

第123年会

日本薬学会

The Pharmaceutical Society of Japan

Nagasaki

要旨集－2

化学系薬学
有機化学、生薬学、天然物化学

医薬化学
医薬品化学



会期 平成15年3月27日(木)～29日(土)

28【P2】II-422

乳酸球菌(EF2001)に対する抗アレルギーに関する研究

○山下剛範¹、具然和¹、斎藤清人¹、岩佐広行²、岩佐正弘²、田中正史¹、林 郁夫¹、鈴木郁功¹(¹鈴鹿医療科学大学、²(株)日本BRM研究所)

【目的】先行研究により、乳酸球菌(EF2001)には免疫効果が認められ、その作用機構はマクロファージ活性作用によることが明らかにされている。本研究では、乳酸球菌(EF2001)の投与と非投与における血中 IgE の濃度を調べることで抗アレルギーの有無を検討した。【方法】BALB/C 系雄マウスを 6 週齢で導入し、1 週間の予備飼育後、乳酸球菌(EF2001)を毎日経口投与した。投与 3 週間後に心臓より採血を行い、ELISA 法により血清中の IgE 抗体を測定した。IgE 抗体の測定は、アマシャムバイオサイエンス社製の IgE、mouse ELISA system を用いて測定を行い、測定手順はキットに従って行った。

【結果及び考察】IgE の濃度は、コントロールと比較して、乳酸球菌(EF2001)投与群の方が低下を示した。また、乳酸球菌(EF2001)投与により、OVA 特異的総 IgE レベルを低下させた。これらは、乳酸球菌(EF2001)は、マクロファージ活性作用による内分泌系及び神経系に間接的に恒常性を保つことで、IgE レベルを低下させると考えられる。乳酸球菌(EF2001)を摂取することで免疫増強効果だけでなく、むしろ IgE の濃度を下げ、抗アレルギーに有効であると考えられる。

28【P2】II-423

肥満細胞の成熟過程に伴って発現誘導される PYPAF1 の解析

○渥美洋平¹、矢ノ下玲¹、古賀久美子¹、武富芳隆¹、杉木俊彦¹、永井博次²、村上誠¹、工藤一郎¹ (¹昭和大・薬・衛生化学、²岐阜薬大・薬理)

【目的】我々はマウス骨髓由来培養肥満細胞を in vivo で 組合組織型肥満細胞様に成熟させる系を確立し、この過程で発現誘導される新規遺伝子 (MMIG: mast cell maturation inducible gene) を 7 種同定している。これらのうち MMIG1 の全一次構造を決定し、性状 解析を試みた。

【方法・結果】(1) MMIG-1 は 1033 アミノ酸からなるタンパク質であり、N 末端に PYRIN domain、中央に nucleotide binding site domain (NBS)、C 末端に leucinerich repeat domain (LRR) を有していた。本因子は最近報告されたヒト PYPAF-1 と約 85% の相同意を示したことから、そのマウスホモログであると考えられた。(2) 本遺伝子は少なくとも 10 個の exon からなり、マウス第 11 番染色体に存在していた。(3) LRR 領域における 4 種の splicing variants が検出され、各々が肥満細胞の成熟過程の異なる時期に誘導されることが示唆された。(4) 本因子は血球細胞での高い発現が認められた。(5) FLAG タグ標識本因子を過剰発現させた HEK293 細胞の抗体染色の結果、細胞質に局在していた。また、過剰発現細胞に有意な形態変化が認められた。(6) ニトロフルオロベンゼン誘発アトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて本因子の発現誘導が確認された。

【考察】PYRIN、NBS、LRR ドメインを持つ一群の蛋白は細胞の増殖分化、炎症、アレルギーに関与することが提唱されており、PYPAF-1 もこれらの生命現象に関わるものと推察される。

28【P2】II-424

肥満細胞の成熟過程に伴って発現誘導される NDRG1 の機能解析

○杉木俊彦¹、武富芳隆¹、矢ノ下玲¹、渥美洋平¹、村上誠¹、工藤一郎¹ (¹昭和大・薬・衛生化学)

【目的】我々は未成熟なマウス骨髓由来培養肥満細胞を組合組織型肥満細胞様へと分化成熟させる培養系を確立し、cDNA subtraction 法により分化成熟の早期から NDRG1 遺伝子が強く発現誘導されることを見い出した。更に NDRG1 が肥満細胞の脱颗粒反応の亢進に何らかの形で関与することを見い出した。そこで我々は、NDRG1 発現の分子メカニズムの解明を目的として以下の実験を行った。

【方法・結果】(1) 抗 NDRG1 抗体を用いた免疫染色により RBL-2H3 細胞内における NDRG1 の局在を観察したところ、未刺激時には細胞質に斑点状に存在しており、IgE/抗原刺激後すみやかに核周辺へと移行した。(2) ³²P 正リン酸で標識した RBL-2H3 細胞の lysate から NDRG1 を免疫沈降し、NDRG1 のリン酸化を観察した。その結果、NDRG1 は構成的にセリンとスレオニンがリン酸化されており、更に IgE/抗原刺激後 1 分でセリン残基のリン酸化が亢進する傾向がみられた。(3) 大腸菌により調製した NDRG1 リコンビナントタンパク質は in vitro において protein kinase A (PKA)、protein kinase C (PKC) 及び Calmodulin kinase II (CaMKII) により強くリン酸化された。また RBL-2H3 細胞内での NDRG1 のリン酸化は PKA 及び CaMKII の阻害剤により顕著に、PKC 阻害剤により部分的に抑制され、これに伴って脱颗粒反応が有意に抑制された。(4) NDRG1 と相互作用する分子を yeast two-hybrid 法により探索し、exocytosis に関与する分子である Hsc70 を同定した。また、NDRG1 と Hsc70 が実際に RBL-2H3 細胞内において結合することを免疫共沈降法により明らかにした。【考察】NDRG1 の機能が Hsc70 との相互作用及びリン酸化によって制御を受けている可能性が示唆された。

28【P2】II-425

オキシトシナーゼサブファミリーに属する新規酵素のクローニングおよび生理機能の解析

○谷岡利裕、服部 明、増田信奈子、辻本雅文 (理研・細胞生化学)

【目的】近年、オキシトシナーゼサブファミリーを形成する分子の新たな生理機能が解明されるようになり、本酵素群は多くの重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。今回、本サブファミリーに属する新たな酵素分子の同定およびその生理機能の解明を目的として以下の解析を行った。

【方法・結果】Placental leucine aminopeptidase (P-LAP)/オキシトシナーゼと相同性を有する EST 配列をプローブとして、白血球 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、新規酵素 Leukocyte-derived neutral aminopeptidase (L-NAP) を単離した。L-NAP には、alternative splicing によって生成する 2 種類のアイソフォーム、960 アミノ酸よりなる long form と 532 アミノ酸からなる short form が存在することが明らかとなった。次に、種々の組織における L-NAP mRNA レベルを検討した結果、その発現は広範囲であり、特に心臓、脾臓、末梢白血球での発現が高かった。一方、培養細胞株における L-NAP タンパク質の発現様式を調べたところ、Jurkat T 細胞では両アイソフォームが、293 細胞では long form が、HeLa 細胞では short form のみが発現しており、各細胞に特異的であることが明らかとなった。また、Jurkat T 細胞を用いて L-NAP 発現に対する IFN-γ 刺激の影響を検討した結果、それは顕著に亢進された。次に L-NAP の細胞内局在を細胞免疫染色および細胞分画法を用いて調べた結果、L-NAP は小胞体内腔に存在することが示唆された。

【考察】L-NAP と同じくオキシトシナーゼサブファミリーに属する Adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP) が小胞体内腔に存在し、内在性抗原ペプチドの N 末端トリミングを行うことを、我々はごく最近明らかにしたが、上記結果より L-NAP も抗原ペプチド生成に関与している可能性が示唆された。

28【P2】II-426

脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼは内在性抗原ペプチドの最終プロセシング酵素である

○服部 明、辻本雅文 (理研・細胞生化)

【目的】内在性抗原は、細胞質においてプロテアソームなどによって大まかに消化された後、小胞体へと運ばれて MHC クラス I 分子へと提示される。近年、この内在性抗原の消化過程には、小胞体内腔での抗原前駆体ペプチドの N 末端トリミングという最終段階が存在する可能性が強く示唆されるようになってきた。しかしながら、これまでに小胞体内腔に局在するアミノペプチダーゼ分子は全く知られておらず、その責任酵素の同定には至っていない。そこでオキシトシナーゼサブファミリーに属する新規酵素として我々が最近クローニングした脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼ (A-LAP) について、その関与を検討した。

【結果および考察】A-LAP の細胞内局在を免疫染色によって検討した結果、HeLa 細胞における A-LAP の染色像は、抗 KDEL 抗体のそれと極めてよく一致していた。さらに、エンドグリコシダーゼを用いた解析および超遠心法による細胞分画の結果から、A-LAP は小胞体内腔に存在することが明らかとなった。また、組換え型酵素を用いた解析の結果、A-LAP の人工基質に対する基質特異性およびオボアルブミン抗原ペプチドの消化能は、小胞体アミノペプチダーゼのそれとよく似ていた。次に、HeLa 細胞を用いて A-LAP 発現に及ぼす各種サイトカインの影響を検討したところ、解析したサイトカインのうちインターフェロン (IFN)-γ が最も顕著に A-LAP の発現を亢進した。以上の解析結果から、A-LAP が内在性抗原ペプチドの最終プロセシング酵素として機能している可能性が強く示唆された。さらに A-LAP の発現が IFN-γ によって顕著な亢進を受けることから、本酵素はウィルス感染細胞やガン細胞などの排除機構において重要な役割を担っていると考えられる。

28【P2】II-427

リウマチ患者由来滑膜細胞からの炎症性サイトカインの産生に及ぼすエストラジオール類の影響

○伊藤友香、石田紗智子、林 秀敏、小野喜菊夫 (名市大薬)

【目的】関節リウマチ (RA) は関節滑膜病変の増悪、寛解を繰り返す炎症性自己免疫疾患であり、滑膜では様々なサイトカインが過剰に産生され、炎症の持続および関節破壊に関与していると考えられる。一方、エストラジオール (E2) は女性ホルモンとして、生殖機能のほか、免疫組織、脂質・骨代謝等において作用することが報告されているが、RA の炎症や進行に対する E2 の影響については不明な点が多い。今回我々はリウマチ患者由来滑膜細胞からの炎症性サイトカインの産生が E2 や E2 活性をもつ内分泌搅乱物質によってどのような影響を及ぼされるのかを IL-1α に注目して検討した。

【方法】リウマチ患者由来線維芽細胞様滑膜細胞株 MH7A を用いてエストラジオール類による IL-1α の転写活性の変化を IL-1α 5' 上流域の様々な長さや変異を持つレポーター遺伝子を調製し、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。

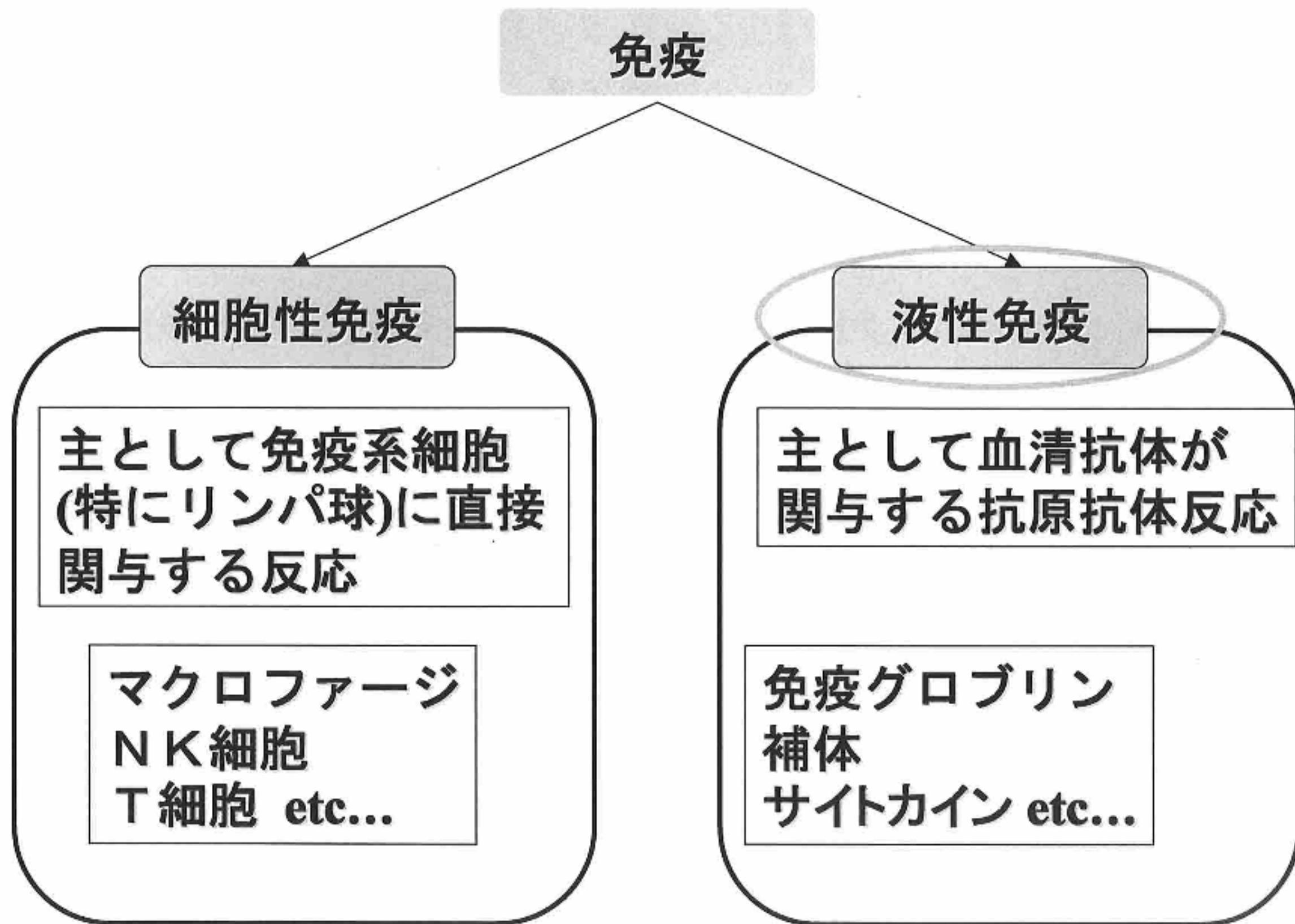
【結果および考察】MH7A 細胞を E2 あるいは E2 活性をもつ内分泌搅乱物質で刺激するとエストロゲンレセプター (ER) α 依存的に IL-1α の転写活性が大きく増加することが分かった。一方、ERβ ではこのような活性化はみられなかった。またプロモーター解析の結果からこの転写活性化には IL-1α のプロモーター領域の GC rich 領域が重要であることが明らかとなった。IL-1α のプロモーターの塩基配列上には典型的な ER 結合部位は存在しないことから、E2 あるいは内分泌搅乱物質により活性化された ERα が直接 DNA に結合するのではなく、別の因子を介して転写活性に影響を与えることが示唆された。

EF 2001 (*Enterococcus·Faecalis*) における 総IgE, IgG, IgMの測定によるアレルギー反応 抑制と免疫増強に関する研究

具 然和¹、鈴木郁功¹、馬面賢一²、大神田正文
²、岩佐広行¹、岩佐正弘¹、
1鈴鹿医療科学大学大学院
2日本BRM Co., LTD.

実験目的

1. Enterococcus Faecalisによる抗体産生の有無および免疫賦活作用のメカニズムについて免疫グロブリンIgG, IgM測定により調査および検討する。
2. Enterococcus Faecalisによる免疫グロブリンIgE測定により、アレルギー抑制反応について検討する。

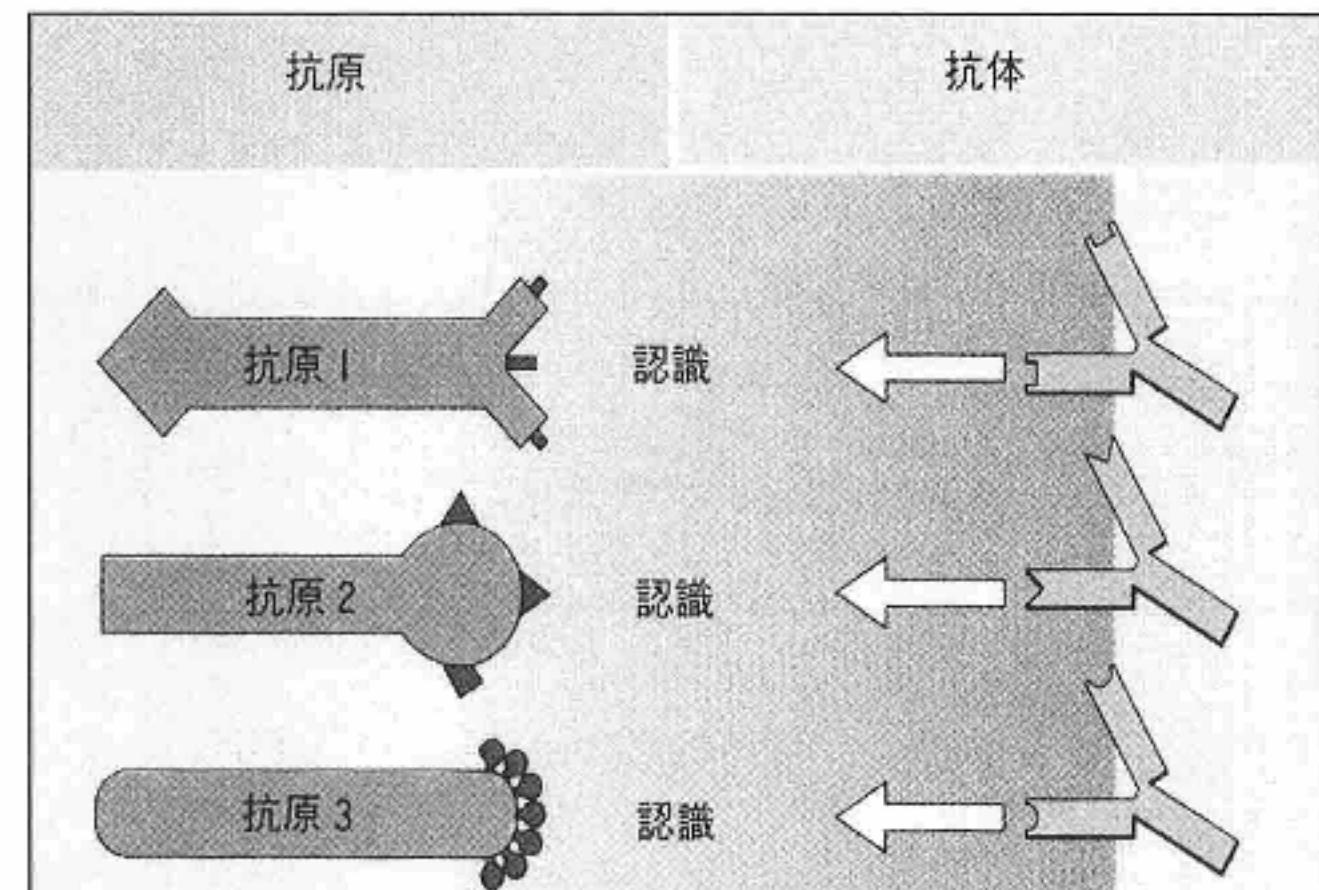


抗原抗体反応

生体の中に特定の異物(抗原)が入ると、これを認識したB細胞から分化した形質細胞より認識された抗原とのみ結合する抗体が産生され、その抗体は抗原と特異的に反応し無毒化・不活化する。

また、この反応により、抗体が抗原に結合することで、病原体を攻撃する免疫細胞が異物として認識する目印ともなる。

抗原抗体反応の模式図

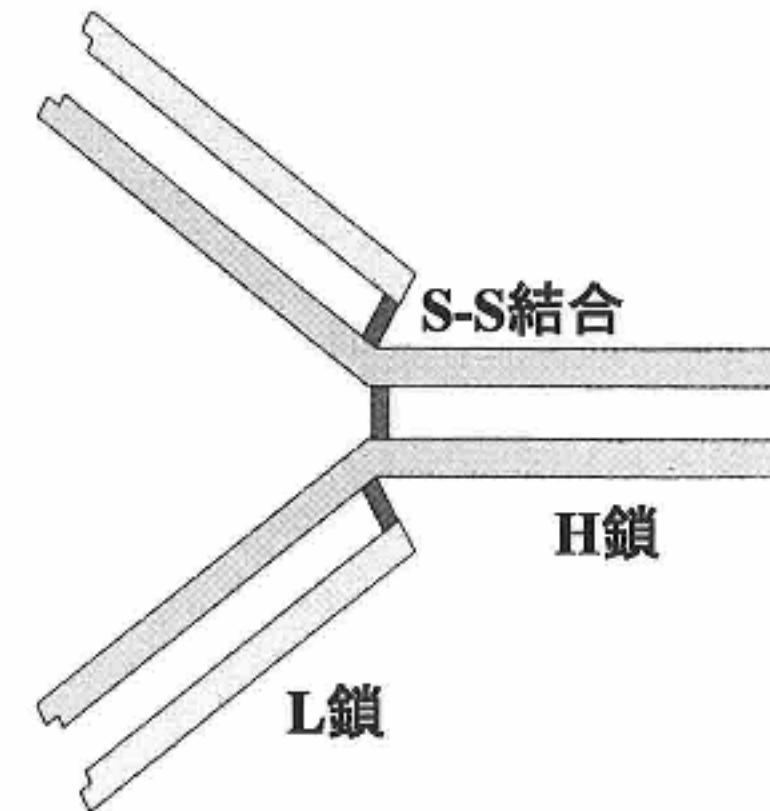


南江堂 免疫学イラストレイテッドより

抗体とは

- ・抗体は、免疫グロブリン(Immunoglobulin:Ig)とも呼ばれ、血清や組織体液中に存在する糖蛋白質である。
- ・その基本構造は長・短2種類のポリペプチド鎖がS-S結合で結ばれた4本鎖構造からできている。
- ・免疫グロブリンはIgG, IgM, IgA, IgE, IgDの5種類があり、それぞれ生物学的活性は異なる。

免疫グロブリンの基本構造



南江堂 免疫学イラストレイテッドより

免疫グロブリンの種類と特徴

IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
<ul style="list-style-type: none">●免疫グロブリンの約80%●貪食作用の促進、ウイルスや細菌の毒素を無毒化●4種類のサブクラスを持つ	<ul style="list-style-type: none">●免疫グロブリンの約10%●病原菌やウイルスなどの抗原の破壊貪食作用の促進●免疫の初期応答	<ul style="list-style-type: none">●免疫グロブリンの10~20%●病原菌やウイルスなどの抗原(アレルゲン)の侵入を抑制●血清型と分泌型の2種類がある	<ul style="list-style-type: none">●免疫グロブリンの0.004%●抗原と結合しヒスタミンなどの化学伝達物質を放出●I型アレルギーの原因	<ul style="list-style-type: none">●免疫グロブリンの約0.2%●ヒトの生理的役割不明 マウスでは免疫記憶機構に関与●B細胞の分化過程でIgM出現後に一過性に現れる

実験方法

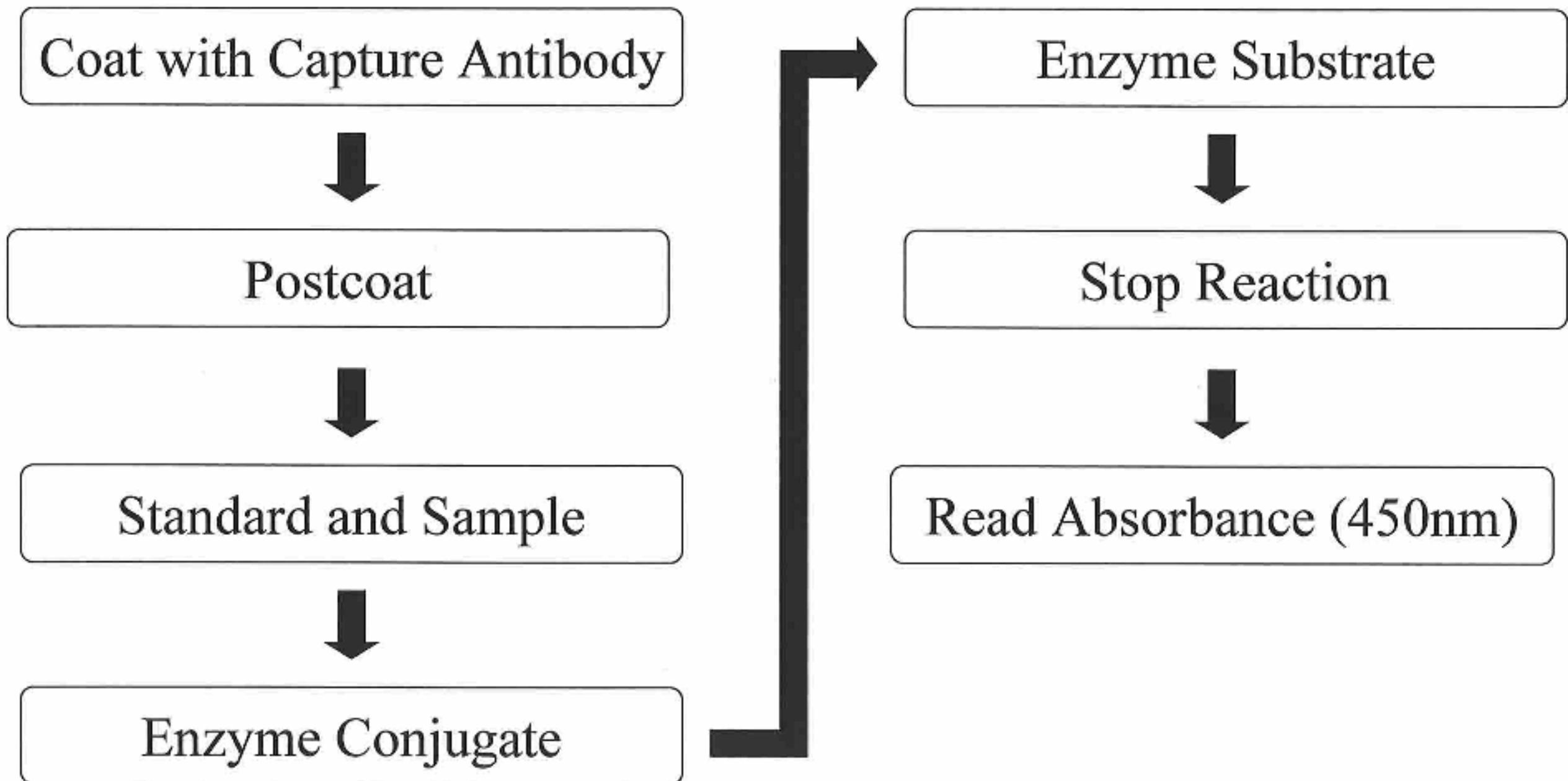
C3HとBALCマウス（♂・6週齢）で導入し、1週間の予備飼育後、生理食塩水に懸濁した*Enterococcus Faecalis*を、腹腔に隔日間隔で250mg/kg投与し、投与開始から3週間後のマウス血清を採取し、ELISA法により血清中の総IgE、IgGおよびIgMの測定を行った。

実験動物：C3HとBALCマウス（♂）6週令 予備飼育1週間

実験グループ：各群10匹

- Control群（生理食塩水投与）
- IgE群（*Enterococcus Faecalis*投与）
- IgG群（*Enterococcus Faecalis*投与）
- IgM群（*Enterococcus Faecalis*投与）

測定手順



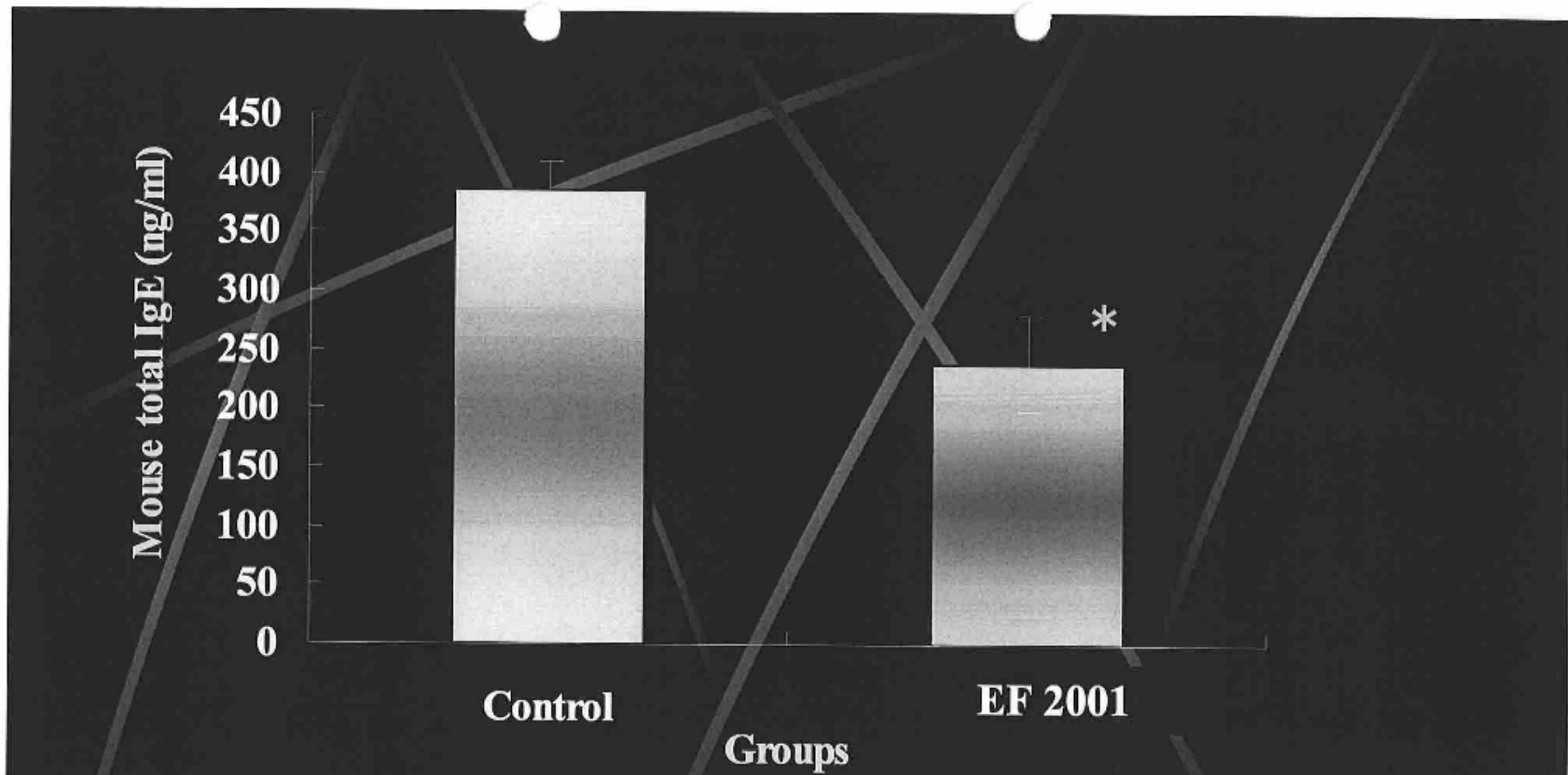


Fig. 1. BLB/C mice of IgE in the blood. Each histogram represents the mean value \pm SE for 10 mice IgE (M). Significantly different * $p < 0.05$ Control vs. EF 2001.

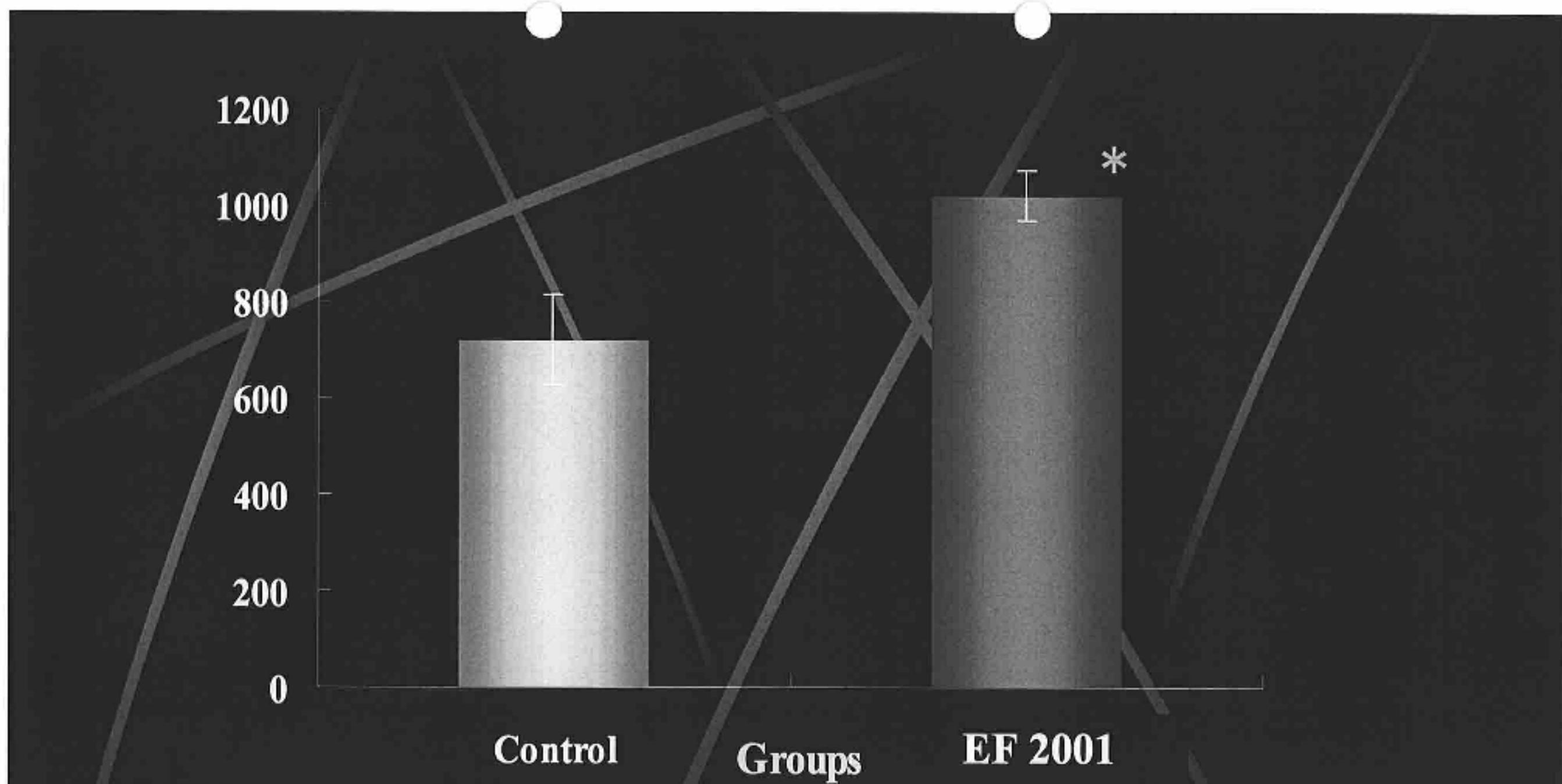


Fig. 2. C3H mice of IgM in the blood. Each histogram represents the mean value \pm SE for 10 mice IgM (M) Significantly different * $p<0.05$ Control vs. EF 2001.

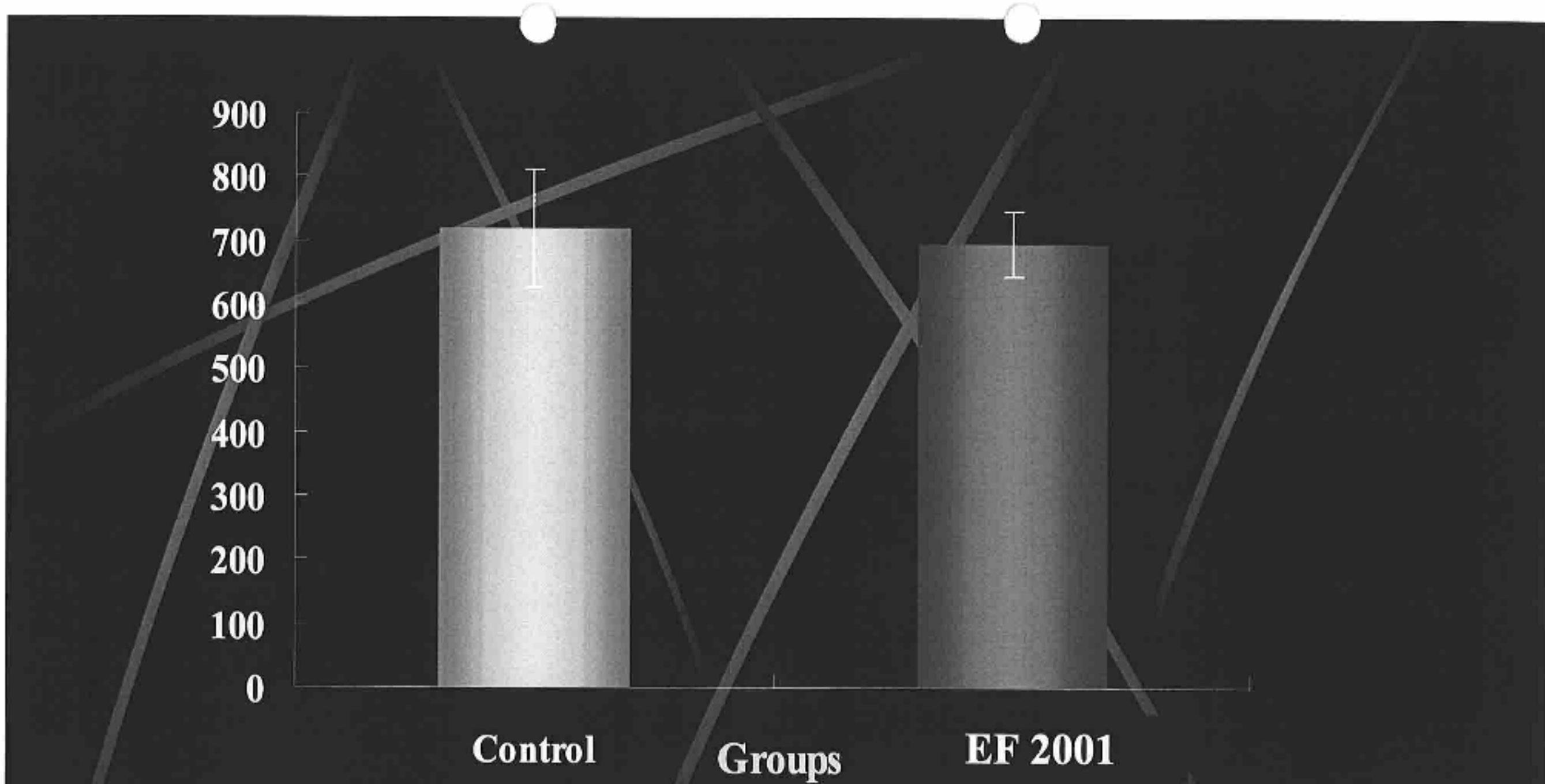


Fig.3. C3H mice of IgG in the blood. Each histogram represents the mean value \pm SE for 10 mice IgG (M). Significantly different * $p<0.05$ Control vs. EF 2001.

考察および検討（IgG, IgMの測定）

Enterococcus Faecalis 投与における抗体の產生があり、Control群に比べ、Enterococcus Faecalis投与群のほうが血清中の総IgMの濃度は増加した。しかし、血清中の総IgGの濃度はむしろ若干、低下した。



Enterococcus Faecalisの持つ免疫賦活作用が、マクロファージやNK細胞、T細胞などの細胞性免疫を活性化させるのみならず、液性免疫抗作用の促進も考えられる。

考察および検討 (IgEの測定)

Enterococcus Faecalis 投与における抗体の產生があり、Control群に比べ、*Enterococcus Faecalis*投与群のほうが血清中の総IgEの濃度は低下した。



*Enterococcus Faecalis*の投与により、血中IL-2レベルが上昇し、脾臓のサイトカイン産生がTh2型からTh1型へと変化したと考えられる。従って、IgG及びIgEレベルを低下させ、アレルギー抑制効果を示したと示唆される。