

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 福永 浩司
所属機関名： 東北大学大学院薬学研究科
所属部署名： 薬理学分野 職名： 教授
所 在 地： 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3
電 話： 022-795-6836 内線： 6836



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

神経変性疾患治療薬のトランスレーショナルリサーチの基盤形成

3. 成果の概要

本研究では生薬を含む天然化合物の中から、神経細胞において神経生存シグナルであるプロテインキナーゼ B の活性化反応を指標にして、新規バナジウム有機錯体化合物を創製した。さらに、日本と中国における神経変性疾患の創薬研究拠点を作るために共同して、シーズ化合物の創薬研究を行なった。

※発表論文等

Transcriptional Upregulation of Calcineurin A β by Endothelin-1 is Partially Mediated by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II δ 3 in Rat Cardiomyocytes. Ying-Mei Lu, Norifumi Shioda, Yui Yamamoto, Feng Han, Kohji Fukunaga BBA - Gene Regulatory Mechanisms 2010 in press.

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 福永 浩司	職名： 教授
所属機関名： 東北大学大学院薬学研究科	部署名： 薬理学分野
中国側研究者氏名： 韓 峰 (Feng Han)	職名： 准教授
所属機関名： 浙江大学薬学部・薬理毒性研究所	部署名： 薬理学分野

神経変性疾患治療薬のトランスレーショナル・リサーチの基盤形成

日本側研究者氏名	福永 浩司
所属機関	東北大学大学院薬学研究科
中国側研究者氏名	韓 峰
所属機関	浙江大学薬学部

要 旨

本研究の目的は日本と中国における神経変性疾患治療薬のトランスレーショナル・リサーチの基盤を形成することである。東北大学(日本)、蘇州大学(中国)、浙江大学(中国)チームで神経変性疾患治療薬の開発研究を行った。Fas-ligand (FasL) は TNF ファミリーに属するアポトーシス誘導因子のひとつであり、分子量約 40kDa の II 型膜貫通蛋白質である受容体である Fas と結合することによって Fas を発現する細胞でアポトーシスを誘導する。主に細胞膜に発現する膜型 FasL (mFasL)の細胞外領域にあたる C 末端側 26kDa が metalloprotease のひとつである ADAM10 に限定分解され、soluble Fas-ligand (sFasL) が産生される。しかしながら、脳虚血において sFasL がいつ、どの細胞で産生され神経細胞死を誘導するのか明らかではない。本研究では 2 種類の脳虚血モデルを用いて ADAM10 の活性化機構と脳虚血後の FasL の発現細胞を初めて明らかにした。さらに、FasL の誘導を抑制する神経変性疾患治療薬のシーズを見出した。

Key Words 神経変性疾患, Fas-ligand, ADAM10, アポトーシス, Akt

緒 言:

私達はアルツハイマー病のモデルマウスである嗅球摘出マウスを用いて bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium (IV) [VO(OPT)] が protein tyrosine phosphatase1B を抑制して、PI3 キナーゼを活性化する結果、細胞の生存シグナルである protein kinase B (Akt) を活性化することを報告した(図1) (1)。新しいシーズである VO(OPT) は嗅球摘出マウスにおいて傷害された海馬歯状回における神経新生を回復させ、同時に認知機能障害を改善した (2)。脳虚血において Akt 活性が低下して、その結果 FasL が誘導されること、FasL の誘導は神経細胞に置いて Caspase 8、Caspase 3 を活性化してアポトーシスを誘導することを明らかにした (3, 4)。しかし、脳虚血障害時に FasL が脳のどの細胞で産生され、脳損傷を起こすのか不明であった。本研究では 2 種類の脳虚血モデルを用いて FasL の活性化機構を明らかにした。さらに、FasL の活性化を抑制する神経変性疾患治療薬のシーズを見出した。

実験方法:

マウス中大脳動脈一過性閉塞虚血モデルは既報の方法により作製した (3)。12 週齢の C57BL6J マウスを実験に用いた。シリコンコーティングしたナイロン栓糸を内頸動脈から挿入して、中大脳動脈を 90 分間閉塞した後再開通した。再開通直後(0)、2、6、24 時間後に脳組織を摘出して免疫ブロット解析を、灌流固定して免疫組

組織化学的解析を行った。多発性脳塞栓モデルであるマイクロスフェア脳塞栓モデルは 10-12 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いて既報の方法で作製した (5)。マイクロスフェア注入直後(0)、0.5、2、3、7 日目に大脳皮質を摘出して FasL の発現を免疫ブロット法で解析し、灌流固定して免疫組織化学でも解析した。ミノサイクリンは 45 mg/kg/day でマイクロスフェア注入の翌日から 6 日間、腹腔内投与した。

実験結果：

福永らはマウス中大脳一過性閉塞虚血モデルを用いて、90 分間虚血の再開通直後 (0)、2、6、24 時間後に虚血部位である大脳皮質を摘出して、組織抽出液を調製して、免疫ブロット解析を行い、ADAM10 の活性化の時間経過を調べた。ADAM10 の活性化体は再開通直後から有意に上昇し、少なくとも 24 時間、その活性体の発現は上昇した。免疫組織化学手法を用いて ADAM10 の発現細胞を調べると、特に、虚血の梗塞周辺領域(ペナンプラ)において強い発現が見られ、その免疫反応性を示す陽性細胞のほとんど MAP2 陽性細胞であった。このことはペナンプラ領域の神経細胞において活性型 ADAM10 が脳虚血直後から持続的に発現することが示唆された。次に、同じ脳組織抽出液を用いて、mFasL と sFasL の発現を免疫ブロット法にて解析した。活性型 ADAM10 の発現上昇の時間経過に一致して、sFasL の量は 2 時間をピークとして急激に上昇し、24 時間まで有意な上昇が持続した。逆に、mFasL の発現量は 0 及び 2 時間で一過性に低下した。面白いことに虚血再開通後 24 時間後には mFasL も発現量が有意に上昇した。私達は以前に、FasL 遺伝子発現が虚血後 1-2 日目に上昇することを見いだしており、この結果と一致している。

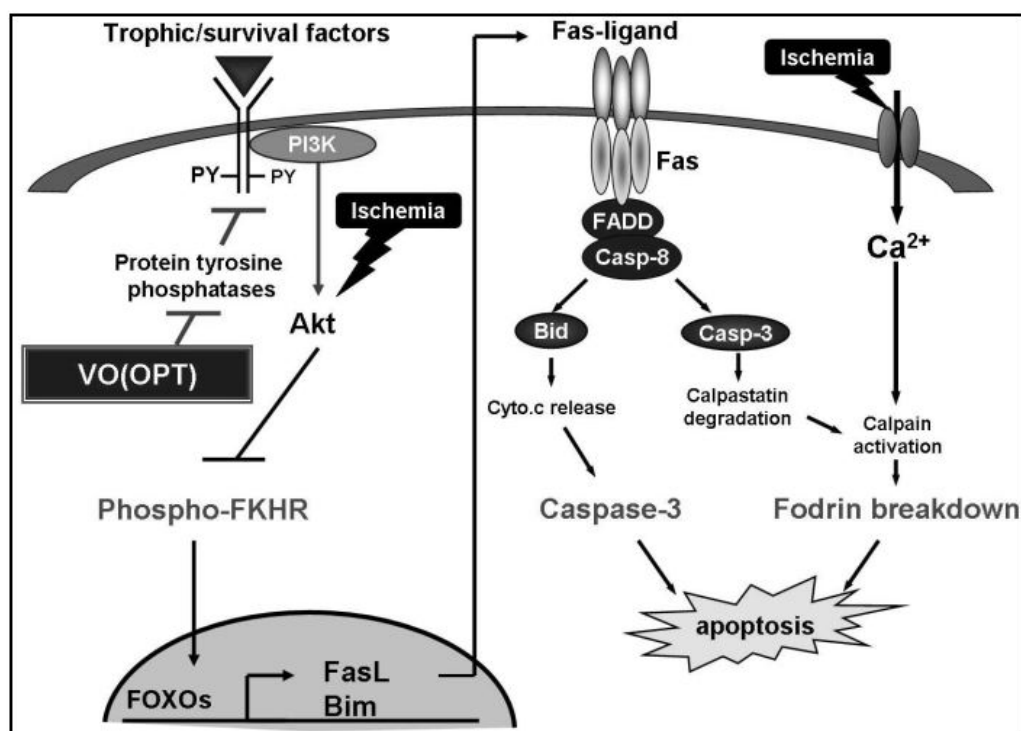


図 1. 脳虚血における Fas-ligand の発現とアポトーシスの誘導機構

次に、免疫組織化学的解析により、sFasL の発現部位について検討した。偽手術群のマウス大脳皮質においては sFasL の免疫染色はほとんど見られない。それに対して、虚血再開通マウス大脳皮質のペナンプラ領域では著しい免疫陽性細胞の上昇が見られた。神経細胞のマーカーである NeuN とミクログリア細胞のマーカーである

ED1 で二重染色を行うと、ほとんどの sFasL 陽性細胞は NeuN で染色され、僅かな sFasL 陽性細胞が ED1 陽性であった。このことは虚血直後から発現する活性型 sFasL は主にペナンプラ領域の神経細胞に発現することを示している。虚血直後の sFasL の発現上昇は私達のオリジナルな発見である (Fukunaga et al, 論文準備中)。

共同研究者である韓博士は、彼らが開発した多発性脳塞栓モデルであるマイクロスフェア脳塞栓ラットを用いて、虚血後亜急性期での FasL の誘導を調べた (5)。マイクロスフェア注入後 2-7 日目にかけて、持続的な FasL の上昇が認められた。免疫組織化学的解析により、FasL の発現細胞を同定した。マイクロスフェア注入後 24 時間以降に発現が上昇するほとんどの細胞は ED1 陽性細胞であり、ミクログリアにおいて FasL が上昇することが示された。一方、少数の神経細胞とアストログリア細胞においても FasL の発現は上昇していた。次に、ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリンをマイクロスフェア注入後 1 日目から 6 日間投与して、FasL の発現を検討した。マイクロスフェア注入後 7 日目に見られる FasL の顕著な誘導はミノサイクリン投与により完全に抑制された。同時に、神経細胞死も有意に抑制された (Han et al, 論文投稿中)。このことは活性化ミクログリアにおける FasL の誘導は神経細胞のアポトーシスの引き金になることを示している。

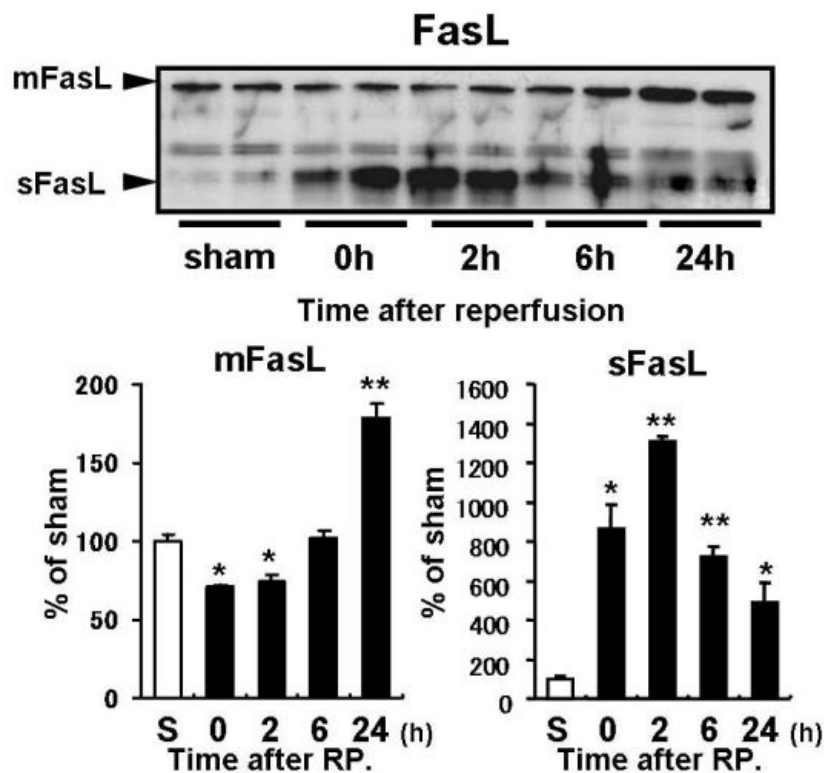


図 2. マウス中大脳動脈閉塞虚血後の大脳皮質における FasL の誘導の時間経過

考察：

本研究で私達 (東北大学) と韓博士 (浙江大学) は異なる中大脳閉塞マウスとマイクロスフェア脳塞栓ラット脳虚血モデルで検討した。急速に脳損傷が進展する中大脳動脈閉塞では再開通直後から FasL は ADAM10 により、mFasL から sFasL が神経細胞において産生され、活性型 sFasL が神経細胞死を誘導すること、また、24 時間後では mFasL が誘導されることが明らかとなった。一方、マイクロスフェア脳塞栓では 12 時間後から 7 日にか

けて mFasL の誘導が起こり、アポトーシスを誘導された。マイクロスフェア脳塞栓における mFasL の誘導細胞はミクログリアであり、ミクログリア抑制薬であるミノサイクリンがほぼ完全に mFasL 誘導を抑制することが解った。一方、Qin 博士らは、脳虚血においてアポトーシスとは異なるオートファジーによる細胞障害が細胞死を誘導することを見いだした (6)。今後はオートファジーによる細胞死に対する V0(OPT) とミノサイクリンの抑制効果について共同で解析する。

結語：

本研究では脳梗塞に伴う FasL の誘導を抑制する 2 つのシーズを開発した。V0(OPT) は Akt の活性化反応を介して FasL や Bim などのアポトーシス誘導因子の発現を抑制した(図 1)。テトラサイクリン系抗生物質であるミノサイクリンはミクログリアの活性化反応を抑制することで、FasL の発現を抑制する。これらの研究成果は私達のグループのオリジナルな発見であり、今後の脳梗塞急性期と亜急性期治療において新しい創薬開発に繋がる。今後はこれらのシーズ化合物の毒性と臨床応用について日本と中国で共同研究を進めて臨床開発の基盤を作る。

参考文献

1. F. Han, N. Shioda, S. Moriguchi, ZH. Qin and K. Fukunaga: The vanadium (IV) compound rescues septo-hippocampal cholinergic neurons from neurodegeneration in olfactory bulbectomized mice. *Neuroscience* 151: 671-679 (2008)
2. N. Shioda, F. Han, M. Morioka and K. Fukunaga: Bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV) enhances neurogenesis via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal regulated kinase activation in the hippocampal subgranular zone after mouse focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 155: 876-887 (2008)
3. N. Shioda, F. Han, S. Moriguchi, K. Fukunaga: Constitutively active calcineurin mediates delayed neuronal death through Fas-ligand expression via activation of NFAT and FKHR transcriptional activities in mouse brain ischemia. *J. Neurochem.* 102: 1506-1517 (2007)
4. N. Shioda, T. Ishigami, F. Han, S. Moriguchi, M. Shibuya, Y. Iwabuchi and K. Fukunaga: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway by a vanadyl compound mediates its neuroprotective effect in mouse brain ischemia. *Neuroscience* 148: 221-229 (2007)
5. F. Han, A. Ali Raie, N. Shioda, ZH. Qin and K. Fukunaga: Accumulation of beta-amyloid in the brain microvessels accompanies increased hyperphosphorylated tau proteins following microsphere embolism in aged rats. *Neuroscience* 153: 414-427 (2008)
6. HL. Zhang, ZL. Gu, SI. Savitz, F. Han, K. Fukunaga and ZH. Qin: Neuroprotective effects of prostaglandin A(1) in rat models of permanent focal cerebral ischemia are associated with nuclear factor-kappaB inhibition and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma up-regulation. *J. Neurosci. Res.* 86: 1132-1141 (2008)

作成日：2010 年 3 月 10 日