

2008/10/8A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

脳卒中後遺症治療を標的にする
遺伝子改変病態モデルの開発

平成20年度 研究報告書

主任研究者 植田 弘師
平成21年(2009年)4月

目次

I. 総括研究報告	
脳卒中後遺症治療を標的にする遺伝子改変病態モデルの開発-----	1
植田 弘師	
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野	
II. 分担研究報告	
1. 脳卒中後遺症治療を標的にする遺伝子改変病態モデルの開発	
-遺伝子改変病態モデルにおける組織化学的解析- -----	7
藤田 亮介	
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野	
2. 脳卒中後遺症治療を標的にする遺伝子改変病態モデルの開発	
-遺伝子改変病態モデルにおける行動学的解析- -----	10
井上 誠	
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	13

脳卒中後遺症治療を標的にする遺伝子改変病態モデルの開発

研究代表者：植田 弘師

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野・教授

研究要旨

プロサイモシン・アルファ(ProTα)は、脳卒中超急性期～急性期に神経を強力に保護する核蛋白質である。一方、内在性ProTαの欠損は神経脆弱性に繋がり、脳卒中後遺症として問題視される高次脳機能障害、錐体外路系障害、慢性痛に関連する可能性が挙げられる。本研究は、Cre-loxPシステムを利用して部位特異的ProTα欠損マウスを作製し、脳卒中後遺症モデルとしての正当性を評価することを目的とする。脳卒中後遺症モデルの確立は、脳卒中後遺症の治療研究において基礎的解析ツールを与えることで、その発展に貢献できると期待される。本年度の研究成果は、以下7点からなる。

1. 大脳皮質・海馬領域特異的ProTα欠損マウス (Emx1-Cre;ProTα^{lox/lox}) の作製に必要となるEmx1-Cre;ProTα^{lox/+}の出生を確認し、最終段階の交配により得られた仔の解析に着手した。
2. 線条体領域特異的ProTα欠損マウス (Gng7-Cre;ProTα^{lox/lox}) の作製に必要となるGng7-Cre;ProTα^{lox/+}の出生を確認し、最終段階の交配により得られた仔の解析に着手した。
3. 視床部位特異的ProTα欠損マウスの作製に必要となるCre遺伝子発現ウイルスベクターを準備した。
4. ProTα欠損ヘテロ型マウス (ProTα^{+/+})には、痛覚閾値の変化が認められないことを確認した。
5. ProTαの免疫組織学的染色法を確立し、脳内ProTαの発現分布を確認した。
6. 海馬依存性のLTP現象を評価する新たなシステムを確立した。
7. 非侵襲的画像解析法を行い、脳虚血により影響を受けやすい脳領域の解析に着手した。

分担研究者

藤田 亮介 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野・助教
井上 誠 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野・准教授

A. 研究目的

脳卒中は高い死亡率だけでなく、ほとんどの場合後遺症を被る事になる。この後遺症の中でも錐体外路系障害、不安・躁うつ障害、記憶・学習障害、慢性痛などが問題視されている。しかしながら、これら後遺症の責任脳領域の特定は、広範な傷害領域を形成する既存の脳卒中モデルでは困難であり、現状ではその病態解明には至っていない。最近、我々は

脳卒中超急性期～急性期（虚血開始7時間）に神経を強力に保護する核蛋白質プロサイモシン・アルファ(Prothymosin α: ProTα)を見だし、その内在性保護因子としての重要性を明らかにした。そこで本研究は、部位特異的 ProTα 欠損マウスにおける神経脆弱性を応用し、脳卒中後遺症の責任脳領域同定とその治療研究に必要となる脳卒中後遺症モデル動物の開発を行うことを目的とする。その方法として①部位特異的 ProTα 欠損動物の作製、②部位特異的 ProTα 欠損マウスにおける脳卒中後遺症解析、③部位特異的 ProTα 欠損マウスにおける幹細胞移植あるいは ProTα 遺伝子レスキューによる機能回復である。

B. 研究方法

1) 実験動物

実験には C57BL/6J 系雄性マウス 6 週齢 (21-24 g)、ProTα^{+/+} マウス (現有)、ProTα^{flox/flox} マウス (現有)、Emx1-Cre マウス (理化学研究所、糸原先生、共同研究)、Gng7-Cre マウス (東京大学、三品先生、共同研究)、MP-WGA-EGFP マウス (現有)、MP-floxed-BDNF マウス (現有)、MP-floxed-HB-EGF マウス (現有)、MP-NOP マウス (現有)、あるいは、これらのマウスの交配により得られたマウスを使用した。マウスは、恒温 (22±2 °C)、恒湿 (55±5 %) の部屋で、12 時間ずつの昼夜自然管理下で飼育し、水道水及び一般実験用の固形飼料 (MF, オリエンタル酵母, Tokyo) を自由に摂取させた。

2) 実験動物のジェノタイプング

マウスの耳片よりゲノム DNA を回収し、MangoMix 2x マスターミックス (BIOLINE, UK)、あるいは qPCR マスターミックスプラス SYBR グリーン I (Eurogentec, USA) を用い規定のプロトコルに従って、遺伝子型を同定した。プライマーは以下のものを用いた。

ProTα^{+/+} マウス

(5'-TCCTTGGCTTTTACTGCCAGAAG-3',
5'-AGGCGCTTTCCGATCCCCATCCAG-3',
5'-AGAACCCTTACCATTTGCCAG-3')

ProTα^{flox/flox} マウス

(5'-TCCTTGGCTTTTACTGCCAGAAG-3',
5'-TCACCTGGAGAATCAATCAAGGC-3'),
Emx1-Cre マウス

(5'-TGCAACGAGTGATGAGGTTTCGCAGA-3',
5'-TCCGTTATTCAACTTGCACCATGC-3')

Gng7-Cre マウス

(5'-GGCGACGTTGTTAGTACCTGAC-3',
5'-ATCCCTGAACATGTCCATCAGGTTTC-3',
5'-TATAGGTACCCAGAAGTGAATTCGGTT
CGC-3')

3) 知覚受容解析 (熱性疼痛試験)

実験の前に、マウスをガラス板の上に置き、上からケージをかぶせ、30 分以上実験と同じ環境下に置いて適応させた。マウスの右後肢足底部に熱刺激を与え、刺激からの逃避反応潜時 (Paw Withdrawal Latency; PWL) を

測定した。測定には Model 33 Tail flick analgesia meter (IITC Inc.) を使用した。実験には、正常な動物で 10-12 秒の潜時になる程度の刺激を行い、組織損傷を防ぐために Cut-off time を 20 秒に設定した。

4) 知覚受容解析 (機械性疼痛試験)

実験の前に、実験の環境に慣れさせ侵害刺激に対する正確な行動を評価するため、マウスを網の上に置き、上からケージをかぶせ、30 分以上実験と同じ環境下に置いて適応させた。測定には Transducer Indicator Model 1601 (ISIS) を用い、網の上に置いたマウスの右後肢足底部にフィラメントを押しあて、機械刺激からの逃避反応を起こす閾値 (Paw Withdrawal Threshold; PWT) を測定した。実験には、正常な動物で 10-12 g の閾値になる程度の刺激を行い、組織損傷を防ぐために Cut-off gram を 20 g に設定した。

5) 免疫組織化学染色

ペントバルビタール麻酔下で開腹開胸後、心臓の右心耳に切れ目をいれ左心室から PBS を灌流、脱血させた後、4% パラホルムアルデヒド/0.1 M PB で灌流固定した。脳および脊髄を摘出し、25% sucrose/PBS に浸漬して 4°C で一晩放置した。O.C.T. Compound (Sakura) で包埋し、EtOH/ドライアイスにより、組織を急速凍結させた。クリオスタットを用いて厚さ 30 μm の脳脊髄切片を作製した。組織切片を PBS で洗浄後、ブロッキング反応として 2% BSA/PBST (0.1% Triton X-100 in K⁺-free PBS) 溶液で室温にて 1 時間反応させた。次に 1% BSA/PBST 溶液にて 1:200 に希釈した一次抗体 anti-ProTα antibody (ALEXIS) を 4°C 16 ~ 20 時間、さらに、二次抗体 Alexa488-conjugated anti-mouse IgG (1:500; Molecular Probe) を、室温にて 2 時間反応させた。蛍光封入剤 (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA) で封入後、蛍光顕微鏡 (Keyence, Tokyo, Japan) で観察した。

7) Cre 遺伝子導入レンチウイルスベクターの作製

DsRed2 遺伝子 (Clontech) および NLS-Cre

遺伝子 (理化学研究所) を PCR 法により増幅後、pENTRTM/D-TOPO (Invitrogen, CA) に挿入した。このベクターを用い、ViraPowerTM Promoterless Lentiviral Gateway Kit (Invitrogen, CA) に従い、pLenti6/Ubc/DeRed2-NLS-Cre ベクターを作製した。ウイルス産生の際は、293FT 細胞 (Invitrogen, CA) に、pLenti6/Ubc/DsRed2-NLS-Cre、pLP1、pLP2、pLP/VSVG をリポフェクタミン法により遺伝子導入した。導入3日後に細胞上清を回収し、超遠心法によりウイルス濃縮を行った。

8) Cre 遺伝子導入アデノウイルスベクターの作製

AxCANCre (ウイルス感染細胞ライセート) (理化学研究所) を 293 細胞に感染させ、約 2~3 日後の死滅細胞を回収し、凍結融解によってウイルスを遊離させた。その後、遠心によりウイルス液上清を回収し、さらに限外ろ過法によるウイルス濃縮および、塩化セシウム密度勾配遠心によるウイルス濃縮を行った。

9) 脳内マイクロインジェクション法

ペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下、マウスを脳固定器に設置した後、頭頂部の皮膚を切開し、頭蓋骨を露出させた。オペ用ドリルを用いて直径 1 μ m 程度のわずかな穴を開け、そこにマイクロインジェクター (投与針 30G) を挿入し、右側視床 (視床外側腹側核) 部位に固定した (Bregma より -0.94 mm 前方、右側 1.0 mm、深さ 3.0 mm)。ウイルス液はシリンジポンプを用いて流速 0.5 μ L/min で投与し、逆流を防ぐために、さらに 10 分間静置した後インジェクターをゆっくりと戻し、最後に切開部位を縫合した。対照群として、等量の人工脳脊髄液 (ACSF) を同様に右側視床内投与した。

10) MED 解析装置を用いた海馬切片における LTP 現象解析

長期増強 (long-term potentiation; LTP) 現象の評価には、64ch 細胞外電位記録システム装置 (MED64 システム、アルファメッド) を用いた。マウス脳海馬急性スライス標本 (300 μ m) を作製し、海馬スライス標本の Schaffer

側枝への電気刺激により、CA1 領域での電氣的神経応答を評価した。

11) 非侵襲的画像解析法

Positron Emission Tomography (PET) による非侵襲的画像解析法には、マウスでは解像度の高い画像が得られないことを考慮して、ラットを用いた。虚血ストレスにより影響を受けやすい脳領域の評価には、脳虚血によるグルコース取り込み能の低下を指標とした。本実験は、神戸・理化学研究所・分子イメージングセンターとの共同研究である。

(倫理面への配慮)

本実験は長崎大学動物実験委員会の承認 (承認番号 0706130596) および、長崎大学組換え DNA 実験委員会の承認 (承認番号 0705070877) を受け、実施している。

C. 研究結果

1) 大脳皮質・海馬領域特異的 ProTa 欠損ヘテロ型マウス (Emx1-Cre;ProTa^{lox/+}) の作製

Emx1-Cre トランスジェニックマウスと Floxed ProTa ノックインマウス (ProTa^{lox/lox}) の交配を行い、Emx1-Cre;ProTa^{lox/+} の出生が確認できた。さらに、最終交配段階である Emx1-Cre;ProTa^{lox/+} 同士の交配に移行し、得られた仔の解析に着手した。解析には、PCR 法によるジェノタイプ解析、および免疫組織化学染色法を用いた部位特異的 ProTa 欠損の確認を使用している。この最終交配段階では、期待される目的マウスの出生はわずか 3/16 の確率であることを考慮して、引き続き、マウスの増産と維持を行っていく。

2) 線条体領域特異的 ProTa 欠損ヘテロ型マウス (Gng7-Cre;ProTa^{lox/+}) の作製

Gng7-Cre ノックインマウスと ProTa^{lox/lox} の交配を行い、Gng7-Cre;ProTa^{lox/+} の出生が確認できた。さらに、最終交配段階である Gng7-Cre;ProTa^{lox/+} 同士の交配に移行し、得られた仔の解析に着手した。解析には、PCR

法によるジェノタイピング解析、および免疫組織化学染色法を用いた部位特異的 Pro α 欠損の確認を使用している。この最終交配段階では、期待される目的マウスの出生はわずか1/8の確率であることを考慮して、引き続き、マウスの増産と維持を行っていく。

3) 視床領域特異的 Pro α 欠損マウス作製に必要となる Cre 遺伝子発現ウイルスベクターの開発

視床領域特異的 Pro α 欠損マウスの作製に必要となる Cre 遺伝子発現アデノウイルスベクター (ウイルス力価 $>10^{11}$ PFU/mL) の開発に成功した。これは、高タイターかつ広領域における遺伝子導入を利点とする。さらに、より長期的遺伝子導入を可能とする Cre 遺伝子発現レンチウイルスベクタープラスミドの組換えを終了し、ウイルス産生株である 293FT 細胞を用いて、レンチウイルスを作製した。さらに、これらの Cre 遺伝子発現ウイルスベクターの機能性を確認するために、MP-WGA-EGFP マウス (現有) を用いて、脳内マイクロインジェクション法による解析を進めている。さらに、脳虚血における Pro α の神経保護作用に関連することの示唆される BDNF および HB-EGF について予備的検討を行うために、MP-floxed-BDNF マウス (現有)、MP-floxed-HB-EGF マウス (現有) への Cre 遺伝子発現アデノウイルスベクターのマイクロインジェクションを行い、機能性を解析中である。

4) 中枢神経系における内在性 Pro α の発現分布と、部位特異的 Pro α の確認

抗 Pro α 特異的マウスモノクローナル抗体を用いて、野生型 C57BL/6J マウスの脳および脊髄神経における Pro α 蛋白質の発現解析を行った。その結果、大脳皮質、海馬、視床領域を含む全ての領域において、ユビキタスな Pro α 蛋白質の発現を確認した。さらに、ヘキスト色素を用いてカウンターステインを行い、Pro α 発現と比較しながら再評価を行ったところ、全細胞において Pro α 蛋白質の発現を認めることができた。

5) 脳スライス標本を用いた LTP 現象評価法の確立

新たな学習機能評価法として、64ch 細胞外電位記録システム装置 (MED64 システム、アルファメッド) を用い、マウス脳海馬急性スライス標本 (300 μ m) における電氣的神経活動を評価する系を確立した。野生型 C57BL/6J マウスより作製した海馬スライス標本における Schaffer 側枝への電氣刺激により、CA1 領域での電氣的神経応答が観察された。更に反復電氣刺激 (Theata burst 刺激) により、刺激後少なくとも 60 分間における応答増強効果が観察され、長期増強 (long-term potentiation; LTP) 現象を確認した。さらに、学習機能の増加することの知られる MP-NOP マウスを用いて予備的検討を行い、LTP 現象が増加することを確認することができた。以上のことから、今後、Pro $\alpha^{+/+}$ マウス、および部位特異的 Pro α 欠損マウスの学習機能解析の準備が整ったと言える。

6) Pro $\alpha^{+/+}$ マウスにおける知覚受容閾値の評価

部位特異的 Pro α 欠損マウスの作製に先だって、Pro $\alpha^{+/+}$ マウスにおける知覚受容閾値を解析した。熱性疼痛試験の結果、野生型 C57BL/6J マウス (対照群) と Pro $\alpha^{+/+}$ マウスに有意な差は認められなかった。同様に、機械性疼痛試験においても、両群に有意な差は認められなかった。

7) 非侵襲的画像解析法による脳虚血により影響を受けやすい脳領域の解析
Positron Emission Tomography (PET) による非侵襲的画像解析法を行い、ラット脳虚血によるグルコース取り込み能の低下を指標に、虚血ストレスにより影響を受けやすい脳領域を解析中である。本実験は、神戸・理化学研究所・分子イメージングセンターとの共同研究である。

8) 機能回復評価に必要となる Pro α 遺伝子発現ウイルスベクターの設計

Pro α 遺伝子レスキューによる機能回復効果を検証するために必要となる Pro α 遺伝子発現ウイルスベクターの設計に着手した。必要となる Pro α 遺伝子は既にクローニング済みであり、ベクター開発の準備が

整ったと言える。

D. 考察

大脳皮質・海馬領域特異的 ProTα欠損ヘテロ型マウス (Emx1-Cre;ProTα^{lox/+})、および、線条体領域特異的 ProTα欠損ヘテロ型マウス (Gng7-Cre;ProTα^{lox/+})の出生が確認され、その表現系に目立った異常は認められなかった。このことは、現有する ProTα^{+/+}マウスに発育異常は認められないことに裏付けられる知見である。一方、ProTα^{+/+}マウスは現在までに得られておらず、おそらく胎生致死であると考えられる。ProTαは、転写促進や細胞増殖に働くこと、および脳神経のみならず肝臓・肺など各種臓器に発現することが報告されていることから、発生初期段階において重要な役割を担っていると推測される。このことから、本研究の目的である Cre/loxP システムを用いた ProTαコンディショナルノックアウトマウスの確立は有意義であり、重要視されると考えられる。

さらに、本年度は、コンディショナルノックアウトマウスの機能学的解析に有用となる LTP 機能解析法を新たに確立することができた。LTP 現象は、学習・記憶の形成に関わる基本要素であることから、ステップスルーなどの行動学的解析と併用することで、詳細な評価が可能となる。一方、痛覚閾値については、ProTα^{+/+}マウスにおいて有意な変化は認められなかった。この点からも、部位特異的 ProTα欠損マウスの解析はより必要性があると考えられる。行動解析については、その他、学習・記憶や運動機能などの神経機能を含めて評価していく予定である。

もっとも興味あるのは、部位特異的 ProTα欠損マウスにおいて、神経脆弱性が観察されるかという点であり、来年度を中心に詳細に解析を行っていく予定である。特に、ProTαはストレス時に遊離される蛋白質であることから、ストレス負荷時における神経機能への変化が予想される。こうした変化を捉え、新たな疾患モデル動物としての可能性を評価していくことが、今後の課題である。

E. 結論

本年度の研究成果より、大脳皮質・海馬領域特異的 ProTα欠損ヘテロ型マウス (Emx1-Cre;ProTα^{lox/+})、および、線条体領域特異的 ProTα欠損ヘテロ型マウス (Gng7-Cre;ProTα^{lox/+})を得ることができた。また、視床領域特異的 ProTα欠損マウスの作製に必要となる Cre 遺伝子発現ウイルスベクターを準備した。さらに、内在性の ProTα蛋白質について、脳内におけるユビキタな発現分布を見出すことができた。今後は、これらの部位特異的遺伝子欠損マウスをツールとして、ProTαの生理作用や、虚血ストレスによる機能障害と各種脳領域の関連性を明らかにする予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujita R, Ueda M, Fujiwara K, **Ueda H**. Prothymosin-alpha plays a defensive role in retinal ischemia through necrosis and apoptosis inhibition. *Cell Death Differ* 2009, 16(2):349-358

2. 学会発表

1. **植田弘師**、Prothymosin αによるアポトーシス誘導を介した神経ネクロシス抑制、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
2. 藤村一輝、畠山有理、藤田亮介、**植田弘師**、神経細胞における Prothymosin αによる PKCβを介した GLUT4 膜移行促進機構の解明、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
3. 植村朋香、藤田亮介、**植田弘師**、Prothymosin αによる PKCβを介した初代培養ミクログリアの活性化、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本

- 生化学会大会 合同大会 (BMB2008)
12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
4. 山崎達朗、藤田亮介、植田弘師、新規脳保護分子 Prothymosin α によるラット一過性脳卒中傷害の改善、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
 5. 米窪沙織、藤田亮介、植田弘師、Prothymosin α による虚血依存的なミクログリア活性化、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
 6. 神崎めぐみ、高濱和弘、藤田亮介、植田弘師、脳卒中治療薬としての Prothymosin α の可能性、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
 7. 藤田亮介、水間広、和田康弘、渡辺恭良、植田弘師、PET 解析を用いた Prothymosin- α による PKC β 活性化を介したグルコース取込み促進、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

脳卒中後遺症治療を標的にする遺伝子改変病態モデルの開発 -遺伝子改変病態モデルにおける組織化学的解析-

研究分担者：藤田 亮介

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野・助教

研究要旨

プロサイモシン・アルファ(ProTα)は、脳卒中超急性期～急性期に神経を強力に保護する核蛋白質である。一方、内在性ProTαの欠損は神経脆弱性に繋がり、脳卒中後遺症として問題視される高次脳機能障害、錐体外路系障害、慢性痛に関連する可能性が挙げられる。本研究は、野生型マウス、および、Cre-loxPシステムを利用して得られる部位特異的ProTα欠損マウスについて、ProTαの組織学的発現分布を比較解析することにより、ProTα欠損の特異性を評価することを目的とする。さらに、非侵襲的画像解析法を行い、脳虚血により影響を受けやすい脳領域を同定し、高次脳機能障害、錐体外路系障害、慢性痛の発生との関連性を評価する。本年度の研究成果は、以下の2点からなる。

1. 中枢神経における内在性ProTαのユビキタスな発現分布を確認した。
2. 非侵襲的画像解析法を行い、脳虚血により影響を受けやすい脳領域の解析に着手した。

A. 研究目的

脳卒中は高い死亡率だけでなく、ほとんどの場合後遺症を被る事になる。この後遺症の中でも錐体外路系障害、不安・躁うつ障害、記憶・学習障害、慢性痛などが問題視されている。しかしながら、これら後遺症の責任脳領域の特定は、広範な傷害領域を形成する既存の脳卒中モデルでは困難であり、現状ではその病態解明には至っていない。最近、我々は脳卒中超急性期～急性期（虚血開始7時間）に神経を強力に保護する核蛋白質プロサイモシン・アルファ(ProTα)を見だし、その内在性保護因子としての重要性を明らかにした。そこで本研究は、部位特異的 ProTα 欠損マウスによる神経脆弱性を応用し、脳卒中後遺症の責任脳領域同定とその治療に関わる基礎実験に必要な脳卒中後遺症モデル動物の開発を行うことを目的とする。その方法として①部位特異的 ProTα 欠損動物の作製、②部位特異的 ProTα 欠損マウスにおける脳卒中後遺症解析、③部位特異的 ProTα 欠損マウスにおける幹細胞移植あるいは ProTα 遺伝子レスキューによる機能回復である。この中で、

本分担研究は、野生型マウスおよび部位特異的 ProTα欠損マウスについて、ProTαの組織学的発現分布を比較解析することにより、ProTα欠損の特異性を評価することを目的とする。さらに、非侵襲的画像解析法を行い、脳虚血により影響を受けやすい脳領域を同定し、高次脳機能障害、錐体外路系障害、慢性痛の発生との関連性を評価することを目指す。

B. 研究方法

1) 実験動物

実験には C57BL/6J 系雄性マウス 6 週齢（21-24 g）を使用し、恒温（22±2 °C）、恒湿（55±5 %）の部屋で、12 時間ずつの昼夜自然管理下で飼育し、水道水及び一般実験用の固形飼料(MF, オリエンタル酵母, Tokyo)を自由に摂取させた。

2) 免疫組織化学染色

ペントバルビタール麻酔下で開腹開胸後、心臓の右心耳に切れ目をいれ左心室から PBS を灌流、脱血させた後、4% パラホルム

アルデヒド/0.1 M PB で灌流固定した。脳および脊髄を摘出し、25% sucrose/PBS に浸漬して 4°C で一晩放置した。O.C.T. Compound (Sakura) で包埋し、EtOH/ドライアイスにより、組織を急速凍結させた。クリオスタットを用いて厚さ 30 μ m の脳脊髄切片を作製した。組織切片を PBS で洗浄後、ブロッキング反応として 2% BSA/PBST (0.1% Triton X-100 in K⁺-free PBS) 溶液で室温にて 1 時間反応させた。次に 1% BSA/PBST 溶液にて 1:200 に希釈した一次抗体 anti-ProT α antibody (ALEXIS) を 4°C 16 ~ 20 時間、さらに、二次抗体 Alexa488-conjugated anti-mouse IgG (1:500; Molecular Probe) を、室温にて 2 時間反応させた。蛍光封入剤 (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA) で封入後、蛍光顕微鏡 (Keyence, Tokyo, Japan) で観察した。

3) 非侵襲的画像解析法

Positron Emission Tomography (PET) による非侵襲的画像解析法には、マウスでは解像度の高い画像が得られないことを考慮して、ラットを用いた。虚血ストレスにより影響を受けやすい脳領域の評価には、脳虚血によるグルコース取り込み能の低下を指標とした。本実験は、神戸・理化学研究所・分子イメージングセンターとの共同研究である。

(倫理面への配慮)

本実験は長崎大学動物実験委員会の承認 (承認番号 0706130596) および、長崎大学組換え DNA 実験委員会の承認 (承認番号 0705070877) を受け、実施している。

C. 研究結果

1) 中枢における内在性 ProT α の発現分布と、部位特異的 ProT α の確認

抗 ProT α 特異的マウスモノクローナル抗体を用いて、野生型 C57BL/6J マウスの脳および脊髄神経における ProT α 蛋白質の発現解析を行った。その結果、大脳皮質、海馬、視床領域を含む全ての領域において、ユビキタスな ProT α 蛋白質の発現を確認した。

さらに、ヘキスト色素を用いてカウンターステインを行い、ProT α 発現と比較しながら再評価を行ったところ、全細胞において ProT α 蛋白質の発現を認めることができた。

2) 非侵襲的画像解析法による脳虚血により影響を受けやすい脳領域の解析
Positron Emission Tomography (PET) による非侵襲的画像解析法を行い、ラット脳虚血によるグルコース取り込み能の低下を指標に、虚血ストレスにより影響を受けやすい脳領域を解析中である。本実験は、神戸・理化学研究所・分子イメージングセンターとの共同研究である。

D. 考察

ProT α は、大脳皮質、海馬、線条体、視床を含むすべての脳領域に発現することが確認された。さらに、ヘキスト色素によるカウンターステインと比較解析することで、脳内の全細胞において ProT α がユビキタスに発現分布することが明らかになった。この結果は、これまでに報告のない新たな知見であることから、今後、アストロサイトマーカーである GFAP やミクログリアマーカーである Iba-1 との二重染色法を用いて、より詳細な発現解析を行う必要がある。また、この ProT α 免疫組織学的染色法は、部位特異的 ProT α 欠損マウスの選択性の解析法に有用であることから、次年度に向けた準備が整ったと言える。

さらに、非侵襲的画像解析法を行い、虚血ストレスにより影響を受けやすい脳領域を解析に着手した。領域特異性については、部位特異的 ProT α 欠損マウスを利用しながら、比較解析研究を行う予定である。

E. 結論

本年度の研究成果より、野生型マウスにおいて ProT α は、大脳皮質、海馬、線条体、視床を含むすべての脳領域に発現することが確認された。また、脳内の全細胞において ProT α がユビキタスに発現分布することが明らかになった。さらに、非侵襲的画像

解析法を行い、虚血ストレスにより影響を受けやすい脳領域を解析に着手し、次年度の研究に向けた準備を整えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Fujita R.**, Ueda M, Fujiwara K, Ueda H. Prothymosin-alpha plays a defensive role in retinal ischemia through necrosis and apoptosis inhibition. *Cell Death Differ* 2009, 16(2):349-358

2. 学会発表

1. 藤村一輝、畠山有理、**藤田亮介**、植田弘師、神経細胞における Prothymosin α による PKC β を介した GLUT4 膜移行促進機構の解明、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
2. 植村朋香、**藤田亮介**、植田弘師、Prothymosin α による PKC β を介した初代培養ミクログリアの活性化、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
3. 山崎達朗、**藤田亮介**、植田弘師、新規脳保護分子 Prothymosin α によるラット一過性脳卒中傷害の改善、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
4. 米窪沙織、**藤田亮介**、植田弘師、Prothymosin α による虚血依存的なミクログリア活性化、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
5. 神崎めぐみ、高濱和弘、**藤田亮介**、

植田弘師、脳卒中治療薬としての Prothymosin α の可能性、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド

6. **藤田亮介**、水間広、和田康弘、渡辺恭良、植田弘師、PET 解析を用いた Prothymosin- α による PKC β 活性化を介したグルコース取込み促進、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

脳卒中後遺症治療を標的にする遺伝子改変病態モデルの開発 -遺伝子改変病態モデルにおける行動学的解析-

研究分担者：井上 誠

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野・准教授

研究要旨

プロサイモシン・アルファ(ProTα)は、脳卒中超急性期～急性期に神経を強力に保護する核蛋白質である。一方、内在性ProTαの欠損は神経脆弱性に繋がり、脳卒中後遺症として問題視される高次脳機能障害、錐体外路系障害、慢性痛に関連する可能性が挙げられる。本研究は、Cre-loxPシステムを利用して部位特異的ProTα欠損マウスを作製し、脳卒中後遺症モデルとしての正当性を行動学的に評価することを目的とする。脳卒中後遺症モデルの確立は、脳卒中後遺症の治療研究において基礎的解析ツールを与えることで、その発展に貢献できると期待される。本年度の研究成果は、以下の2点からなる。

1. ProTα欠損ヘテロ型マウス(ProTα^{+/-})には、痛覚閾値の変化が認められないことを確認した。
2. 海馬依存性のLTP現象を評価する新たなシステムを確立した。

A. 研究目的

脳卒中は高い死亡率だけでなく、ほとんどの場合後遺症を被る事になる。この後遺症の中でも錐体外路系障害、不安・躁うつ障害、記憶・学習障害、慢性痛などが問題視されている。しかしながら、これら後遺症の責任脳領域の特定は、広範な傷害領域を形成する既存の脳卒中モデルでは困難であり、現状ではその病態解明には至っていない。最近、我々は脳卒中超急性期～急性期（虚血開始7時間）に神経を強力に保護する核蛋白質プロサイモシン・アルファ(ProTα)を見だし、その内在性保護因子としての重要性を明らかにした。そこで本研究では、部位特異的 ProTα 欠損マウスによる神経脆弱性を応用し、脳卒中後遺症の責任脳領域同定とその治療に関わる基礎実験に必要な脳卒中後遺症モデル動物の開発を行う。その方法として①部位特異的 ProTα 欠損動物の作成、②部位特異的 ProTα 欠損マウスにおける脳卒中後遺症解析、③部位特異的 ProTα 欠損マウスにおける幹細胞移植あるいは ProTα 遺伝子レスキューによる

機能回復である。本分担研究は特に、部位特異的 ProTα 欠損動物の行動学的解析を中心に、脳卒中後遺症モデルとしての正当性を評価することを目的とする。

B. 研究方法

1) 実験動物

実験には C57BL/6J 系雄性マウス 6 週齢 (21-24 g)、ProTα^{+/-}マウス(現有)、MP-NOP マウス(現有)を使用した。マウスは、恒温 (22±2 °C)、恒湿 (55±5 %) の部屋で、12 時間ずつの昼夜自然管理下で飼育し、水道水及び一般実験用の固形飼料(MF, オリエンタル酵母, Tokyo)を自由に摂取させた。

2) 実験動物のジェノタイプング

マウスの耳片よりゲノム DNA を回収し、MangoMix 2x マスターミックス(BIOLINE, UK)、あるいは qPCR マスターミックスプラス SYBR グリーン I (Eurogentec, USA)を用い規定のプロトコルに従って、遺伝子型を同定した。プライマーは以下のものを用いた。

Pro $\alpha^{+/+}$ マウス

(5'-TCCTTGGCTTTTACTGCCAGAAG-3',
5'-AGGCGCTTCCGATCCCCATCCAG-3',
5'-AGAACCCTTACCATTGGCCAG-3')

3) 知覚受容解析 (熱性疼痛試験)

実験の前に、マウスをガラス板の上に置き、上からケージをかぶせ、30分以上実験と同じ環境下に置いて適応化させた。マウスの右後肢足底部に熱刺激を与え、刺激からの逃避反応潜時 (Paw Withdrawal Latency; PWL) を測定した。測定には Model 33 Tail flick analgesia meter (IITC Inc.) を使用した。実験には、正常な動物で 10-12 秒の潜時になる程度の刺激を行い、組織損傷を防ぐために Cut-off time を 20 秒に設定した。

4) 知覚受容解析 (機械性疼痛試験)

実験の前に、実験の環境に慣れさせ侵害刺激に対する正確な行動を評価するため、マウスを網の上に置き、上からケージをかぶせ、30分以上実験と同じ環境下に置いて適応化させた。測定には Transducer Indicator Model 1601 (ISIS) を用い、網の上に置いたマウスの右後肢足底部にフィラメントを押しあて、機械刺激からの逃避反応を起こす閾値 (Paw Withdrawal Threshold; PWT) を測定した。実験には、正常な動物で 10-12 g の閾値になる程度の刺激を行い、組織損傷を防ぐために Cut-off gram を 20 g に設定した。

5) MED 解析装置を用いた海馬切片における LTP 現象解析

長期増強(long-term potentiation;LTP)現象の評価には、64ch 細胞外電位記録システム装置(MED64 システム、アルファメッド)を用いた。マウス脳海馬急性スライス標本(300 μm)を作製し、海馬スライス標本の Schaffer 側枝への電気刺激により、CA1 領域での電気的神経応答を評価した。

(倫理面への配慮)

本実験は長崎大学動物実験委員会の承認 (承認番号 0706130596) および、長崎大学組換え DNA 実験委員会の承認 (承認番号 0705070877) を受け、実施している。

C. 研究結果

1) 脳スライス標本を用いた LTP 現象評価法の確立

新たな学習機能評価法として、64ch 細胞外電位記録システム装置(MED64 システム、アルファメッド)を用い、マウス脳海馬急性スライス標本(300 μm)における電気的神経活動を評価する系を確立した。野生型 C57BL/6J マウスより作製した海馬スライス標本における Schaffer 側枝への電気刺激により、CA1 領域での電気的神経応答が観察された。更に反復電気刺激(Theata burst 刺激)により、刺激後少なくとも 60 分間における応答増強効果が観察され、長期増強(long-term potentiation;LTP)現象を確認した。さらに、学習機能の増加することの知られる MP-NOP マウスを用いて予備的検討を行い、LTP 現象の増加を確認することができた。以上のことから、今後、Pro $\alpha^{+/+}$ マウス、および部位特異的 Pro α 欠損マウスの学習機能解析の準備が整ったと言える。

2) Pro $\alpha^{+/+}$ マウスにおける知覚受容閾値の評価

部位特異的 Pro α 欠損マウスの作製に先だって、Pro $\alpha^{+/+}$ マウスにおける知覚受容閾値を解析した。熱性疼痛試験の結果、野生型 C57BL/6J マウス (対照群) と Pro $\alpha^{+/+}$ マウスに有意な差は認められなかった。同様に、機械性疼痛試験においても、両群に有意な差は認められなかった。

D. 考察

本年度は、コンディショナルノックアウトマウスの機能学的解析に有用となる LTP 機能解析法を新たに確立することができた。LTP 現象は、学習・記憶の形成に関わる基本要素であることから、ステップスルーなどの行動学的解析と併用することで、詳細な評価が可能となる。

一方、痛覚閾値については、Pro $\alpha^{+/+}$ マウスにおいて有意な変化は認められなかった。この点からも、部位特異的 Pro α 欠損

マウスの解析はより必要性があると考えられる。行動解析については、その他、学習・記憶や運動機能などの神経機能を含めて評価していく予定である。

もっとも興味あるのは、部位特異的 Pro α 欠損マウスにおいて、神経脆弱性が観察されるかという点であり、次年度を中心に詳細に解析を行っていく予定である。特に、Pro α はストレス時に遊離される蛋白質であることから、ストレス負荷時における神経機能への変化が予想される。こうした変化を捉え、新たな疾患モデル動物としての可能性を評価していくことが、今後の課題である。

E. 結論

本年度の研究成果より、海馬依存性の LTP 機能解析法を新たに確立することができた。また、Pro α ^{+/+}マウスでは、疼痛閾値について変化が認められないことが明らかになった。次年度は、部位特異的 Pro α 欠損マウスを用いて、学習・記憶や運動機能などの神経機能についても評価していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

1. Fujita R, Ueda M, Fujiwara K, Ueda H. Prothymosin-alpha plays a defensive role in retinal ischemia through necrosis and apoptosis inhibition. *Cell Death Differ* 2009, 16(2):349-358

Prothymosin- α plays a defensive role in retinal ischemia through necrosis and apoptosis inhibition

R Fujita¹, M Ueda¹, K Fujiwara² and H Ueda^{1*}

Prothymosin- α (ProTx α) causes a switch in cell death mode from necrosis to neurotrophin-reversible apoptosis in primary cultured cortical neurons. In the present study, post-ischemic administration (3 or 24 h, intravenously) of recombinant mouse ProTx α without neurotrophins completely prevented ischemia-induced retinal damage accompanying necrosis and apoptosis, as well as dysfunction assessed by electroretinogram. Treatments with anti-erythropoietin (EPO) or brain-derived neurotrophic factor (BDNF) immunoglobulin G (IgG) reversed ProTx α -induced inhibition of apoptosis. ProTx α upregulated retinal EPO and BDNF levels in the presence of ischemia. Moreover, intravitreal administration of anti-ProTx α IgG or an antisense oligodeoxynucleotide for ProTx α accelerated ischemia-induced retinal damage. We also observed that ischemia treatment caused a depletion of ProTx α from retinal cells. Altogether, these results suggest that the systemic administration of ProTx α switches ischemia-induced necrosis to apoptosis, which in turn is inhibited by neurotrophic factors upregulated by ProTx α and ischemia. ProTx α released upon ischemic stress was found to have a defensive role in retinal ischemia.

Cell Death and Differentiation (2009) 16, 349–358; doi:10.1038/cdd.2008.159; published online 7 November 2008

Ischemic stress in the central nervous system causes both necrosis, which occurs first in the ischemic core, and apoptosis, which occurs following necrosis in the region surrounding the core, called the penumbra.^{1–3} Necrosis, which accompanies cell membrane destruction, is followed by the release of intracellular cytotoxic substances that cause cell death expansion, whereas apoptosis occurs after some delay, but may also have a potential role in restricting the spread of irretrievable damage in the penumbra, as microglia phagocytize apoptotic neurons without releasing cytotoxic substances. Although several compounds that inhibit apoptosis have been reported to be protective against ischemic damage *in vivo*, their potencies are limited,^{4–7} possibly because the necrotic region becomes enlarged at a relatively early stage. Thus, necrosis could be a most important target for treating ischemic damage.

We previously demonstrated that a switch in cell death mode occurs when cortical neurons are cultured under serum-free conditions without any supplements. Specifically, cortical neurons die by necrosis when cultured at low densities, but die by apoptosis after some delay when cultured at high densities.^{8,9} Recently, we identified a molecule, prothymosin- α (ProTx α), which is responsible for the density-dependent cell death mode switch, by analyzing factors in conditioned media derived from high-density cultures.¹⁰ Detailed analysis revealed that ProTx α inhibits necrosis by reversing the

decreased externalization of the glucose transporters GLUT1 and GLUT4, through the activation of protein kinase C β_2 (PKC β_2), while causing apoptosis by upregulating the proapoptotic proteins Bax and Bim through activation of PKC β_1 and β_2 . More recently, we demonstrated that ProTx α strongly prevents ischemia-induced damage after rat middle cerebral artery occlusion.¹¹ In that study, ProTx α inhibited both necrotic and apoptotic cell death *in vivo*, in contrast with the fact that this protein caused apoptosis in a culture study.¹⁰ However, the machineries underlying this difference remain to be determined.

The retina is a part of the central nervous system that is easily accessible for quantitative analysis of pathophysiological processes and experimental manipulation.¹² Transient ischemia-induced damage of the retina, as well as of the brain, results in a prolonged period of neuronal cell death. The mechanisms of ischemia-induced neuronal cell death include an early phase of excitotoxicity through glutamate, leading to necrosis, and a prolonged phase of apoptosis.^{13,14} This model seems to be ideal for characterizing the *in vivo* effects and roles of ProTx α in terms of gain-of-function and loss-of-function, as it causes both necrosis and apoptosis, and drug manipulation is very easy. The present study shows that ProTx α causes a switch in cell death mode in an *in vivo* retinal ischemia model, and that it inhibits cell death expansion.

¹Division of Molecular Pharmacology and Neuroscience, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan and ²Department of Applied Life Science, Faculty of Biotechnology and Life Science, Sojo University, Kumamoto, Japan

*Corresponding author: H Ueda, Division of Molecular Pharmacology and Neuroscience, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan. Tel: +81 95 819 2421; Fax: +81 95 819 2420; E-mail: ueda@nagasaki-u.ac.jp

Keywords: ischemia; necrosis; apoptosis; prothymosin- α ; BDNF and retina

Abbreviations: AS-ODN, antisense oligodeoxynucleotide; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; EPI, epithelial cell layer; EPO, erythropoietin; ERG, electroretinogram; GCL, ganglion cell layer; IgG, immunoglobulin G; i.v., intravenous administration; i.v., intravitreal administration; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; MS-ODN, missense oligodeoxynucleotide; ONL, outer nuclear layer; PI, propidium iodide; rProTx α , recombinant mouse prothymosin- α ; TEM, transmission electron microscopy

Received 14.4.08; revised 04.9.08; accepted 06.10.08; Edited by GP Gasic; published online 7.11.08

Results

ProTx-induced prevention of histological and functional retinal ischemic damage. When mouse eyes were subjected to hydrostatic pressure (130 mm Hg) for 45 min followed by reperfusion, the thicknesses of retinal cell layers, namely the ganglion cell layer (GCL), the inner nuclear layer (INL) and the outer nuclear layer (ONL), decreased in a time-dependent manner (Figure 1a and Table 1). The maximal decrease was attained on day 7 after ischemic-reperfusion stress, and no further damage was observed on day 14. This decrease in thickness was mostly attributable to damage to the inner plexiform layer (IPL) fibers. Intravitreal (i.v.b.) application of recombinant mouse ProTx (rmProTx) 30 min before the stress, or 3 or 24 h after the stress, prevented this decrease in the thickness of layers (Figure 1a and Table 1). Systemic intravenous (i.v.) administration of rmProTx at 100 µg/kg 3 h after the stress also provided complete protection. In electroretinograms (ERGs), the amplitudes called a-waves (indicated in Figure 1b) are known to represent the function of photoreceptor cells, whereas b-waves represent the functions of bipolar and Muller cells.¹⁵ On day 7 after ischemic stress, the a- and b-wave amplitudes were markedly decreased to approximately 25 and 15%, respectively, of those in sham-operated and vehicle-treated control animals, as shown in Figure 1c and

d. This functional damage was significantly prevented by local (i.v.b.) or systemic (i.v.) application of rmProTx in a dose-dependent manner. To examine the retinal transport of rmProTx, biotinylated rmProTx was administered at 1 mg/kg (i.v.) 3 h after ischemia and reperfusion. As shown in Figure 1e, a significant amount of biotinylated rmProTx was detected in the retina 6 h after reperfusion. However, negligible amounts of biotinylated rmProTx were detected in the preparations from sham-operated mice.

Necrosis precedes apoptosis following ischemic stress. By transmission electron microscopy (TEM) analysis, the cell morphology is different between INL and ONL cells. In the INL, cell-cell adhesion is very tight (low magnification), the nuclei occupy most of the space in cells (middle magnification) and mitochondria have clear cristae (high magnification) (Figure 2a). In the ONL, cells show very high electron density in central nuclei and characteristic lower-density regions at their edges. As early as day 1 after ischemic stress, INL and ONL cells died by necrosis, which was characterized by a loss of electron density in the cytosol and swollen mitochondria without nuclear condensation (Figure 2a, arrowhead). Three days after the stress, necrotic cells disappeared, but apoptosis, which was characterized by nuclear fragmentation or condensation,

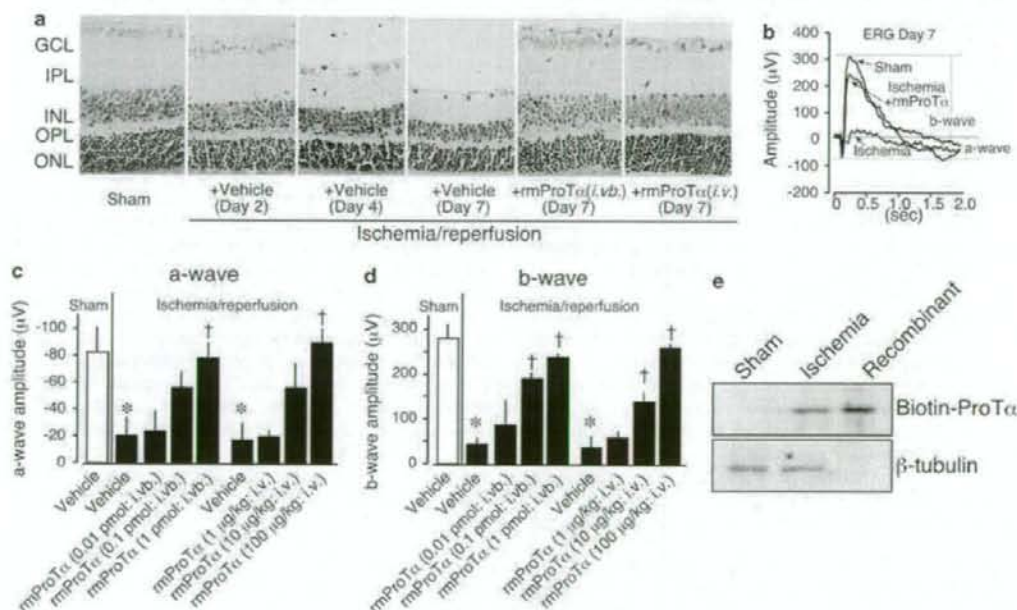


Figure 1 ProTx prevents retinal ischemia-induced necrosis and apoptosis. (a) H&E staining of retinal sections at days 2, 4 and 7 after ischemia and reperfusion. rmProTx (100 µg/kg, i.v.) was administered at 24 h after retinal ischemic stress. (b) ERG recordings at day 7 after ischemic stress. rmProTx was given at 24 h after the stress. Results represent the means ± S.E.M. of 6 independent experiments. (c and d) Dose-dependent prevention of retinal ischemic damage evaluated by a- (c) and b- (d) wave ERG analysis. ProTx (0.01–1 pmol i.v.b. or 1–100 µg/kg, i.v.) was administered 24 h after retinal ischemic stress. The results were evaluated on the basis of a- and b-wave amplitudes, and represent the means ± S.E.M. of six independent experiments. **P* < 0.05 versus sham. †*P* < 0.05 versus ischemia vehicle treatment. (e) Evidence for biotinylated ProTx transport through the blood-retina barrier after ischemic stress. Biotinylated ProTx at 1 mg/kg (i.v.) was given to mice 3 h after reperfusion. Proteins (50 µg) from the retina were isolated 3 h after administration and then used for western blot analysis

Table 1 ProTx-induced prevention of retinal neuron damage under ischemic conditions

Treatment	Days after ischemia/reperfusion	GCL	INL	ONL
Control	0	18.23 ± 3.24	113.05 ± 5.11	303.64 ± 42.38
Sham+vehicle	7	16.61 ± 1.12	123.02 ± 5.91	296.69 ± 28.37
Ischemia+vehicle	2	14.63 ± 0.88	110.60 ± 15.61	222.20 ± 6.98*
Ischemia+vehicle	4	7.82 ± 3.56*	88.95 ± 12.84*	171.56 ± 19.62*
Ischemia+vehicle	7	5.37 ± 0.30*	75.37 ± 3.76*	147.54 ± 7.09*
Ischemia+vehicle	14	6.30 ± 0.48*	72.63 ± 3.64*	144.51 ± 4.44*
Sham+ProTx (-0.5 h, 1 pmol, i.v.)	7	15.84 ± 1.99	133.01 ± 2.15	273.80 ± 19.66
Ischemia+ProTx (-0.5 h, 0.01 pmol, i.v.)	7	6.35 ± 0.38	82.56 ± 5.16	135.86 ± 8.85
Ischemia+ProTx (-0.5 h, 0.1 pmol, i.v.)	7	11.57 ± 1.50 [#]	104.53 ± 6.50 [#]	217.02 ± 1.59 [#]
Ischemia+ProTx (-0.5 h, 1 pmol, i.v.)	7	14.74 ± 0.67 [#]	116.33 ± 0.88 [#]	270.06 ± 9.54 [#]
Ischemia+ProTx (3 h, 0.01 pmol, i.v.)	7	4.94 ± 2.21	71.53 ± 3.38	144.23 ± 12.25
Ischemia+ProTx (3 h, 0.1 pmol, i.v.)	7	12.31 ± 0.25 [#]	83.82 ± 4.23	222.31 ± 4.70 [#]
Ischemia+ProTx (3 h, 1 pmol, i.v.)	7	14.24 ± 0.48 [#]	101.63 ± 5.12 [#]	286.01 ± 5.48 [#]
Ischemia+ProTx (24 h, 0.1 pmol, i.v.)	7	6.86 ± 0.95	84.55 ± 3.68	138.61 ± 2.85
Ischemia+ProTx (24 h, 1 pmol, i.v.)	7	10.62 ± 0.25 [#]	95.27 ± 4.85 [#]	245.28 ± 5.24 [#]
Ischemia+ProTx (-0.5 h, 1 µg/kg, i.v.)	7	5.51 ± 1.25	75.83 ± 3.64	158.21 ± 8.25
Ischemia+ProTx (-0.5 h, 10 µg/kg, i.v.)	7	10.86 ± 2.28 [#]	88.57 ± 6.56 [#]	172.87 ± 6.85 [#]
Ischemia+ProTx (-0.5 h, 100 µg/kg, i.v.)	7	12.30 ± 2.32 [#]	110.82 ± 6.65 [#]	258.59 ± 5.28 [#]
Ischemia+ProTx (3 h, 1 µg/kg, i.v.)	7	4.91 ± 2.35	72.23 ± 2.88	142.66 ± 5.28
Ischemia+ProTx (3 h, 10 µg/kg, i.v.)	7	12.61 ± 3.66 [#]	108.60 ± 5.58 [#]	196.54 ± 12.84 [#]
Ischemia+ProTx (3 h, 100 µg/kg, i.v.)	7	15.27 ± 1.41 [#]	112.41 ± 7.53 [#]	236.95 ± 7.09 [#]
Ischemia+ProTx (24 h, 10 µg/kg, i.v.)	7	5.23 ± 3.26	78.56 ± 4.85	135.81 ± 6.64
Ischemia+ProTx (24 h, 100 µg/kg, i.v.)	7	13.23 ± 0.84 [#]	104.29 ± 3.68 [#]	201.22 ± 4.65 [#]

Abbreviations: GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; i.v., intravenous; ONL, outer nuclear layer.
**P* < 0.05 versus sham; [#]*P* < 0.05 versus ischemia vehicle treatment

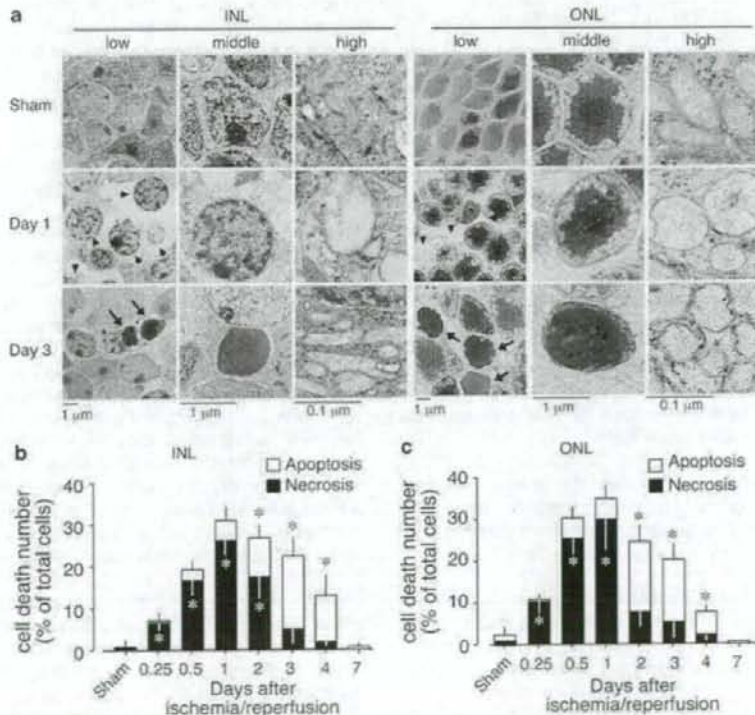


Figure 2 Necrosis precedes apoptosis after ischemic stress. (a) TEM analysis of the INL (left) and ONL (right). At days 1 and 3 after ischemia and reperfusion, necrosis is characterized by membrane destruction and loss of electron density in the cytosol (arrowheads). Apoptosis is characterized by nuclear condensation (arrow). (b and c) Quantitative comparisons in terms of the cell populations showing necrotic and apoptotic features in the TEM analysis in (a). Results represent the means ± S.E.M. of four independent experiments. **P* < 0.05 versus sham

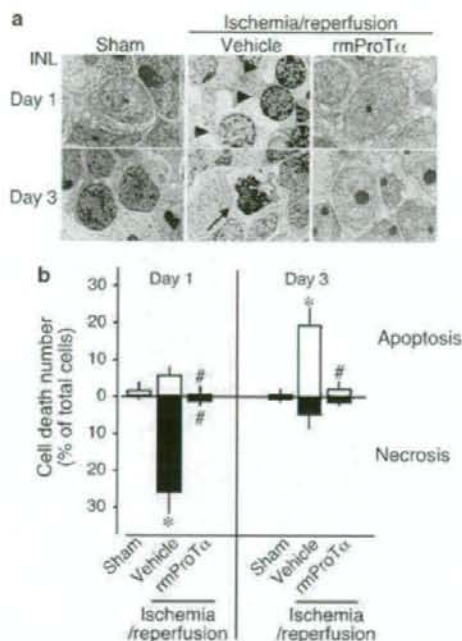


Figure 3 ProTx prevents retinal ischemia-induced necrosis and apoptosis. (a) TEM analysis of the INL. rmProTx (100 μ g/kg, i.v.) was administered 3 h after retinal ischemic stress and the retina was isolated 1 or 3 day after the stress. (b) Quantitative comparisons in terms of the cell populations showing necrotic (closed column) and apoptotic (open column) features in the TEM analysis in (a). Results represent the means \pm S.E.M. of 4–6 independent experiments. * $P < 0.05$ versus sham. # $P < 0.05$ versus ischemia vehicle treatment

appeared instead (Figure 2a, arrow). However, mitochondrial swelling was not observed. Time-course studies revealed that the maximum incidence of necrosis in the INL and ONL was observed at day 1, although that of apoptosis occurred at day 3 after ischemic stress, as shown in Figure 2b and c.

As shown in Figure 3a and b, we confirmed that intravenous administration of rmProTx at 100 μ g/kg (i.v.) 3 h after ischemic stress completely inhibited necrosis by TEM analysis. This treatment also abolished apoptosis.

ProTx-induced inhibition of necrotic and apoptotic cell death. Propidium iodide (PI) staining has been used as a marker for necrosis due to plasma membrane damage.¹⁶ In the present retinal system, *in vivo* pretreatment with PI is relatively easy, as it can be intravitreally administered 30 min before isolation of the retina. No significant signal was observed throughout the sham-operated retina, except in the epithelial layer (EPI), which is liable to be damaged and artificially stained with PI during the process of sample preparation. When hydrostatic pressure was given to the retina, marked PI staining was observed in the ONL as early as 6 h (day 0.25) after stress, and subsequently, in the INL and GCL at days 0.5 and 1, respectively. However, the PI signals substantially disappeared thereafter until day 3

(Figure 4a), possibly due to lysis of the dead cells. Quantitative analyses using NIH Image software revealed that the maximal PI signals in the retinal region, including the GCL, INL and ONL, but not the EPI, were observed at day 1 after the stress (Figure 4b). Systemic administration of rmProTx at 100 μ g/kg (i.v.) 30 min before the stress thoroughly inhibited retinal ischemia and reperfusion-induced PI staining for 3 days.

As shown in Figure 5a, apoptosis activity measured by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) staining, which detects DNA double strand break in apoptosis, was strongly observed at day 3 in the ONL, INL and GCL; moreover, on days 1 and 5 after the stress, weak signals were seen in the ONL and INL. Caspase-3 activation has also been used to characterize apoptosis. As shown in Figure 5b, caspase-3-like protease activity, which digests the substrate acetyl-DEVD-aminomethylcoumarin (Ac-DEVD-MCA) to release the fluorescent aminomethylcoumarin, showed no significant increases in the sham-operated retina. A marked increase in this activity was detected in the ischemia and reperfusion-treated retina at day 3, but not before or after this time. Systemic administration of rmProTx 30 min before the stress completely prevented the retinal apoptosis induced by ischemia and reperfusion up to day 5. Active caspase-3-like immunoreactivity has also been used to characterize apoptosis. A strong signal was detected in the ONL optic disc and INL, specifically, at day 3, but not before or after this time, as shown in Supplementary Figure 1a. Systemic administration of rmProTx 30 min before the stress completely prevented retinal apoptosis induced by ischemia and reperfusion at day 5. Quantitative analyses using NIH ImageJ software revealed that maximum active-caspase-3 immunoreactivities were observed as late as day 3 after the ischemic stress (Supplementary Figure 1b).

Involvement of neurotrophins in ProTx-induced retino-protection against ischemic damage. Weak brain-derived neurotrophic factor (BDNF) immunoreactivities were observed in the INL, IPL, ONL and ONL optic disk (Figure 6a). Ischemic stress elevated the BDNF level in the GCL at 24 h after the stress, without substantial changes in the other cell layers. The administration of rmProTx at 100 μ g/kg (i.v.) enhanced BDNF expression throughout the retinal layers (GCL, INL and ONL optic disk). However, rmProTx alone, without ischemia treatment had no effect (data not shown), though it remains unclear whether the lack of change is attributed to poor transportation into the retina without ischemia. Moreover, erythropoietin (EPO) expression was elevated in the GCL after ischemic stress, with no substantial changes in other cell layers. ProTx administration did not change the EPO levels in the GCL or INL, but increased the level in the ONL optic disc. Western blot analysis confirmed that ProTx plus ischemic stress caused significant elevations of mature BDNF and EPO, but not nerve growth factor or basic fibroblast growth factor (bFGF), in the retina (Figure 6b and Supplementary Figure 2). As shown in Figure 6c, the apoptosis activity measured by TUNEL staining was weak, but significant in the ONL layer as early as day 1 after the stress. Systemic (i.v.) injection of ProTx markedly inhibited both necrotic PI and apoptotic TUNEL staining throughout the retina. It should be noted that ProTx

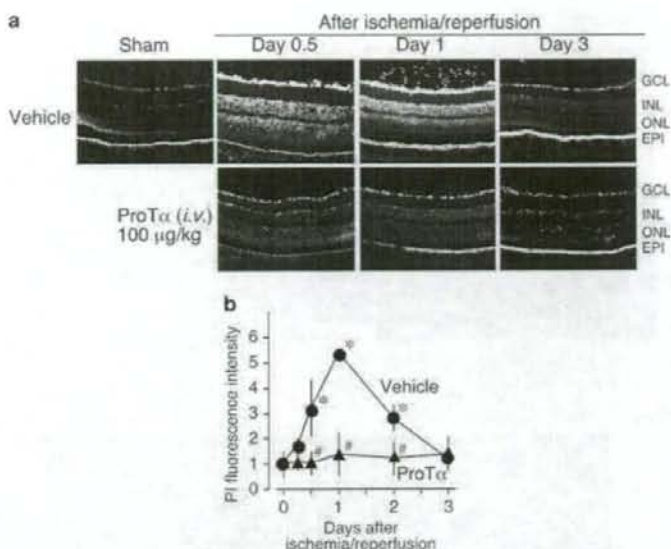


Figure 4 Time course of PI staining of retinas after ischemia and reperfusion under the ProT α -treated condition. (a) PI staining of retinal sections at the indicated time points after ischemia and reperfusion. GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer and EPI: epithelial cell layer. (b) Fluorescence intensities were analyzed using NIH Image. * $P < 0.05$ versus 0 day. As the PI signal in the EPI is observed in the preparation without ischemia, we did not include the change in this layer in the evaluation of cell death. Results represent the means \pm S.E.M. of 4–6 independent experiments. # $P < 0.05$ versus ischemia vehicle treatment

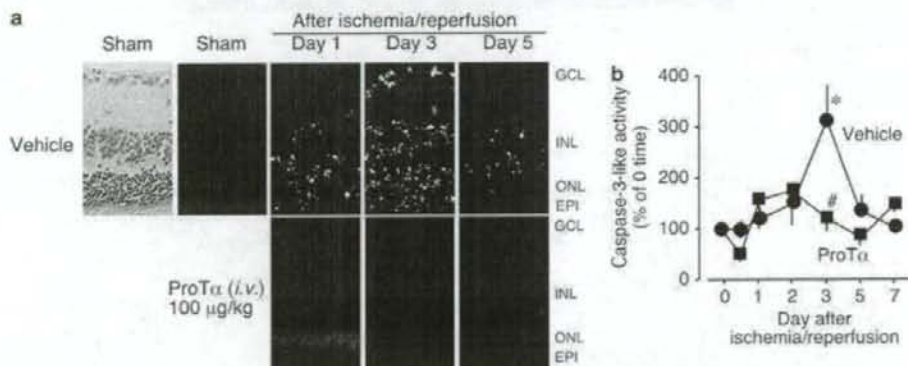


Figure 5 Time course of apoptotic cell death of retinas after ischemia and reperfusion under the ProT α -treated condition. (a) TUNEL staining of retinal sections at the indicated time points after ischemia and reperfusion. *rm*ProT α (100 μ g/kg, i.v.) was administered 3 h after retinal ischemic stress. GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer and EPI: epithelial cell layer. (b) Caspase-3-like activity of retinal cells at the indicated time points after ischemia and reperfusion. *rm*ProT α (100 μ g/kg, i.v.) was administered 3 h after retinal ischemic stress. Results represent the means \pm S.E.M. of 4–6 independent experiments. * $P < 0.05$ versus day 0. # $P < 0.05$ versus ischemia vehicle treatment

inhibited both necrosis and apoptosis following retinal ischemia. This finding contrasts with our recent study, in which ProT α was shown to inhibit necrosis, but to cause apoptosis.¹⁰ However, complete inhibition of cell death was observed when ischemic neurons were cotreated with ProT α and anti-apoptotic neurotrophins, the expression levels of which are upregulated in this model (Figure 6a and b). In fact, when anti-BDNF or anti-EPO immunoglobulin G (IgG; 1 μ g per eye) was intravitreally administered 30 min before ischemic stress,

TUNEL staining reappeared more intensely than in the vehicle control, but no significant change in the intensity of PI staining was observed (Figure 6c and d). However, these anti-IgG treatments alone had no effect on the levels of either necrosis or apoptosis. Pretreatment with BDNF- or EPO-antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) reversed the ProT α -induced inhibition of apoptosis, but not of necrosis (Figure 6d and Supplementary Figure 3). These results were consistent with the results for anti-BDNF or EPO IgG. However,