

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 細胞を用いた in vitro 薬物毒性試験法の開発および毒性評価
- 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 疾患関連因子の探索および薬物療法の開発

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細胞を用いた in vitro 薬物毒性試験法の開発ならびに毒性発現機構の解明を行い、成育医療における薬物療法の開発に取り組んでいる。

3. 研究成果

3.1 細胞を用いた in vitro 薬物毒性試験法の開発および毒性評価

A) ES細胞を用いた薬物毒性試験法の開発並びに毒性評価

これまでに、マウスES細胞を用いてEmbryonic Stem Cell Test (EST法)を行い、抗けいれん剤、抗ガン剤などの毒性評価を行い、この方法が動物を用いた実験結果と相関することを明らかにした(小児臨床薬理学会雑誌、2006年)。平成19年度は神経管欠損等の神経系の催奇形性が報告されている抗けいれん剤のバルプロ酸、カルバマゼピンについて細胞分化過程に及ぼす薬剤の影響について、細胞表面マーカーの解析を行い解析した。その結果、バルプロ酸、カルバマゼピンは、共に内胚葉、及び中胚葉系への分化を抑制し、外胚葉系の神経への分化に関しては逆に分化を促進することが明らかとなった。しかしながら、外胚葉系への分化促進作用はバルプロ酸に比べるとカルバマゼピンは軽度であった。これらの結果は、カルバマゼピンは神経管欠損などの生殖発生毒性を有するがその頻度や重症度がバルプロ酸に比較して軽度である in vivo の観察結果と一致し、マウスES細胞を用いた生殖発生毒性評価は有用と考えられた(Biochem Biophys Res Commun. 2007; 352:164-169, Biochem Biophys Res Commun. 2007; 356:739-744, 日本小児臨床薬理学会雑誌 印刷中 (2007))。さらにマウスES細胞を用いたEST法、細胞表面マーカーの解析により抗うつ剤のSSRI(パロキセチン、フルボキサミン、フルオキセチン)について解析を行った。これらの薬剤は、動物実験では安全と考えられていたが、マウスES細胞を用いた毒性評価では弱毒性～強毒性と評価され外胚葉系への分化が促進されることが明らかとなった(第34回日本小児臨床薬理学会発表)。この結果より、近年パロキセチンにて心奇形性が報告されていることを考え合わせると、妊婦においては再度安全性を確認する必要があると考えられる。また、ヒトES細胞を用いた薬物安全性・毒性試験法を開発するために京都大学よりヒトES細胞の譲渡を受け、研究を開始した。ヒトES細胞は細胞ごとにその性質・特徴が異なることが知られているため、薬剤毒性試験研究に向けた培養法・試験法の開発に取り組んでいる。

B) 株化細胞(マウス神経芽腫由来N1E-115細胞)を用いた薬物毒性機構の解明

バルプロ酸は、双極性障害の治療薬や抗けいれん剤として幅広く臨床で用いられているが、一方で、副作用として神経管欠損などの胎児発生障害を起こすことも知られている。本研究においては、何故VPAがこのような障害を引き起こすか、ということ明らかにするために、中枢神経系のモデル細胞としてマウス神経芽腫由来細胞であるN1E-115を用いて、そのメカニズムを解析した。細胞

へのバルプロ酸添加により、バルプロ酸はN1E-115細胞を神経に分化させる能力を持つことが判明し、in vivo ばかりではなく in vitro においても神経細胞の分化を促進させることが明らかとなった。次に、VPA による N1E-115 細胞の神経分化に及ぼす分子機構を調べるために、バルプロ酸添加により誘導される遺伝子を網羅的に調べた。DNA チップを用いて変動する遺伝子の解析を行った結果、神経分化に直接的に関与する転写因子や神経細胞に特異的に存在する細胞内シグナル伝達分子及び細胞骨格系分子等を含む多数の遺伝子の発現が上昇していた。これらのバルプロ酸により発現が誘導される遺伝子の中で、きわめて強く発現上昇が見られる Gadd45a という分子に着目し、バルプロ酸による N1E-115 細胞の分化における Gadd45a の機能解析を行った。未分化状態の N1E-115 細胞に Gadd45a を強制発現させると神経分化を誘導し、逆に、RNA 干渉法を用い Gadd45a を特異的にノックダウンさせるとバルプロ酸による神経分化作用をほぼ完全に抑制した。さらに、この Gadd45a の下流に Jun キナーゼ (JNK) があり細胞接着斑蛋白パキシリンのリン酸化を誘導することが明らかになった。このことは、バルプロ酸による副作用を解除するヒントを提供する可能性が示唆される (Exp Cell Res. 2007; 日本小児臨床薬理学会雑誌 印刷中 (2007))。

C) 神経幹細胞、前駆細胞を用いた組織障害・毒性発現機構の解明

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。このニューロスフェア法を用いることにより、初期神経分化への各種因子の影響を検討出来る。ニューロスフェア法を用いて、神経分化に対するアルコールの影響を検討した。飲酒時の血中アルコール濃度に相当する 100 mM 以下のアルコール存在下では、アポトーシス陽性細胞の割合やニューロンへの分化能に変化は認められなかったものの、分裂能の有意な低下が認められた。この結果から神経幹細胞がニューロンへと成熟する過程で、最もアルコールに対して感受性の強い時期は分裂過程であることが示唆された。続いて、アルコールが神経幹細胞の分裂能を阻害する分子メカニズムを解明するため、リン脂質代謝酵素 Phospholipase D (PLD) の関与について検討した。アルコール存在下の神経幹細胞では、PLD によるリン脂質の加水分解に異常をきたし、その下流シグナル因子である Mitogen-activated protein kinase (MAPK) のリン酸化の減少を引き起こすことによって分裂が阻害された。PLD-MAPK シグナル伝達異常による神経幹細胞の分裂能低下は胎児性アルコール症候群の患者にみられる中枢神経系の発達障害を誘引する分子メカニズムの一つであることが示唆された。この結果は第 34 回小児臨床薬理学会 (熊本) にて発表した。また、喫煙の神経堤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。神経堤細胞の遊走はタバコ主流煙抽出物 (CSE) を加えることにより、濃度依存的かつタバコのタール含量依存的に抑制された。CSE は神経堤細胞でアポトーシスを誘導しない上に、細胞増殖性にも影響することなく、細胞遊走を抑制した。CSE の神経堤細胞遊走抑制へのダイオキシン受容体 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の関与を検討するため、AhR 拮抗薬である α -naphthoflavone (α -NF) の効果を検討した。 α -NF は CSE 処理による細胞遊走抑制を阻害した。また、神経堤細胞に AhR 遺伝子を導入したところ CSE 処理時と同様に細胞遊走が抑制された。この結果、CSE は AhR シグナルを介して神経堤細胞の遊走を抑制することが明らかとなった。この結果は第 34 回小児臨床薬理学会 (熊本) にて発表した。

D) 脂肪幹細胞を用いた毒性試験の開発

美容形成目的に脂肪吸引手術にて摘出されたヒト皮下脂肪より間葉系幹細胞を分離樹立し、この細胞を用いて毒性試験法の開発を行っている。分離樹立した脂肪幹細胞の培養法の検討とともに脂肪細胞、神経細胞、肝細胞などへの分化誘導法を検討した。

E) 肝細胞を用いた薬物毒性・安全性・代謝機能の解明

生体肝移植に用いられる肝臓でドナー側から生じる余剰肝やレシピエント側の摘出した肝臓から肝細胞を分離し、培養をおこない、培養法及び凍結融解法の確立を行っている（移植免疫診療科、移植外科との共同研究）。これらの技術の確立後、薬物代謝毒性試験に応用を図る予定である。

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

低分子ストレスタンパク質（sHSP）の変異は、デスミン心筋症、白内障、遺伝性末梢制運動性ニューロパシー（HMN）およびシャルコ・マリー・トゥース病（CMT 病）の原因であることが知られている。しかし、その病態発症機序は明らかではない。sHSP 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を目的として、HSP22 K141N を心筋特異的および神経特異的に発現しているトランスジェノックマウスの作製を試みている。心筋細胞特異的なトランスジェニックマウスは、導入型 α ミオシン重鎖プロモーターをもちいて作製中である。神経特異的 HSP22 K141N トランスジェニックマウスは、神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現しているトランスジェニックマウス（Nestin-Cre TG マウス）と CAG プロモーターによって HSP22 K141N を発現させることが出来るトランスジェニックマウス（CAG-flox-CAT-flox-HSP22 K141N TG マウス）を掛け合わせるにより作製している（Nestin-Cre x CAG-flox-CAT-flox-HSP22 K141N ダブル TG マウス。現在これらのライン化を行い、実験に最適なラインを選別中である。また、初代心筋細胞を用いた *in vitro* 実験の結果、HSP22 K141N 変異タンパクを発現させた心筋細胞では、点変異 HSP22 を含む不溶性凝集体が細胞核周辺に蓄積してくることが明らかとなった。今後、さらに検討していく予定である。

B) GPCR（アドレナリン受容体、バソプレッシン受容体、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ソプレッシン受容体や α 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。

a) α 1 アドレナリン受容体

これまで、 α 1 アドレナリン受容体サブタイプの遺伝子改変動物を作成するためにマウスの受容体サブタイプ遺伝子のクローニング、遺伝子構造の解析を行った（Jpn J Pharmacol. 1999）。これらの受容体の中で、特に α 1D アドレナリン受容体について、ES 細胞を用いたジーンターゲット法およびトランスジェニック技術を用いて遺伝子改変マウスの作成を行い、この変異動物を解析し、受容体の生理機能、薬物の選択性を明らかにしてきている。マウス α 1D アドレナリン受容体のノックアウトマウスの作製および解析の結果、本受容体が血圧調節に重要な働きをし（J Clin Invest. 2002）さらに高血圧症の発症ならびにその維持に重要な働きをしていることを証明した（Hypertension. 2002）。更に、 α 1 アドレナリン受容体ノックアウトマウス（ α 1A-KO, α 1B-KO, α 1D-KO, α 1AB-KO）を用いて血管内皮損傷モデルを作成し、内皮損傷後の内皮の増殖に及ぼす受容体の各サブタイプの影響を観察した。その結果 α 1AB-KO では、内皮損傷後内皮細胞の増殖がコントロール及びその他のノックアウトマウスに比べて有意に抑制されていた。この結果より血管内皮の増殖には α 1A アドレナリン受容体および α 1B アドレナリン受容体が関与し、これらの受容体の拮抗薬により血管内皮の増殖が抑制される可能性が明らかとなった（Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007）。また、 α 1A-KO, α 1B-KO, α 1D-KO より α 1AB-KO, α 1AD-KO, α 1BD-KO の二重欠損マウスを作成し、さらに α 1ABD-KO 三重欠損マウスを作成した。これらのマウスを用いて循環調節機構（血圧、心拍、昇圧反応など）、受精・妊娠に及ぼす α 1 アドレナリン受容体の機能解明を行った。その結果、血圧の維持には α 1B および α 1D 受容体が、雄の射精機能においては α 1A 受容体が重要な働きをしていることを明らかにした（Br J Pharmacol. 2007）。19年度は、作成した α 1ABD-KO 三重欠損マウスを用いて血管反応性について解析を行った。その結果血管作動物質であるセロトニンやプロスタグランディンに対する血管収縮反応が亢進していることが明らかとなった（論文投稿中）。

b) バゾプレッシン受容体

これまで、バゾプレッシン受容体サブタイプの遺伝子改変動物を作成するためにマウスのバゾプレッシン受容体サブタイプ遺伝子のクローニング、遺伝子構造の解析を行った (Jpn J Pharmacol. 1999)。バゾプレッシン受容体の中で、特に V1a, V1b 受容体について、ES 細胞を用いたジーンターゲット法およびトランスジェニック技術を用いて遺伝子改変マウスの作成を行い、この変異動物を解析し、受容体の生理機能、薬物の選択性を明らかにしてきている。V1b バゾプレッシン受容体ノックアウトマウスの解析によりバゾプレッシンは生体内において V1b 受容体を介して脳下垂体前葉ホルモンである ACTH の分泌や膵臓ランゲルハンス島細胞からのインスリン分泌に重要な働きをしていることを明らかにしている (J Clin Invest. 2004; Mol Pharmacol. 2004)。さらに、V1a および V1b バゾプレッシン受容体ノックアウトマウスをもちいて循環調節機構、内分泌系、代謝系および中枢神経系におけるバゾプレッシン/V1a および V1b バゾプレッシン受容体の機能解析を行った。V1a バゾプレッシン受容体ノックアウトマウスでは、圧受容体反射が障害され循環血液量も減少し、血圧が低下していることを明らかにした (Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; Eur J Pharmacol. 2007)。また、この V1a バゾプレッシン受容体ノックアウトマウスでは、脂質代謝が亢進し (Mol Endocrinol. 2007)、蛋白代謝も亢進し (J Physiol. 2007)、耐糖能が低下していること (Endocrinology. 2007) が明らかとなった。また、V1a バゾプレッシン受容体ノックアウトマウスでは心筋細胞の AVP による増殖効果が欠損し大動脈狭窄モデルにおける心肥大も起こりにくいことを明らかにした (Eur J Pharmacol. 2007)。内分泌系においては副腎皮質からのアルドステロン分泌に V1a バゾプレッシン受容体が関与していることを明らかにした (Eur J Pharmacol. 2007)。V1b バゾプレッシン受容体ノックアウトマウスでは、副腎髄質からのカテコールアミン分泌が抑制され (Am J Physiol-Endoc M. 2006)、膵臓からのグルカゴン分泌にも V1b バゾプレッシン受容体が重要な働きをしていることを明らかにした (J Endocrinol. 2007)。19 年度は、V1a バゾプレッシン受容体ノックアウトマウスでレニン・アンジオテンシ・アルドステロン系 (RAS) の活性化の障害により循環血液量が減少し、血圧低下が起こっていること (論文投稿中)、V1b バゾプレッシン受容体ノックアウトマウスでインスリン感受性が亢進するとともに脂質代謝が変化していることを見いだした。

3.3 疾患関連因子の探索および薬物療法の開発

A) 末梢神経脱ミエリン病発症機構の解明とその治療法の開発

ミエリン形成過程は、発生・形態学的に分類すると、3 期、すなわち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。座骨神経では、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的インジェクションや神経栄養因子受容体の遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* の実験、さらにはグリア (Schwann cell) -神経細胞 (DRG neuron) 共培養系の *in vitro* の実験から、ミエリン形成過程 (Stage I～Stage III) 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経路 (Rho ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質に属する数種類のシグナル伝達分子や極性因子) を介することを見出した (JCS. 2007; Exp. Cell Res. 2007; Science. 2006; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006)。

これらの研究は現在まで報告はなく、末梢神経ミエリン形成に関して重要な知見を与えるものと考えられる。一方で、ミエリン形成の分子基盤は、その病態発症と密接な関係があると考えられるため、現在までに行った研究は多くの手掛かりを提供している。さらに、病態発症共培養系を確立することを目的として、病態モデルマウス (遺伝性の末梢神経変性症の 50% を占める IA 型シャルコーマリツース (CMT) 病原因遺伝子 PMP22 の点変異を有する自然発症型のモデルマウスであるトラン

ベラー (Tr) やトランベラーJ (TrJ)) からシュワン細胞と DRG 神経細胞を精製し、共培養を行うことを試みている。この試験管内実験系は動物個体を用いる薬物投与実験とは異なり開放系で各種のスクリーニングに適している。我々の研究グループでは、この実験系の確立を試み、最近成功している (未発表データ)。それは、より生体に近いかたちとして、座骨神経由来の繊維芽細胞を培養シャーレの底に一層生やすことにより、上層のシュワン細胞と神経細胞の安定した共培養が得られるという技術である。ここで観察される脱ミエリン現象は不完全なミエリンやミエリン層が薄いものが多く、それによってシュワン細胞が死滅に至るわけではないため、最終的な評価段階まで共培養を問題なく継続することができる。また、この病態ミエリンは電子顕微鏡レベルで生体内とほぼ同一であることを確認している (生化学 2007)。

B) 中枢神経脱ミエリン病発症機構の解明とその治療薬の開発

中枢神経系においては末梢神経系のような発生過程を再現できる *in vitro* の実験系は未だに成功していない。従って、中枢神経の発達過程の回路形成を観察できるグリア-ニューロン共培養系を完成させることを優先し、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脱ミエリン病の発症機構の解明とその治療法の開発を行うという実験手順を踏まなければならない。研究成果としてはまだ初期段階であるが、(1) ラット胎児大脳からオリゴデンドロサイト前駆細胞の単離・精製を試み、95%以上の純度でとる実験系を確立した。

(2) 精製されたオリゴデンドロサイト前駆細胞は *in vitro* で、その後の分化過程 (*in vivo* では胎生後期から生後までの時期) を再現することができた。(3) レトロウイルスを用いて遺伝子導入を行い50%以上の細胞での発現を確認し、さらに、それ以上の確率でノックダウンも可能になった。

(4) 実際に Pelizaeus-Merzbacher 病を引き起こす点変異を有する四回膜貫通型蛋白 PLP をオリゴデンドロサイト前駆細胞に導入し、部分的なミエリン形成阻害を確認できた、ことが挙げられる。今後、海馬や大脳皮質の神経細胞の単離・精製を行い、オリゴデンドロサイト前駆細胞との共培養系を確立する。

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 (HSPs) の分子シャペロン機構を明らかにする目的で、HSP22, HSP27 を心筋細胞に発現させ、その分子シャペロン効果を評価している。HSP22 や HSP27 は、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、アミロイドオリゴマーの発生、ユビキチンプロテオゾーム系 (UPS) の不活性化を抑制し、細胞障害を軽減した。その作用機序としては、HSP25 や HSP22 がアミロイドオリゴマー構造をした変性タンパクに直接結合し、その構造を修飾することによりアミロイドオリゴマー形成を阻害することが分かった。一方、同じく HSP ある alpha-beta-crystallin (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。すなわち、同じ HSP でも Unfolded protein に対する作用が全く異なることが明らかとなった (J Biol Chem. 2007)。HSP22 の保護効果を *in vivo* 条件で検討するため、トランスジェニックマウスを作製した。HSP22 を心筋特異的に発現しているトランスジェニックマウスは、心重量、心機能に変化はなく、組織学的にもコントロール群 (ノントランスジェニック) と比較して差は認められなかった。このトランスジェニックマウスと unfolded protein が原因で発症するデスミン心筋症のモデルマウス (CryAB R120G トランスジェニックマウス) を掛け合わせたところ、デスミン心筋症による生存率の低下を抑制することが出来た。現在、その機序を検討している。また、HSP22 および HSP25 の発現を増加させることが出来る化合物の探索も開始した。

D) ネフローゼ症候群における疾患関連因子の同定・解析

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) についてプロテオーム解析装置ならびにバイオインフォーマテッ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。健康人および微小変化型ネフローゼ症候群の治療前とステロイド剤治

療後の血清中のタンパク質の比較定量を行ったところ、血清糖タンパク質の一種である zinc alpha 2-glycoprotein 1 (ZAG) や mannan-binding lectin associated serine protease 1 (MASP1) が、ネフローゼ症候群の病態とともに変動しているのが明らかになった。19年度は、これらの蛋白の解析法としてウエスタンブロット法、ELISA 法による定性的・定量的測定法の検討を行った。更に、ネフローゼモデルマウス (ICG マウス) を用いて血中 MASP1 蛋白について解析を行った。