

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670256

研究課題名(和文)多発性硬化症における新規治療ターゲット分子の探索

研究課題名(英文)Research for new therapeutic targets in multiple sclerosis

研究代表者

粕谷 善俊(KASUYA, Yoshitoshi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70221877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルを用いて多発性硬化症の新規治療ターゲットを探索し、以下の成果を得た。(1) EAE発症抵抗性のp38 +/-マウスを用いてEAE発症介在候補分子の探索を行った。脊髄サンプルをDNA arrayに供し、WTおよびp38 +/-マウス間でsphingosine kinase 1, urokinase receptor, Ask2, Hexokinase 3、STK32Aの発現に差が見られた。(2) 生理活性ペプチド、エンドセリン(ET)がETA受容体を介して、Th17細胞におけるIL-17産生を調節することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To research new therapeutic targets in multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis was conducted, and the following results were obtained. (1) Using p38 +/- mice resistant to the pathogenesis of EAE, plausible candidates involved in the development of EAE were evaluated. A DNA array analysis with the spinal cord samples showed that a significant difference in mRNA expression of sphingosine kinase 1, urokinase receptor, Ask2, Hexokinase 3 and STK32A was observed between WT and p38 +/- mice. (2) A bioactive substance, endothelin (ET) can regulate IL-17 production in Th17 cells through ETA receptor.

研究分野：医歯薬学

キーワード：多発性硬化症 実験的自己免疫性脳脊髄炎 p38 エンドセリン

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は自己免疫疾患の 1 つであり、脱髄を主体とする病変により、視力障害、手足の麻痺や歩行障害、種々の感覚障害など、色々な箇所に多発的に障害が生ずる慢性疾患である。我が国においては難病として特定疾患に指定されている希少難病であるが (患者数: 10 万人に 9 人程度) 欧米では 10 万人あたり 40-50 名もの患者がおり、米国においては 40 万人以上の患者が確認されている。MS の発症形式は、再発と寛解を繰り返すタイプ (Relapsing Remitting: RR)、再発-寛解を繰り返しながら寛解期の短縮を伴い病状が進行するタイプ (Secondary Progressive: SP)、初期から長期にわたり病状が持続進行するタイプ (Primary Progressive: PS) の 3 つに大別される。現在、MS の治療薬は、主に RR-MS に対する治療薬であり、進行性の MS 治療薬は見当たらない。また、経口可能な薬剤も極めて少ないため、投薬時の患者の身体的負担も問題となっている。さらに、効果の期待される新薬も免疫抑制を作用点としているため、疾患の性格上、長期服用による副作用が懸念されている。したがって、これらの問題点を解決し有効な治療ターゲット分子を絞り込むには、これまでとは異なるアプローチが必要となる。

2. 研究の目的

MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) モデルを用いて、MS の新たな治療戦略の検討と創薬ターゲットの提案を目的とする。特に、EAE の発症に極めて重要な機能を果たす Th17 細胞/IL-17 産生の機能制御に関わる因子に着目してターゲットを絞り込む。

3. 研究の方法

(1) EAE 発症抵抗性マウスを用いた EAE 発症介在因子の探索: すでに我々は、MAP キナーゼの 1 つである p38 が Th17 細胞において転写レベルで IL-17 産生を制御し、EAE の発症に積極的に関わることを証明した。特筆すべきは、解析に用いた p38^{+/-}ヘテロマウス (p38^{+/-}: ノックアウトマウスは胎生致死) が、野生型 (WT) マウスに比べて、EAE の発症時の症状が軽減されているだけでなく、発症頻度も明らかに低値を示していた (40% vs 91%) ことである (Namiki K, et al., *J Biol Chem* 287:24228-24238, 2012)。そこで、WT および p38^{+/-}マウスを百日咳毒素 (PTX) -free の条件下で MOG₃₅₋₅₅ 抗原免疫 8 日後、所属リンパ節由来細胞を in vitro で MOG₃₅₋₅₅ 抗原にて 72 時間再刺激し、調製蛋白サンプルを Phospho Antibodies Array に供した。また、MOG₃₅₋₅₅ 抗原を用いて WT および p38^{+/-}マウスを免疫し、抗原免疫時を 0 日として 0 および 2 日目に PTX を静注し、20 日後、それぞれの genotype の脊髄/第 4-6 腰髄から total RNA

を抽出し、DNA array 解析に供した。

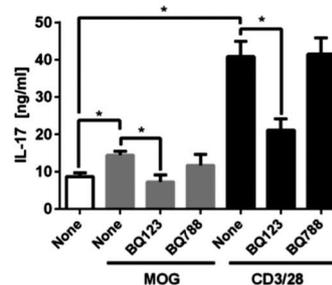
(2) 生理活性ペプチド、エンドセリン (ET) の Th17 細胞/IL-17 産生における機能解析: G 蛋白共役型受容体 (GPCR) に対する阻害剤は、すでに様々な治療薬として認可されているものが多いため、それらが MS に対する阻害効果を示せば、適用拡大によって臨床応用に直結する。我々は、様々な生理的・病態的作用を有するものの、免疫系においてはその機能が不明である ET に着目し、それらの阻害剤 (ET には A および B 受容体が存在) を用いて、ET が Th17 細胞/IL-17 産生に関わるか否かを検討した。WT マウスを PTX-free の条件下で MOG₃₅₋₅₅ 抗原免疫 8 日後、所属リンパ節由来細胞を in vitro で MOG₃₅₋₅₅ 抗原にて 72 時間再刺激時に、BQ123 (ETA 阻害剤) または BQ788 (ETB 阻害剤) を共存させ、IL-17 産生を観察した。また、naïve WT マウスのリンパ節より CD4⁺細胞を調製し、CD3 および CD28 抗体と in vitro Th17 polarizing agents (30 ng/ml IL-6, 1 ng/ml TGF- β , 10 μ g/ml anti-mouse IL-4 and 10 μ g/ml anti-mouse IFN- γ) で、72 時間処理した (Th17 分化過程)。その後、CD3 および CD28 抗体で 6 時間再刺激を行った (Th17 の活性化過程)。これらの各過程での BQ123 存在下の IL-17 産生能の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) EAE 発症抵抗性マウスを用いた EAE 発症介在因子の探索: 1318 種の候補リン酸化酵素の array 解析において、WT および p38^{+/-}マウスの両 genotype のリンパ球で MOG 刺激によって、リン酸化度合いの異なる分子が多数認められたが、両者での差については、trial ごとにバラツキが見られ、reliable な介在分子を同定するまでには至っていない。一方、脊髄サンプルの DNA array 解析から、リン酸化酵素として、sphingosine kinase 1、urokinase receptor、Ask2、Hexokinase 3、STK32A の発現が再現性を持って、p38^{+/-}と比較して WT において 2 倍以上亢進していた。今後、これら分子のリン酸化度合いと EAE への介在様式を検討していく。

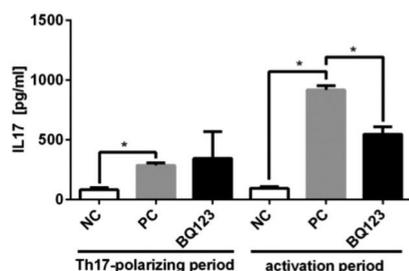
(2) 生理活性ペプチド、エンドセリン (ET) の Th17 細胞/IL-17 産生における機能解析: 図 1 に示すように、ET が ETA 受容体を介して少なくとも Th17 細胞からの IL-17 産生を調節することが明らかとなった。

図 1



そこで、この調節様式が、Th17 細胞への分化/成立に関わるのか、もしくは、成立した Th17 細胞における IL-17 の産生に関わるのかを明らかにするために、naïve T 細胞を用いた in vitro differentiation system で検討を加えた。その結果、図 2 に示すように ET/ETA シグナリンググループが、成立した Th17 細胞での IL-17 合成・産生に関与することが明らかとなった。

図2



本成果は、発表論文 として報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Yoshioka K, Namiki K, Sudo T, Kasuya Y. p38 controls self-renewal and fate decision of neurosphere-forming cells in adult hippocampus. FEBS Open Bio (査読有) 2015 in press.
DOI: 10.1016/j.fob.2015.05.001

粕谷善俊, p38 の機能と阻害薬の動向、日薬理誌(査読有)、145 巻 1 号、2015、21-26
DOI: 10.1254/fpj.145.21

Emoto N, Kasuya Y., Yanagisawa M. The Second Tomoh Masaki Award (2013). Life Sci (査読有) 118, 2014, 87-90
DOI: 10.1016/j.lfs.2014.09.001

Naito Y, Yoshioka K, Tanaka K, Tatsumi K, Kimura S, Kasuya Y. Endothelin B receptor-mediated encephalopathic events in mouse sepsis model. Life Sci (査読有) 118, 2014, 340-346
DOI: 10.1016/j.lfs.2014.03.012

Tanaka K, Yoshioka K, Tatsumi K, Kimura S, Kasuya Y. Endothelin regulates function of IL-17-producing T cell subset. Life Sci (査読有) 118, 2014, 244-247
DOI: 10.1016/j.lfs.2014.01.084

Tanaka K, Fujita T, Umezawa H, Namiki K, Yoshioka K, Hagihara M, Sudo T, Kimura S, Tatsumi K, Kasuya Y.

Therapeutic effect of lung mixed culture-derived epithelial cells on lung fibrosis. Lab Invest (査読有) 94, 2014, 1247-1259
DOI: 10.1038/labinvest.2014.109

Amano H, Murata K, Matsunaga H, Tanaka K, Yoshioka K, Kobayashi T, Ishida J, Fukamizu A, Sugiyama F, Sudo T, Kimura S, Tatsumi K, Kasuya Y. p38 Mitogen-activated protein kinase accelerates emphysema in mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. J Recept Signal Transduct Res (査読有) 34, 2014, 299-306
DOI: 10.3109/10799893.2014.896380

粕谷善俊, p38 阻害剤、VIII. 関節リウマチの治療/新規開発治療薬、最新関節リウマチ学-寛解・治癒を目指した研究と最新治療-, 日本臨床(査読無)72 巻増刊号 3、2014、pp525-529

田中健介、巽浩一郎、粕谷善俊、肺組織共培養系由来の上皮細胞とその機能と応用、日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌 別冊(査読有) 44 巻, 2013、31-35
<http://rods777.ddo.jp/s002/kaimen.htm>

[学会発表](計 19 件)

梅澤弘毅、田中健介、藤田哲雄、吉岡健人、巽浩一郎、粕谷善俊、肺線維化に対して治療能力を持つ新たな肺胞上皮細胞集団、第 88 回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(名古屋市熱田区)、2015、3 月 20 日

内藤雄介、吉岡健人、巽浩一郎、粕谷善俊、選択的 ETB アンタゴニストによる敗血症モデルマウスの脳への効果、第 88 回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(名古屋市熱田区)、2015、3 月 19 日

吉岡健人、並木 香奈、須藤龍彦、粕谷善俊、成体海馬由来神経幹細胞の自己複製能・神経分化能における p38MAP キナーゼの役割、第 88 回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(名古屋市熱田区)、2015、3 月 19 日

Kobayashi T, Tanaka K, Amano H, Fujita T, Kimura S, Tatsumi K, Kasuya Y. Role of IL-6 signal in the epithelial injury-based mechanisms of lung fibrosis. American Thoracic Society (ATS) 2014 International Conference, San Diego, USA, Apr. 21

Fujita T, Tanaka K, Tatsumi K, Kimura S, Kasuya Y. Intratracheal

administration of ET receptor antagonists suppresses the development of LPS-induced acute lung injury. American Thoracic Society (ATS) 2014 International Conference, San Diego, USA, Apr. 20

Naito Y, Yoshioka Y, Tanaka K, Matsunaga H, Ishida J, Fukamizu A, Kimura S, Tatsumi K, Kasuya Y. A simple and low-invasive sepsis mouse model. American Thoracic Society (ATS) 2014 International Conference, San Diego, USA, Apr. 18

Amano H, Murata K, Matsunaga H, Tanaka K, Kobayashi T, Ishida J, Fukamizu A, Sugiyama F, Kimura S, Tatsumi K, Kasuya Y. A role of p38 mitogen-activated protein kinase in emphysema induced by cigarette smoke solution and lipopolysaccharide in mice. American Thoracic Society (ATS) 2014 International Conference, San Diego, USA, Apr. 18

小林健、田中健介、天野寛之、藤田哲雄、梅澤弘毅、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊、IL-6 シグナルの阻害はブレオマイシン誘導性肺障害を悪化させる、第 87 回日本薬理学会年会、仙台国際センター(仙台市青葉区) 2014、3 月 21 日

藤田哲雄、田中健介、巽浩一郎、木村定雄、粕谷善俊、急性肺損傷におけるエンドセリン受容体拮抗薬の気管内投与による肺炎症の制御、第 87 回日本薬理学会年会、仙台国際センター(仙台市青葉区) 2014、3 月 21 日

天野寛之、村田和弥、松永博文、田中健介、小林健、石田純治、深水昭吉、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊、新たな COPD モデルの提案と p38MAPK の関連について、第 87 回日本薬理学会年会、仙台国際センター(仙台市青葉区) 2014、3 月 21 日

田中健介、吉岡健人、巽浩一郎、木村定雄、粕谷善俊、エンドセリンが IL-17 産生 T 細胞の機能を制御する、第 87 回日本薬理学会年会、仙台国際センター(仙台市青葉区) 2014、3 月 19 日

Fujita T, Tanaka K, Tatsumi K, Kimura S, Kasuya Y. Intratracheal administration of endothelin receptor antagonists attenuates pulmonary inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. The Thirteenth International

Conference on Endothelin, University of Tsukuba, Tokyo Campus (Bunkyo-ku, Tokyo), 2013, Sep. 10

Naito Y, Tanaka K, Yoshioka K, Tatsumi K, Kimura S, Kasuya Y. Effects of selective ETB receptor antagonist on brain in sepsis mouse model. The Thirteenth International Conference on Endothelin, University of Tsukuba, Tokyo Campus (Bunkyo-ku, Tokyo), 2013, Sep. 10

Tanaka K, Yoshioka K, Tatsumi K, Kimura S, Kasuya Y. Endothelin controls the IL-17 production from T lymphocytes. The Thirteenth International Conference on Endothelin, University of Tsukuba, Tokyo Campus (Bunkyo-ku, Tokyo), 2013, Sep. 10

田中健介、藤田哲雄、吉岡健人、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊、肺胞 II 型上皮細胞の新規調整法と応用、第 53 回日本呼吸器学会学術講演会、東京国際フォーラム(東京都千代田区) 2013、4 月 20 日

内藤雄介、吉岡健人、田中健介、松永博文、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊、新たな敗血症モデルマウスについての検討、第 53 回日本呼吸器学会学術講演会、東京国際フォーラム(東京都千代田区) 2013、4 月 20 日

天野寛之、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊、II 型肺胞上皮細胞と IL17、第 53 回日本呼吸器学会学術講演会、東京国際フォーラム(東京都千代田区) 2013、4 月 20 日

小林健、田中健介、天野寛之、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊、肺線維症の病態進展と蛋白質リン酸化シグナル、第 53 回日本呼吸器学会学術講演会、東京国際フォーラム(東京都千代田区) 2013、4 月 20 日

粕谷善俊、p38 阻害薬、第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 / 第 22 回国際リウマチシンポジウム(招待講演)、国立京都国際会館(京都市左京区) 2013、4 月 18 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 3 件)

名称: 肺サーファクタントタンパク質陽性細胞への分化誘導能を有する細胞培養上清液
発明者: 萩原昌彦、粕谷善俊、田中健介、

藤田哲雄
権利者：宇部興産株式会社、千葉大学
種類：特許
番号：特願 2014-259829 号
出願年月日：2014 年 12 月 24 日
国内外の別：国内

名称：肺障害治療能を有する細胞培養上清液
発明者：萩原昌彦、粕谷善俊、田中健介、藤田哲雄
権利者：宇部興産株式会社、千葉大学
種類：特許
番号：特願 2014-259827 号
出願年月日：2014 年 12 月 24 日
国内外の別：国内

名称：増大された継代能を有する神経幹細胞、前記増大された継代能を有する神経幹細胞の製造方法、神経幹細胞の継代能を増大させるための神経幹細胞の培養方法
発明者：宮本憲優、尾野雄一、並木香奈、粕谷善俊
権利者：エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社
種類：特許
番号：PCT/JP2013/079200 号
出願年月日：2013 年 10 月 29 日
国内外の別：国際（国際公開番号：WO2104/069431 号）

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/bunsis eitai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

粕谷 善俊（KASUYA, Yoshitoshi）
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：70221877

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者