

厚生省
新薬開発研究費

自己免疫疾患治療薬の開発研究
—微生物二次代謝産物を中心として—

青柳班

平成元年度研究報告書

平成2年3月

研究報告書の作成にあたって

厚生省薬務局より昭和60年度に新薬開発研究として「自己免疫疾患治療薬の開発研究—微生物二次代謝産物を中心として」がとりあげられ、青柳を班長として本研究班が発足して最終年度を迎えた。

本研究班は根本的治療法のない難病である膠原病、神経疾患など自己免疫疾患の患者ならびに病態モデル動物の病態解析を生化学、薬理学、生理学、病理学などの領域から究明し、さらに前臨床試験など広範囲の研究を施行し、治療薬を開発することを目的とした。本邦斯界の優れた研究者から構成された本班は各班員の努力により自己免疫疾患に対する治療薬の開発に大きく前進したと言えよう。即ち、膠原病、神経疾患を含む自己免疫疾患のモデル動物に対し、数種の酵素阻害物質、15-Deoxyspergualin, Bactobolin, Bactobolamineなどに顕著な予防効果あるいは治療効果のあることが見出され、自己免疫疾患に対する新しい治療薬開発の可能性を強く示唆した。

難病治療薬開発という使命を担った本班は班員各位の絶大の努力により、その任務を全うし得たことを幸せに思う。厚生省から与えられた研究期間は一応終了したが、この研究を通して培われた研究網を基として、さらに本研究班の目的達成に努力する。

本研究を重要課題としてとりあげた厚生省薬務局ならびに班員各位に衷心より感謝する次第である。

平成2年3月

班長 青柳高明

目 次

研究報告書の作成にあたって	青柳高明	i
---------------	------	---

総括研究報告

自己免疫疾患治療薬の開発研究		
—微生物二次代謝産物を中心として—		3
	青柳高明	

分担研究報告

自己免疫疾患治療薬の開発研究		
A. 生理活性物質の概要		17
	青柳高明	
自己免疫疾患治療薬の開発研究		
B. 光学異性体 Deoxyspergualin の脾内酵素網におよぼす影響		25
	青柳高明	
膠原病の基礎的解明とその治療への応用(V)		
—エリテマトーデスモデルマウス(BXSB雄マウス, MRL/lprマウス)のペプチダーゼに及ぼす 15-デオキシスパーガリンの効果と膠原病患者体液のプテリジン類の変化—		31
	永津俊治	
イノシトールリン脂質代謝回転抑制物質のスクリーニングと免疫抑制作用		39
	梅澤一夫	
免疫修飾に作用する微生物代謝産物の研究		
A) 15-Deoxyspergualin の免疫修飾作用		47
	石塚雅章	
免疫修飾に作用する微生物代謝産物の研究		
B) 免疫調節物質の探索		53
	石塚雅章	
自己免疫性脳脊髄炎, 神経炎の治療薬開発		55
	田平武	
Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis(EAMG)ラットの治療実験		61
	佐藤猛	

15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究	67
	徳 永 徹
I 型糖尿病モデルマウスに対する IFN- γ の効果	75
	谷 口 克
ポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤(ベナドロスチン)の <i>in vivo</i> 抗体産生に及ぼす効果： ループス(SLE)モデルマウスを用いた解析	83
	金 井 芳 之
エリテマトーデスモデルマウスを用いた微生物代謝二次産物の治療効果に関する研究	89
	藤 原 道 夫
各種微生物二次代謝産物による病変の修飾に関する神経病理学的研究	95
	生 田 房 弘
実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)に関する二次代謝産物治療剤の検索	99
	永 井 克 孝
インパルス応答から見た各種免疫調節剤の作用解析と比較	103
	和 田 孝 雄
微生物二次代謝産物の免疫抑制効果，とくに腎炎発症・進展の抑制について	113
	大 久 保 充 人
Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の実験的アレルギー性神経炎に対する治療効果の検討	121
	井 形 昭 弘
15-DSG, methyl-DSG, Diplotin A, Foroxymithine, Bestatine の HAM 患者 末梢血リンパ球自己増殖反応(APR)への影響	127
	井 形 昭 弘
ヒト末梢血単核球による抗核抗体産生におよぼす 15-deoxyspergualin の影響に関する研究 —抗体産生抑制機序について—	131
	本 間 光 夫

本研究班を終了するに当たって

本研究班を終了するに当たって	137
	青 柳 高 明
自己免疫疾患治療薬の開発研究—微生物二次代謝産物を中心として— 開発研究班分担研究者一覧	149

総括研究報告

自己免疫疾患治療薬の開発研究

—微生物二次代謝産物を中心として—

主任研究者 青柳高明

本研究班は自己免疫疾患の治療薬を開発することを目的として、昭和60年度に厚生省薬務局より新薬研究班として発足し、最終年度を迎えた。本班は根本的治療法のない難病である全身性エリテマトーデス、進行性全身性硬化症、慢性関節リウマチなどを含む膠原病また脱髄性神経疾患などを対象とし、これらの疾病に対する治療薬を発見することを目的とした。この研究は医学界、薬学界にとって最大研究課題の一つと言えよう。

微生物代謝産物として発見された多くの酵素阻害物質、抗菌物質、制癌物質などの低分子二次代謝産物は新規な構造を有するとともに、免疫調節作用を有することで世界の注目を集めている。

自己免疫疾患治療薬の開発研究を行うことを目的とした本研究班は病態解析に基づく探索法を確立し、治療効果を有する化合物の分離・精製、構造決定ならびに治療効果を検討した。各年度別に施行した研究の大別は下記のSchemeに示す。

年度	昭和60	昭和61	昭和62	昭和63	平成1	平成2
新規治療薬の探索	----->					
分離・精製・構造決定	----->					
自己免疫疾患の病態解析	----->					
治療効果判定基準の設定	----->					
誘導体の合成		----->				
前臨床試験			----->			

本研究班の対象疾患としては、全身性エリテマトーデス、進行性全身性硬化症、結節性多発性動脈炎、皮膚筋炎、リウマチ熱、慢性関節リウマチ

を含む膠原病ならびに脱髄性神経疾患、重症筋無力症、ネフローゼ症候群などである。

本年度の研究において、自己免疫疾患の病態解析に著しい成果が認められ、この結果に基づく探索法の開発研究が一段と進歩した。さらに、benadrostin, dioctatin A, poststatinなどの酵素阻害物質および15-deoxyspergualin, bactobolin, bactobolamineなどが自己免疫疾患モデル動物に対し、顕著な予防あるいは治療効果のあることが報告された。自己免疫疾患症に対し治療効果を期待できる可能性が示唆され、上記疾患の治療に大きな光を与えたということができた。さらに病因の解明に務め、臨床研究に貢献するよう努力する。

各分担研究者により施行された研究は次の通りである。

1) 青柳高明 (微生物化学研究所) : 自己免疫疾患治療薬の開発研究

A) 生理活性物質の概要

B) 光学異性体 DSG の脾内酵素網におよぼす影響

2) 永津俊治 (名古屋大学医学部) : 膠原病の基礎的解明とその治療への応用(V), エリテマトーデスモデルマウス(BXSB雄マウス, MRL/lprマウス)のペプチダーゼに及ぼす15-デオキシスパーガリンの効果と膠原病患者体液のプテリジン類の変化

3) 梅澤一夫 (慶応義塾大学理工学部) : イノシトールリン脂質代謝回轉抑制物質のスクリーニン

グと免疫抑制作用

4) 石塚雅章 (化学療法研究所) : 免疫修飾に作用する微生物代謝産物の研究

A) 15-Deoxyspergualin の免疫修飾作用(III)

B) 免疫修飾物質の探索

5) 田平 武 (国立精神・神経センター) : 自己免疫性脳脊髄炎, 神経炎治療薬の開発

6) 佐藤 猛 (順天堂大学医学部) : Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis ラットの治療実験

7) 徳永 徹 (国立予防衛生研究所) : 15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究

8) 谷口 克 (千葉大学医学部) : I 型糖尿病モデルマウスに対する IFN- γ の効果

9) 金井芳之 (東京大学医科学研究所) : ポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤(ベナドロスチン)の *in vivo* 抗体産生に及ぼす効果, ループモデルマウスを用いた解析

10) 藤原道夫 (新潟大学医学部) : エリテマトーデスモデルマウスを用いた微生物代謝二次産物の治療効果に関する研究

11) 生田房弘 (新潟大学脳研究所) : 各種微生物二次代謝産物による病変の修飾に関する神経病理学的研究

12) 永井克孝 (東京大学医学部) : 実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) に関する二次代謝産物治療剤の探索

13) 和田孝雄 (慶応義塾大学医学部) : インパルス応答から見た各種免疫調節剤の作用解析と比較

14) 大久保充人 (北里大学医学部) : 微生物二次代謝産物の免疫抑制効果, 特に腎炎発症・進展の抑制について

15) 井形昭弘 (鹿児島大学) :

A) Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の実験的アレルギー性神経炎に対する治療効果の検討

B) 15-Deoxyspergualin, methyl-DSG, Diplothin-A, foroxymithine, Bestatine の HAM 患者末梢血リンパ球自己増殖反応 (APR) への影響

16) 本間光夫 (慶応義塾大学医学部) : ヒト末梢血単核球による抗核抗体産生におよぼす 15-deoxyspergualin の影響に関する研究—抗体産生抑制機序について

次に上記各班員の研究報告について要約する。

1. 自己免疫疾患治療薬の開発研究

青柳班員は自己免疫疾患治療薬の開発研究にあたり, 各班員の要望に答えるために二次代謝産物の構造および化学的性状などの概要を説明するとともに, 二次代謝産物の配布を行った。さらに, 自己免疫疾患の発病機序を究明することを目的として, 強い免疫抑制能を有する 15-Deoxyspergualin (DSG) の 2 種の光学異性体の脾内酵素網に及ぼす影響について研究を行った。

A) 生理活性物質の概要 : 自己免疫疾患治療薬の開発研究を目的とした本研究班の各班員に二次代謝産物として得られた生理活性物質, 即ちプロテアーゼ阻害物質を含むエクトエンザイム阻害物質, 抗菌物質, 制癌物質およびその他の生理活性物質につき, その構造, 阻害活性, 阻害機構, 毒性および溶解性などの周知を図り, また各班員の要望する生理活性物質の配布を行った。

B) 光学異性体 DSG の脾内酵素網におよぼす影響 :

免疫抑制作用を有する DSG の (-), (+)-enantiomers の作用機序解明を目的とし, 両-enantiomers を連続投与したマウス脾内の酵素活性の動態を経時的に調べた。(-)-DSG 群は DPP-IV と GlcNAc-ase 活性が有意に抑制された。両酵素とも T 細胞と密接な関係を有し, (-)-DSG は T 細胞の異なった subsets に影響を与えるものと思われる。一方, (+)DSG は AP-B と Leu-

AP 活性の有意な増加および GlcNAc-ase のみが有意に抑制された。上記両-enantiomers の作用機序についてさらに検討する。

2. 膠原病の基礎的解明とその治療への応用(V)

—エリテマトーデスモデルマウス(BXSB 雄マウス, MRL/*lpr* マウス)のペプチダーゼに及ぼす 15-デオキシスパーガリンの効果と膠原病患者体液のプテリジン類の変化—

永津班員はエリテマトーデスモデルマウスのペプチダーゼに及ぼす 15-デオキシスパーガリンの効果と膠原病患者体液のプテリジン類の変化について研究した。

エリテマトーデスモデル動物の BXSB 雄マウス(対照は BXSB 雌マウス)と MRL/*lpr* マウス(対照は MRL/+マウス)に 13 週齢から免疫抑制薬 15-デオキシスパーガリン(DSP)を投与して、発症を抑制して、薬剤を投与しない発症したマウスと比較して、ペプチダーゼ類の変化を検索した。20 週齢の発症したマウスは脾臓のジペプチルアミノペプチダーゼ(DAP)-II が増加, DAP-IV が減少し、従って DAP-II/DAP-IV 比が増加, ポストプロリンクリーピングエンザイム(PPCE)の増加が認められた。DSP 投与で発症を抑制したマウスではこれらのペプチダーゼの変化はなく, 対照マウスとの間に有意差はなかった。この成績は, エリテマトーデスモデルマウスの DAP-II, DAP-IV, PPCE の変化は自己免疫疾患の原因と密接に関係しており, 酵素阻害のある微生物二次代謝産物に自己免疫疾患治療薬を発見する可能性を示唆している。

従来の研究でエリテマトーデスモデル動物の NZB マウス(対照は BALB/c マウス)で脾臓などの組織に微量に存在するネオプテリンが有意に増加し, ネオプテリン/ピオプテリン比が有意に増加することを報告したが, 本年度の研究で, 血清のネオプテリンとネオプテリン/ピオプテリン比

が膠原病の全身性エリテマトーデス(SLE)で対照正常者と比べて有意に増加すること, 関節液のネオプテリンとネオプテリン/ピオプテリン比が膠原病の慢性関節リウマチ(RA)で対照の非自己免疫疾患である骨関節症と比べて, 有意に増加することを見出した。関節液のネオプテリンとピオプテリンは血清より有意に増加していた。この成績は関節液のネオプテリンは関節内でマクロファージから生成され, ネオプテリン/ピオプテリン比は自己免疫疾患の生化学的指標であることを示唆する。

3. イノシトールリン脂質代謝回転抑制物質のスクリーニングと免疫抑制作用

梅澤班員は自己免疫疾患治療薬を検索するため, イノシトールリン脂質代謝回転抑制物質について研究した。

リンパ球活性の機構にイノシトールリン脂質代謝回転が含まれることから, 前年度につづき微生物二次代謝産物からイノシトールリン脂質代謝回転阻害物質をスクリーニングし, 得られた化合物の免疫系における作用を検討した。その結果, 放線菌から新規ポリエーテル構造を有する阻害物質を単離し, inostamycin と命名した。inostamycin は既知ポリエーテル化合物の lysocellin と構造が類似するが, 阻害活性はより強く, IC_{50} , $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で EGF に誘導される A 431 細胞のイノシトールリン脂質代謝回転を阻害した。イノシトールリン酸の生成も阻害したが, 添加時期により阻害効果が異なる実験結果から, inostamycin はおそらくイノシトールリン脂質代謝回転経路の中で CDP-DG イノシトールトランスフェラーゼを阻害することが示唆された。inostamycin はマウスのエーリツヒがんに対し, *in vivo* で抗がん活性を示した。inostamycin は線維芽細胞の PDGF による S 期誘導を阻害したが, マウス脾細胞の conA, IL-2, または MLC により活性化される DNA 合

成は毒性の表れない濃度で阻害しなかった。また *in vivo* でマウスの抗体産生、遅延型過敏反応を抑制しなかった。

前年度報告した PI キナーゼ阻害物質、orobol と 2,3-dihydroxy benzaldehyde は *in situ* でもイノシトールリン脂質代謝回転とイノシトールリン酸の生成を阻害した。

4. 15-Deoxyspergualin の免疫修飾作用および免疫修飾物質の探索

石塚班員は 15-deoxyspergualin (15-DSG) の免疫修飾作用について研究した。また、免疫修飾物質の探索も行った。

A) 15-DSG の免疫修飾作用(III)

前年度までの本研究によって 15-DSG は T 細胞に作用して IL-2 産生を増強し、ConA による T 細胞の IL-2 受容体形成を抑制または増強することを明らかにした。マウスへの投与は各種の T 細胞サブセット比に影響を与えず、腹腔浸出マクロファージの活性化に作用することも認めた。本年度は T 細胞の産生する IL-3 あるいはマクロファージ活性化因子に対する 15-DSG の作用について検討した。その結果、T 細胞を 15-DSG で *in vitro* で処理することによって IL-3 産生誘導およびその増強が見られた。15-DSG で直接処理しても腹腔マクロファージの活性化は見られないことから、その作用はリンフォカインによって仲介されていると考えられたので、15-DSG 投与マウスから採取した T 細胞と正常マウスから得たマクロファージを接触させずに培養し、その効果を調べたところ、マクロファージは活性化され T 細胞によって仲介されていることを認めた。活性化因子を大量に採取することを目的に EL 4 細胞を 15-DSG で処理した後、その培養上清のマクロファージに対する作用を調べたところ活性化因子の産生が見られた。

B) 免疫修飾物質の探索

微生物代謝産物中に自己免疫疾患に有用な物質として免疫担当細胞の修飾に作用する物質を探索し、抗生物質 Nocardamin および Deferoxamine にその作用を見出した。これらの物質は混合リンパ球培養反応および IL-2 誘導 T 細胞増殖を特異的に阻害した。これらの鉄キレート物質の免疫疾患への応用が期待される。

5. 自己免疫性脳脊髄炎、神経炎の治療薬開発

田平班員は自己免疫性脳脊髄炎、神経炎の治療薬開発について研究した。

(1) Bactobolin 誘導体の検討

これまでに Bactobolin がミエリン塩基性蛋白 (BP) 感作により誘発されるラットの自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を抑制することを示し、しかし毒性が強く効果域が狭いことから、その誘導体の合成の必要性を指摘してきた。本年度は、明治製菓、微化研で開発された Bactobolin の誘導体である Actinobolin, Bactobolamine, N-Acetyl-Bactobolamine について検討した。

方法：Lewis ラットをモルモット BP とフロインド完全アジュバンドで感作し、各濃度の上記薬剤を連日腹腔内注射し、EAE の臨床的重症度を従来の方法で評価した。

結果：Actinobolin は 120 mg/kg, day 1-17 の投与で、EAE の発症を有意に遅延させた。

Batobolamine は 40-50 mg/kg でごく軽度の発症遅延を示したが、有意ではなかった。更に高濃度の検討が必要である。Bactobolamine の毒性に lot 差が見られ、ある lot では 40 mg/kg 以上でラットが死亡した。N-Ac-Bactobolamine は 40 mg/kg で毒性を示さず、EAE 抑制効果も示さなかった。

考案：今回テストした 3 つの誘導体はいずれも著しい毒性の低下が見られたが、効果も低下した。更に新しい誘導体の合成が必要である。

(2) Bactobolin のサプレッサー誘導能の検討

Bactobolin がサプレッサーを誘導し EAE を抑えるのか否かについて検討した。

方法：Lewis ラットを BP/CFA で感作し、Bactobolin を連日注射，day 11-12 の脾細胞を naive recipient に移入し，BP/CFA で感作した。結果：初期の 2~3 回の実験で Bactobolin による EAE の抑制が脾細胞で移入できるかの印象を得たが，その後の実験で Whole SPC, adherent vs. nonadherent, T vs. non-T に分けて検討したが，サプレッサーの証明に到らなかった。

6. Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis ラットによる新免疫抑制剤の探索研究

佐藤班員は Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis (EAMG) ラットを用いて，新しい免疫抑制剤を探索した。

昨年度までは，抗腫瘍抗生物質である 15-Deoxyspergualin (15-DSG)，Bactobolin, Actinobolin ならびにプロテアーゼ阻害剤である Arphamenine A の重症筋無力症に対する治療効果を検討したが，今年度はこれらに Bactobolamine を加え，今まで行った治療実験について総括的に考察してみた。

15-DSG および Actinobolin は EAMG の発症を有効に阻止したが，Bactobolin, Arphamenine A は免疫直後から投与を開始しても抗体産生を十分に抑制できず，EAMG の発症を阻止できるとは言えなかった。

急性期から慢性期に移行すると思われる免疫後 10 日目から治療を開始した場合，15-DSG および Actinobolin の免疫抑制効果は十分に発揮されなかった。残念ながら，一旦免疫を獲得し抗体産生能を持った EAMG ラットに対して，それを有効に治療し得る薬剤は現在のところ開発されていないようである。

Bactobolamine は Actinobolin の誘導体で，

Actinobolin と同様に毒性が非常に低いことで注目されている。25 mg/kg/day の Bactobolamine は免疫直後から投与しても，十分に抗体価の上昇を抑制することができず，免疫後 10 日目から 5, 25, 50 mg/kg/day いずれの投与量の Bactobolamine も有効に抗体産生の抑制をすることができなかった。

今後さらに安全かつ強力な免疫抑制剤が開発されることを期待したい。

7. 15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究

徳永班員は 15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序について研究した。

昨年までの研究で，15-deoxyspergualin (DSG) および 15-deoxymethylspergualin (MeDSG) が，マウスの二次 CTL の誘導および骨髄細胞の分化・増殖を抑制することを明らかにした。特に，CTL 誘導の系において，MeDSG による抑制がインターフェロン γ を添加することで回復するが，MeDSG は MLR におけるインターフェロン γ を初めとするサイトカイン産生は抑制しないこと，CTL 前駆細胞の熟成 CTL への分化の過程が DSG および MeDSG に最も感受性が高いことを見出した。DSG (MeDSG) の免疫抑制効果が分化誘導抑制によるものか否か，また，CTL 以外の細胞の分化も DSG (MeDSG) によって抑制されるか否かを明らかにするため，今回は骨髄性白血病細胞 (HL-60, M1) のマクロファージへの分化 (PC12)，マクロファージ活性化 (分化の一側面と考える) に伴う表層蛋白質 (Ia 抗原) の変化に対する MeDSG の効果を検討した。分化誘導の前後あるいは同時に MeDSG を添加し，HL-60 および M1 細胞の Fc レセプター発現，PC12 細胞の神経突起伸展，マクロファージ (P388D, および腹腔マクロファージ) の Ia 抗原発現を調べたが，全く抑制効果は認められなかった。ところが，M1 細胞の

DNA, RNA, 蛋白合成は MeDSG により著明に低下し, 特に, 5 日間共存培養した際の蛋白合成は 1 ng/ml 以上の濃度で 50% 以上抑制された。

8. I 型糖尿病モデルマウスに対する IFN- γ の効果

谷口班員は I 型糖尿病モデルマウスに対する IFN- γ の効果について研究した。

NOD マウスは, 代表的な臓器特異的自己免疫疾患である I 型糖尿病を解析する上での格好のモデル動物である。生後 4~6 週齢までに, 藤ラ氏島への限局性の細胞浸潤を認め, 12 週齢頃より β 細胞の崩壊による顕性糖尿をきたす。発症動物は, 多飲, 多尿, 高血糖, 尿糖を呈し, 体重が減少し, ketoacidosis をきたし死亡する。本症の発症は T 細胞依存性であり, β 細胞崩壊は MHC クラス II 限局性に CD4 (L3T4) 陽性 T 細胞により完遂される。

γ -インターフェロン (IFN- γ) は, MHC クラス I やクラス II の発現, T 及び B 細胞機能の調節, NK 細胞やマクロファージの活性化, IL-2 の発現促進等, 多彩な免疫調節機能を有するペプチドである。しかし, IFN- γ の各種自己免疫疾患に対する全身投与の効果は必ずしも一定ではない。すなわち, SLE モデルマウスに対しては, ループス腎炎をはじめとする各種病態を悪化させる。また, 臨床的にも多発性硬化症が, IFN- γ の投与により悪化すると報告もある。逆に, 実験的アレルギー性脳脊髄炎は, IFN- γ の投与により, 病状の進行が阻止されるという。

今回は I 型糖尿病のモデル動物である NOD マウスに IFN- γ を全身投与し, 自己免疫病発症に対する同剤の効果を検討した。その結果, IFN- γ は糖尿病発症前のいずれの時機から投与しても, NOD マウスの顕性糖尿の発症を抑制した。しかし, 組織学的には, IFN- γ は insulinitis を早期に誘導する作用を有していた。すなわち, IFN- γ は

NOD マウスの自己免疫現象に対して, insulinitis の促進と糖尿病発症の抑制 (β 細胞破壊の抑制) という 2 つの異なった作用を有することが明らかとなった。IFN- γ がどのような機序により insulinitis を促進し, 逆に β 細胞の破壊を抑制するのかは不明であるが, 我々のこれまでのモノクローナル抗体投与実験ならびに, これまで集積されてきた NOD マウスの遺伝学的解析から, “insulinitis の存在” と “ β 細胞の破壊” とは, それぞれ独立した事象であり, IFN- γ は少なくともこの 2 つの自己免疫現象に対して, 相異なった作用を示すと考えられた。

9. ループスモデルマウスを用いたベナドロスチンの *in vivo* 抗核抗体産生に及ぼす効果の解析

金井班員はループスモデルマウスを用いてポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤 (ベナドロスチン) の *in vivo* 抗体産生に及ぼす効果について研究した。

全身性エリテマトーデス (SLE) 合併妊娠で子宮内胎児死亡 (IUFD), 早・流産の頻度の高いことが知られている。我々はこの病態の研究および治療のための動物モデルを MRL/l マウスの妊娠の系に見いだすことに成功した。すなわち当核妊娠系で正常分娩と思われる高仔産例と IUFD によると思われる低仔産例があって, 後者が妊娠 1 週にて血清抗ポリ ADP-リボース抗体に選択的上昇がみられ, IUFD の予知が出来るというものである。これに関して治療という側面から MRL/l マウスを用いてのポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤投与による抗ポリ ADP-リボース抗体の選択的抑制を検討してきた。雌 MRL/l マウス 10 週齢 (通常我々は 10 週で mating を行っている) には抗ポリ ADP-リボース抗体価が相対的に抗 ssDNA 抗体価より高値を示すものが約 50% (そのうち特に高いものは 17%) 存在することがわかり, そのようなマウス群でベナドロスチンの選択

の抗体抑制効果がみられることがわかった。また一見ベナドロスチンによる抑制効果がないようなマウスでも測定系に一本鎖 DNA 抗原を共存させると抑制効果がみられるようになるという知見も得た。さらに前回は週3回投与法を用いたが、今回週1回投与でも効果的であるという予備的知見も得た。今回10週齢 MRL/l マウスのベナドロスチン投与による抗ポリ ADP-リボース抗体の選択的抑制の確認と、用いた MRL/l マウスの全例においてポリ ADP-リボース感作による特異的抗体 (IgG) が産生されたことから、MRL/l マウスにおける抗ポリ ADP-リボース抗体の産生にポリ ADP-リボース抗原の関与が強く示唆された。以上の結果、MRL/l マウスの妊娠前後でのベナドロスチン投与と低仔産例の防止の実験的基盤が確立したと考える。

10. エリテマトーデスモデルマウスを用いた微生物代謝二次産物の治療効果に関する研究

藤原班員はエリテマトーデスモデルマウスを用いて微生物代謝二次産物の治療効果について研究した。

1) Poststatin および Diocstatin の効果

これら産物を 5 mg/kg MRL/lpr マウスに5週齢から週3回7週間投与し、B細胞活性化現象とループス腎炎発症に対する影響を調べた。両者とも抑制効果は認められなかった。

2) 15-デオキシスパーガリン (DSP) の作用機序

これまでの実験から、DSP は強い免疫抑制活性を持ち、エリテマトーデスモデルマウス MRL/lpr および BXS^B(♂) マウスに対して治療効果を示すことが示されている。MRL/lpr マウスで DSP の作用様式を調べ、次のような結果を得ている。①このマウスに特徴的なリンパ節の腫脹を抑える。②それは Thy-1.2⁺ (T細胞マーカー)、CD4⁻ および CD8⁻、B²²O⁺ (これは通常 B細胞に発現される) の T細胞の増殖を強く抑制する。③

正常の T および B細胞は障害されないで、免疫応答性は温存される。このように DSP は治療薬として期待できる。

3) 移植細胞対宿主反応 (GVHR) の抑制

C57BL/6 (B6) マウスの CD4⁺T細胞を (B6 × bml²*) F1 マウスに移入すると GVHR が起り、ループス腎炎や臓器特異的自己免疫疾患が発症することが知られている。(*bml²マウス: B6 と MHC クラス II (Ia) 抗原のみ異なる) この系を用いて DSP の効果を検討したところ、強い抑制効果が示された。DSP の投与スケジュールとして、GVHR が進んでから投与しても抑制効果をもたらされるが、初期 (細胞移入直後) のみ投与すると、GVHR は却って増強することが示されている。治療には持続的投与が必要なことが示唆された。

11. 各種微生物二次代謝産物による病変の修飾に関する神経病理学的研究

生田班員は Bactobolin の EAE 抑制効果について研究した。

Bactobolin のラット EAE を抑制する最少有効量を知るために以下の実験を行った。

6週齢雄 Lewis ラット、各群5例づつにモルモット脊髄を抗原として EAE を惹起した。EAE 発症後 Bactobolin 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.01 mg/kg の各量を、麻痺の認められる期間連日腹腔内投与した。動物は全て感作 29 日目に、灌流固定し、全中枢神経系を組織学的に検討した。

結果: Bactobolin 0.1 mg/kg 投与群では、1例は cannibalism により死亡した。比較的軽症に経過した1例のラットでは、対照5例の何れよりも強い EAE 病巣をみとめた。これ以外の3例では、対照 EAE ラットに比べ病巣は明らかに少なく、微小かつ比較的古いものが多かった。

Bactobolin 0.05 mg/kg, 0.01 mg/kg 夫々を投与した群では、両群とも同様の組織像を示した。すなわち、いずれも癒合性の広範な脱髄巣を示す

ラットが多く、大型から中等大の脱髄病巣も多数認められた。いずれも対照群に比較し、強い病変を示していた。

まとめ：脊髄 homogenate を抗原とするラット EAE 系では、Bactobolin の最少有効量は 0.1 mg/kg と推定された。より少量の 0.05 mg/kg、および 0.01 mg/kg では、逆に EAE 病変を増強しているように思われた。

12. 実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)に関する二次代謝産物治療剤の検索

永井班員は実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)に関する二次代謝産物治療剤の探索研究を行った。

Bactobolin のラット EAE への治療効果は 1 mg/kg 以下の濃度で認められた。昨年度は 0.3 mg/kg で有効性が確認されたが、今年度は 0.1 mg/kg で治療効果を検討した。本薬剤の毒性が強いために、使用には限界がある。なるべく毒性の少ない薬剤の検索が今後必要と考えられる。今回は新しく bactobolamine, poststatin と dioctatin-A について比較検討した。

ラット EAE はルイスラットにモルモット脊髄抗原を接種して作製した。これらの薬剤の投与は、0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg/kg の濃度で発症直後から開始し麻痺のみられる期間中に行った。

評価判定基準として EAE ラットの臨床経過と病変数を調べた。Bactobolin 0.1 mg/kg 投与群で症状の軽減がみられた。病変数は control 群との間に有意差は認められなかったが減少傾向を示した。また、病巣の大きさと新旧病変の比較から bactobolin は、いったん形成された EAE 病変の進行を抑制しているものと推測された。

Poststatin 1 mg/kg 投与群では bactobolin 0.1 mg/kg 投与群よりも抑制効果は低かった。それに対して poststatin 0.1 mg/kg 投与群では病変数は少なく、抑制効果を認めるようであり、検

討中である。

さらに、MBP 抗原感作ラット EAE に対する効果についても比較検討中である。

13. インパルス反応から見た各種免疫調節剤の作用解析と比較

和田班員はインパルス反応から見た各種免疫調節剤の作用解析と比較研究を行った。

本班の過去 4 年間にわたる研究によって、自己回帰モデルによるフィードバック解析法を免疫ネットワーク解析に利用し、さらに免疫調節作用をシステム論の立場から解明することを試みてきた。今回の研究では各種免疫調節剤の作用を、インパルス応答という手法を通して比較することを試みた。

正常コントロール 2 名、全身性エリテマトーデス 1 名、慢性関節リウマチ 6 名、慢性血液透析患者 3 名について、30 週ないし 60 週にわたり、毎週 1 回、末梢静脈から採血し、IgG, CD4, CD8 を検査した。各種の免疫調節剤を投与し、サラゾピリンについては血中濃度を測定し、投与量または血中濃度の変動が免疫ネットワークに及ぼす影響についても研究した。

ベスタチンを透析患者に投与した時の時系列変化を解析すると、この薬剤は IgG の産生異常を正常化させるが、その作用は恐らく B 細胞を賦活化させることによって生じるものと考えられた。一方、カルフェニール、サラゾピリンなどでは、たしかに免疫ネットワークに影響するが、患者によってかなり差があり、ベスタチンのように明確な機能を見出すに至らなかった。これら 2 薬剤はリウマチ患者において、臨床的に効果が認められているが、その効果がリンパ球ネットワークに直接関係しているかどうか不明である。むしろ各種の炎症因子などに作用し、その結果として間接的に免疫ネットワークに影響する可能性が強いと思われる。

ベスタチンには副作用がほとんど無いに等しいことから考えると、ベスタチンをリウマチ患者に投与して、免疫機能異常にどう影響するかを検討することは非常に有意義と考えられる。今後、専門家の意見をいれてその是非について検討したい。

14. 微生物二次代謝産物の免疫抑制効果、特に腎炎発症・進展の抑制について

大久保班員はニュージーランド B/W F1 マウスの進行した糸球体腎炎に対する 15-deoxyspergualin および bactobolamine の効果について研究した。

(1) ニュージーランド B/W F1 マウスの進行した糸球体腎炎に対する 15-deoxyspergualin の効果—同一マウスにおける検討—

15-deoxyspergualin (15-dsp) の B/W マウスの進行した糸球体腎炎に対する効果を昨年度に報告したが、今回は同一マウスにおける変化を経時的に追求することにより、その効果を確認するとともに、さらに詳細な検討を行った。32 週齢の B/W マウスに片側腎摘を施行した後、PBS, methylprednisolone 20 mg/kg または 15-dsp 6.7 mg/kg の週 4 回皮下投与を開始した。40 週齢で採尿、採血後にマウスを屠殺、腎を摘出して(免疫)組織学的に腎糸球体病変を評価した。マウス生存率は 38 週齢以降 15-sep 群で対照群に比較して有意に高値であった。また、群間の比較で、蛋白尿の推移はコントロール群と有意に異なっていた。同様に、腎糸球体光顕所見の推移、IgG の腎糸球体への沈着も対照群に比し有意に改善された。15-dsp 群の血清抗 DNA 活性の変化も対照群と有意に異なっていた。以上の結果から、15-dsp は B/W マウスの腎症発症を抑制するだけでなく、すでに進行した糸球体腎炎に対しても治療効果を有することが確認された。

(2) ニュージーランド B/W マウスの進行した糸

球体腎炎に対する bactobolamine の効果

Bactobolamine (BBM) の免疫抑制効果を検討するため、すでに腎症を発症した 28 週齢のニュージーランド B/W F1 マウス (B/W マウス) に BBM 3.5-30 mg/kg × 4/wk を投与した。40 週齢で採尿、採血後に屠殺して、腎臓を摘出、腎糸球体の組織学的並びに免疫組織学的検討を行った。蛋白尿は BBM 15-30 mg/kg 群で対照群に比較して有意に減少した。腎糸球体組織学的検査でも BBM 30 mg/kg 群で対照群に比して有意低値であった。同様に腎糸球体における C3 および IgG の沈着も 15 および 30 mg/kg 群で有意に減少した。BBM の免疫抑制機序にかんして現在 BALB/c マウスを用いて検討中である。

15. Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の実験的アレルギー性神経炎に対する治療効果の検討および 15-Deoxyspergualin, methyl-DSG, Diplotin A, Foroxymithine, Bestatine の HAM 患者末梢血リンパ球自己増殖反応 (APR) への影響

井形班員は Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の実験的アレルギー性神経炎に対する治療効果および 15-Deoxyspergualin, methyl-DSG, Diplotin A, Foroxymithine, Bestatine の HAM 患者末梢血リンパ球自己増殖反応 (APR) への影響について研究した。

(A) Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の実験的アレルギー性神経炎に対する治療効果の検討

末梢神経髄鞘に対する自己免疫疾患と考えられている Guillain-Barré 症候群の実験モデルである EAN を用いて Bactobolin, Actinobolin, Foroxymithine の EAN 発症後投与による治療効果につき臨床的、組織学的に検討した。EAN は Lewis ラットに牛末梢ミエリン 300 μg 蛋白を完全アジュバンドと共に接種し作成。Bactobolin 1

mg/kg・匹, Actinobolin 200 mg/kg・匹, Foroxymithine 1 mg/匹, 20 mg/匹を EAN 発症後より連日 5 日間腹腔内投与し, 臨床症状, 組織所見の程度をスコアし, コントロールと比較した。

Bactobolin 1 mg/kg では有意の治療効果はみられなかった。Actinobolin 200 mg/kg の大量投与で臨床的にも組織学的にも明らかに EAN 所見の軽減が認められ, 治療効果ありと判断した。Foroxymithine は両投与量でも明らかな治療効果は認められなかった。

(B) 15-Deoxyspergualin, methyl-DSG, Diploin A, Foroxymithine, Bestatine の患者末梢血リンパ球自己増殖反応 (APR) への影響

HTLB-I が関与し, 免疫学的機序により発症すると考えられる HAM の治療薬の開発を目的に HAM 患者に特有に認められる APR を抑制することを指標として各種免疫修飾剤のスクリーニングを行った。15-DSG と methyl-DSG は APR を抑制し, 安定な methyl-DSG がより低濃度で抑制した。また高濃度では逆に抑制が低下した。Diploin A は APR を抑制せず, むしろ高める方向に作用した。Foroxymithine は用量依存性に APR を抑制した。Bestatine は 10 μ g/ml までは用量依存性に APR を抑制したが, より高濃度にしてもそれ以上の抑制は認められなかった。以上より, APR のこれらの薬剤に対する動態は EAE ~EAN など自己免疫疾患動物モデルに対する抑制効果と類似しており, HAM の病態の解析と治療薬の開発に本方法が有用と考えられる。

16. ヒト末梢血単核球による抗核抗体産生におよぼす 15-deoxyspergualin の影響に関する研究—抗体産生抑制機序について—

本間班員はヒト末梢血単核球による抗核抗体産生におよぼす 15-deoxyspergualin (DSG) の影響について研究した。

目的: 本年度は, T 細胞活性化経路における

DSG の作用部位を調べるため, マイトーゲンによる細胞内カルシウム濃度の変化を調べた。

方法: 健常人と SLE 患者の末梢血より単核球を得, サイクロスポリン A または DSG を添加し 24 時間培養した。対照には, 薬剤非添加で培養したものをを用いた。培養終了後, カルシウム感受性蛍光色素である Fura-2AM を加え, 反応させた後, カルシウム緩衝液に浮遊し検体とした。細胞内カルシウム濃度は Fluorescence Spectrophotometer を用い測定した。検体にマイトーゲンとして PHA を加え, 細胞内カルシウム濃度の上昇反応を調べた。またカルシウム・イオノフォアを加えて上昇反応の指標とした。

結果: 健常人単核球では, PHA 添加直後より細胞内カルシウム濃度の上昇 (初期上昇反応) があり, 5 分後よりさらに軽度の上昇 (後期上昇反応) が認められた。約 10 分後にイオノフォアを加えたところ, 著明な細胞内カルシウム濃度の上昇がみられた (最大蛍光強度)。

基礎値から最大蛍光強度までの上昇を 100% とし, 個々の成績を評価した。健常人対照では, 初期上昇反応は約 40% であった。サイクロスポリン A 処理では, 25% であった。DSG 処理単核球でも同様 (約 25%) の抑制が認められた。いずれも後期上昇反応には影響しなかった。一方 SLE では, 初期上昇反応は約 40% と健常人と差がなかったが, 後期上昇反応は逆に低下した。サイクロスポリン A 処理で, 初期上昇反応は約 50% となったが, 後期上昇反応は認められなかった。DSG 処理では, 初期上昇反応は約 30% で, 後期上昇反応は僅かに認められた。

結語: 1) 健常人において, DSG はサイクロスポリン A と同様 PHA 刺激による細胞内カルシウム濃度の初期上昇反応を抑制した。2) SLE 患者では, PHA 刺激後細胞内カルシウム濃度の初期上昇反応は健常人同様に認められたが, 後期上昇反応はむしろ低下した。3) SLE における細胞

内カルシウム濃度の後期上昇反応の欠如は、DSG 処理で改善された。

以上より、DSG はサイクロスポリン A 同様、健康人単核球の細胞内小胞体からのカルシウムの動

員を抑制すると考えられた。細胞外からのカルシウム動員は、SLE 患者単核球で低下していたが、DSG 処理により一部改善した。

分 担 研 究 報 告

自己免疫疾患治療薬の開発研究

A. 生理活性物質の概要

青 柳 高 明*

研究協力者 小川慶治*, 小島露子*, 永井真知子*, 原田滋子*

自己免疫疾患治療薬の開発研究を行うことを目的とした本研究班は、微生物代謝産物として発見された多くの酵素阻害物質、抗菌物質、制癌物質ならびに新しい探索研究の結果、見出されたさまざまな生理活性物質を用い治療薬の開発研究を行っている。

これらの生理活性物質は新規な構造を有する低分子物質であるとともに、免疫調節作用を有することで世界の注目を集めている。

初めに、本研究班の班員の要望に答えるため、エンドペプチダーゼ阻害物質、エクトエンザイム阻害物質、その他の酵素阻害物質ならびに免疫修飾物質を含む抗菌物質、抗癌物質などの化学構造、阻害活性、毒性および溶解性などの概要を述べる。

Endopeptidases に属する serine proteinases, cystein proteinases, aspartic proteinases, metal proteinases を阻害する物質として見出した leupeptin, antipain, pepstain, hydroxyepstatin, pepstanone, phosphoramidon などの構造は図1に示す。

Ectoenzyme のうち、exopeptidases に属する aminopeptidases, dipeptidylaminopeptidases, carboxypeptidases, dipeptidylcarboxypeptidases ならびに alkaline phosphatase, esterase および phospholipases などを阻害する多くの低分子阻害物質を発見した。

Aminopeptidases に対する阻害物質として amastatin, bestatin, arphamenines A と B, actinonin, ebelactones A と B, formestin A と B, probestin, prostatin, leuhistin など、また dipeptidylaminopeptidases を阻害する物質として dioctatins A と B, diprotins A と B などを見出した。一方、carboxypeptidases 阻害物質として, (s)- α -benzylmalic acid および histargin など、また dipeptidylcarboxypeptidases 阻害物質として angiotensin converting enzyme を阻害する (s,s)-N,N'-ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS), Foroxymithine および histargin などを見出した。上記 exopeptidases 阻害物質の構造は図2-(1, 2)に示す。

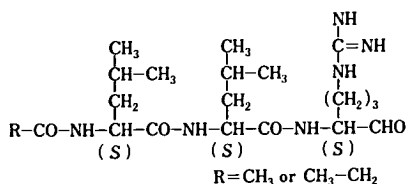
さらに ectoenzyme である alkaline phosphatase の阻害物質として forphenicine を、また esterase の阻害物質として esterastin および ebelactones A と B を、さらに phospholipase の阻害物質として plipastatins A1, A2, B1, B2 など、さらに EDDS などを見出した。これらの阻害物質の構造は図2-(3)に示す。

免疫修飾物質を含む抗腫瘍性物質の探索研究において (\pm)-15-deoxyspergualin, bactobolin, bactobolamine, Ac-bactobolamine, Thr-bactobolamine, Suc-bactobolamine, Coformycin, Azomycin などを、また poly(ADP-ribose)-synthetase 阻害物質として benadrostin, さらに sialid-

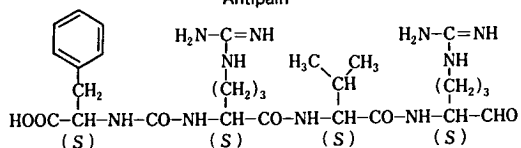
*微生物化学研究所

Inhibitors of serine and cysteine proteinases.

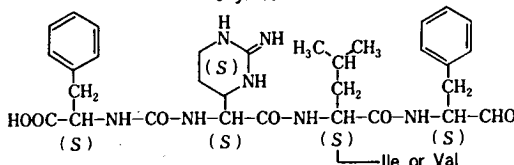
Leupeptin



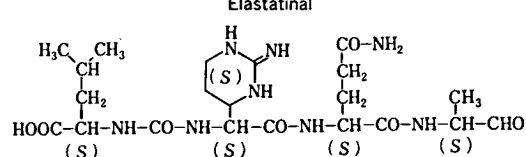
Antipain



Chymostatin

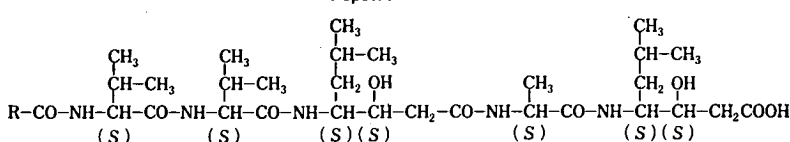


Elastatinal



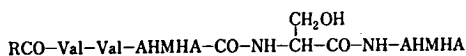
Inhibitors of carboxyl proteinases.

Pepstatin

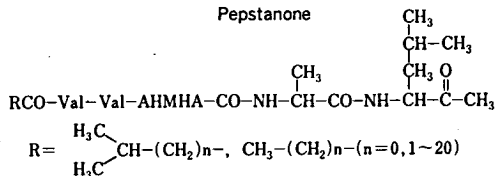


Isovaleryl-L-valyl-L-valyl-AHMHA-L-alanyl-AHMHA

Hydroxypepstatin



Pepstanone



AHMHA : (3S, 4S)-4-Amino-6-methylheptanoic acid .

Inhibitors of metal proteinases.

Phosphoramidon

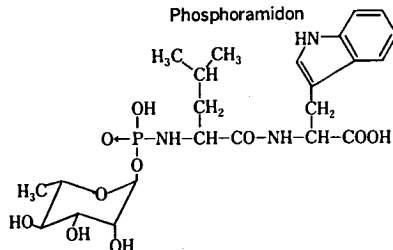


図 1 エンドペプチダーゼ阻害物質

