

新たに開発した自然免疫スクリーニング系を用いた

新しい作用点を有する医薬品の開発

(課題番号 13557200)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))

研究成果報告書

平成16年4月

研究代表者 倉田 祥一郎

(東北大学大学院薬学研究科助教授)

はしがき

平成13年度から平成15年度の3年間にわたり科学研究費補助金「基盤研究（B）（2）」を受けた「新たに開発した自然免疫スクリーニング系を用いた新しい作用点を有する医薬品の開発」の研究成果をとりまとめ、以下のように報告いたします。

研究組織

研究代表者：倉田祥一郎（東北大学大学院薬学研究科助教授）

研究分担者：久保寺 登（中外製薬株式会社・製品企画部、企画推進担当部、部長（研究職））

交付決定額（配分額）	（金額単位：千円）		
	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	8400	0	8400
平成14年度	2800	0	2800
平成15年度	2900	0	2900
総計	14100	0	14100

研究発表

(1) 学会誌等 (原著論文)

1. Punzo, C., Kurata, S. and Gehring, W. J. : The eyeless homeodomain is dispensable for eye development in *Drosophila*. *Genes & Dev.* **15**, 1716-1723. 2001.
2. Onuma, Y., Takahashi, S., Asashima, M., Kurata, S. and Gehring, W. J. : Conservation of Pax6 function and upstream activation by Notch signaling in eye development of frogs and flies (vertebrates and invertebrates). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 2020-2025. 2002.
3. Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T., and Kurata, S. : Overexpression of a pattern recognition receptor, peptidoglycan recognition protein-LE, activates Imd/Relish-mediated antibacterial defense and prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 13705-13710. 2002.
4. Ikejima, M., Nozaki, T., Kurata, S., Natori, S., Esumi, H., Sugimura, T., and Masutani, M. : Purification and characterization of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA from *Sarcophaga peregrina*. *Proc. Japan Acad.* **78**, 282-285. 2002.
5. Yajima, M., Takada, M., Takahashi, N., Kikuchi, H., Natori, S., Oshima, Y., and Kurata, S. : A newly established in vitro culture using transgenic *Drosophila* revealed functional coupling between the phospholipase A2-generated fatty acid cascade and lipopolysaccharide-dependent activation of the imd pathway in insect immunity. *Biochem. J.* **371**, 205-210, 2003.
6. Punzo, C., Plaza, S., Seimiya, M., Kurata, S., Schnupf, P., Jäger, J., and Gehring, W. J. : eyeless and twin of eyeless conservations and differences in *Drosophila melanogaster*. *Development* 発表予定

(2) 学会誌等 (総説)

1. 倉田祥一郎 : 昆虫免疫—ショウジョウバエからみえる自然免疫の普遍性と異物多様性への対応. *医学の歩み* **202**, 945-950. 2002.
2. 倉田祥一郎 : 自然免疫における異物認識 : PGRP ファミリーの役割. *細胞工学* **21**, 1318-1319. 2002.

3. 倉田祥一郎: ショウジョウバエにおける病原体認識機構. 分子細胞治療 2, 598-604. 2003.
4. Shoichiro Kurata: Recognition of infectious non-self and activation of immune responses by Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP)-family members in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 89-95. 2004.

(3) 口頭発表 (一般発表)

1. 竹花文、勝山朋紀、大島吉輝、相垣敏郎、倉田祥一郎
 ショウジョウバエ自然免疫におけるパターン認識に関与する分子の同定
 第74回日本生化学会大会 (京都)、2001年10月
2. 菅原栄紀、竹花文、大島吉輝、高田春比古、倉田祥一郎
 自然免疫を制御するパターン認識分子 peptidoglycan recognition protein (PGRP)の機能解析
 第122年会 日本薬学会 (千葉)、2002年3月
3. 倉田祥一郎
 A Pattern Recognition Receptor, Peptidoglycan Recognition Protein-LE, Activates Imd/Relish-Mediated Antibacterial Defense and Prophenoloxidase Cascade in *Drosophila*
 2nd Innate Immunity Workshop (Myconos, Greece), May, 2002
4. 竹花文、矢野環、大島吉輝、倉田祥一郎
 ショウジョウバエ自然免疫を制御するペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP) -LE の機能解析
 第75回日本生化学会大会 (京都)、2002年10月
5. 矢野環、竹花文、小谷篤志、高田春比古、大島吉輝、倉田祥一郎
 ショウジョウバエ自然免疫におけるパターン認識分子 PGRP-LE のペプチドグリカン認識特異性の検討
 第75回日本生化学会大会 (京都)、2002年10月
6. 高橋奈帆子、菊地晴久、倉田祥一郎、大島吉輝
 自然免疫抑制活性を指標とした昆虫由来生薬の成分研究
 第41回日本薬学会東北支部大会 (弘前)、2002年10月
7. 上田和則、関谷瑞樹、藤田智光、喜多山実、宮川泰宏、高橋奈帆子、菊

地晴久、倉田祥一郎、大島吉輝

自然免疫を制御する生理活性物質の探索

第123年会 日本薬学会 (長崎)、2003年3月

8. 藤田智光、喜多山実、菊地晴久、高橋奈帆子、上田和則、倉田祥一郎、島津光明、佐藤大樹、大島吉輝

昆虫寄生糸状菌からの自然免疫制御物質の探索

第123年会 日本薬学会 (長崎)、2003年3月

9. 矢野環、竹花文、小谷篤志、高田春比古、大島吉輝、倉田祥一郎

ショウジョウバエ自然免疫におけるパターン認識分子 PGRP-LE のペプチドグリカン認識特異性の検討

第123年会 日本薬学会 (長崎)、2003年3月

10. Tamaki Yano and Shoichiro Kurata

Analysis of the innate immunity pathway mediated by PGRP-LE in *Drosophila*

特定領域研究平成15年度公開シンポジウム (札幌) 2003年7月

11. Tamaki Yano and Shoichiro Kurata

Analysis of the innate immunity pathway mediated by PGRP-LE in *Drosophila*

The 16th Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology [I]
October 28-31, 2003. Hayama. Japan.

12. Akiko Uehara, Shoichiro Kurata, Kenichiro Shibata, Shunji Sugawara and Haruhiko Takada

Up-regulation of peptidoglycan recognition protein (PGRP) mRNA expression by chemically synthesized bacterial components in human oral epithelial cells

The 16th Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology [I]
October 28-31, 2003. Hayama. Japan.

13. 矢野 環、石王 応知、小谷 篤志、大島 吉輝、倉田 祥一郎

ショウジョウバエ 自然免疫におけるパターン認識分子 PGRP-LE の構造活性相関

第26回日本分子生物学会 (神戸) 2003年12月

14. 矢野 環、石王 応知、小谷 篤志、大島 吉輝、倉田 祥一郎

ショウジョウバエ 自然免疫におけるパターン認識分子 PGRP-LE の構造活性相関

第124年会 日本薬学会 (大阪)、2004年3月

15. 関谷 瑞樹、上田 和則、菊地 晴久、岡崎 香織、倉田 祥一郎、濱口 卓也、川嶋 朗、大島 吉輝

昆虫を用いた自然免疫制御物質の探索とその制御機構の解析

第124年会 日本薬学会 (大阪)、2004年3月

(4) 口頭発表 (研究代表者: 招待発表)

1. ショウジョウバエの自然免疫を制御するパターン認識分子

第10回 内毒素・LPS 研究会 (北里研究所)、2001年6月23日

2. ショウジョウバエの生体防御反応を制御するパターン認識分子

日本比較免疫学会 第13回学術集会 (札幌) シンポジウム「比較免疫研究の現状と課題」、2001年7月23-25日

3. ショウジョウバエの自然免疫系を制御するパターン認識分子

第38回補体シンポジウム、第12回生体防御学会合同学術集会 (京都)
2001年8月25日

4. ショウジョウバエの自然免疫を制御するパターン認識分子

大阪大学蛋白質研究所セミナー、自然免疫: 感染防御の最前線」、2001年9月12, 13日

5. ショウジョウバエの自然免疫を制御するパターン認識分子 PGRP

日本薬学会東北支部第161回例会 特別講演会 (仙台)、2001年12月14日

6. ショウジョウバエの自然免疫を制御するパターン認識分子 PGRP

文部科学省科学研究費特定領域研究 (B) 公開シンポジウム

「自然免疫による異物認識の分子基盤」、2001年12月21-22日 (福岡)

7. ショウジョウバエの自然免疫を制御するパターン認識分子 PGRP

「昆虫ワークショップ '02」、2002年3月11日-13日 (葉山)

8. 自然免疫における PGRP ファミリーによる異物認識とシグナル伝達

文部科学省科学研究費特定領域研究 (B) 公開シンポジウム

「自然免疫による異物認識の分子基盤」(主催者: 倉田祥一郎)、2002年10月24-25日 (仙台)

9. 自然免疫におけるペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP) ファミリーによる異物認識

第25回日本分子生物学会ワークショップ「自然免疫による異物認識の分子基盤」、2002年12月13日（横浜）

10. Innate immunity における PGRP ファミリーによる異物認識とシグナル伝達

第76回日本細菌学会総会シンポジウム「内因性抗菌物質と innate immunity」、2003年4月3日（熊本）

11. The role of peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE in Drosophila immunity
EMBO Workshop "Pattern Recognition Proteins and Receptors" May 14-18, 2003, Trest Castle, Czech Republic.

12. Recognition of infectious non-self and activation of immune responses by Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP)-family members in Drosophila

Korea-Japan Applied Entomology and Zoology Joint Conference 2003, Symposium "New directions in insect immunity" May 29-31, 2003, Busan, Korea.

13. Recognition of infectious non-self and activation of immune responses by Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP)-family members in Drosophila

The 16th Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology [I]
October 28-31, 2003. Hayama. Japan.

(5) 出版物

荒木慶彦編著、生命科学研究の原点－「プロ」をめざす君たちへ、第1章「ハエから夢見る未来の医療」青山社 2003

研究成果による工業所有権の出願状況

発明の名称：遺伝子組換えショウジョウバエを用いた自然免疫スクリーニング法

発明者：倉田祥一郎、大島吉輝

出願人：科学技術振興事業団

特許出願日：2002年10月4日

特許出願番号：特願2002-292976

研究成果

平成13年度

自然免疫は、生物が進化のごく初期に獲得した、生体防御の基本となる防御機構である。さらに、哺乳動物において、病原菌の感染時に獲得免疫が成立するためには、自然免疫系が必要であることが示された。したがって、自然免疫系に作用する物質を検索することは、新たな免疫賦活剤や免疫抑制剤の開発に直結する可能性が高い。研究代表者は、自然免疫系がヒトと昆虫で共通であることに着目し、遺伝子組換え昆虫を用いて自然免疫のスクリーニング系を新たに開発した。本研究の目的は、研究代表者が新たに開発したスクリーニング系を用いて、自然免疫に作用する化合物を検索し、新たな免疫賦活剤や免疫抑制剤を開発することにある。研究分担者・久保寺は、スクリーニングする化合物のライブラリーを作製した。その際、これまでの研究成果をふまえ、自然免疫を制御する脂質メディエーターに構造が類似している化合物のライブラリーを作製した。そこで、研究代表者・倉田は、自然免疫スクリーニング系を用いて、自然免疫に作用する化合物を、このライブラリーから検索し、自然免疫を抑制する化合物を得た。一方、昆虫と昆虫寄生菌との関係に着目し、昆虫寄生菌が宿主の自然免疫を抑制する物質を生産しているかどうか、自然免疫スクリーニング系で探索した。その結果、多くの昆虫寄生菌が、自然免疫を抑制する物質を生産していることを見出した。

平成14年度

ショウジョウバエの自然免疫は、imd 経路と Toll 経路の二つのシグナル伝達系で制御されている。これらは、それぞれ哺乳動物でも存在しており、RIP と Toll 様受容体 (TLR) を介する経路に相当する。平成14年度は、(1) 本研究で用いるスクリーニング系が、imd 経路に作用する化合物を特異的に検出できることを明らかにした (Biochem. J. 371, 205-210, 2003)。したがって、本スクリーニング系で同定した化合物は、哺乳動物の RIP が関わるシグナル伝達カスケードに作用することが期待できる (特許出願：出願日：2002年10月4日、出願番号：特願2002-292976)。実際、本スクリーニング系において、哺乳動物で抗炎症作用を有するホスホリパーゼ A2 阻害剤が同定された (Biochem. J. 371, 205-210, 2003)。(2) 本スクリーニングで同

定した化合物のあるものは、ショウジョウバエの突然変異体を組み合わせた解析から、imd 経路のカスケードにおいて、アダプター分子である imd の下流で、転写因子 Relish の上流に作用することが明らかとなった。

平成15年度

本研究の目的は、研究代表者が新たに開発した遺伝子導入ショウジョウバエを利用したスクリーニング系を用いて、自然免疫に作用する化合物を検索し、新たな免疫賦活剤や免疫抑制剤を開発することにある。これまでに、千を越す化合物・微生物抽出物についてスクリーニングし、シクロペンタン誘導体を同定した。この化合物は、ショウジョウバエ自然免疫の imd 経路に作用して免疫抑制効果を示す。この化合物の作用点を同定したところ、膜上の受容体から転写因子 Relish が核に移行するまでの、細胞内シグナル経路に作用していることが明らかとなった。ショウジョウバエの imd 経路は、哺乳動物自然免疫系の TNF 経路に共通性を示すことから、この化合物が、哺乳動物の TNF 経路に抑制的に働くことが予想された。実際、ヒト正常内皮細胞を用いて、TNF 刺激によるケモカイン産生への影響を調べたところ、本化合物は、TNF によるケモカイン産生に抑制的に働くことが示された。さらに、その作用点は昆虫自然免疫と同じ細胞内シグナル伝達系であることが判明した。本研究は、自然免疫系が進化的に保存されており、昆虫とヒトで共通性を示すことに着目し、遺伝子導入ショウジョウバエを利用して自然免疫に作用する化合物を検索することにより、新たな免疫賦活剤や免疫抑制剤の開発を目指すという極めて独創的な研究であったが、新たな作用点を有する医薬品の開発にとって、予想以上に有効な戦略であることが示された。

本研究の成果は、既に学会誌等に発表しており、以下にその印刷物を記載する。

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録していません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。