

—平成18年度 岐阜薬科大学特別研究費（プロジェクト）—

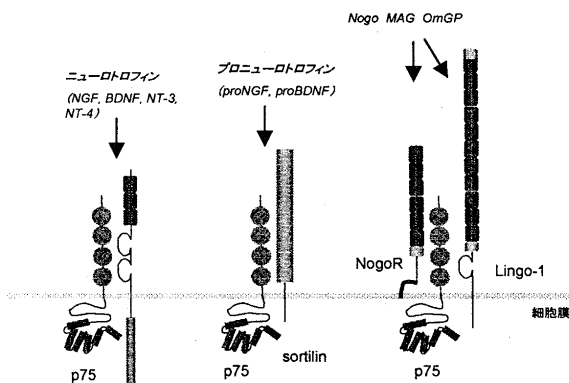
p75^{NTR}の機能制御を目的とする創薬研究システムの構築

古川 昭栄¹⁾、野元 裕¹⁾、福光 秀文¹⁾
 稲垣 直樹²⁾、田中 宏幸²⁾

1. 緒言

ニューロトロフィン受容体、p75^{NTR}は神経系と免疫系を中心に様々な細胞内シグナルを伝達する¹⁾。近年、神経系での多彩な機能が明らかになってきた。すなわち、これまで知られていた 1) 神経軸索の伸長、分化促進、生存維持作用のほかに、2) Nogo や MAG による中枢神経軸索の伸長阻害²⁾、3) アポトーシスの誘導作用³⁾が見出された（下の図を参照）。多彩なシグナルは多くの p75^{NTR} リガンドや共受容体の存在によると考えられる。しかも細胞の生存と死、軸索の伸展と阻害など、驚くほど正反対の応答を起こすのが p75^{NTR} シグナルの特徴である。神経細胞以外にも多くの細胞で発現しており、増殖、分化、機能維持などの通常シグナルのほか、病態形成にも関与する。近年、癌細胞の増殖や転移、動脈硬化への関与も報告されている。難治化、慢性化する現代の疾病の治療の鍵となる分子でありその機能制御は新しい創薬視点になると考えられる。

本研究では学内の多方面の研究領域からの参加を歓迎する。そのため古川らは今年度 p75^{NTR} 研究用ツールの作製、整備を行った。稲垣、田中は p75^{NTR} 遺伝子欠損マウスを用いてアレルギー疾患への p75^{NTR} の関与を解析した。



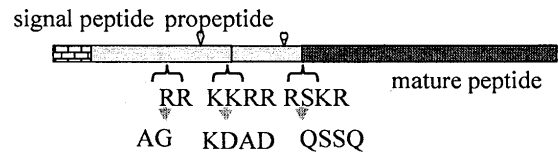
2. p75^{NTR} 研究ツールの作製

本研究の遂行に必要な研究用ツールとして、1) p75^{NTR} に高親和性で結合し、細胞死を誘導するプロ NGF タンパ

ク質、2) 膜貫通ドメインを除いた p75^{NTR} の細胞外ドメイン、3) p75^{NTR} 受容体のコンディショナルトランスジェニックマウス (p75^{NTR}Tg マウス) について、1)、2) は作製中、3) はベクターの構築を終了したところである。

1) プロ NGF の大量調製

プロ NGF は前駆体部分に 3ヶ所のプロセシングサイトがあり通常発現中に切断され成熟型になる。そこで K, R を他のアミノ酸に改変した改変プロ NGF 遺伝子(下の図)をバキュロウイルスベクターに組み込み、カイコでの発現を業者(片倉工業)に委託した。今後、カイコ抽出物からカラムによる精製を行う。10 mg 程度を調製する予定である。

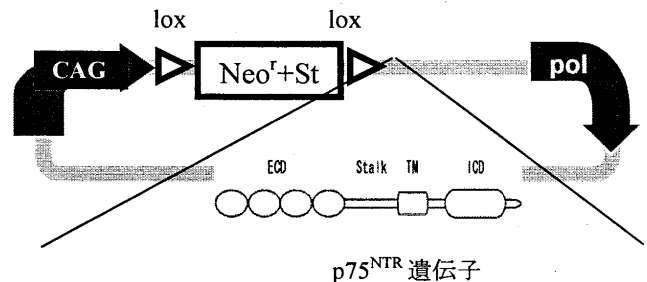


2) p75^{NTR} の細胞外ドメインの大量調製

p75^{NTR} の細胞外ドメインについてもカイコで大量に発現させ、調製する。この分子を生体に投与すると p75^{NTR} リガンドに拮抗するので、p75^{NTR} 機能を抑制する有用な道具となる。

3) p75^{NTR}Tg マウスの作製

CAG promoter は哺乳類で広範に発現を誘導する。この下流に loxp 遺伝子に挟まれた neomycin 遺伝子とストップコドンがあるが通常発現しない。しかしアデノウイルスベクターで Cre 遺伝子を同一細胞で発現させると loxp で挟まれた stop コドンが除去され p75^{NTR} 遺伝子が発現する。平成 19 年度にはモデルとして使えるよう計画中である。



3. マウス搔破行動発現における p75^{NTR} の役割

神経成長因子低親和性受容体 p75^{NTR} 遺伝子を欠損するマウス (p75^{NTR}-KO マウス) および野生型マウス (WT マウス) を用いて搔破行動の発現を検討し、比較した。

1) histamine および serotonin 注射による搔破行動

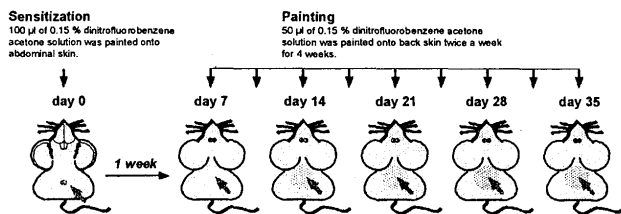
WT マウスおよび p75^{NTR}-KO マウスの頸背部の毛を刈り、10⁻⁴ g/ml の histamine あるいは serotonin の生理食塩水溶液 20 μl を皮内注射した後 2 時間に出現する、注射部位への搔破行動を計数した。

histamine 注射は、注射直後に 0.5% Evans blue 生理食塩水溶液 0.25 ml を静脈内注射すると、30 分間に、WT マウス、p75^{NTR}-KO マウスのいずれにおいても約 20 μg の色素漏出が認められたが、搔破行動はいずれのマウスにおいてもほとんど誘発されなかった。

serotonin 注射は、WT マウスで約 20 μg の、p75^{NTR}-KO マウスでは約 30 μg の色素漏出を誘発し、WT マウスに 2 時間で約 90 回の搔破行動を誘発したが、p75^{NTR}-KO マウスでは搔破行動はほとんど認められなかった。

2) dinitrofluorobenzene 反復塗布による皮膚炎と搔破行動

マウスの腹部の毛を刈り、0.15% dinitrofluorobenzene (DNFB) acetone 溶液 100 μl を塗布して感作し、1 週間後から週 2 回、計 9 回、毛を刈った頸背部皮膚に 0.15% DNFB 溶液 50 μl を塗布して皮膚炎を誘発 (図参照) し、9 回目の塗布後に搔破行動および炎症部位の組織像を観察した。



[hematoxylin-eosin 染色] acetone を塗布した p75^{NTR}-KO マウス皮膚は、acetone を塗布した WT マウス皮膚に比して明らかに薄く、DNFB を反復塗布した後においても、表皮の肥厚、皮膚の腫脹などの炎症の程度は p75^{NTR}-KO マウスの方が軽度であった。

[抗 PGP9.5 抗体を用いた免疫染色] 抗 PGP9.5 抗体を用いて皮膚の神経線維を染色して観察した。DNFB 反復塗布により、肥厚した表皮内への多数の神経線維の侵入が認められたが、p75^{NTR}-KO マウスでは表皮へ侵入する神経線維は明らかに減少した。染色部位を定量的に評価した成績では、p75^{NTR}-KO マウスでは WT マウスの約 1/3 であった。

[搔破行動] 9 回目の塗布後 2 時間に、WT マウスでは約 500 回の搔破行動が誘発されたが、p75^{NTR}-KO マウスでは約 30 回にすぎなかった。

3) 考察

p75^{NTR}-KO マウスではメディエーターによる搔破行動および DNFB 塗布による搔破行動がほとんど誘発されないことから、p75^{NTR} が搔破行動の発現に主要な役割を演じることを示唆する。また、DNFB 反復塗布によって表皮内への神経線維の伸長が誘導されるが、p75^{NTR}-KO マウスでは表皮内神経線維は WT マウスの 1/3 程度で

あることから、p75^{NTR} が神経線維の伸長にも重要な役割を演じることを示唆するが、p75^{NTR}-KO マウスでは搔破行動がほぼ完全に消失することに比べると、神経線維伸長には他の受容体あるいは機序も関与するものと推定される。

4. ホルムアルデヒド反復塗布によるマウス皮膚炎における神経原性炎症の関与

1) 緒言

これまでに教室では、シックハウス症候群の発症原因物質の一つとして考えられている揮発性有機化合物のうち、ホルムアルデヒド(FA)のマウス皮膚症状への影響を検討した結果、FA (2-10%) を 1 週間に 1 回宛、計 5 回、反復塗布することにより耳介腫脹が生じることを見出している。また、5 回目の FA 塗布 24 時間後の耳介組織においてカプサイシン受容体である TRPV1 および神経栄養因子の BDNF ならびに NT-3 の mRNA の発現増強が観察された。

2) 目的

そこで、これら機能分子の意義を明らかにする目的で、TRPV1 受容体拮抗薬の capsazepine および NGF 低親和性受容体 p75^{NTR} 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。

3) 実験方法

実験は、当教室のマウス DNFB 皮膚炎モデルのプロトコールに従って行った。すなわち、雌性 BALB/c マウスの両耳介の表裏に 5% の FA を週 1 回、計 5 回反復塗布し反応を惹起した。溶媒をアセトンとして検討した。塗布前後の種々の時間に、炎症反応の評価として耳介の厚みを測定した。受容体拮抗薬ならびに遺伝子欠損マウスを用いた検討では、いずれの場合も 5%FA の反復塗布による耳介腫脹反応に対する影響を観察した。すなわち、TRPV1 競合的受容体拮抗薬である capsazepine は、FA 塗布 30 分前に皮下投与した。また、耳介組織において発現亢進の認められた BDNF および NT-3 の意義を、NGF 低親和性受容体 p75^{NTR} 欠損マウス (Jackson Laboratory, USA) を用いて検討した。

4) 結果と考察

その結果、FA(5%)による耳介腫脹に及ぼす TRPV1 受容体拮抗薬の capsazepine の影響を検討したところ抑制傾向が観察された。また、NGF 低親和性受容体 p75^{NTR} 遺伝子欠損マウスを用いた検討では、野生型マウスに比し耳介腫脹の有意な低下が観察された。以上の成績より、神経栄養因子などを介した神経原性炎症が FA 誘発皮膚反応に関与していることが示唆された。

5. 引用文献

- 1) N. F. Schor, The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog. Neurobiol.*, **77**, 201-214 (2005).
- 2) S. Mi *et al.*, LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat. Neurosci.*, **7**, 221-228 (2004).
- 3) A. Nykjaer *et al.*, Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, **427**, 843-848 (2004)