察できる特色をもっている。具体的な研究目標としては、第一に、ニューロンからいかなる生理活性物質が放出されグリアによるミエリン形成を制御しているのか、逆に如何にしてミエリンを形成しつつあるグリアがニューロン回路網の成熟を司るのかということ明らかにする。さらに、このような共培養系は系統的に単純であるが故に、応用が比較的容易であると期待され、モデル疾患動物由来の細胞を用いることにより、特に、神経伝導に異常を生じる脱ミエリン病等の神経疾患の研究に貢献できると考えられる。その一方で、動物個体を用いた薬理学的試験の前段階として、神経疾患の改善・治療薬の候補のスクリーニング系に応用を図っていく予定である。

## C) 低分子ストレスタンパク質の機能解析ならびに創薬への応用

低分子ストレスタンパク群(sHSP)は現在10種類ほど知られているが、それぞれの機能解析は十分に検討されていない。sHSPの分子シャペロン機構を解析し、創薬に応用する目的で、alpha-beta-Crystallin (CryAB)、HSP22、HSP27などのsHSPをそれぞれ心筋細胞に発現させ、その効果を評価した。HSP22やHSP27を心筋細胞に発現させると、正常な立体構造を保てない蛋白質(unfolded protein)による不溶性凝集体の蓄積が抑制された。この凝集体蓄積抑制効果はHSP22の方がHSP25よりも強かった。また、HSP22およびHSP27は不溶性凝集体の前駆体であり細胞毒性を有するアミロイドオリゴマーの発生を抑制し、ユビキチンプロテオソーム系(UPS)の不活性化および細胞障害を軽減した。一方、同じsHSPファミリーであるCryABはアミロイドオリゴマーを増大させ、細胞毒性を軽減しなかった。この結果より、1)同じsHSPファミリーでもUnfolded proteinに対する作用が全く異なること、2)HSP22およびHSP25は不溶性凝集体の蓄積およびアミロイドオリゴマーの形成を抑制し、細胞保護効果を有することが明らかとなった(Sanbe et al., JBC 2007)。この作用をin vivo条件で検討するため、HSP22を心臓特異的に過剰発現しているトランスジェニック(TG)マウスを作製した。このマウス(line 101)の心臓では、HSP22の過剰発現による心臓重量の増加および線維症等の病態は認められなかった。現在、HSP22の発現増加が心筋症病態を改善させることが出来るか否かを検討するため、HSP22を発現しているTGマウスと心筋症モデルTGマウスを掛け合わせ、ダブルTGマウスを作製し、経過を観察中である。

HSP22およびHSP25の機能評価と同時に、HSP22およびHSP25の発現を誘導できる化合物の探索も開始した。グレリルグレニルアセトン(GGA)はHSP70などのストレスタンパク質を発現誘導することが知られており、臨床でも胃潰瘍薬として使用されている。しかしながら、GGAのsHSP、特にHSP22に対する発現誘導効果を検討した報告はない。そのため我々はGGAのHSP22発現誘導効果を検討した。その結果、GGAは単離心筋細胞において、HSP70を発現誘導するよりもより低濃度でHSP22を強く発現誘導した。また、GGAはunfolded proteinのアミロイドオリゴマー形成抑制および不溶性凝集体蓄積抑制効果を示し、細胞生存率を改善した。この結果は、GGAがHSP22の発現誘導を介して、unfolded proteinの細胞毒性を低下させる可能性を示唆する。現在は、その効果がin vivoで確認出来るかどうかを検討中である。

## D) 胎児の成長・発達に影響を及ぼす因子の解明と予防・治療法の開発

アルコール、喫煙およびビタミンなどが組織および器官形成に影響を及ぼすことはよく知られているが、その標的細胞および標的分子は明らかではない。本研究では、各組織における特異的細胞の分化(cell lineage)に対する因子(アルコールおよびその他の因子など)の効果を分子レベル、細胞レベル、動物レベル(遺伝子改変動物を含む)で検討し、標的細胞および作用時期を明らかにすることを目的としている。アルコールの神経組織形成への影響を解析する目的で、神経幹細胞を

もちいた評価系（ニューロスフェア法）を構築した。この系を用いてアルコールの影響を解析した結果、アルコールが神経幹細胞の増殖能に影響を及ぼすことが明らかになった。その機序としては、ホスファチジン酸を介する情報伝達障害が示唆された。また、喫煙の神経提細胞への影響を検討するため、組織培養法を構築し、解析を開始した。その結果、タバコ主流煙抽出物に含まれるターール成分が神経提細胞の遊走能に影響を及ぼすことが明らかとなった。現在、更にその詳細な機序を解析中である。

#### E) ネフローゼ症候群における疾患関連因子の同定・解析

国立成育医療センター研究所は、平成15年度より、厚生労働科学研究である「疾患関連たんぱく質解析研究事業」に分担研究者として参加し、研究協力機関として「創薬プロテオームファクトリープロジェクト」の研究協力を行ってきている。このプロジェクトにおける我々の分担は、腎疾患をはじめとする小児難治性疾患患者由来の試料供給および疾患関連蛋白の探索・解析である。本研究では、腎疾患に関する疾患関連たんぱく質を網羅的に解析し、病態や投薬によって発現変動する因子をタンパク質レベルにて測定し、新規薬物療法を開発することを目的としている。薬剤治療研究部では、腎疾患（IgA腎症、ネフローゼ症候群）の患者より得られたヒト試料（血清）について最新のプロテオーム解析装置ならびにバイオインフォーマティクスを用いて疾患関連たんぱく質の網羅的解析をプロテオームファクトリー施設との共同で行っている。解析後、ヒト試料におけるプロテオーム・プロファイリングを構築し、疾患特異的蛋白の探索・同定と共に、病態・投薬に伴う変化を解析している。

### 3.2 遺伝子改変動物を用いた疾患関連因子および薬物受容体の機能解析ならびに創薬への応用

#### A) 低分子ストレスタンパク質異常により発症する疾患の病態解明とその治療法の開発

Alpha-beta-crystallin、HSP22 および HSP25 などの低分子ストレスプロテインの点変異、欠損変異は心筋症、白内障および運動性末梢性ニューロパシー（HMN）、Charcot-Marie-Tooth ((CMT))2 型の原因になることが報告されている。しかし、その病態発症機序は明らかではない。これらの病態を詳細に解析し、発症機序を解析するために、それぞれの病態モデルの作製を試みている。点変異 sHSP による疾患モデルを作製するため、心筋特異的 HSP22 K141N transgenic マウス（心筋症モデル）および、神経特異的 HSP22 K141N transgenic マウス（HMN あるいは CMT2 型モデル）を作製中である。心筋特異的に HSP22 K141N を発現しているマウス（line6）では、心筋細胞内に不溶性凝集体が蓄積していることが確認され、現在さらに詳細に検討中である。また、invitro 系で詳細に検討するため、これらのアデノウイルスベクターを用いた発現コンストラクトを作製し、培養細胞に発現させ、その作用を検討している。

#### B) GPCR（アドレナリン受容体、バゾプレッシン受容体、その他）の機能解析ならびに創薬への応用

G蛋白質共役型受容体の代表であり、複数のサブタイプが存在することが知られてきているバゾプレッシン受容体や 1 アドレナリン受容体をモデル系として用い、遺伝子改変動物（ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス）による各受容体の個体レベルでの機能評価と新規開発薬物の個体レベルでの薬効評価を行っている。遺伝子改変動物を用いた解析の結果、1 アドレナリン受容体が輸精管収縮機能や血管内皮細胞増殖等に関与し、バゾプレッシン受容体が糖脂質たんぱく質代謝に関与していることが明らかとなった。

### 3.3 幹細胞を用いた薬物毒性試験方法の開発ならびに創薬への応用

幹細胞（胚性幹細胞を含む）を用いて新たな薬物毒性試験方法の開発を行う。幹細胞を用いた薬物毒性試験方法の開発は、1）従来の Embryonic Stem Cell Test（EST法の改良）（評価方法の開発）、2）従来のEST法の応用（多剤投与時の毒性評価）、3）ヒト胚性幹細胞を用いた毒性試験方法の開発、4）胚性幹細胞から神経細胞への分化障害を指標とした毒性試験方法の開発、5）ヒト組織幹細胞を用いた毒性試験方法の開発（胎盤由来幹細胞）について研究を行う。EST法は、細胞生存率・心筋への分化障害を指標としているが、より感受性・特異性を高めるために組織特異

的マーカー、DNAチップを用いた評価方法の改良を行う。また現在の試験方法では、単剤のみの評価しかできないが、多剤投与時における毒性評価方法の開発を行う。さらに現在マウス胚性幹細胞を用いたEST法にヒト胚性幹細胞を応用し、ヒト特異的な毒性試験方法の開発を行う。また心筋以外への細胞（神経細胞）への分化誘導を行い神経細胞への分化障害を指標とする神経組織特異的毒性試験方法の開発を行う。さらにヒト胎盤からの幹細胞樹立を行い、樹立した細胞を用いて薬物の毒性試験方法の確立を行う。

マウスES細胞を用いて抗けいれん剤のバルプロ酸、カルバマゼピンの毒性評価を行った結果、ES細胞の分化増殖に影響を及ぼすことが明らかとなった。