

200911014A

別添1

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 植田 弘師

平成22(2010)年 5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

内田 仁司

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機能学的解析-----10

松本 みさき

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

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

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. 塞栓子を用いた一過性中大脳動脈閉塞モデルにおける無症候性虚血の条件設定を確立した。
2. 血栓生成による中大脳動脈閉塞モデル、およびその無症候性虚血の条件設定を確立した。
3. 大脳皮質・海馬領域特異的ProTα欠損マウス（ProTα<sup>lox/lox</sup>; Emx1-Cre）において、ProTαが発現消失すること、および一般行動に異常がないこと、を明らかにした。
4. 線条体領域特異的ProTα欠損マウス（ProTα<sup>lox/lox</sup>; Gng7-Cre）において、ProTαが発現消失すること、および一般行動に異常がないこと、を明らかにした。
5. ProTα<sup>lox/lox</sup>の線条体領域にCre遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを導入し、線条体領域特異的ProTα欠損マウスを作製した。このマウスでは、無症候性虚血下において生存率の低下と運動障害の悪化が認められた。
6. ProTα<sup>lox/lox</sup>の視床領域にCre遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを導入し、視床領域特異的ProTα欠損マウスを作製した。このマウスでは、無症候性虚血下において神経因性疼痛様の疼痛閾値の変調が観察された。
7. 最終年度における機能回復解析に必要となる、ProTα遺伝子発現するウイルスベクターの作製に着手した。

分担研究者

内田 仁司 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子薬理学分野・技術補佐員

松本 みさき 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子薬理学分野・リサーチ・レジデント兼技術補佐員

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ことになる。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。その研究計画は、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遺伝子発現ウイルスベクターおよび制御薬剤による、部位特異的 ProTα 欠損動物の機能回復である。

## 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<sup>flox/flox</sup> 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 マウスと Gng7<sup>-/-</sup> マウス (東京大学、三品先生、共同研究)、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) を自由に摂取させた。

### 2) 実験動物のジェノタイプピング

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)、あるいは qPCR マスターミックスプラス SYBR グリーン I (Eurogentec) 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<sup>flox/flox</sup> マウス, 5'-TCC TTG GCT TTT ACT GCC AGA AG-3', 5'-TCA CCT GGA GAA TCA ATC AAG GC-3'; Emx1-Cre マウス, 5'-TGC AAC GAG TGA TGA GGT TCG CAG A-3', 5'-TCC GGT TAT TCA ACT TGC ACC ATG C-3'; Gng7-Cre マウス, 5'-GGC GAC GTT GTT AGT ACC TGA C-3', 5'-ATC CCT GAA CAT GTC CAT CAG GTT C-3', 5'-TAT AGG TAC CCA GAA GTG AAT TCG GTT CGC-3'

### 3) 塞栓子を用いた一過性中大脳動脈閉

### 塞 (tMCAO) モデル

Small animal anesthetizer MK-A100 (室町機械株式会社) と 3% イソフルラン (エスカイン®、マイラン製薬株式会社) を用いて麻酔し、37 °C の恒温台 (池本理化学株式会社) の上にて、咽頭部位の皮膚を切開し、左総頸動脈を硬質絹糸で確保した。軟質絹糸で外頸動脈を二か所硬く結び、内頸動脈に塞栓子を 1-1.5 cm 挿入し、中大脳動脈を閉塞した。

### 4) 血栓形成による中大脳動脈閉塞 (PIT) モデル

Small animal anesthetizer MK-A100 (室町機械株式会社) と 3% イソフルラン (エスカイン®、マイラン製薬株式会社) を用いて麻酔し、37 °C の恒温台 (池本理化学株式会社) の上にて、中大脳動脈領域の頭蓋骨にドリルで約 1.5mm 径の小孔を開けた。ローズベンガル (Wako) を尾静脈内投与し、直後に UV スポット光源 (L-4887-13; 浜松ホトニクス) に接続したライトガイド (A4888; 浜松ホトニクス) の先端部を、遠位中大脳動脈に垂直に充て、緑色光を 10 分間照射した。

### 5) 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。

### 6) 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 μm 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 (Bregma より -0.94 mm 前方、右側 1.0 mm、深さ 3.0 mm)、あるいは線条体部位 (Bregma より +0.5 mm 前方、右側 2.5 mm、深さ 3.5 mm) に固定した。ウイルス液はシリンジポンプを用いて流速 0.5  $\mu$ L/min で投与し、逆流を防ぐために、さらに 10 分間静置した。その後、インジェクターをゆっくりと戻し、切開部位を縫合した。対照群には、人工脳脊髄液を投与した。

## 7) 行動機能学的解析手法

### 7-1. Rota-rod トレッドミル法

測定には ROTA-ROD TREADMILL FOR RATS & MICE MK-610A (室町機械株式会社) を用いた。回転軸径 30 mm  $\phi$ 、フランジ間隔 80 mm、ロータ上端から着地面までの高さ 225 mm のロータ上にマウスを乗せ、等速回転および加速回転時の歩行能力を測定した。マウスがロータ上から落下するまでの時間を評価した。

### 7-2. フットプリント法

マウスの前肢および後肢足底をそれぞれ赤および黒インクで塗布し、幅 48 mm、長さ 650 mm、高さ 230 mm の通路上を歩行させた。Stride width や Stride length などのパラメータを解析し、歩行機能を評価した。

### 7-3. 知覚受容解析 (電気刺激誘発性疼痛試験法)

電気刺激には Neurometer<sup>®</sup> CPT/C (Neurotron Inc.) を用いた。マウスを固定し、二つの金属電極の一方をマウスの右後肢足蹠に、もう一方を後肢の甲に軽く触れさせる。試験には無髄 C 線維を刺激する 5 Hz および有髄 A $\delta$  線維を刺激する 250 Hz の周波数を用いて、低閾値から徐々に高い刺激を与え、感知できる最低レベルの刺激量を測定した。

## 8) 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、エタノール/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  $\mu$ 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<sup>+</sup>-free PBS) 溶液で室温にて 1 時間反応させた。1% BSA/PBST 溶液にて 1:200 に希釈した抗 ProT $\alpha$  抗体 (ALEXIS) を 4°C にて 16-20 時間、次いで二次抗体 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) で封入後、蛍光顕微鏡 (Keyence) で観察した。

## 9) 定量的リアルタイム PCR 法

TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて、マウスの各脳領域から Total RNA を抽出した。逆転写反応により cDNA を作製し、qPCR マスターミックスプラス SYBR グリーン I を用いて、リアルタイム PCR 反応を行った。内標準には、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、相対発現量を算出することにより定量化した。用いたプライマーは以下の通りである。GAPDH, 5'-TAT GAC TCC ACT CAC GGC AAA T-3', 5'-GGG TCT CGC TCC TGG AAG AT-3'; Gng7, 5'-TGT CAG GTA CTA ACA ACG TCG CCC A-3', 5'-ATC TCA GTT AGG CCA GGC GAC AGT CA-3'

## 10) ウェスタンブロット法

SDS サンプルバッファーを用いて、マウスの各脳領域から総タンパク質を抽出した。18%の アクリルアミドゲルを用いて、8  $\mu$ g の総タンパク質を電気泳動した。一次抗体には抗 Gng7 抗体 (1:1000; Santa Cruz) および抗  $\beta$ -tubulin 抗体 (1:1000; Santa Cruz) を用い、二次抗体には HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:2000; Promega) を用いた。検出には、HRP に対する化学発光試薬 (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate;

Thermo Scientific) を用いた。

### (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) tMCAO 法における無症候性虚血条件の設定確立

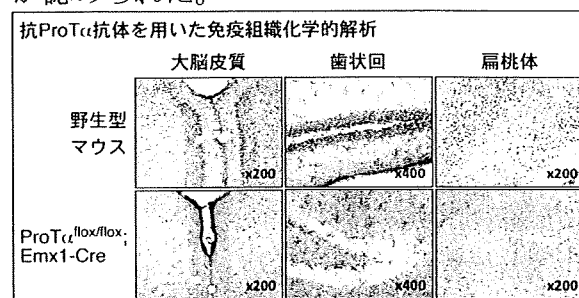
本研究では、部位特異的 ProTα欠損マウスにおける虚血脆弱性を利用し、軽度虚血負荷に対する障害性の悪化を評価する。ここでは、野生型マウスでの無症候性虚血条件について検討を行った。塞栓子を用いた tMCAO 法では、虚血時間に応じて障害性を調節することができる。具体的には、15 分間の虚血負荷では、生存率と運動機能(クリニカルスコア、Rota-rod トレッドミル法)に影響が殆どないことを確認している。

### 2) PIT 法の確立と無症候性虚血条件の設定確立

血栓生成に伴う中大脳動脈閉塞モデルを確立した。血栓生成は、光感受性色素であるローズベンガルを尾静脈内投与し、遠位中大脳動脈に緑色光を 10 分間照射することにより誘発した。このモデルにおいて、形態学的変調を含む脳機能障害と運動障害が観察されることを確認した。ローズベンガル用量と光照射時間とを変更し、ProTα投与による虚血障害の軽減と遺伝子欠損マウスにおける傷害悪化の両方を解析できる条件決定を行い、実際 ProTα投与による用量依存性の保護作用を見出した。具体的には、「ローズベンガル用量: 15 mg/kg」と「照射時間: 10 分間」の組み合わせ条件では、生存率と運動機能(クリニカルスコア)に影響が殆どないことを確認している。

### 3) ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre マウスの解析

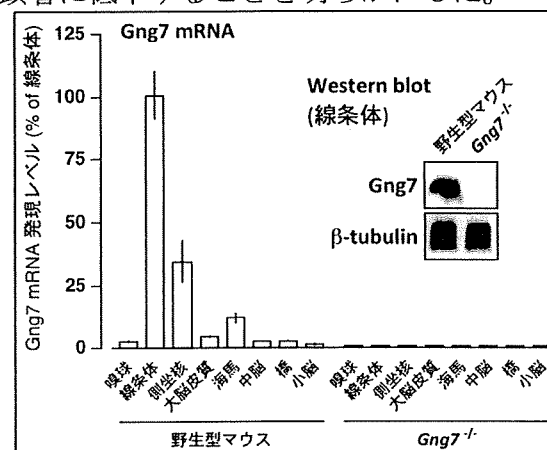
研究初年度において確立した、ProTα特異的マウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法により、ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre マウスにおける ProTαの脳内発現レベルを解析した。その結果、大脳皮質や海馬領域において顕著な ProTαの発現低下が認められた。



さらに、非虚血時の ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre マウスでは、1) 自発運動を含む一般行動、2) フットプリント法により評価した歩行機能、において異常は認められなかった。虚血時における行動機能学的変化については、現在解析中である。

### 4) ProTα<sup>flox/flox</sup>; Gng7-Cre マウスの解析

野生型マウスを用いて、Gng7 の mRNA および蛋白質の脳内発現分布を解析したところ、線条体に高発現していることが確認できた。さらに、Gng7<sup>-/-</sup>マウスでは、Gng7 の mRNA および蛋白質発現が消失することを確認した。また、ProTα<sup>flox/flox</sup>; Gng7-Cre マウスの線条体では、ProTαの蛋白質発現が顕著に低下することを明らかにした。



さらに、非虚血時の ProTα<sup>flox/flox</sup>; Gng7-Cre マウスでは、1) 自発運動を含む一般行動、2) フットプリント法により評価した歩行

機能、3) Rota-rodトレッドミル法により評価した四肢の筋力および協調性、において異常は認められなかった。虚血時における行動機能学的変化については、現在解析中である。

#### 4) Cre 遺伝子発現ウイルスベクターによる線条体領域特異的 ProTα欠損マウスの解析

研究初年度に作製した Cre 遺伝子発現アデノウイルスベクターを、ProTα<sup>flox/flox</sup> マウスの線条体 (Bregma より+0.5 mm 前方、右側 2.5 mm、深さ 3.5 mm) に導入し、線条体領域特異的 ProTα欠損マウスを作製した。

非虚血時では、1) 自発運動を含む一般行動、2) フットプリント法により評価した歩行機能、3) Rota-rodトレッドミル法により評価した四肢の筋力および協調性、において異常は認められなかった。一方、無症候性条件下 (15 分間虚血) の tMCAO 法を用いた解析から、この変異マウスでは生存率が低下し、さらに運動機能 (クリニカルスコア、Rota-rodトレッドミル法) が障害されることを明らかにした。

#### 5) Cre 遺伝子発現ウイルスベクターによる視床領域特異的 ProTα欠損マウスの解析

Cre 遺伝子発現アデノウイルスベクターを、ProTα<sup>flox/flox</sup> マウスの視床 (Bregma より-0.94 mm 前方、右側 1.0 mm、深さ 3.0 mm) に導入し、視床領域特異的 ProTα欠損マウスを作製した。

非虚血時では、1) 自発運動を含む一般行動、2) フットプリント法により評価した歩行機能、において異常は認められなかった。一方、無症候性条件下 (15 分間虚血) の tMCAO 法を用いた解析から、この変異マウスでは痛み閾値の変調が観察された。具体的には、Neurometer<sup>®</sup>による線維特異的な電気刺激を用いて、無髄 C 線維の閾値上昇 (知覚鈍麻) と有髄 Aδ 線維の閾値低下 (痛覚過敏) を見出した。

#### 6) 機能回復評価に必要となる ProTα 遺伝子発現ウイルスベクターの作製

最終年度における「ProTα遺伝子レスキューによる機能回復」の解析に必要となる、ProTα遺伝子発現アデノウイルスベクターの作製に着手した。

#### D. 考察

当該年度における重要な研究の進展は、tMCAO 法と PIT 法における無症候性虚血条件を確立したことである。また、部位特異的 ProTα欠損マウスの解析では、領域特異的な ProTαの発現消失を確認するとともに、一般行動の評価を終え、さらに無症候性虚血のデータ解析が進んでいる。特に、当該年度に確立した、Cre 遺伝子発現ウイルスベクターによる線条体領域特異的 ProTα欠損マウスでは、障害性の悪化が認められた。また、Cre 遺伝子発現ウイルスベクターによる視床領域特異的 ProTα欠損マウスでは、神経因性疼痛様の疼痛閾値変調が観察された。本研究により得られる成果は、知財化と論文報告を行うことを計画している。

一つの困難性は、ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre マウスでは運動障害が避けられないことから、記憶学習を正確に評価できないことである。その解決策として、最終年度では運動障害を伴わない、総頸動脈閉塞性虚血モデルにて評価する。

#### E. 結論

当該年度までに、大脳皮質・海馬領域、線条体領域、視床領域特異的な ProTα欠損マウスの作製に成功した。さらに、無症候性虚血の条件を確立し、線条体領域特異的 ProTα欠損マウスにおける障害性の悪化、視床領域特異的 ProTα欠損マウスにおける異常痛を見出した。また、ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre マウスおよび ProTα<sup>flox/flox</sup>; Gng7-Cre マウスにおける無症候性虚血後の行動機能学的変調についても、順調に解析が進んでおり、

現在データの集計等を行っている。総じて、本研究は計画予定通りに進んでいる。最終年度では、部位特異的遺伝子欠損マウスの機能回復を通じて、本モデルの正当性を検証する。さらに、ProTαの生理作用についても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. **Ueda H**, Matsunaga H, Uchida H, Ueda M; Prothymosin alpha as robustness molecule against ischemic stress to brain and retina. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1194: 20-26.
2. Matsunaga H, **Ueda H**; Stress-induced non-vesicular release of prothymosin-alpha initiated by an interaction with S100A13, and its blockade by caspase-3 cleavage. *Cell Death Differ* 2010, in press.
3. **Ueda H**; Prothymosin alpha and cell death mode switch, a novel target for the prevention of cerebral ischemia-induced damage. *Pharmacol Ther* 2009, 123: 323-33.

### 2. 学会発表

1. **Ueda H** ; Identification of prothymosin alpha, the necrosis-apoptosis switch molecule in ischemic culture of cortical neuron, SECOND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THYMOSINS IN HEALTH AND DISEASE, Catania, 2009.10 (招待講演)
2. **植田 弘師** ; 脳のロバストネスを司る新しいタイプの神経保護分子プロサイモシンα, 九州薬学フォーラム, 東京都渋谷区, 2009.11
3. 杉本 潤哉、米窪 沙織、**植田 弘師** ; ラット中大脳動脈閉塞モデルにおけるミ

クログリアを介したプロサイモシンαの脳保護作用, 第62回薬理学会西南部会, 松山, 2009.11

4. 永原 朋貴、高濱 和弘、**植田 弘師** ; ラットおよびマウス中大脳動脈閉塞モデルにおけるプロサイモシンαの長時間型有用性, 第62回薬理学会西南部会, 松山, 2009.11
5. 黒須 洋、植村 朋香、藤村 一輝、**植田 弘師** ; プロサイモシンαによるミクログリア活性化機構の解析性, 第62回薬理学会西南部会, 松山, 2009.11

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. 「血液脳関門障害改善薬」  
特願 2009-185816

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

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：内田 仁司

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野・技術補佐員

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. 大脳皮質・海馬領域特異的ProTα欠損マウス (ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre) におけるProTα発現低下を、組織化学的手法を用いて明らかにした。
2. 線条体領域特異的ProTα欠損マウス (ProTα<sup>flox/flox</sup>; Gng7-Cre) におけるProTα発現低下を明らかにした。

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ことになる。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。その研究計画は、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

における脳卒中後遺症解析、③遺伝子発現ウイルスベクターおよび制御薬剤による、部位特異的ProTα欠損動物の機能回復である。当該年度における本分担研究は、抗ProTα抗体を用いた免疫組織化学的手法により、部位特異的ProTα欠損マウスにおけるProTαの発現低下について、その領域特異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<sup>flox/flox</sup> 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)、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) 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、エタノール/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、ブロッッキング反応として2% BSA/PBST (0.1% Triton X-100 in K<sup>+</sup>-free PBS) 溶液で室温にて1時間反応させた。1% BSA/PBST 溶液にて希釈した抗ProTα抗体(1:200; ALEXIS)を4°Cで16-20時間反応させ、次に二次抗体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) で封入後、蛍光顕微鏡 (Keyence) で観察した。

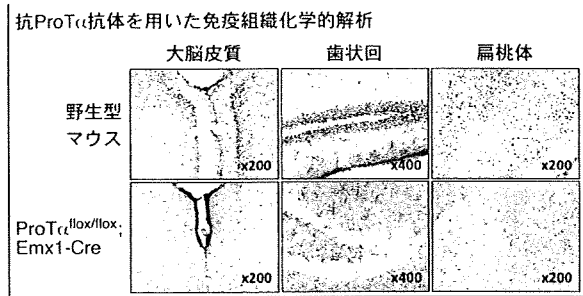
### (倫理面への配慮)

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) ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre マウスにおけるProTα蛋白質の発現低下

ProTα特異的マウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法により、ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre マウスにおけるProTαの脳内発現レベルを解析した。その結果、大脳皮質や海馬領域において顕著なProTαの発現低下が認められた。



### 2) ProTα<sup>flox/flox</sup>; Gng7-Cre マウスにおけるProTα蛋白質の発現低下

1)と同様の手法を用いて、ProTα<sup>flox/flox</sup>; Gng7-Cre マウスの線条体では、ProTαの蛋白質発現が顕著に低下することを明らかにした。

## D. 考察

研究初年度において、ProTαは、大脳皮質、海馬、線条体、視床を含むすべての脳領域にユビキタスに発現することを確認している。また、予備的解析では、ProTαは、神経細胞、ミクログリア、アストロサイトのいずれの細胞にも発現することが見出されている。当該年度においては、組織化学的手法を用いて、1) ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre マウスでは主に大脳皮質と海馬においてProTα発現が欠損すること、2) ProTα<sup>flox/flox</sup>; Gng7-Cre マウスでは主に線条体においてProTα発現が欠損すること、を明らかにした。また、本年度はCre遺伝子発現ウイルスベクターを用いて、線条体領域および視床領域特異的なProTα欠損マウスを作製したが、ProTαの発現消失については現在解析を行っている。

## E. 結論

本年度の研究成果より、ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre マウスおよびProTα<sup>flox/flox</sup>; Gng7-Cre マウスでは、領域特異的なProTαの発現消失を確認することができた。今後の重要な研究課題の一つとして、虚血負荷時における部位特異的ProTα欠損マウスの細胞死評価が挙げられる。その解析手法の確立については、準備段階をすでに終えている。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. **Ueda H**, Matsunaga H, Uchida H, Ueda M; Prothymosin alpha as robustness molecule against ischemic stress to brain and retina. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1194: 20-26.

### 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

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

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機能学的解析 -

研究分担者：松本 みさき  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野・  
リサーチ・レジデント兼技術補佐員

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. 非虚血下のProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-CreマウスおよびProTα<sup>flox/flox</sup>; Gng7-Creマウスでは、自発運動を含む一般行動に異常は認められなかった。
2. Cre遺伝子発現ウイルスベクターによる線条体領域特異的ProTα欠損マウスでは、無症候性虚血下にて生存率の低下と運動障害の悪化が認められた。
3. Cre遺伝子発現ウイルスベクターによる視床領域特異的ProTα欠損マウスでは、無症候性虚血下にて神経因性疼痛様の疼痛閾値の変調が観察された。

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ことになる。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。その研究計画は、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遺伝子発現ウイルスベクターおよび制御薬剤による、部位特異的 ProTα 欠損動物の機能回復である。本分担研究は、部位特異的 ProTα 欠損マウス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<sup>flox/flox</sup> 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）、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) を自由に摂取させた。

## 2) 塞栓子を用いた一過性中大脳動脈閉塞 (tMCAO) モデル

Small animal anesthetizer MK-A100 (室町機械株式会社) と 3% イソフルラン (エスカイン®、マイラン製薬株式会社) を用いて麻酔し、37 °C の恒温台 (池本理化学株式会社) の上にて、咽頭部位の皮膚を切開し、左総頸動脈を硬質絹糸で確保した。軟質絹糸で外頸動脈を二か所硬く結び、内頸動脈に塞栓子を 1-1.5 cm 挿入し、中大脳動脈を閉塞した。

## 3) 行動機能学的解析手法

### 3-1. Rota-rod トレッドミル法

測定には ROTA-ROD TREADMILL FOR RATS & MICE MK-610A (室町機械株式会社) を用いた。回転軸径 30 mm φ、フランジ間隔 80 mm、ロータ上端から着地面までの高さ 225 mm のロータ上にマウスを乗せ、等速回転および加速回転時の歩行能力を測定した。マウスがロータ上から落下するまでの時間を評価した。

### 3-2. フットプリント法

マウスの前肢および後肢足底をそれぞれ赤および黒インクで塗布し、幅 48 mm、長さ 650 mm、高さ 230 mm の通路を歩行させた。Stride width や Stride length などのパラメータを解析し、歩行機能を評価した。

### 3-3. 知覚受容解析 (電気刺激誘発性疼痛試験法)

電気刺激には Neurometer® CPT/C (Neurotron Inc.) を用いた。マウスを固定し、二つの金属電極の一方をマウスの右後肢足趾に、もう一方を後肢の甲に軽く触れさせる。試験には無髄 C 線維を刺激する 5 Hz および有髄 Aδ 線維を刺激する 250 Hz の周波数を用いて、低閾値から徐々に高い刺激を与え、感知でき

る最低レベルの刺激量を測定した。

## (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) ProTα<sup>lox/lox</sup>; Emx1-Cre マウスの行動解析

非虚血時の ProTα<sup>lox/lox</sup>; Emx1-Cre マウスでは、1) 自発運動を含む一般行動、2) フットプリント法により評価した歩行機能、において異常は認められなかった。虚血時における行動機能学的変化については、現在解析中である。

### 2) ProTα<sup>lox/lox</sup>; Gng7-Cre マウスの行動解析

非虚血時の ProTα<sup>lox/lox</sup>; Gng7-Cre マウスでは、1) 自発運動を含む一般行動、2) フットプリント法により評価した歩行機能、3) Rota-rod トレッドミル法により評価した四肢の筋力および協調性、において異常は認められなかった。虚血時における行動機能学的変化については、現在解析中である。

### 3) Cre 遺伝子発現ウイルスベクターによる線条体領域特異的 ProTα 欠損マウスの行動解析

Cre 遺伝子発現アデノウイルスベクターを、ProTα<sup>lox/lox</sup> マウスの線条体 (Bregma より +0.5 mm 前方、右側 2.5 mm、深さ 3.5 mm) に導入し、線条体領域特異的 ProTα 欠損マウスを作製した。

非虚血時では、1) 自発運動を含む一般行動、2) フットプリント法により評価した歩行機能、3) Rota-rod トレッドミル法により評価した四肢の筋力および協調性、において異常は認められなかった。一方、無

症候性条件下（15分間虚血）のtMCAO法を用いた解析から、この変異マウスでは生存率が低下し、さらに運動機能（クリニカルスコア、Rota-rodトレッドミル法）が障害されることを明らかにした。

#### 4) Cre 遺伝子発現ウイルスベクターによる視床領域特異的 ProTα欠損マウスの解析

Cre 遺伝子発現アデノウイルスベクターを、ProTα<sup>flox/flox</sup>マウスの視床（Bregmaより-0.94 mm前方、右側1.0 mm、深さ3.0 mm）に導入し、視床領域特異的 ProTα欠損マウスを作製した。

非虚血時では、1) 自発運動を含む一般行動、2) フットプリント法により評価した歩行機能、において異常は認められなかった。一方、無症候性条件下（15分間虚血）のtMCAO法を用いた解析から、この変異マウスでは痛み閾値の変調が観察された。具体的には、Neurometer<sup>®</sup>による線維特異的な電気刺激を用いて、無髄C線維の閾値上昇（知覚鈍麻）と有髄Aδ線維の閾値低下（痛覚過敏）を見出した。

#### D. 考察

本年度において、部位特異的 ProTα欠損マウスの解析では、一般行動の評価を終え、無症候性虚血のデータ解析が進んでいる。特に、当該年度に確立した、Cre 遺伝子発現ウイルスベクターによる線条体領域特異的 ProTα欠損マウスでは、障害性の悪化が認められた。また、Cre 遺伝子発現ウイルスベクターによる視床領域特異的 ProTα欠損マウスでは、神経因性疼痛様の疼痛閾値変調が観察された。

一つの困難性は、ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre マウスでは運動障害が避けられないことから、記憶学習を正確に評価できないことである。その解決策として、最終年度では運動障害を伴わない、総頸動脈閉塞性虚血モデルにて評価する。

#### E. 結論

大脳皮質・海馬領域、線条体領域、視床領域特異的な ProTα欠損マウスでは、一般行動に異常が認められなかった。また、無症候性虚血条件下では、線条体領域特異的 ProTα欠損マウスにおける障害性の悪化、視床領域特異的 ProTα欠損マウスにおける異常痛を見出した。さらに、ProTα<sup>flox/flox</sup>; Emx1-Cre マウスおよび ProTα<sup>flox/flox</sup>; Gng7-Cre マウスにおける無症候性虚血後の行動機能学的変調についても、順調に解析が進んでおり、現在データの集計等を行っている。本研究により得られる成果は、知財化と論文報告を行うことを計画している。

#### 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

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|
|      | なし      |           |     |      |     |     |     |

## 雑誌

| 発表者氏名   | 論文タイトル名   | 発表誌名                     | 巻号   | ページ     | 出版年      |
|---|---|--------------------------|------|---------|----------|
| <b>Ueda H,</b><br>Matsunaga H,<br>Uchida H,<br>Ueda M | Prothymosin alpha as robustness molecule against ischemic stress to brain and retina.   | <i>Ann N Y Acad Sci</i>  | 1194 | 20-26   | 2010     |
| Matsunaga H,<br><b>Ueda H</b>                         | Stress-induced non-vesicular release of prothymosin-alpha initiated by an interaction with S100A13, and its blockade by caspase-3 cleavage. | <i>Cell Death Differ</i> |      |         | in press |
| <b>Ueda H</b>   | Prothymosin alpha and cell death mode switch, a novel target for the prevention of cerebral ischemia-induced damage.                        | <i>Pharmacol Ther</i>    | 123  | 323-333 | 2009     |

## ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES

Issue: *Thymosins in Health and Disease***Prothymosin  $\alpha$  as robustness molecule against ischemic stress to brain and retina**Hiroshi Ueda,<sup>1</sup> Hayato Matsunaga,<sup>2</sup> Hitoshi Uchida,<sup>1</sup> and Mutsumi Ueda<sup>1</sup><sup>1</sup>Division of Molecular Pharmacology and Neuroscience, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan. <sup>2</sup>Department of Applied Life Science, Faculty of Biotechnology and Life Science, Sojo University, Kumamoto, Japan

Address for correspondence: Dr. Hiroshi Ueda, Division of Molecular Pharmacology and Neuroscience, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-14 Bunkyo-Machi, Nagasaki 852-8521, Japan. ueda@nagasaki-u.ac.jp

Following stroke or traumatic damage, neuronal death via both necrosis and apoptosis causes loss of functions, including memory, sensory perception, and motor skills. As necrosis has the nature to expand, while apoptosis stops the cell death cascade in the brain, necrosis is considered to be a promising target for rapid treatment for stroke. We identified the nuclear protein, prothymosin alpha (ProT $\alpha$ ) from the conditioned medium of serum-free culture of cortical neurons as a key protein-inhibiting necrosis. In the culture of cortical neurons in the serum-free condition without any supplements, ProT $\alpha$  inhibited the necrosis, but caused apoptosis. In the ischemic brain or retina, ProT $\alpha$  showed a potent inhibition of both necrosis and apoptosis. By use of anti-brain-derived neurotrophic factor or anti-erythropoietin IgG, we found that ProT $\alpha$  inhibits necrosis, but causes apoptosis, which is in turn inhibited by ProT $\alpha$ -induced neurotrophins under the condition of ischemia. From the experiment using anti-ProT $\alpha$  IgG or antisense oligonucleotide for ProT $\alpha$ , it was revealed that ProT $\alpha$  has a pathophysiological role in protecting neurons in stroke.

**Keywords:** apoptosis; brain-derived neurotrophic factor; cell death mode switch; ischemia; necrosis; robustness

**Introduction**

Stroke is a major cause of death and a major factor behind people spending their life confined to bed. Stroke results in dysfunctions of motor skills, memory, and sensory perception that are caused by various kinds of ischemia leading to neuronal death. Necrotic death occurs first in the ischemic core. Neuronal necrosis in the ischemic core is caused by deprivation of oxygen, glucose, and some neurotrophic factors, and results in the release of cytotoxic substances including high-mobility group box 1.<sup>1,2</sup> These cytotoxic substances cause further damage to the surrounding neurons, through an activation of nonneuronal cells, astrocytes, and microglia that release other types of cytotoxic molecules, such as cytokines and nitric oxide.<sup>3</sup> Meanwhile in the penumbra surrounding the core, apoptosis takes over the necrosis. Considering that apoptosis has the nature of being a converging type of cell death, it is interesting to hypothesize that apoptosis plays

a limited role in terminating the neuronal death expansion by necrosis.<sup>1</sup> In other words, the cell death mode switch from necrosis to apoptosis is a type of "Robustness" in the ischemic brain. Our major concern, however, was to identify the key molecule to exert an inhibition of necrosis, a mechanism that accomplishes the robustness or cell death mode switch. Here, we introduce the identification of prothymosin alpha (ProT $\alpha$ ) and propose its possible robustness roles in the ischemic brain and retina through a demonstration of cellular and *in vivo* actions.

**Identification of ProT $\alpha$  as a necrosis-inhibitory factor**

The search for necrosis-inhibitory factors was initiated by the simple observation of density-dependent survival of cortical neurons in serum-free culture. After careful characterization of this unique cell death, we found that the death mode of cortical



neurons in serum-free culture was necrosis under low-density conditions, but apoptosis under high-density conditions.<sup>4</sup> Therefore, we decided to search for survival factors that inhibit necrosis in the low-density culture of neurons, from the conditioned medium (CM) of high-density culture of neurons. After various approaches, the use of simple and efficient chromatographies enabled to purify active materials to a homogeneity in SDS-PAGE separation. This protein was analyzed by MALDI-TOF-MS, and a subsequent search of the nonredundant NCBI protein database for matching peptide mass fingerprints revealed 17 peptides that were unique to rat ProT $\alpha$ . Moreover, tandem MS analysis confirmed that the N-terminal of purified ProT $\alpha$  was an acetylated serine.<sup>5</sup> The structure of ProT $\alpha$  has several unique characteristics in that it is highly hydrophilic and acidic (pI = 3.55) owing to its abundance of glutamic and aspartic acids (50% of the total residues) in the middle part of the protein. The cluster of acidic amino acids in this region seems to resemble a putative histone-binding domain. A small stretch of basic residues, corresponding to thymosin- $\alpha_1$ ,<sup>6</sup> is found at the N-terminal, while another stretch of basic residues at the C-terminal includes a nuclear localization signal (NLS; TKKQKK). The fact that ProT $\alpha$  is a monomeric protein without any regular secondary structures under physiological conditions<sup>7</sup> may explain its poor immunogenicity, a favorable property in terms of its clinical use. This purified protein was also biologically identified to be ProT $\alpha$  because a large proportion of ProT $\alpha$  and the survival activity in the CM were recovered in the acid-treated eluates from anti-ProT $\alpha$  IgG-conjugated beads, and ProT $\alpha$  purified to homogeneity exhibited an equivalent concentration-dependency to that of the recombinant protein. The fact that ProT $\alpha$  mutants lacking the N-terminal region ( $\Delta$ 1–29) including thymosin- $\alpha_1$  or C-terminal region ( $\Delta$ 102–112) including the NLS retained the original activity of ProT $\alpha$  also indicates that ProT $\alpha$  itself exerts survival activity through an action on cell surface receptor.

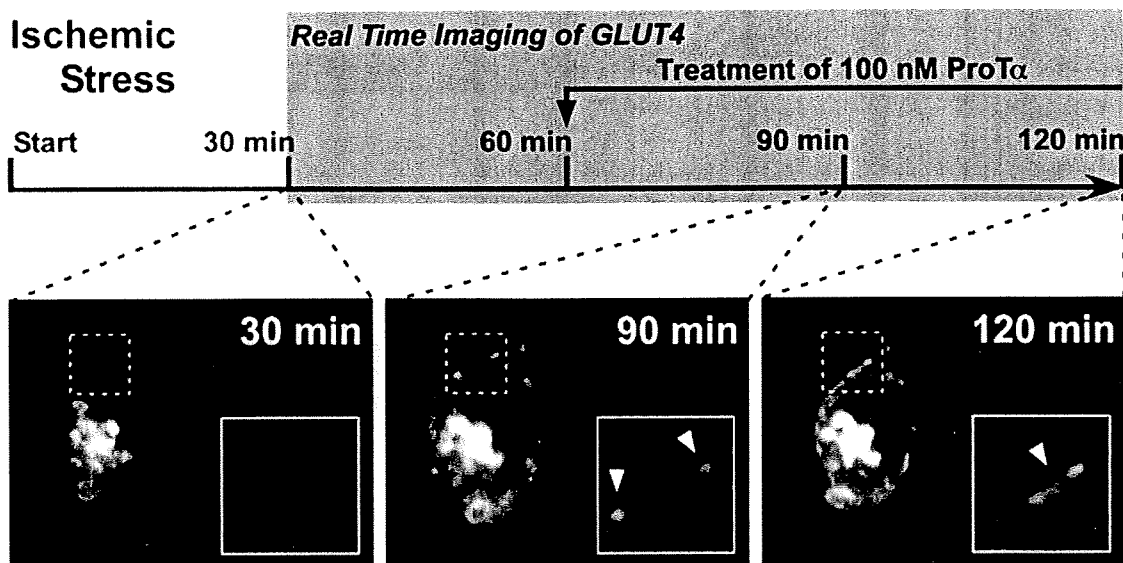
### Nonvesicular neuronal release of ProT $\alpha$ upon ischemic stress

ProT $\alpha$  was detected in CM as early as 1 h after the onset of serum-free and high-density culture. As neurons in high-density culture retain intact plasma

membranes at 1 h after the start of serum-free culture and ProT $\alpha$  lacks a signal peptide sequence required for vesicular release, it is evident that the ProT $\alpha$  release occurs in a regulated and unique non-classical manner.<sup>8,9</sup> However, no ProT $\alpha$  release was observed in the presence of serum. Taken together, these findings suggest that ProT $\alpha$  may play an important neuroprotective role in the event of starvation or ischemic stress.

### Inhibition of necrosis by ProT $\alpha$

Recombinant ProT $\alpha$  reversed the rapid decrease in survival of cortical neurons observed in serum-free and permanent ischemia models.<sup>5</sup> Addition of ProT $\alpha$  abolished the typical necrosis features, such as disrupted plasma membranes and swollen mitochondria in transmission electron microscope analysis at 6 h, but caused apoptosis at 12 h instead. When the cell death mode was evaluated by double staining with PI (necrosis)/annexin V (apoptosis at 3 h), PI/anti-activated-caspase-3 IgG (apoptosis at 12 h), and PI/TUNEL (apoptosis at 24 h), most of the neurons were found to die by necrosis under serum-free stress. Addition of ProT $\alpha$  totally switched the cell death mode from necrosis to apoptosis. Although little is known about the mechanisms of necrosis, it is only accepted that necrosis is caused by energy failure due to loss of cellular ATP.<sup>10–13</sup> The neuronal ATP levels and [<sup>3</sup>H]-2-DG uptake rapidly decrease immediately after the start of serum-free culture, and this decrease is markedly inhibited by the addition of ProT $\alpha$ .<sup>5</sup> Quite similar changes were reproduced in the ischemic low-oxygen, low-glucose (LOG) culture. ProT $\alpha$  also reversed the LOG stress-induced decrease in glucose transporter (GLUT) 1/4 membrane translocation that underlies a mechanism for necrosis, or rapid decrease in ATP and [<sup>3</sup>H]-2-DG uptake levels. The ProT $\alpha$ -induced GLUT1/4 translocation was blocked by the treatments with pertussis toxin (PTX), PLC inhibitor, PKC $\beta$  inhibitor, and PKC $\beta_{II}$  antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN). Furthermore, ProT $\alpha$  reversed the membrane translocation of GLUT4-EGFP,<sup>14</sup> which had been internalized by serum deprivation in N18-RE105 hybrid cells (Fig. 1). Thus, the rescue of membrane translocation of GLUTs by ProT $\alpha$  through activation of putative G<sub>i/o</sub>-coupled receptor, PLC, and PKC $\beta_{II}$  would be a key mechanism



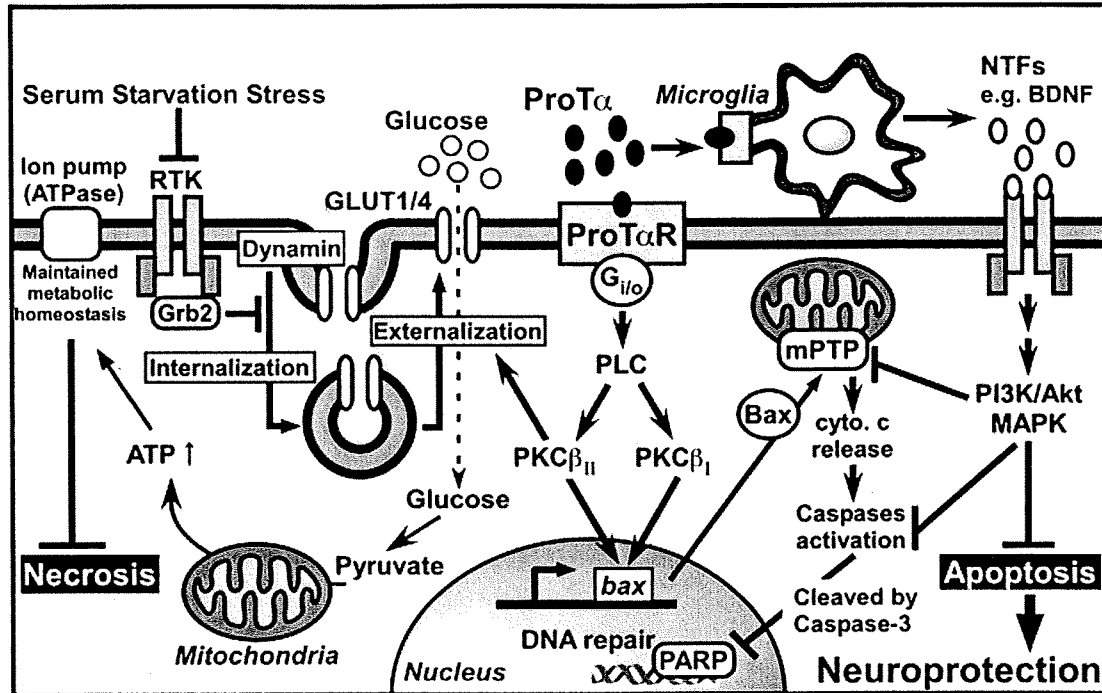
**Figure 1.** ProT $\alpha$ -induced GLUT4 translocation in N18-RE105 hybrid cells. Real-time imaging of ProT $\alpha$ -induced GLUT4 externalization by the use of GFP technique. The GFP images were acquired every 30 sec for 90 min (30 min after ischemic stress). GLUT4-EGFP transiently expressed in N18-RE105 cells was completely internalized 30 min after the serum deprivation, a representative ischemic stress (*left panel*). Externalization of GLUT4 was started 30 min after the treatment of ProT $\alpha$  (100 nM) under serum-deprivation stress (*middle panel*). ProT $\alpha$  recovered the membrane arrival of GLUT4 60 min after the treatment (*right panel*). Inset (*lined frame*): Higher magnifications of images for *dotted frame*. *Arrowheads* denote the membrane translocation of GLUT4.

underlying ischemia-induced necrosis or energy crisis (Fig. 2).

### ProT $\alpha$ -induced cell death mode switch in cultured neurons

The molecular machineries for apoptosis are relatively better characterized than those for necrosis. In terms of the activation of various caspases, caspase-3 is believed to be the final execution molecule for apoptotic cell death linked to DNA breakdown and nuclear fragmentation. ProT $\alpha$  activates caspase-3 in serum-free and permanent ischemia models, as well as caspase-9, but not caspase-8 or caspase-12.<sup>5</sup> Therefore the apoptosis mechanism is mediated through mitochondrial pathway, but not through cell death receptor (caspase-8) or ER stress (caspase-12) pathway. This view was confirmed by the findings that ProT $\alpha$  increased the expression of pro-apoptotic Bax and Bim, while it decreased the expression of anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL, which regulate mitochondrial apoptotic signaling. On the other hand, a PKC $\beta_{II}$  AS-ODN reversed

the ProT $\alpha$ -induced pro-apoptotic Bax expression. However, it should be noted that the Bax expression was also abolished by treatment with an AS-ODN for PKC $\beta_I$ , but not an AS-ODN for PKC $\alpha$ . This fact means that the PKC involved in ProT $\alpha$ -induced GLUT1/4 membrane translocation underlying necrosis is more specific for  $\beta_{II}$ -isoform. As seen in the case with necrosis, ProT $\alpha$ -induced Bax expression was abolished by PTX. Furthermore, we observed that ProT $\alpha$  causes membrane ruffling of microglia through putative  $G_{i/o}$ -coupled receptor, PLC, PKC $\beta_I$ , and  $\beta_{II}$  (Ueda *et al.*, unpublished data). The ProT $\alpha$ -induced upregulation of Bax through PKC $\beta_I$  and  $\beta_{II}$  activation, seems to be consistent with the report that PKC $\beta$  activation leads to Bax upregulation through NF- $\kappa$ B.<sup>15,16</sup> All these findings suggest that various cell biological actions of ProT $\alpha$  are mediated by the activation of  $G_{i/o}$ -coupled receptor, PLC, and PKC (Fig. 2). The second important issue is that ProT $\alpha$  switches the cell death mode by causing apoptosis.<sup>5</sup> As serum-free stress itself does not cause mitochondrial cytochrome c release, this stress is unlikely to drive the apoptosis



**Figure 2.** Cellular robustness actions of ProT $\alpha$  through a machinery of cell death mode switch in ischemic neurons in culture. Serum-free or starvation stress leads to endocytosis of the glucose transporters GLUT1/4, which in turn causes bioenergetic catastrophe-mediated necrosis through a rapid loss of glucose supply. Addition of ProT $\alpha$  to ischemia-treated neurons causes translocation of GLUT1/4 to the membrane to allow sufficient glucose supply through activation of G<sub>i/o</sub>, PLC, and PKC $\beta_{II}$ . ProT $\alpha$ -induced apoptosis occurs later at 12 h after the start of serum-free stress. The machinery is mediated by upregulation of Bax, which in turn causes mitochondrial cytochrome c release and subsequent apoptosis. Bax upregulation is also mediated by activation of G<sub>i/o</sub>, PLC, and PKC, similar to the case for necrosis. However, both PKC $\beta_I$  and PKC $\beta_{II}$  upregulations mediate this apoptotic mechanism. As caspase-3-mediated PARP degradation minimizes the ATP consumption, the apoptosis induction may have a crucial role in inhibiting the rapid necrosis. In addition, as pyruvate, a substrate for ATP production in mitochondria, inhibits necrosis but does not cause apoptosis, the apoptosis machinery seems to be independent of the necrosis inhibition. Neurotrophins, such as BDNF or EPO, which are expected in the ischemic brain and retina, can inhibit the apoptosis machinery at a later stage.

machinery as well as the necrosis machinery. Furthermore, ProT $\alpha$ -induced apoptosis may not be secondary to the inhibition of necrosis, since the addition of pyruvate, which increases ATP levels through the TCA cycle, inhibited the necrosis in this culture system, but did not induce apoptosis.

### Blockade of ProT $\alpha$ -induced apoptosis by neurotrophins

Although addition of ProT $\alpha$  delayed the cell death of cortical neurons in serum-free culture, most of the neurons completely died by apoptosis within

24 h. However, when neurons were treated with ProT $\alpha$  under conditions of ischemia and subsequent reperfusion with serum-containing medium, no significant cell death was observed for at least 48 h.<sup>5</sup> These findings indicate that serum factors prevented the ProT $\alpha$ -induced apoptosis. Indeed, further addition of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), basic fibroblast growth factor, or interleukin (IL)-6, comprising representative apoptosis inhibitors rescued the cell survival in serum-free culture for 48 h, while these factors alone had no effects on the survival (Fig. 2).

### Inhibition of necrosis by apoptosis induction

It should be noted that concomitant addition of *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethylketone (zVAD-fmk), a pan-type caspase inhibitor, with ProT $\alpha$  did not lead to long-lasting survival, but caused marked cell death by necrosis at the later stage.<sup>5</sup> As zVAD-fmk does not affect cytochrome c release, mitochondrial bioenergetic dysfunction may lead to loss of ATP and necrosis induction. Alternatively, the blockade of caspase activity may allow a large poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)-mediated consumption of ATP, as stated earlier (Fig. 2). Indeed we observed that the addition of PARP inhibitor 3-aminobenzamide reversed the rapid decrease in the intracellular ATP levels and inhibited necrosis after the start of the low-density and serum-free culture, while zVAD-fmk significantly reversed the increased ATP levels and necrosis inhibition by ProT $\alpha$  (unpublished data). In other words, apoptosis-induction in the early stage after ischemia may play a defensive role in inhibiting rapid cell death by necrosis. However, as the late phase of apoptosis is also induced by many other cytotoxic cytokines and nitric oxide through different pathways, we have to consider that the beneficial role of apoptosis in terms of antinecrosis could be limited in the case with ProT $\alpha$ -induced one.

### Cellular roles of ProT $\alpha$ in cell death regulation

With regard to cell death regulation, intracellular ProT $\alpha$  was reported to play a cytoprotective role by inhibiting apoptosome formation in HeLa cells subjected to apoptotic stress.<sup>17</sup> This finding is inconsistent with reports that ProT $\alpha$  is released upon necrotic stress and protects against neuronal death.<sup>5</sup> ProT $\alpha$  is a highly acidic nuclear protein of the  $\alpha$ -thymosin family, and is found in the nuclei of virtually all mammalian cells.<sup>18,19</sup> ProT $\alpha$  is generally thought to be an oncoprotein that is correlated with cell proliferation by sequestering anti-coactivator factor, a repressor of estrogen receptor activity, in various cells.<sup>20,21</sup> On the other hand, ProT $\alpha$  has been reported to act as an extracellular signaling molecule, as observed in the activation of macrophages, natural killer cells, and lymphokine-activated killer cells, and in the production of IL-2

and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).<sup>6</sup> Therefore, ProT $\alpha$  has multiple functions inside and outside of the cell, particularly in terms of cell survival and proliferation.<sup>22</sup> Furthermore, the extracellular actions of ProT $\alpha$  seem to be cell type-specific even among brain cells, since ProT $\alpha$  binding is observed in neurons and microglia, but not in astrocytes.<sup>5</sup> The identification of ProT $\alpha$ -binding proteins would be the next subject.

### ProT $\alpha$ -induced inhibition of ischemia-induced necrosis and apoptosis

Systemic administration of recombinant rat ProT $\alpha$  at 30 min and 3 h after focal cerebral ischemia using middle cerebral artery occlusion (MCAO) and reperfusion largely reversed the brain damage and suppressed ischemia-induced motor dysfunction and lethality.<sup>23</sup> Since Myc-tagged recombinant ProT $\alpha$  administered intraperitoneally was detected in the cortex at 3 h after MCAO stress, the neuroprotective actions of ProT $\alpha$  administered through systemic routes are likely to be due to transient disruption of the blood-brain barrier in the ischemic brain.<sup>24</sup> More details were elsewhere reported.<sup>1</sup> The administration of ProT $\alpha$  inhibited both necrotic and apoptotic cell death. When anti-BDNF or anti-erythropoietin (EPO) IgG was given into the sub-arachnoid space through a parietal bone, there was a reversal of ProT $\alpha$ -inhibited apoptosis, but not necrosis.<sup>23</sup> Therefore, ProT $\alpha$  is a unique cell death regulatory molecule, in that it converts irretrievable necrosis into controllable apoptosis. As this apoptosis can be inhibited by growth factors secreted upon ischemic stress, it is expected that ProT $\alpha$  may have an overall neuroprotective or robustness role in the treatment of stroke. Quite similar mechanisms were also observed in the transient global retinal ischemia model resulting from acute vascular occlusion.<sup>25</sup>

### *In vivo* neuroprotective role of ProT $\alpha$ in a retinal ischemia model

To examine the *in vivo* role of ProT $\alpha$ , intravitreal pretreatment with an AS-ODN against ProT $\alpha$  was carried out. This AS-ODN, but not a mismatched scrambled oligodeoxynucleotide (MS-ODN), significantly worsened the histological damage at day 4 after retinal ischemic stress. Similar results were observed for intravitreal pretreatment (1  $\mu$ g/eye, 30 min prior to ischemic stress) of anti-ProT $\alpha$  IgG,