

報告書

平成15年度 丸木記念特別奨学研究費 B 研究実績報告書

神経因性疼痛と神経再生におけるガレクチン-1の
細胞内情報伝達機構の解明

受賞者 吉村 和法 (埼玉医科大学生理学教室)

目的: ガレクチン-1は β ガラクトシドに結合する動物レクチンでガレクチンファミリーに属する。ガレクチンファミリーは無脊椎から脊椎動物に広く分布し、現在までにガレクチン-1から14まで報告されている。ガレクチン-1は分子内に6個のシステインを持ち、還元状態でのみレクチン活性を示す。レクチン活性によって細胞表面の糖脂質や糖タンパク質糖鎖に結合することで細胞の接着および細胞増殖等へ関与していることが報告されている。いくつかの腫瘍(グリオーマ)では悪性度との関連が報告され、ガンの浸潤・転位や免疫系、あるいは発生・分化との関連も示唆されてその多様な働きが注目されている。最近堀江らはレクチン活性を持たない酸化型ガレクチン-1が、マクロファージを介して末梢神経再生を促進する働きを明らかにした。しかし、マクロファージ上のレセプターは不明な上、細胞内でどのような変化が起こっているか、十分に解析されていない。また研究代表者らは坐骨神経切断モデルラットにおいて切断部位に酸化型の組み換え型ヒトガレクチン-1を投与すると後根神経節の知覚神経細胞の生存が促進され、また坐骨神経の脊髄レベルでの痛みを伝達するNK1レセプターの発現が減少することを発見した(*Restorative Neurology and Neuroscience*に投稿中)。このことは明らかに酸化型ガレクチン-1が坐骨神経再生時に痛みの調節にも関与していることを示唆するものであり、ますます酸化型ガレクチン-1の情報伝達の機構解明の意義は大きい。そこで研究代表者はまず、マクロファージの細胞内でどのような細胞内変化が起こっているのか解析した。この研究報告書は、酸化型ガレクチン-1によって誘導されたマウスマクロファージのプロテオーム解析の結果を中心に報告するものである。

方法: 酸化型ガレクチン-1および還元型ガレクチン-1はキリンビール医薬探索研究所の門屋利彦博士より提供されたものを使用した。マクロファージは成熟Balb/c雌雄マウスの腹腔より採取してものを使用した。マクロファージは無血清培地に培養され、それに

酸化型(Ox-Gal)あるいは還元型ガレクチン-1(CS-Gal)を100pg/ml添加し、あるいは無添加(Control)で30分間インキュベートし、リン酸緩衝液で細胞を2回洗浄してから、二次元電気泳動用サンプル調製液でホモゲナイズしてから続けて、超音波処理、遠心を行って、可溶性分画を集め、濃縮し、タンパク質定量を行ってから一次元電気泳動をpH 3-10 NL条件でおこなった。さらに二次元電気泳動は10-20%ゲル濃度で30 mA定電量、3時間泳動を行った。電気泳動後、高感度にリン酸化タンパク質を検出するためにPro-Q Diamond染色を行い、画像解析装置を装備した蛍光検出器(Typhoon 9440)でリン酸化タンパク質スポットを検出した。画像取り込み後、同一ゲルを全タンパク質の高感度染色のためにSypro Ruby染色を行い、同様に蛍光検出器にてSypro Rubyで染色されたタンパク質を検出した。酸化型あるいは還元型もしくは無添加の条件で処理されたマクロファージのリン酸化タンパク質染色およびSypro Ruby染色のパターンを画像解析して酸化型ガレクチン-1と有意な発現差異のあるスポットを、ゲルから切り出してトリプシン消化後、LC/MS/MSにてスポットのタンパク質を同定した。同定されたタンパク質は質量分析器付属の専用ソフトおよびインターネット上のデータベースを利用してバイオインフォマティクス的に解析した。

結果: 図1と2はそれぞれ還元型および酸化型ガレクチン-1処理によるタンパク質発現を、また図3と4は同一ゲル上のリン酸化タンパク質の発現を示している。矢印は特に発現差異が認められるスポットを示している。すくなくとも15個の興味あるスポットが見つかり、現在、そのうち10個のスポットについては解析結果が得られた(表1)。図3と4の比較により特に酸化型ガレクチン-1の刺激によりマクロファージの細胞内でスポット1と10が特にリン酸化されていた。一方、それに対応してタンパク質発現でも図1と2の比較より酸化型ガレクチン-1でスポット1と10は発現上昇していた。また酸化型ガレクチン-1処理マクロファージ

(図2)でタンパク質発現の上昇がスポット2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 15で観察された(スポット12はなし).

考察: LC/MS/MS分析の結果, スポット1は glucose regulated protein であると同定されたが, このタンパク質の発現は最近, MAPキナーゼ経路を活性化することが報告されている. それゆえ, ガレクチン-1のレセプターはなお不明であるが, 酸化型ガレクチン-1のシグナルが不明なレセプターを介して, MAPキナーゼ経路を活性化している可能性が示唆される. この活性化の結果, マクロファージでのまだ未同定な神経栄養因子の分泌が誘導され, それが生理的作用として切断された軸索の再生を促進しているものと推測される. 今後は分泌されている未同定な神経栄養因子の同定を行う予定である. またスポット10はLC/MS/MSより細胞骨格の再構築に関与する cofilin であることが明らかになった. このタンパク質はリン酸化されると, アクチンの脱重合を引き起こすことが既に報告されている. それゆえ, 酸化型ガレクチン-1処理でマクロファージの Cofilin のリン酸化と発現の上昇が起こっている. マクロファージにアクチン細胞骨格の変化が起こっていることが推論される. なお他のスポット2, 3, 4, 5からはすべて同一な glucose regulated protein が同定され, スポット6, 7, 8はすべて alpha enolase であることが判明した. 以上のことをまとめて考慮すると, 少なくとも酸化型ガレクチン-1は坐骨神経の損傷によって還元型ガレクチン-1として末梢神経から放出され, 炎症部位で一酸化窒素などの酸化的条件により酸化型ガレクチン-1に変化し, それが周囲の細胞, 特にマクロファージにストレスシグナルとして機能を開始する. すなわち, そのシグナルはマクロファージ内の神経栄養因子などの分泌を盛んにするMAPキナーゼ経路を活性化する GRP94 (glucose regulated protein) の発現およびリン酸化を上昇させる. またアクチンの脱重合を調節し, また細胞移動の方向を調節する Rho-LIMK-Cofilin のシグナル伝達経路を不活性化に導く cofilin のリン酸化および発現増加を酸化型ガレクチン-1は誘導している. これらのことはまさに予想していた酸化型ガレクチン-1の神経再生の誘導の開始を示唆する結果であると考えられる. 今後は酸化型ガレクチン-1のレセプターの解析も含めてより詳細な酸化型ガレクチン-1のシグナル伝達経路の解明を進めて行く予定である.

なお本研究成果の成果の一部は Restorative Neurology and Neuroscience に発表し, また全体の成果は米国神経科学学会に発表する予定である.

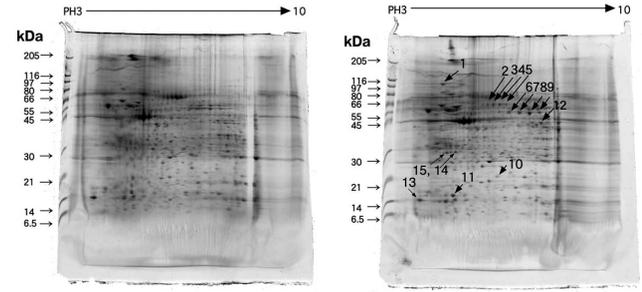


図1. CS-Gal (100 pg/ml) 図2. OX-Gal (100 pg/ml)
Sypro Ruby staining

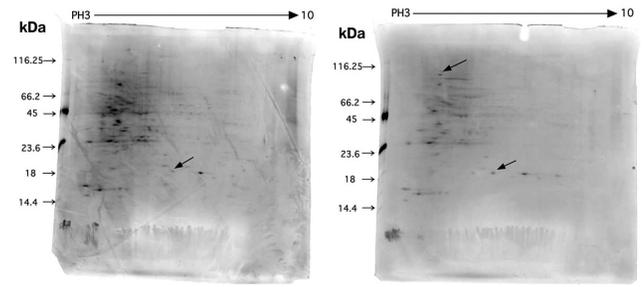


図3. CS-Gal (100 pg/ml) 図4. OX-Gal (100 pg/ml)
Pro-Q Diamond staining

表1.

Spots changed on expression of protein (Red indicates spots changed also in phosphorylation)

Spot's Number	Protein identified	Regulation
1	GRP94 (GP96), glucose-regulated protein	Up
2	Glucose regulated protein	Up
3	Glucose regulated protein	Up
4	Glucose regulated protein	Up
5	Glucose regulated protein	Up
6	Alpha enolase	Up
7	Alpha enolase	Up
8	Alpha enolase	Up
9		
10	Cofilin	Up
11	Coactosin-like protein	Up
12		
13		Down
14		Up
15		Up

図および表の説明: 図1と3, 図2と4は同一ゲルで示されているようにCs-Gal (還元型ガレクチン-1)あるいはOX-Gal (酸化型ガレクチン-1)で30分間処理したマクロファージのホモジネートの二次元電気泳動後, 図1と2はタンパク質染色(Sypro Ruby staining)を, 図3と4はリン酸化タンパク質染色(Pro-Q Diamond staining)を行った染色パターンを示している. 矢印はCS-Gal処理したマクロファージと比較して発現に変化が認められたスポットを示し, それらのスポットはゲルから切り出し, トリプシン処理後, LC/MS/MS分析を行い, その結果が表1にまとめられている. また表1の赤で記載されたタンパク質はリン酸化発現の上昇も確認されたことを示している.

報告書

平成15年度 丸木記念特別奨学研究費 B 研究実績報告書

神経ペプチドメラニン凝集ホルモンによる摂食行動調節の分子機構

受賞者 齋藤 祐見子 (埼玉医科大学薬理学教室)

共同研究者 川村 勇樹*

肥満は、糖尿病や高血圧、高脂血症といった内分泌代謝異常のほか、ある種の癌などを高率に引き起こす。21世紀において肥満は更に医学上の大きな問題となると考えられる。これまでいくつかのペプチド(特にニューロペプチドYやレプチン)が摂食亢進や肥満発症に関わっているとされている。しかしながら現在、最も有望な抗肥満薬のターゲットとして国際的に注目を浴びているのはメラニン凝集ホルモン(melanin-concentrating hormone: MCH)である。MCHは当初サケ脳下垂体から見出された神経ペプチドであり¹⁾、哺乳類ではMCHは視床下部外側野に著しく局在し、MCH陽性ニューロンは脳内に非常に広範囲にわたって投射する²⁾。1998年、MCH欠損マウスが作成され、摂食量が低下し体重も減少することが報告された³⁾。ノックアウトの結果、ヤセの形質が出現するのは世界初の例である。この決定的事実から、MCHは摂食行動の下流に存在する特に重要な“食欲誘起ホルモン”であることが明らかとなった。その受容体は長い間不明だったが、私はGタンパク質キメラを用いた新規アッセイ法を開発することでMCHの受容体がオーファン(孤児)Gタンパク質共役型受容体(GPCR)のひとつ、SLC-1(後にMCH1Rと改名)であることを同定した^{4,5)}。その後、MCH1RのサブタイプMCH2Rが報告されたが⁶⁾、ノックアウトマウス作成⁷⁾やアンタゴニスト開発^{8,9)}によりMCH1Rは摂食において非常に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。そこで本研究は、摂食制御分子、MCH受容体の脳内情報伝達分子としての機能を詳細に解析することを目的とした。MCH1RのAsp¹²³がMCHとの結合に決定的に関与していることは既に知られている。しかし受容体各機能の各ステップにどの部分のどのアミノ酸残基が深く関与しているか知ることは肥満治療薬創薬にとって貴重な情報であるにも関わらず、以前不明のままである。そこで一連の受容体変異体を作成し、HEK293T細胞へそれぞれの変異体プラスミドの遺伝

子導入(トランスフェクション)を行った。導入してから48時間後にリガンドとの結合(radioligand binding assay)・細胞膜への輸送・細胞情報伝達系(calcium influx・サイクリックAMP抑制・MAPキナーゼ活性化)についてアッセイ系を確立し、解析を行った。まず、7種の変異体作成によりN末端Asn²³におけるN-linked glycosylationが受容体の細胞内輸送にとって必須であることを明らかにした¹⁰⁾(図1)。次にMCH1Rの細胞内C末端における19種類の変異体を作成し、様々な受容体機能解析を行った。その結果、C末端に存在する2つの塩基性アミノ酸(Arg³¹⁹, Lys³²⁰)の持つポジティブチャージがMCHを介するcalcium influxにおいて特に重要な役割を果たすことを見出した(図1)。バイオフィーマティクス解析により、細胞内C末端における

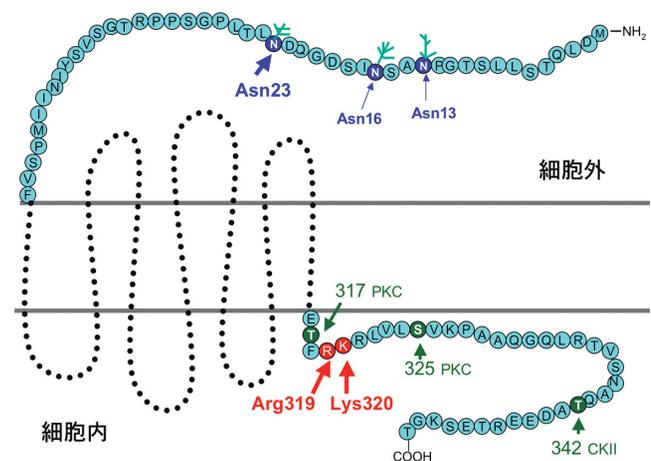


図1. メラニン凝集ホルモン受容体1(MCH1R)のN末端、C末端における構造活性相関¹⁰⁻¹²⁾。様々なMCH1R変異体を作成し、HEK293T細胞に遺伝子導入を行った。そして発現タンパク質量・受容体局在・細胞膜表面発現量・リガンド結合実験・受容体internalization・リガンドによる細胞情報伝達系活性化を解析した。その結果、Asn23, Arg319, Lys320, Thr317, Ser325の受容体機能における重要性が判明した。特にバイオフィーマティクスの活用によりArg319, Lys320は多くのGPCRのC末端で保存されているdibasic motifであることを明らかにした¹¹⁾。

*埼玉医科大学薬理学教室 (現)埼玉医科大学医学教育センター

この2つの塩基性アミノ酸残基の位置は多くのGPCRにおいて非常に高度に保存されていることも明らかにし, GPCRにおける新しいモチーフを提唱した¹¹⁾. 更に, フローサイトメトリーを活用したアッセイ系を確立し, MCHR internalizationの定量的解析を初めて可能にした¹²⁾. その結果, ①MCH1R internalizationはリガンド添加直後から開始し, 30分以内にピークに達する ②internalizationには β -arrestin 2, protein kinase C (PKC), dynamin Iが関与する ③細胞内C末端に存在する2つのアミノ酸 (Thr³¹⁷, Ser³²⁵) がPKCによるリン酸化部位と考えられ, 受容体internalizationに関与する(図 1), 以上3点を明確にした. また, MCH1Rはペプチド受容体としては珍しく脳内全体に広く分布している¹³⁾. そこでyeast-two-hybrid法により, マウス脳部由来cDNAライブラリーを材料としてMCH1Rに結合する分子のスクリーニングを行った. いくつかの有力な既知・新規の候補分子を得て, そのうちの1つは脳線条体に高発現することが確認できた. 現在, 哺乳類細胞に候補遺伝子を導入して, 細胞内においてMCH1Rと結合するかどうか免疫沈降法などを利用して解析中である. 今後はMCH1Rを内在性に高発現する細胞株¹⁴⁾を活用して受容体結合する機能分子を1つ1つ解明し, 脳における摂食調節機構の包括的理解を目指す.

謝 辞

本研究の進展は丸山敬教授, 手塚満恵実験助手により支えられている. ここに記して深く感謝する.

参考文献

1. Kawauchi H. et al. (1983) *Nature* 305: 321-323.
2. Bittencourt JC. et al. (1992) *J Com Neurology* 319: 218-245.
3. Shimada M. et al. (1998) *Nature* 396:670-674.
4. Saito Y. et al. (1999) *Nature* 400: 265-269.
5. Saito Y. et al. (2000) *Trend Endocri Metab* 11: 299-303.
6. Hill J. et al. (2001) *J Biol Chem* 276: 20125-20129.
7. Marsh DJ. et al. (2002) *Endocrinology* 143: 2469-2477.
8. Takekawa S. et al. (2002) *Eur J Pharmacol* 438: 129-135.
9. Borowsky B. et al. (2002) *Nat Med* 8:825-830.
10. Saito Y. et al. (2003) *FEBS Lett.* 533, 29-34.
11. Tetsuka M. et al. (2004) *Endocrinology* in press
12. Saito Y. et al. (2004) *Peptides* in press
13. Saito Y. et al. (2001) *J Comp Neurology* 435: 26-40.
14. Saito Y. et al. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 289: 44-50.

報告書

平成15年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

ケモカイン発現欠損マウス (*plt*マウス)におけるワクシニアウイルス抵抗性とウイルス特異的細胞傷害性T細胞の解析

受賞者 松井 政則 (埼玉医科大学微生物学教室)

共同研究者 赤塚 俊隆*, 守屋 修*

【緒言】*plt*マウスは、1987年、東大・医科学研究所において spontaneous にできた変異マウスであり、当時の医科研助教授であった垣内博士(現東邦大教授)らのグループにより解析が行われてきた。通常、抗原が体内に侵入した場合、樹状細胞(DC)などの抗原提示細胞が抗原を二次リンパ組織に運ぶかもしくは直接抗原が二次リンパ組織に到達して、一次リンパ組織から二次リンパ組織に遊走してきたナイーブT細胞を刺激し免疫反応を惹起させる。しかし、*plt*マウスはT細胞が二次リンパ組織へ遊走する際に必須なケモカイン、CCL21とCCL19の発現欠損があり、その結果リンパ節にT細胞がほとんど存在せず、また、脾臓ではT細胞が赤脾髄のみに存在し白脾髄に存在しない。さらに、活性化DCの二次リンパ組織への遊走も阻止されるため、当初*plt*マウスのT細胞による免疫反応は正常マウスと比べ極めて弱いと考えられた。事実、マウス肝炎ウイルス(MHV)に対する抵抗性は、野生型マウスに比べてずっと低かった。しかし予想に反し、卵白アルブミン(OVA)で免疫した場合、*plt*マウスでは野生型マウスに比べてOVA特異的ヘルパーT細胞(Th)の反応の増強がみられた。CCL21/19発現欠損マウスになぜ抗原特異的Thの反応増強がみられるのか、またその免疫反応の増強がMHVに対する抵抗性という生体反応になぜ反映しないのかという謎はまだ解決されていない。私はこの話に興味を持っていたが、私の専門の細胞傷害性T細胞(CTL)についてはほとんど調べられていなかったため、*plt*マウスのCTL反応について研究させて頂くことになった。CTLは、さまざまなウイルス感染症においてウイルス除去に中心的役割を担うT細胞であり、その誘導にケモカインが重要な役割を演じている。我々はまず予備実験で、致死量前後の組み換えvaccinia virus(VV)を接種し、*plt*マウスと同じ遺伝的バックグラウンドを持つBALB/cマウスと

*埼玉医科大学微生物学教室

の比較でそのウイルスに対する抵抗性を検討した。野生型のVV(VV-wt)を接種した場合、MHVと同様、*plt*マウスはBALB/cより低濃度のウイルス接種で死んでしまった。しかし、C型肝炎ウイルス(HCV) core蛋白をコードする遺伝子を組み込んだVV(VV-core)を接種すると、*plt*マウスはBALB/cより高い抵抗性を示し高濃度でも生き延びた。この予備実験の結果より、HCV core蛋白とCCL21/19の発現欠損とのなんらかの関係で、ウイルス特異的CTLが強力に誘導されてウイルスがクリアーされ、*plt*マウスがrVVに対して抵抗性をもつようになったと考えられた。しかしながら、その後、VV-core接種による、*plt*マウスの抵抗性を再現できなくなった。いまだにその理由はよくわからないが、VV-coreが変異したのかもしれない。そのため、はじめの実験計画を変更することになった。前述のごとく、CCL21/19発現が欠損している*plt*マウスについて、ウイルス感染防御において最も重要なCTLについてはほとんど調べられていないため、VV-wt感染におけるVV特異的CTLについて詳細に検討することにした。

【材料と方法】1) マウス：上述の*plt*マウスと、正常コントロールとして、*plt*マウスと遺伝的バックグラウンドが同じBALB/cマウスを使用した。2) ウイルス：野生型vaccinia virusを使用。3) マウス生存率の測定：致死量前後のさまざまなウイルス量のVVを、一群8匹ずつのマウスに腹腔注射して、それぞれのマウスの生存率を測定し、survival curveを描いた。4) マウス体重の測定：致死量未満のウイルス量のVVを、一群8匹ずつのマウスに腹腔注射して、それぞれのマウス体重を毎日測定した。5) マウス臓器のウイルスタイトルの測定：致死量未満のVVをマウスに接種し、3日、7日、14日後に、さまざまな臓器(卵巣、脾臓、肝臓、腎臓)のウイルスタイトルをBSC-1細胞を用いて測定した。6) CTL活性：VVを接種して2週間後にマウスから脾臓をとり、脾細胞を調整して、VVを感染し⁵¹Crでラ

ベルしたP815細胞株を標的細胞として、 ^{51}Cr 遊離試験を行い、VV特異的CTL活性を測定する。7) フローサイトメトリー：VVを接種したマウスから脾細胞またはリンパ節細胞を調整し、VVを感染したA20細胞で brefeldin Aを加えた培地中で5時間刺激する。その後、FITC-anti-CD8抗体またはFITC-anti-CD4抗体とPE-anti-IFN- γ 抗体で二重染色し、フローサイトメーターで、CD8(+)/IFN- γ (+)またはCD4(+)/IFN- γ (+)細胞の数を測定し、それぞれのマウスで比較する。

【結果と考察】致死量のVVを投与すると、*plt*マウスはBALB/cマウスより少し生存率が低く、致死量未満のVVを投与すると、*plt*マウスはBALB/cマウスより体重減少が激しかった。また、感染後のさまざまな臓器(卵巣、脾臓、肝臓、腎臓)のウイルスタイトルは、*plt*マウスの方がBALB/cマウスより少し高かった。以上の結果から、VVの感染において、*plt*マウスはBALB/cマウスと比べ感受性が高いことがわかったが、その感受性差の程度はMHVの場合に比べて、ずっと少ない。したがって、CCL21とCCL19の発現欠損によるウイルス感受性への影響は、ウイルスの種類によって異なる。しかし、感染直後から4週までの、VV特異的CTL活性にはまったく差がみられなかった。したがって、ウイルス感受性の差はCTLの質的な差ではない。次に、VVを接種後、3日から5週までの脾臓におけるCD8(+)/IFN- γ (+)細胞数を測定した。BALB/cマウスではウイルス抗原により活性化したCD8(+)/IFN- γ (+)細胞数が、感染後7日をピークに劇的に増加し、その後徐々に減少した。一方、*plt*

マウスではCD8(+)/IFN- γ (+)細胞数はほとんど増加しない。CCL21/CCL19の発現欠損のため、活性化DCなどの抗原提示細胞の脾臓への遊走が阻止されるため、効果的にCD8(+)/CTLが活性化されず、CD8(+)/IFN- γ (+)細胞数の増加がみられず、ウイルスに対する抵抗性が減少すると思われる。しかし、T細胞の遊走が阻止されているため、もともとの脾細胞の数が*plt*マウスの方がBALB/cマウスより数倍多いことにより、トータルのCD8(+)/IFN- γ (+)細胞数はほとんど変わらない。そのため、ウイルスに対する抵抗性の差に、MHVのような際立った違いが見られないと思われる。これは、CD8(+)/IL-2(+)細胞、CD8(+)/TNF- α (+)細胞また、CD4(+)/IFN- γ (+)細胞においても同じ傾向を示した。このように、OVAの免疫後にみられた、CD4(+)/ヘルパーT細胞数の劇的な増加はみられなかった。一方、リンパ節においては、*plt*マウスではT細胞がほとんど存在しない。したがって、BALB/cマウスリンパ節では、感染後3日をピークにCD8(+)/IFN- γ (+)細胞が急激に増加するが、*plt*マウスリンパ節では、感染後2週間くらいまでCD8(+)/IFN- γ (+)細胞が存在しない。しかし、興味深いことに3週間くらいから*plt*マウスリンパ節に、CD8(+)/IFN- γ (+)細胞が出現する。

【結論】*plt*マウスはBALB/cマウスより、vaccinia virusに対する感受性が高い。このことは、活性化されたvaccinia virus特異的CTLの質的な差ではなく、CCL21とCCL19の発現欠損によってもたらされるCTLの量的な差に起因すると思われる。

報告書

平成15年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

アデノウイルスベクター導入により発現される新しい血管新生抑制因子の
同定とその臨床応用のための基礎研究

受賞者：森 圭介（埼玉医科大学眼科学教室）

共同研究者：奥田 晶彦*

現在本邦での成人中途失明の原因は、糖尿病網膜症が第一位であり、また、欧米では第一位で近年本邦でも急激に増加し、社会問題にもなっている疾患に加齢黄斑変性(AMD)がある。いずれも、網膜もしくは脈絡膜の新生血管を介して失明にいたる疾患である。現在までにある治療法は、レーザー光凝固で網膜や新生血管を直接凝固するもの、もしくは新生血管を手術的に除去するもので、いずれも網膜への侵襲が強く満足できる視機能を回復させることが難しい。研究代表者らは、この脈絡膜新生血管に対する新しい治療として、光化学療法¹の基礎実験を行ってきた。この光化学療法では、新生血管を高い精度で選択的に閉塞させることが可能で、従来の光凝固よりも網膜への侵襲が軽度であるのがその特徴である。しかし、この光化学療法では新生血管が発芽する環境・背景因子が改善されなかったわけなので、臨床応用した場合には、再発が大きな問題となった。従って、血管新生のプロセスを分子レベルで解明し、分子生物学的手法を用いて血管新生を制御する治療法の開発が必須であると言える。

この立場から、研究代表者らは既に血管新生に対する遺伝子治療のための基礎実験を行って来た。具体的には、抗腫瘍血管新生作用をもつendostatin遺伝子を組み込んだadenoviral vectorを脈絡膜新生血管モデルのマウスに静脈投与し、endostatinが腫瘍新生血管だけでなく、眼内血管新生にも有効であることを証明した。また、網膜色素上皮細胞から分泌されるserine protease inhibitorであるpigment epithelium-derived factor (PEDF)を発現させるadenoviral vectorを眼内注入し、抗血管新生作用のあることを網膜および脈絡膜新生血管モデルで証明した。この際、コントロールとして使用した遺伝子を組み込んでいない、いわゆる「空」のベクター自身にも、強力な網膜血管新生抑制作用のあることが判明した。この血管新生抑制作用は極めて強力で、endostatinやPEDFよりも強く、ほぼ完

*埼玉医科大学ゲノム医学研究センター発生・医学・再生部門

全に網膜新生血管を抑制していた。しかもこのコントロールベクターによる血管新生抑制作用は、ウイルス遺伝子のearly region 4 (E4)を削除しているか否かによりその効果が大きく異なっていたことから、E4から発現される蛋白の中に強力な血管新生抑制物質があることが推測される。しかし、E4を削除していないウイルスベクターは、細胞毒性が強く、そのままでは臨床応用は不可能である。そのため、このE4に含まれる血管新生抑制因子を同定し抽出し、それを新たな薬剤として治療に応用することが考えられる。

当該研究では、このコントロールベクターで発現される未知の血管新生抑制因子を特定し、臨床応用への基礎をつくるのがその目的である。これにより、新しい血管新生抑制因子が同定されれば、強力な血管新生抑制治療薬となろう。もしくは毒性の低いほかのウイルスベクター (gutless adenoviral vectorやadeno-associated viral vector)に組み込めば、新しい血管新生に対する遺伝子治療の確立が期待できる。また、この抗血管新生効果は腫瘍新生血管でも観察され、実際にマウスにおける実験的悪性腫瘍で腫瘍の縮小効果が観察された。

以上の研究背景から行われた当該研究の研究成果は大きく分けて2つに分けられる。ひとつは当初より計画されていた、アデノウイルスベクターによる抗血管新生作用のある遺伝子のスクリーニングである。先に述べたように、糖尿病網膜症および加齢黄斑変性を対象とした、抗血管新生遺伝子治療の基礎実験を行っている際に、コントロールとして使用した遺伝子を組み込んでいない、いわゆる「空」のベクター自身にも、強力な網膜血管新生抑制作用のあることが判明した。この血管新生抑制作用は極めて強力で、ほぼ完全に網膜新生血管を抑制していた。しかもこのコントロールベクターによる血管新生抑制作用は、ウイルス遺伝子のearly region 4 (E4)を削除しているか否かによりその効果が大きく異なっていたことから、E4から発現さ

れる蛋白の中に強力な血管新生抑制物質があることが推測される。しかし、E4の削除していないウイルスベクターは、細胞毒性が強く、そのままでは臨床応用は不可能である。そのため、このE4に含まれる血管新生抑制因子を同定し抽出し、それを新たな薬剤として治療に応用することが考えられた。そのため、E4の削除してあるものとならないものとの2種類のコントロールベクターをマウスの眼内に直接注入し、その後眼内で何のmRNAの発現が亢進もしくは抑制されているかマイクロアレイ法で検索した。ウイルスベクターを注入したマウスは2種類で、ひとつは何もしていない正常のC57BL6マウスで、もうひとつは、未熟児網膜症モデルで眼内新生血管のあるC57BL6マウスである。未熟児網膜症モデルは生後7日から12日の間75%酸素下で飼育し、その後大気下に戻し生後13日に眼球摘出し、mRNAを抽出した。

正常C57BL6マウスにウイルスを注入した場合、全部で12,422のprobe setとESTsのうち、非注入眼とGV10ウイルス(E4の削除していないもの)の比較では、580種類のgeneとESTsの発現が変動していた。非注入眼とGV11ウイルス(E4の削除してあるもの)の比較では、660種類のgeneとESTsの発現が変動して

いた。また、注目すべきは、GV10とGV11との比較であるが、UGのMm81873, Mm51368, Mm24547の3種類のみが変動していた。しかしながら、これらのシグナルは大きくなく、変動が有意かどうかの判定が難しい。また、正常眼での検討と、実際に新生血管の発生が見られるモデルでは発現が異なってくる可能性が考えられたため、未熟児網膜症モデルにGV11ウイルスを注入した場合と、そうでなかった場合を比較した。その結果ウイルス注入で、有意に発現が増強した遺伝子は48種類、抑制されたものが12種類であった。そのうち、特に血管新生の抑制に関連している可能性のあるもののひとつに、MHC class I antigenが挙げられる。それ以外にもいくつか候補があった。

これに加え、もうひとつの付随的な知見として、アデノウイルスベクターには神経保護作用のあることも明らかとなった。これは、網膜変性モデルとして、網膜光障害を作成し、それにウイルスベクターを導入すると、網膜視細胞は保護されていた。いずれにしても、アデノウイルスベクター投与で血管新生および神経保護に関与する遺伝子の発現が亢進していることが明らかとなった。