

脳血管障害におけるゲノム創薬ターゲットの作用機構解析

●田中 利男 ◆中 充子 ◆西村 有平 ◆角田 宏

三重大学大学院医学系研究科 薬理ゲノミクス分野

〈研究の目的と進め方〉

ヒトゲノムシーケンスが公開され、ゲノムサイエンスは、配列から機能ゲノミクスへと大きく展開を始め、医学生物学全般に大きなインパクトを与えた。創薬の研究戦略においても極めて短期間にパラダイムシフトを起こし、ゲノム創薬科学が誕生した。本研究の目的は、現在世界的に展開されつつあるゲノム創薬科学において、ヒトゲノム上我々が発見した新規創薬ターゲットの病態選択性作用機構を解明することである。

我々は既に病態モデル及びその薬物療法において、発現変化する遺伝子群を包括的に解析するディファレンシャルディスプレイを中心としたトランスクリプトーム解析法を導入し、数多くの治療関連遺伝子群の単離及び同定が可能となった。この研究成果として、脳血管攣縮モデルにおけるHeme Oxygenase-1遺伝子が誘導されることや、虚血病態モデルにおいて我々が独自にcDNAクローニングに成功していたS100Cの遺伝子発現が上昇することを見出した。そこで、S100C遺伝子をクローニングし、そのプロモーター領域に少なくとも二カ所の低酸素応答塩基配列を見出した。さらに、欠失突然変異株や位置指定突然変異株を構築し、解析した結果、5'側から二番目の低酸素応答配列が機能的に重要であることを明らかにした。一方、抗虚血作用が明らかにされているタウリンが、このS100C遺伝子の虚血応答発現を抑制することを見出した。

その成果を受けて更に研究を推進し、アンチセンスRNAを用いた検証により、正常群では全く影響を及ぼさないにもかかわらず、脳血管攣縮モデルにおいてはHeme Oxygenase-1誘導抑制が脳血管攣縮を悪化させることを示し、本病態におけるHeme Oxygenase-1の抗脳血管攣縮作用を明らかにした(J. Clin. Invest. 104: 59-66, 1999)。しかしながら、これらの病態選択的なゲノム創薬ターゲットの作用を解析する研究は、国際的にもまだ十分に認知されておらず、科学としては成立していないのが現状であった。われわれは同時に我々が独自に開発を進めていたデータベースによる解析を試みた。それは医薬品1200種と疾患1214種に関連する遺伝子11980種からなる全く新しいゲノム創薬データベースであり、それにトランスクリプトーム/プロテオーム解析結果を統合し、病態選択性ゲノム創薬ターゲット探索法の確立を試みる。

本研究は、国際的にも新しいゲノム創薬データベースにおける治療関連遺伝子に焦点をあてた病態選択性創薬ターゲット作用機構解析の研究戦略確立を目指す世界的に例のない独創的研究である。すなわち、この研究領域で出遅れた我が国の新しいゲノム創薬科学研究のさきがけとなるのが大きな特色である。具体的には、脳血管障害における治療関連遺伝子クラスター解析から、新しい病態選択性創薬ターゲット探索法を確立することを目

的とする。さらに、その病態選択性の作用機構を解明するとともに、病態選択性ゲノム創薬ターゲット探索法の実験的・情報学的な新しい解析システムの構築を試みる。

〈研究開始時の研究計画〉

1) 脳血管障害や脳虚血病態モデル病態関連遺伝子クラスターを同定する為に、脳血管障害や脳虚血病態モデルにおける虚血脳及び正常脳のcDNAライブラリーを構築し、脳虚血DNAマイクロアレイを作製する。発現頻度を補正した標準化脳虚血DNAチップ作製に必要なハイデンシティーリプリケイティングツールにて高密度メンブランマイクロアレイを作製し、発現頻度の高いクローンを除外した標準化を行う。標準化ライブラリーより、PCR法にて遺伝子を増幅し、cDNAチップを作製する。このマイクロアレイにより、数万種類の遺伝子発現変化を高速に、種々の条件で解析することが可能となる。

2) 脳虚血病態の進展(時間経過、重症度)に伴う遺伝子発現変化を包括的にマイクロアレイ法により解析し、それぞれの役割を解明する。脳虚血病態モデルにおける遺伝子発現プロファイル変化の細胞の種類による差異を明らかにして、細胞特異的遺伝子発現応答の分子機構を明らかにする。さらに、細胞特異的応答遺伝子産物の標的分子を同定し、それぞれの作用機序を検討する。ヒト血管平滑筋細胞にヒト溶血液を作用させたヒト脳血管攣縮モデルにおいて、抗脳血管攣縮作用の認められる医薬品を作用させ、遺伝子発現プロファイル、独自のDNAマイクロアレイにより解析する。

3) 独自に構築したゲノム創薬データベースの拡充とデータマイニング。現在、我々のゲノム創薬データベースは登録化学物質13883種、登録疾患1214種、登録遺伝子11980種であり、延べ文献数は8670万文献である。これをさらに拡充し、登録化学物質、疾患、遺伝子種を増加すると共に、このデータベースから、新規ゲノム創薬ターゲット探索に有効な方法論を確立する。さらに、本プロジェクトの遺伝子発現プロファイルデータとの統合的解析法を構築する。

〈研究期間の成果〉

1) 病態モデル及びその薬物療法において、発現変化する遺伝子群を包括的に解析するディファレンシャルディスプレイを中心としたトランスクリプトーム解析法を導入し、数多くの治療関連遺伝子群の単離及び同定が可能となった。本研究では上記の包括的トランスクリプトーム解析に加え、ヒト平滑筋細胞からcDNAライブラリー作成し、これを元にcDNAマイクロアレイを作成した。



ハウスメイドマイクロアレイ

本アレイの作成に当たっては、大量のPCR反応や、PCR産物の精製が必要となるため、作業工程の大部分においてロボティクスによる自動化を推進した。じか地投与によるラット脳血管攣縮モデルを作成し、農を今日時的に回収しマイクロアレイターゲットを作成した。マイクロアレイによる検討では虚血、攣縮の重傷度により有意な遺伝子発現変化が認められたため、有効な解析が可能である事が確認できた。

2)

我々は遺伝子発現プロファイル解析により創薬ターゲット遺伝子を探索し、ラット脳血管攣縮モデルにおけるHeme Oxygenase - 1誘導は抗脳血管攣縮作用をもたらし、アンチセンスRNA投与によりHeme Oxygenase - 1発現を抑制すると、脳血管攣縮が悪化する事を明らかにした。この事実は、特定の病態下で特定の分子が治療的に働くという事を示している。そして本研究において、我々が独自に開発構築した、医薬品1200種と疾患1214種に関連する遺伝子11980種からなる全く新しいゲノム創薬データベースと、トランスクリプトーム/プロテオーム解析結果を統合することにより、Heme Oxygenase - 1は、臨床治療薬の標的分子であることを予想し、病態モデル動物においてその効果を新に解明した。具体的には、抗脳血管攣縮作用が確立している治療薬の一部にHeme Oxygenase - 1誘導作用がある事を新しく発見した。ラットモデルにおいて、この医薬品の静注により、Heme Oxygenase - 1はmRNAレベル、タンパク質レベル双方において相乗的に誘導され、临床上重大な問題となる遅発性脳血管攣縮は著明に抑制されたのである。本研究成果は、医薬品による遺伝子発現調節による病態改善作用を端的に示したものであり、国際特許を出願するに至った。(国際特許出願, WO 01/68094 A1)。

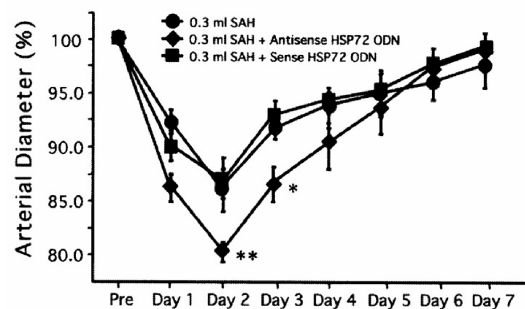
我々は更にその分子メカニズムにつき、研究を進めた。くも膜下出血後の脳血管においては、内皮細胞障害等の原因によりNO/cGMPによる血管拡張作用が障害され、正常血管でみられるcGMPによる脳血管toneの制御が維持されておらず、cGMPレベルと攣縮に相関が見られない。一方、NO/cGMP pathwayの他にHO-1/CO/cGMP pathwayにより、cGMPレベルが制御されるため、HO-1

の発現誘導による脳血管攣縮に対する効果を検討した。攣縮病態下にHO-1を誘導することにより、脳血管攣縮は改善し、攣縮病態で低下したcGMPレベルが上昇することを示しているが、さらに、このcGMPレベルは、HO-1の特異的な抑制により低下し、攣縮時の通常のレベルよりさらに低下した。このことは、単に脳血管攣縮病態の改善にHO-1が作用しているばかりではなく、cGMPに対する血管反応性がHO-1の発現誘導により改善していることを示唆する。Heme Oxygenase-1の細胞保護作用、原因物質と考えられるOxyHbのクリアランスの上昇もこのcGMPに対する血管反応性に関与していると考えられる。

さらに、我々は、独自のデータベース解析から、攣縮病態下においてHO-1を誘導する医薬品を新たに見出したが、その医薬品による分子メカニズムについても検討した。この医薬品は、正常血管ではHO-1を誘導しないが、攣縮病態下では著名にHO-1を誘導する。また、cGMPに対する血管反応性も改善され、攣縮改善とcGMPレベルは相関した。さらに、human HO-1を用いたプロモーター・アッセイから、この医薬品によるHO-1の誘導は転写レベルで制御されることが示唆された。HO-1は動脈硬化、肺高血圧等、種々病態において誘導され、細胞保護作用を示すため、種々の病態にこの医薬品の治療効果の検討により新たな治療法開発が期待される。本成果により、我々のゲノム創薬科学における創薬ターゲット探索の研究戦略の有効性が明らかとなっただけでなく、さらに、病態に選択的に作用する医薬品を得ることが出来た。

トランスクリプトーム解析には古くはディファレンシャルディスプレイや、サブトラクション法、現在では非常にポピュラーになったマイクロアレイによる解析が挙げられ、我々はこれらの技術を用いて解析を進めてきた。その手法にはそれぞれ一長一短があり、複数の手法を適応することにより重要なターゲットをもらすことなく検索可能である。

我々は上記の成果のほかに、さらに全く新しい作用機序による抗脳血管攣縮遺伝子を見出した。それは分子シャペロン、Heat Shock Protein 72である。我々はラット脳血管攣縮モデルにおいてHeat Shock Protein 72を抑制する事により脳血管攣縮が悪化したため、Heat Shock Protein 72は病態を改善する機能を持つ治療遺伝子と考えた。

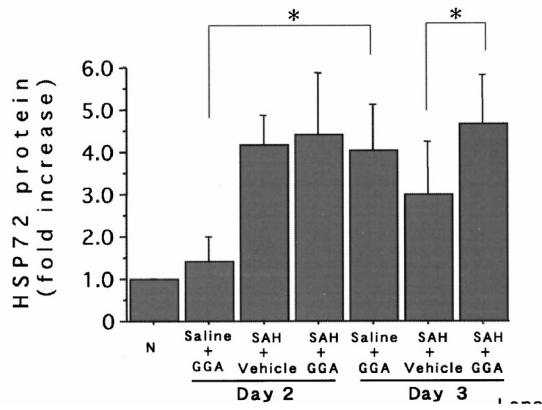


Circulation. 2004 Sep 28;110(13):1839-46. Epub 2004 Sep 20. より引用

Hsp72アンチセンスの投与により、実験的くも膜下出血後の遅発性脳血管攣縮は有意に悪化した。

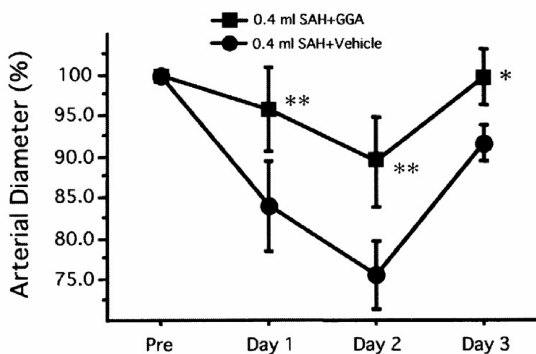
さらに本遺伝子の薬剤による誘導を想定し、本遺伝子、病態、薬剤の関連を、我々が独自に開発した薬理ゲノミクスデータベースを用いて詳細に検討した。

その結果、胃潰瘍治療薬テブレノン (Geranylgeranylacetone) に着目し、モデル動物による検討を行うに至った。ラット脳血管攣縮モデルに胃潰瘍治療薬テブレノンを経口投与したところ、脳底動脈においてHeat Shock Protein 72 が発現誘導を受け、遅発性脳血管攣縮が改善された。



Circulation. 2004 Sep 28;110(13):1839-46. Epub 2004 Sep 20.より引用

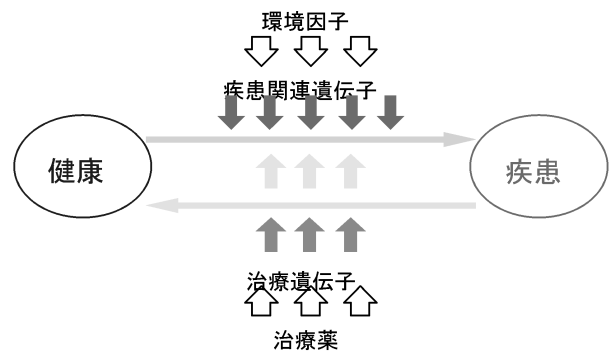
実験的くも膜下出血後、胃潰瘍治療薬テブレノン (Geranylgeranylacetone ; GGA) 投与により発現誘導を受ける。



Circulation. 2004 Sep 28;110(13):1839-46. Epub 2004 Sep 20.より引用

胃潰瘍治療薬テブレノンを経口投与されたラットでは、脳血管攣縮が有意に抑制された。

さらに、ラット脳血管、及びヒト平滑筋細胞に、ヒト溶血を作用させたin vitro脳血管攣縮モデルを用いて、マイクロアレイによる包括的遺伝子プロファイル解析を行った。これらトランスクリプトーム解析結果に対し、病態選択性作用機序に基づくデータマイニングを行ったところ、新にHeat Shock Protein遺伝子の中に、血管攣縮抑制分子と予想されるHeat Shock Protein 27を見出した。その特異的抑制により脳血管攣縮が悪化する事が観察され、新たな血管攣縮抑制分子であることが示唆された。



多因子疾患病態の形成と薬剤による治療遺伝子発現の概念図

治療遺伝子の誘導により、病態を治癒へ向かわせる。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究は、病態モデル動物にトランスクリプトーム解析を適応し、その解析結果をゲノム創薬データベースにより検討する戦略全く新しい戦略に基づき遂行した。その結果、病態選択的な治療関連遺伝子を抽出することを達成し、さらにはその治療関連遺伝子発現調節を介して病態を改善する医薬品を世界で初めて明らかにした。本研究は、病態選択性創薬ターゲットバリデーションの研究戦略確立を目指す、世界的に例のない独創的研究である。すなわち、この研究領域で出遅れた我が国の新しいゲノム創薬科学研究のさきがけとなることが大きな特色である。具体的には、脳血管障害における治療関連遺伝子クラスター解析から、新しい病態選択性創薬ターゲットバリデーション法を確立し、さらに、その病態選択性の作用機構を解明するとともに、病態選択性ゲノム創薬ターゲットバリデーション法の実験的・情報学的な新しい解析システムの構築を試みたものである。

これらの研究の前提となる概念図を以下に示す。

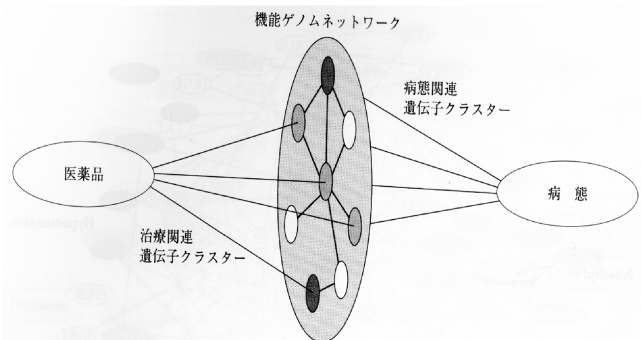


図4 薬理ゲノミクスデータベースによる治療/病態遺伝子クラスター

治療/病体遺伝子クラスター概念図

遺伝子発現プロファイル解析データを統合することにより関連の深い医薬品ターゲットを推定する。

病態形成を担う責任遺伝子群と、医薬品による治療効を担う遺伝子群はお互いに関連している。このつながりを我々は機能ゲノムネットワークと名づけ、このネットワークの解明が、多因子疾患における薬物療法の有効性の機序を解明することであると考えている。この概念は我々の研究戦略を端的に表しており、国際的にも全く新しい研究戦略である

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

哺乳類病態モデルにおいては、その構築に非常に手間とコストがかかる。本病態モデル、ラット脳血管攣縮モデルにおいても同様であり、トランスクリプトーム解析、ゲノム創薬データベース解析により新たなターゲット候補を推定したとしても、その実施、検証には莫大な時間と労力を必要とする。今回我々が得た、他の創薬ターゲット候補群は、上記の理由により今回検証しえなかった。その根本的解決法として、我々は現在新たなモデル動物に本研究戦略を適応する試みを開始している。

また、トランスクリプトーム解析、ゲノム創薬データベース解析を統合することにより、本研究はある程度の成果を上げることができたが、統合により演算量は莫大になった。研究手法の進展により包括的遺伝子発現プロファイル解析が可能となり、一度に多くの遺伝子発現情報を得ることができようになった。これら研究手法の進歩傾向は、これから止まることなく続いていくと予想される。遺伝子、疾患、薬物に関する情報はより急速に蓄積されていくため、我々はプログラム、システム双方の改良の取り組みを始めている。

〈今後の課題〉

本研究成果により、本研究戦略が非常に強力且つ有効であることを示すことができた。しかし上述したように、近年の実験技術の進歩と、それに伴い急速に蓄積されてゆく医学分子生物学的情報は、予想を上回る勢いであり、そこから生まれる新たなターゲット群は既存の検証系ではもはや対応が難しい状況になりつつある。具体的な課題として、遺伝子発現プロファイル解析とゲノム創薬データベースの統合による創薬ターゲット同定戦略は非常に有効な研究戦略であるのは確かだが、莫大な計算を要するため、より強力な情報処理システム、プログラムの改良が必須である。またその結果を検証するモデル動物系も、従来のげっ歯類中心のスキームではもはや負いきれない状況に変化しつつあり、他のモデル動物を用いた検証系の構築を始めている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1)

Nikaïdo H, Tsunoda H, Nishimura Y, Kirino T, Tanaka T. Potential role for heat shock protein 72 in antagonizing cerebral vasospasm after rat subarachnoid hemorrhage. *Circulation*. 2004 Sep 28;110(13):1839-46. Epub 2004 Sep 20

404091401

Amano H, Maruyama K, Naka M, Tanaka T. Target validation in hypoxia-induced vascular remodeling using transcriptome/metabolome analysis. *Pharmacogenomics J*. 2003;3(3):183-8.

404091405

Matsumoto Y, Oshida T, Obayashi I, Imai Y, Matsui K, Yoshida NL, Nagata N, Ogawa K, Obayashi M, Kashiwabara T, Gunji S, Nagasu T, Sugita Y, Tanaka T, Tsujimoto G, Katsunuma T, Akasawa A, Saito H. Identification of highly expressed genes in peripheral blood T cells from patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Dec;129(4):327-40.

404091421

Imai Y, Nakada A, Hashida R, Sugita Y, Tanaka T, Tsujimoto G, Matsumoto K, Akasawa A, Saito H, Oshida T. Cloning and characterization of the highly expressed ETEA gene from blood cells of atopic dermatitis patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Oct 11;297(5):1282-90.

404091422

Hayashi M, Shimada Y, Nishimura Y, Hama T, Tanaka T. Genomic organization, chromosomal localization, and alternative splicing of the human phosphodiesterase 8B gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Oct 11;297(5):1253-8.

404091423