

## 第40回 聖マリアンナ医科大学組換え DNA 実験セミナー

(主催：組換え DNA 実験安全委員会)

【平成 15 年 10 月 24 日(金) 於：明石会館 5 階実習室 2】

今回は、山田光彦先生(昭和大学附属烏山病院・精神科・講師)をお招きし、『リバースファーマコロジーによる新規抗うつ薬のゲノム創薬研究』と題してご講演頂きました。

松井 宏晃(アイソトープ研究施設)

## 講演抄録

うつ病の生涯罹患率は想像以上に高く、米国では女性で 21.3%，男性で 12.7% という。うつ病治療が長期化することによる社会的な損失も大問題であり、確実な治療効果を有する新規抗うつ薬の開発が急務である。

抗うつ薬の作用機序はこれまで主にモノアミン神経伝達機構に基づいて研究がなされてきた。約 50 年前に提唱された、いわゆる「モノアミン仮説」に基づき開発された薬物は、確かに一定の成果を上げてきたが、その限界は明らかであり、抗うつ薬の真の作用機序を理解するためには、新たな仮説の提言が必要である。実際、抗うつ薬の臨床効果は長期間の服薬継続によってはじめてもたらされるのであり、抗うつ薬の作用機序はその急性薬理作用と峻別して考える必要がある。近年、抗うつ薬長期投与により間接的に引き起こされた神経化学的变化を遺伝子転写機構の調節を伴う量的変化として捉える研究が可能となってきた。そこで、我々は、抗うつ薬長期投与により発現変化する脳内機能分子の網羅的な探索を試みている。

まず、ゲノム・プロテオーム研究とバイオ・インフォマティクスを組み合わせ、実験動物脳より、うつ病治療のターゲットとなりうる遺伝子やタンパク質をスクリーニングした。その結果、数百個の候補遺伝子をラット前頭葉皮質および海馬から同定し、ADRGs (antidepressant related genes) と名付けて cDNA 全長の塩基配列を得、詳細に解析を進めた。次に、候補遺伝子について、クローンごとに RT-PCR 法、Northern

blotting 法等を用いて再現性の確認および定量を行ってきた。また、最近では、これらの ADRGs 遺伝子をスポットした独自の cDNA マイクロアレイ (ADRG microarray) を開発し、スクリーニングの迅速化を可能にした。このマイクロアレイを利用し、コントロール群および様々な処置群(向精神薬投与、電気けいれん負荷、ストレス負荷など)のラット脳サンプルより mRNA を抽出し遺伝子発現プロファイルの解析を進めている。さらに、候補ターゲット分子が真のターゲットとなりうるかを選別するために、定量的 RT-PCR 法による解析、特異抗体を用いたタンパク質レベルでの解析、in situ hybridization 法および免疫組織化学的解析などを併用し、加えて、ADRG 遺伝子産物を発現しないノックアウト動物を作出し、行動解析を行うなど、多方面からのアプローチを併用している。

これまでに得られた候補分子群の中には、神経突起・軸索の進展や退縮、神経伝達物質の開口放出機構といった神経可塑的变化に機能的に関わるものが複数存在していた。そこで、「真の抗うつ薬作用機序とは機能タンパク質の発現を介した脳システムの神経可塑的变化である」という新たな作業仮説を立て、抗うつ薬の作用機序として、「神経回路網の構造・機能的リモデリング」を想定した研究を進めている。この「治療機序の解明による抗うつ薬新規ターゲット分子の探索」は我々に画期的な作業仮説を提言するものであり、将来は新しい作用機序をもつ医薬品の開発という具体的な成果につながるものと考えられる。

参考文献：1) Nature Gen., 8:236-242,1994. 2) Biol. Chem., 380:1365-1364,1999. 3) J. Neurochem., 73:2510-2516,1999. 4) J. Biol. Chem., 276:41150-41160,2001.

## 第 41 回 聖マリアンナ医科大学組換え DNA 実験セミナー

(主催：組換え DNA 実験安全委員会)

【平成 15 年 11 月 27 日 (木) 於：明石会館 5 階実習室 2】

今回は、新田淳美先生 (名古屋大学大学院医学系研究科・医療薬学分野・助教) をお招きし、『疎水性ジペプチド Leu-Ile の神経保護および薬物依存改善作用』と題してご講演頂きました。

松井 宏晃 (アイソトープ研究施設)

## 講演抄録

パーキンソン病の原因は、黒質 - 線条体ドパミン神経細胞の変性である。グリア由来の培養細胞 (rat B49) から分泌される神経栄養因子として同定された GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) には、ドパミン神経細胞の生存を促進し、機能を高める作用がある。さらに、線条体で分泌された GDNF は、中脳のドパミン細胞へと逆行性に軸索輸送される。このため、GDNF はパーキンソン病の治療薬として注目された。しかし、GDNF は分子量が大きく、血液 - 脳関門を通過せず、末梢投与では中枢作用を示さない。そこで、GDNF を増加させる低分子化合物ならば、血液 - 脳関門を通過し中枢作用を示す治療薬になりうるものと考えた。

免疫抑制薬 Cyclosporin A が神経細胞において BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) や GDNF を増加させることがわかった。加えて、免疫抑制薬 FK506 (Tacrolimus) には、神経細胞のみならずグリア細胞においても BDNF や GDNF 増加作用があることがわかった。確かに FK506 は血液 - 脳関門を通過し脳内へ移行するが、強力な免疫抑制作用を有するため、長期投与と実験が困難であった。そこで、FK506 の GDNF 増加作用に着目し、免疫抑制作用を欠くイムノフィリンリガンドを探索した。FK506 結合タンパク質との結合に必要な FK506 の部分構造がジペプチド、ロイシル-イソロイシン (Leu-Ile) の構造に類似していることから、ラット海馬の初代培養細胞を種々の合成ジペプチド存在下に培養し、GDNF 量を測定した。その結果、Leu-Ile が最も顕著な GDNF 増加

作用を示した。期待したように、Leu-Ile には免疫抑制活性を認めなかった。Leu-Ile は、脳室内のみならず腹腔内投与でも、脳内の BDNF および GDNF を増加させた。神経損傷モデルとして第 10 胸髄レベルで脊髄半切を施したラットに Leu-Ile を投与し、Baso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale を用い、損傷後の運動機能改善度を評価した。その結果、Leu-Ile を 2 週間投与したラットでは、対照群に比して運動機能が有意に改善した。以上の結果を踏まえ、Leu-Ile を髄損傷治療薬として臨床応用すべく、目下、創薬研究を進めている。

GDNF のコカイン依存改善作用や TNF のモルヒネあるいはアンフェタミン等の薬物依存改善作用が報告された。そこで、Leu-Ile が GDNF を増加させ、薬物依存改善作用を示すとの仮説を立てた。依存形成薬物には、日本で社会的な問題となっている、アンフェタミンを選択した。ラットに Leu-Ile を投与すると、アンフェタミン投与後の運動亢進が減弱した。一般に動物実験で薬物依存改善作用を認める薬物は、依存形成する薬物と同時投与あるいは前投与しないと薬物依存改善作用を示さない。興味あることに、Leu-Ile は、アンフェタミン依存形成後に投与しても、薬物依存を改善した。当初、Leu-Ile は、FK506 結合タンパク質に結合するイムノフィリンリガンドと考えていたが、詳細な解析により、FK506 結合タンパク質 (FKBP12, FKBP55) には結合しないことがわかった。また、Leu-Ile は、アンフェタミン依存と関連するドパミントランスポーターにも結合しない。現在、Leu-Ile の作用メカニズムを明らかにする目的で、Leu-Ile 結合タンパク質 (受容体?) の同定を試みている。

参考文献：1) Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease (Edited by Mizuno et al., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002), pp.463-467. 2) J. Pharmacol. Exp Ther., 291:1276-1283(1999).