

201008006A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 植田 弘師

平成23(2011)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	
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-----	6
黒須 洋	
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-----	16

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～急性期に神経細胞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錐体外路系障害、高次脳機能障害、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5点からなる。

1. 線条体領域特異的ProTα欠損マウス（ProTα^{lox/lox}; Gng7-Cre）の無症候性虚血条件下において、対照群のマウスと比較し、生存率の低下と運動機能障害の増悪が認められた。
2. 線条体領域特異的ProTα欠損マウス（ProTα^{lox/lox}; Gng7-Cre）の無症候性虚血条件下において認められる生存率の低下と運動機能障害の増悪が、ドパミン受容体刺激薬およびMAO-B阻害薬の投与により顕著に改善することを明らかにした。
3. 大脳皮質・海馬領域特異的ProTα欠損マウス（ProTα^{lox/lox}; Emx1-Cre）の無症候性虚血条件下において、海馬領域の神経細胞死の増加を観察した。
4. 大脳皮質・海馬領域特異的ProTα欠損マウス（ProTα^{lox/lox}; Emx1-Cre）の血栓生成による無症候性虚血条件下において、虚血依存的な精神異常を観察した。
5. ProTα^{lox/lox}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作製した視床領域特異的ProTα欠損マウスにおいて、遺伝子欠損から長期の時間経過により神経障害性疼痛様の疼痛閾値の変調が観察されることを明らかにした。

分担研究者

黒須 洋 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～急性期に神経細胞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。その研究計画は、①部位特異的ProTα欠損マウスの作製、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薬剤による部位特異的ProTα欠損マウスの機能回復である。

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^{flax/flax} 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^{fl} 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 PCR 法により判定した。プライマーは以下のものを用いた。ProTα^{flax/flax} 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 (t-MCAO) 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) を用いて麻醉し、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。15

分間閉塞状態を維持した後塞栓子を除去、切開部位を縫合し、麻醉からさめるまで 37°C の恒温台に静置した。

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) を用いて麻醉し、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 分間照射することで、中大脳動脈内に血栓を形成し、支配領域に脳梗塞を引き起こした。

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) 麻醉下、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 mm 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) に固定した。ウイルス液はシリンジポンプを用いて流速 0.5µL/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、人工脳脊髄液あるいはアデノウイルスの空ベクターを投与した。

7) 行動機能学的解析法

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 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。

7-2. Fear conditioning test

1 日目は獲得試行として、180×170×398 mm の四角の conditioning chamber のグリッド (26 本、2 mm 径) 上にマウスを入れ 2 分後、80 dB、2 kHz の音を 1 分間鳴らし 0.5 mA の電流を 1 sec 流した。1 分おきに音と電流を計 3 回繰り返し、最後の電流を与えて 2 分後にマウスを飼育ケージに戻した。24 時間後に再び同じ四角 chamber にマウスを 6 分間入れ、空間学習機能の評価した。48 時間後には 1 日目と異なる三角の chamber (180×180×180×398 mm、グリッドなし) にマウスを入れて 6 分後、1 日目と同様の音を 3 分間鳴らし、音条件依存的な学習機能の評価した。全ての実験は Video tracking system (Muromachi Kikai) を用いて解析を行った。呼吸以外の動きが完全にない状態を freezing と定義した。

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[®] 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 δ 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 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。1% BSA/PBST 溶液にて 1:200 に希釈した抗 ProT α 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) Propidium iodide (PI) 染色

Propidium iodide (PI) は核の DNA に結合する化合物である。当研究室では、ネクロシスを起こした細胞は膜が破たんしていることを利用し、ネクロシス細胞のみを染める方法として PI 染色を確立している。具体的な手法は、マウスを断頭後、摘出した脳を brain slicer で 1 mm の環状切片を作成し、PI/DMEM (10 μ g/ml) で 37°C、1 時間保温した。20 分おきに 3 回 DMEM で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドで 1 晩固定した。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 μ m の脳脊髄切片を作製した。組織切片を PBS で洗浄後、封入し、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) 線条体領域特異的 ProTα欠損マウス (ProTα^{flox/flox}; Gng7-Cre) の無症候性虚血条件下において、対照群のマウスと比較し、生存率の低下と運動機能障害の増悪が認められた。

ProTα^{flox/flox}; Gng7-Cre マウスに無症候性虚血 (15分 tMCAO) 処置を行った結果、対照群のマウスと比較し、生存率の低下および運動機能 (クリニカルスコア、Rota-rod トレッドミル法) が増悪することを明らかにした (図 1)。

2) 線条体領域特異的 ProTα欠損マウス (ProTα^{flox/flox}; Gng7-Cre) の無症候性虚血条件下において認められる生存率の低下と運動機能障害の増悪が、ドパミン受容体刺激薬および MAO-B 阻害薬の投与により顕著に改善することを明らかにした。

ProTα^{flox/flox}; Gng7-Cre マウスに無症候性虚血 (15分 tMCAO) 処置を行った際の障害に対する機能回復を、ドパミン受容体刺激薬または MAO-B 阻害薬の投与によって試みた。その結果、これらの薬剤によって生存率の回復と運動機能障害 (クリニカルスコア、Rota-rod トレッドミル法) が改善することが明らかとなった (図 2~5)。

3) 大脳皮質・海馬領域特異的 ProTα欠損マウス (ProTα^{flox/flox}; Emx1-Cre) の無症候性虚血条件下において、海馬領域の神経細胞死の増加を観察した。

ProTα^{flox/flox}; Emx1-Cre マウスに無症候性虚血 (15分 tMCAO) 処置を行い、Propidium iodide 染色を行うことにより脳虚血による細胞死の組織学的解析を行った。その結果、虚血処

置によって ProTα遺伝子が欠損している海馬領域において神経細胞死の増加が認められることを明らかにした。

4) 大脳皮質・海馬領域特異的 ProTα欠損マウス (ProTα^{flox/flox}; Emx1-Cre) の血栓生成による無症候性虚血条件下において、虚血依存的な精神異常を観察した。

ProTα^{flox/flox}; Emx1-Cre マウスに血栓生成による無症候性虚血 (15 mg/kg RB PIT モデル) 処置を行った際の学習・精神症状を Fear conditioning test によって解析した。その結果、空間学習、音条件依存的学習ともに高い Freezing を示すことを明らかとした。この結果から、ProTα^{flox/flox}; Emx1-Cre マウスに無症候性虚血を行うことで、不安等の精神症状が発現することが分かった (図 6)。

5) ProTα^{flox/flox} 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作製した視床領域特異的 ProTα欠損マウスにおいて、遺伝子欠損から長期の時間経過により神経障害性疼痛様の疼痛閾値の変調が観察されることを明らかにした。

視床領域特異的 ProTα欠損マウスにおける無症候性条件下 (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ることを昨年度報告した。詳細な解析のため、本年度はアデノウイルスベクターを導入して3週間後に痛み閾値を調べたところ、閾値の変調を観察した。具体的には、Neurometer[®]による線維特異的な電気刺激を用いて、Aδ線維および Aβ線維の閾値低下 (痛覚過敏) を見出した。このことから ProTαは視床領域において、通常時より疼痛閾値に対し何らかの制御に関わっていることが示唆された (図 7)。

D. 考察

当該年度における重要な研究の進展は、①線条体特異的 ProTα欠損マウスの無症候性虚血における障害悪化を組織学的、運動学的に明らかにした、②大脳皮質・海馬領域特異的 ProTα欠損マウスの虚血依存的な精神異常を明らかにした点である。線条体特異的 ProTα欠損マウスにおいては薬剤投与による生存率の回復、運動機能の改善を見出し、後遺症モデルの正当性のみならず治療評価系としての有用性も検証することが出来た。本研究により得られた成果は、知的財産化および論文として報告することを計画している。

E. 結論

当該年度までに、部位特異的 ProTα欠損マウスの作製、神経脆弱性、機能障害、薬剤による機能回復の解析について全て完了した。本研究ではハンチントン病様の脳梗塞後遺症モデルおよび高次脳機能障害モデル等の作製に成功し、さらに既存薬剤による症状の改善効果を見出した。このことはこれらのモデル動物が創薬スクリーニングに応用できることを示している。脳梗塞後遺症モデルとしての正当性が証明されたことより、今後脳梗塞後遺症モデル動物としての活用、および新たな治療薬開発への応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **植田弘師**; ネクローシスを抑制する脳保護タンパク質プロサイモシンα, *日薬理誌* 2010, 135(5) 219

2. 学会発表

1. **Ueda H, Matsunaga H**; Prothymosin a: novel neuroprotective polypeptide against ischemic

damages, The 84th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society · The 11th Southeast Asian Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists, 横浜, 2011.3

2. **植田弘師**; 脳虚血及び網膜虚血を保護するプロサイモシンα, 第2回 Neuroprotective Meeting for Young Researcher (NMYR), 東京, 2010.10

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「虚血障害脆弱性モデルマウス」
特許出願準備中

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学的解析-

研究分担者：黒須 洋

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～急性期に神経細胞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錐体外路系障害、高次脳機能障害、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、行動学的解析を行うことにより、脳梗塞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。本年度の研究成果は、以下の3点からなる。

1. 線条体領域特異的ProTα欠損マウス (ProTα^{flox/flox}; Gng7-Cre) の無症候性虚血条件下において、対照群のマウスと比較し、生存率の低下と運動機能障害の増悪が認められた。
2. 線条体領域特異的ProTα欠損マウス (ProTα^{flox/flox}; Gng7-Cre) の無症候性虚血条件下において認められる生存率の低下と運動機能障害の増悪が、ドパミン受容体刺激薬およびMAO-B阻害薬の投与により顕著に改善することを明らかにした。
3. 大脳皮質・海馬領域特異的ProTα欠損マウス (ProTα^{flox/flox}; Emx1-Cre) の血栓生成による無症候性虚血条件下において、虚血依存的な精神異常を観察した。

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。その研究計画は、①部位特異的ProTα欠損マウスの作製、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薬剤による部位特異的ProTα欠損マウスの機能回復である。当該年度における本分担研究は、部位特異的ProTα欠損マウスにおける脳卒中後遺症解析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^{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 マウスと Gng7^{-/-} 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 PCR 法により判定した。プライマーは以下のものを用いた。ProTα^{flox/flox} 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 (t-MCAO) 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。15 分間閉塞状態を維持した後塞栓子を除去、切開部位を縫合し、麻酔からさめるまで 37°C の恒温台に静置した。

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 分間照射することで、中大脳動脈内に血栓を形成し、支配領域に脳梗塞を引き起こした。

5) 行動機能学的解析法

5-1. 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。

5-2. Fear conditioning test

1 日目は獲得試行として、180×170×398 mm の四角の conditioning chamber のグリッド(26 本、2 mm 径)上にマウスを入れ 2 分後、80 dB、2 kHz の音を 1 分間鳴らし 0.5 mA の電流を 1 sec 流した。1 分おきに音と電流を計 3 回繰り返し、最後の電流を与えて 2 分後にマウスを飼育ケージに戻した。24 時間後に再び同じ四角 chamber にマウスを 6 分間入れ、空間学習機能を評価した。48 時間後には 1 日目と異なる三角の chamber(180×180×180×398 mm、グリッドなし)にマウスを入れて 6 分後、1 日目と同様の音を 3 分間鳴らし、音条件依存的な学習機能を評価した。全ての実験は Video tracking system(Muromachi Kikai)を用いて解析を行った。呼吸以外の動きが完全でない状態を freezing と定義した。

(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) 線条体領域特異的 ProTα欠損マウス (ProTα^{flox/flox}; Gng7-Cre) の無症候性虚血条件下において、生存率の低下と運動機能障害の増悪が認められた。

ProTα^{flox/flox}; Gng7-Cre マウスに無症候性虚血 (15分 tMCAO) 処置を行った結果、対照群のマウスと比較し、生存率の低下および運動機能 (クリニカルスコア、Rota-rod トレッドミル法) が増悪することを明らかにした (図1)。

2) 線条体領域特異的 ProTα欠損マウス (ProTα^{flox/flox}; Gng7-Cre) の無症候性虚血条件下において認められる生存率の低下と運動機能障害の増悪が、ドパミン受容体刺激薬および MAO-B 阻害薬の投与により顕著に改善することを明らかにした。

ProTα^{flox/flox}; Gng7-Cre マウスに無症候性虚血 (15分 tMCAO) 処置を行った際の障害に対する機能回復を、ドパミン神経活動とグルタミン酸神経活動を制御する薬剤投与によって試みた。その結果、これらの薬剤によって生存率の回復と運動機能 (クリニカルスコア、Rota-rod トレッドミル法) が改善されることを明らかとした (図2~5)。

3) 大脳皮質・海馬領域特異的 ProTα欠損マウス (ProTα^{flox/flox}; Emx1-Cre) の血栓生成による無症候性虚血条件下において、虚血依存的な精神異常を観察した。

ProTα^{flox/flox}; Emx1-Cre マウスに血栓生成による無症候性虚血 (15 mg/kg RB PIT モデル) 処置を行った際の学習・精神症状を Fear conditioning test によって解析した。その結果、空間学習、音条件依存的学習ともに高い Freezing を示すことを明らかとした。この結果から、ProTα^{flox/flox}; Emx1-Cre マウスに無症候性虚血を行うことで、不安等の精神症状が発現することが分かった (図6)。

D. 考察

当該年度において、線条体特異的 ProTα欠損マウスの無症候性虚血における障害悪化を組織学的、運動学的に明らかとし、大脳皮質・海馬領域特異的 ProTα欠損マウスの虚血依存的な精神異常を明らかにした。線条体特異的 ProTα欠損マウスにおいては薬剤投与による生存率の回復、運動機能の改善を見出し、後遺症モデルの正当性のみならず治療評価系としての有用性も検証することが出来た。

E. 結論

当該年度までに、部位特異的 ProTα欠損マウスの作製、神経脆弱性、機能障害、薬剤による機能回復の解析について全て完了した。脳梗塞後遺症モデルとしての正当性も証明され、今後脳梗塞後遺症モデル動物としての活用が大いに期待される。3年間にわたる本研究により、脳梗塞研究の基礎的解析ツールを提供でき、新たな治療薬開発への応用が期待される。

F. 健康危険情報

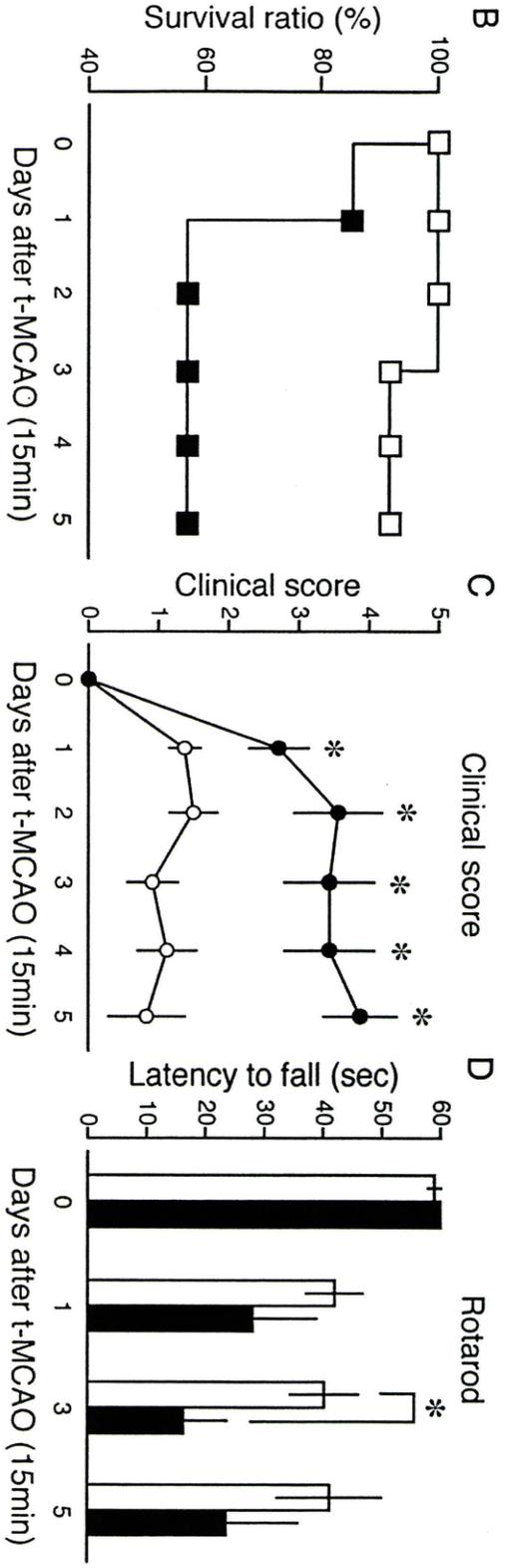
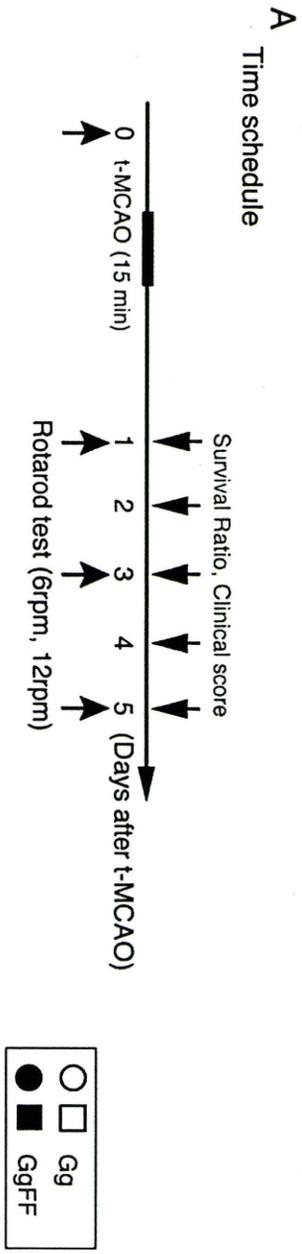
なし

G. 研究発表

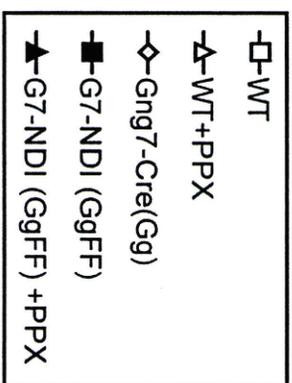
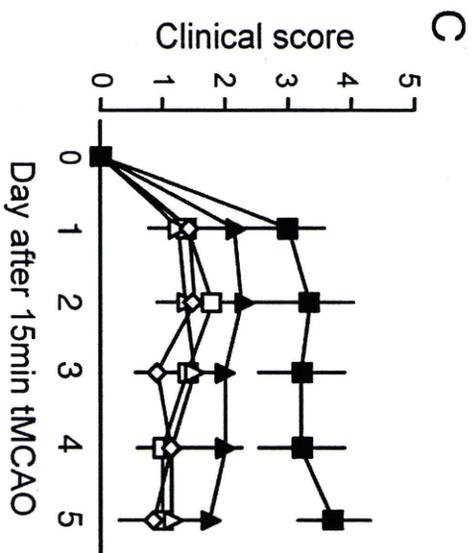
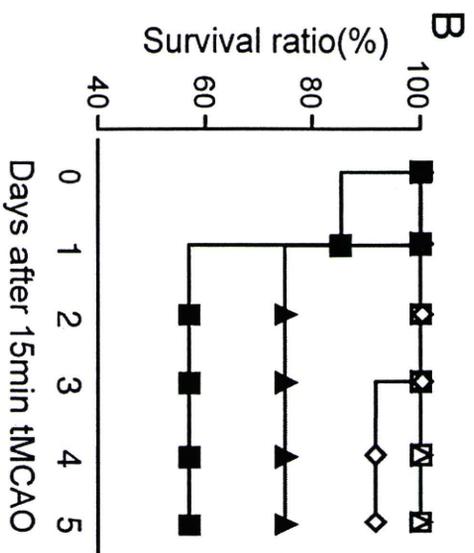
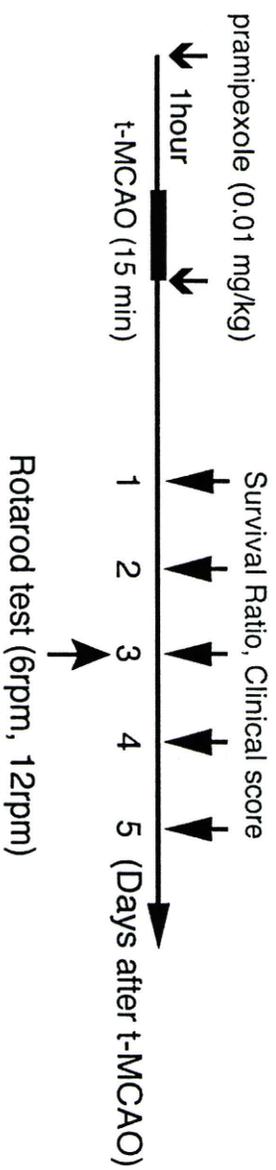
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

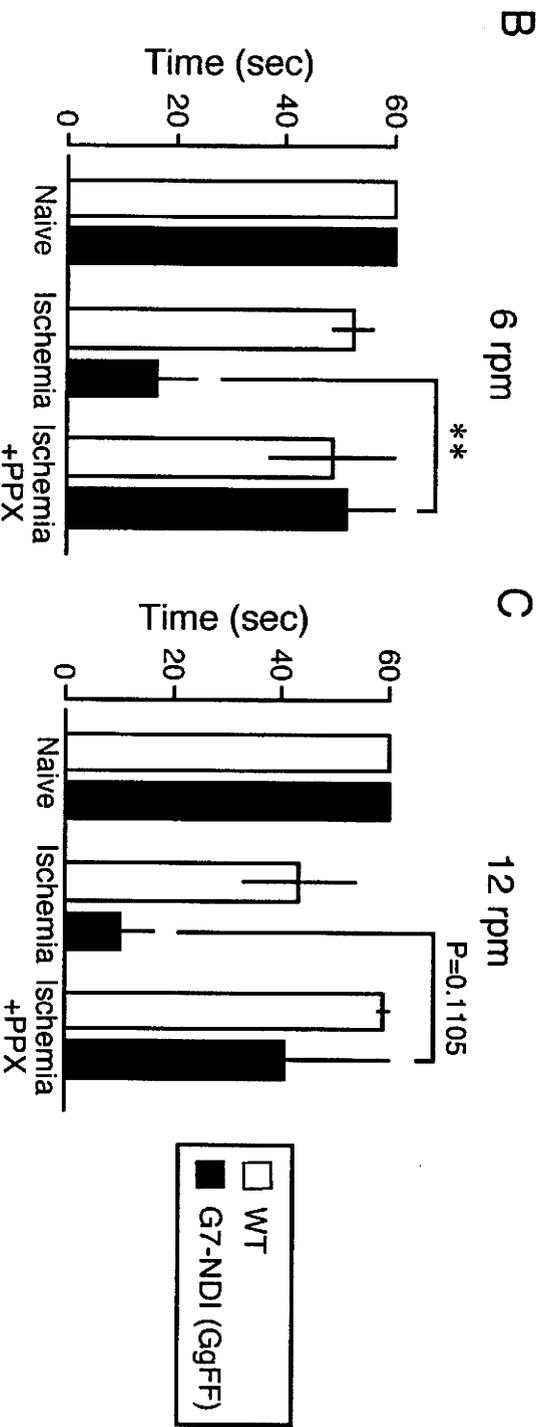
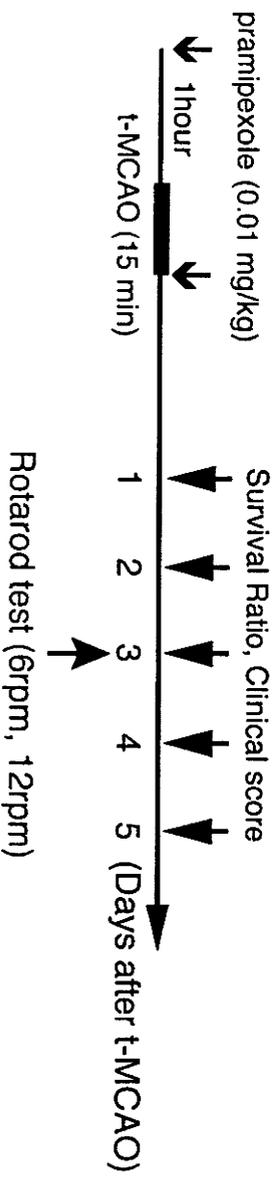
なし



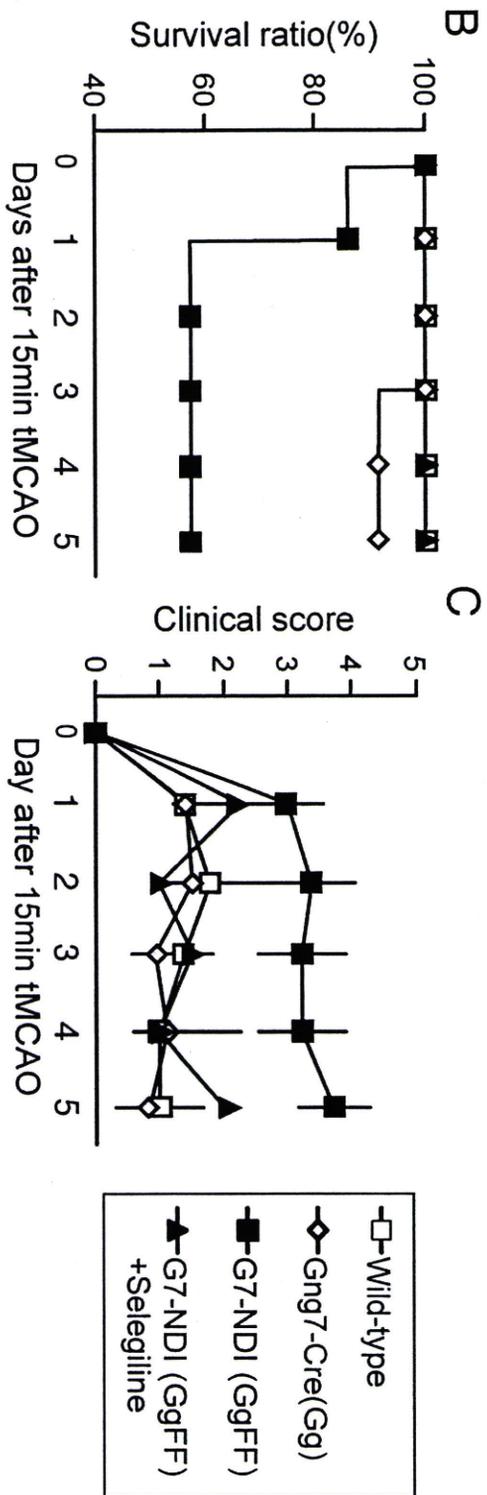
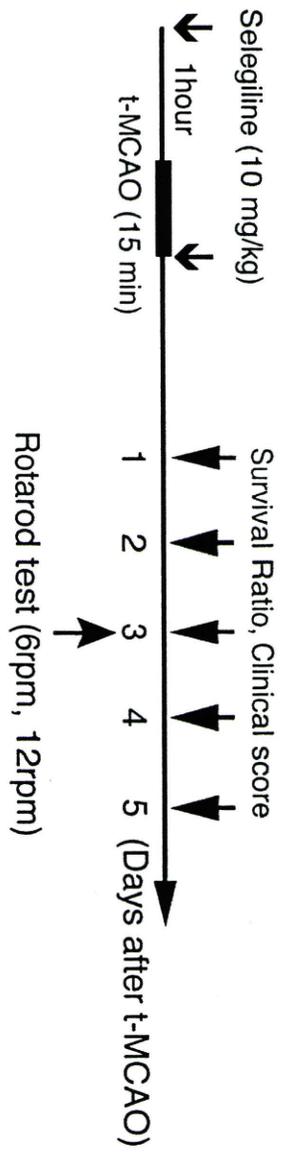
A Time schedule



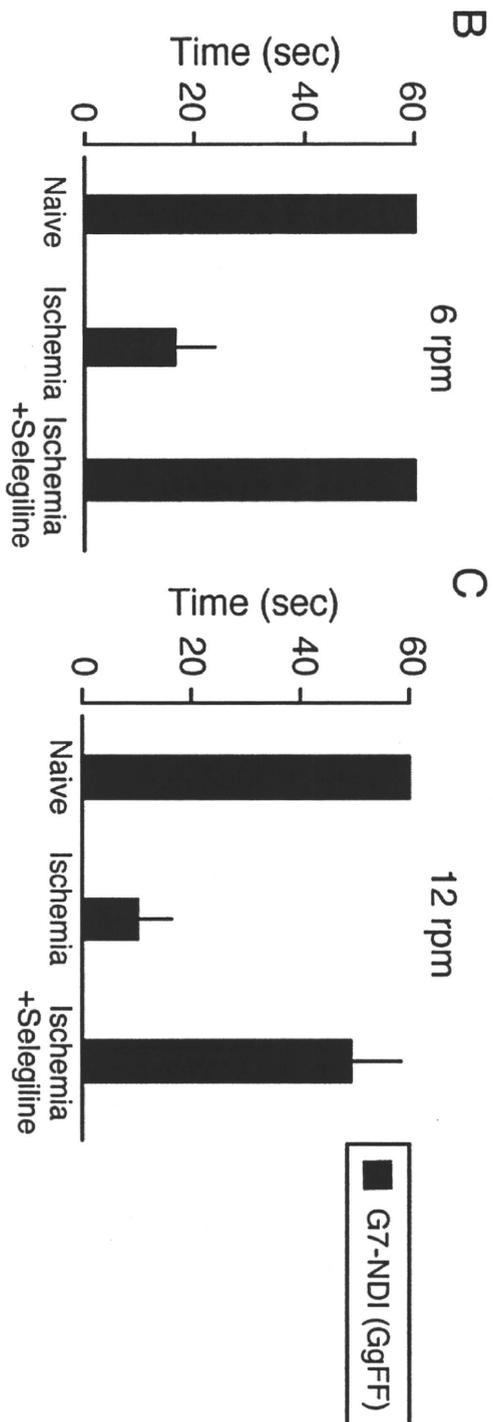
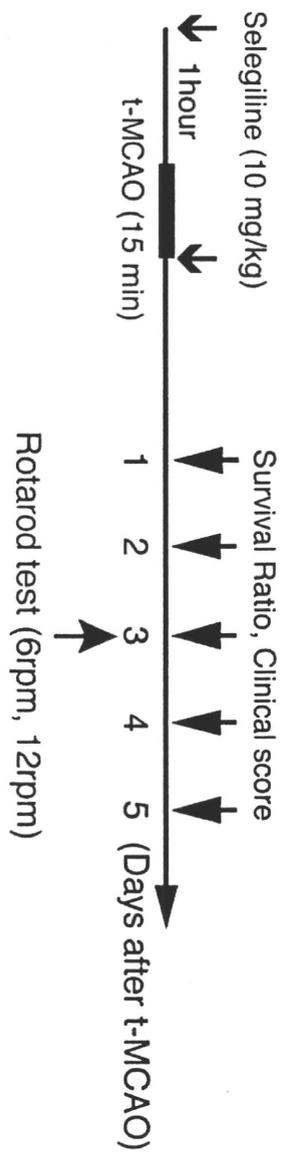
A Time schedule



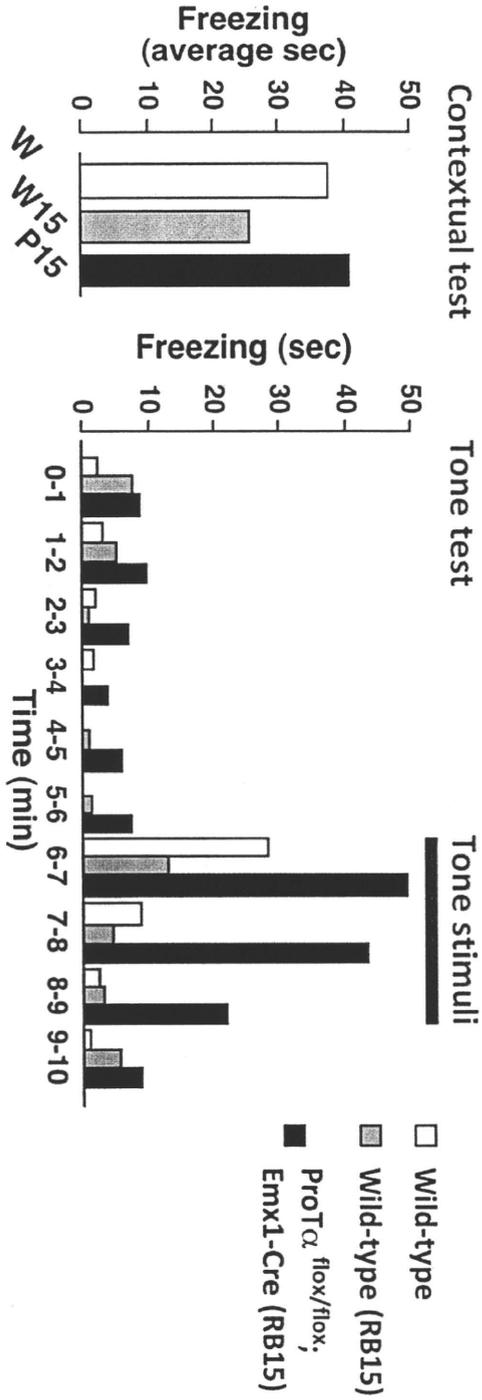
A Time schedule



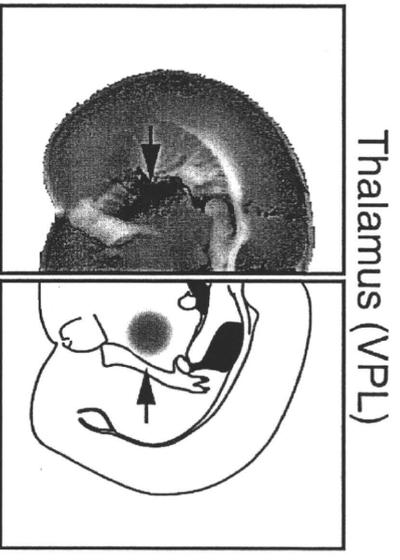
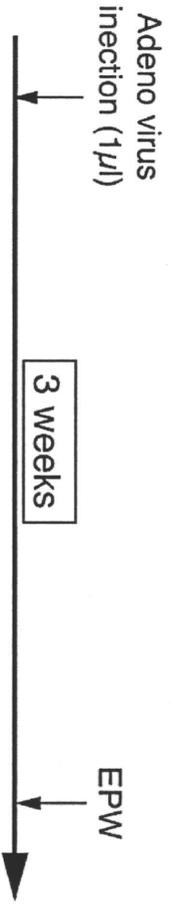
A Time schedule



Fear-conditioning test

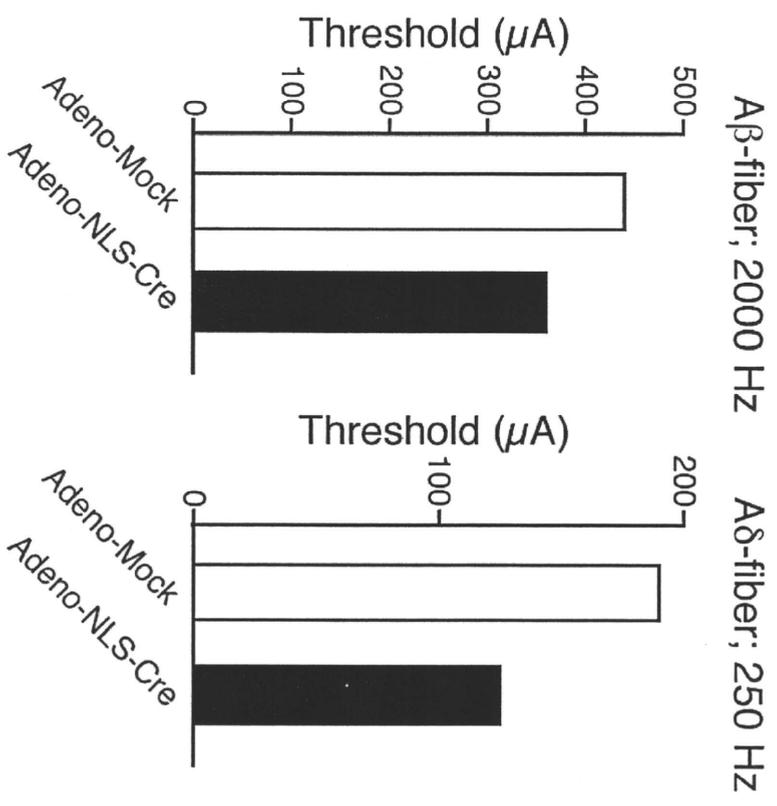


Microinjection



Evans Blue (1mg/ml), 1µl injection

- Adeno virus
- Adeno-Mock; $1 \times 10^{12} < \text{PFU/ml}$
- Adeno-NLS-Cre; $1 \times 10^{12} \text{ PFU/ml}$



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
植田弘師	ネクロシスを抑制する脳保護タンパク質プロサイモシン α	<i>日薬理誌</i>	135	219	2010

S3C33-1 Anti-high mobility group box1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction

Hideo Takahashi¹, Shuji Mori², Masahiro Nishibori¹

¹Dept. Pharmacol., Okayama Univ. Grad. Sch. Med., Dent. & Pharm. Sci., 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan, ²Dept. Pharmacy, Shujitsu Univ., 1-6-1 Nishigawahara, Okayama, Japan.

High mobility group box1 (HMGB1), originally identified as an architectural nuclear protein, exhibits an inflammatory cytokine-like activity in the extracellular space. Here we show that treatment with anti-HMGB1 monoclonal antibody (mAb) remarkably ameliorated brain infarction induced by 2-h occlusion of the middle cerebral artery in rats, even when the mAb was administered after the start of reperfusion. Consistent with the 90% reduction in infarct size, the accompanying neurological deficits in locomotor function were significantly improved. mAb inhibited the increased permeability of the activation of microglia, the expression of TNF-alpha and iNOS, and suppressed activity of MMP-9. Immunohistochemical study revealed that HMGB1 immunoreactivity in the cell nuclei decreased or disappeared in affected areas, suggesting the release of HMGB1 into the extracellular space. Anti-HMGB1 mAb efficiently inhibited the development of brain edema through the protection of blood-brain barrier (BBB) structure in the early reperfusion phase following focal ischemia of brain tissue. These results indicate that anti-HMGB1 mAb inhibits the development of brain infarction through the protection of BBB structure in the ischemic region.

S3C33-3 Prothymosin α : a novel neuroprotective polypeptide against ischemic damages

Hiroshi Ueda, Hayato Matsunaga

Div. Mol. Pharmacol. & Neurosci., Nagasaki Univ. Grad. Sch. of Biomed. Sci., 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

In stroke, both necrotic and apoptotic neuronal cell death cause the loss of functions that include memory, sensory perception and motor skills. Since necrosis potentially expands cell death, while apoptosis restricts the spread of irretrievable damage, neuronal necrosis is considered to be a principle target for the rapid treatment of stroke. Prothymosin α (ProT α), a highly acidic nuclear protein that lacks signal peptide, was isolated from the conditioned medium after serum-free culture of cortical neurons and found to convert a cell death mode switch from necrosis to apoptosis. Indeed, ProT α administered via systemic routes markedly inhibited the functional and histological damages induced by cerebral and retinal ischemia. Although ProT α converted a cell death mode switch from necrosis to apoptosis *in vivo*, the ProT α -induced apoptosis was found to be completely inhibited by brain-derived neurotrophic factor or erythropoietin produced in the ischemic brain. Analysis in terms of the therapeutic time window and potency suggest that ProT α could be the prototypic compound to develop the medicine, and ProT α signaling may also be an important novel therapeutic strategy useful for the treatment of stroke.

S3C33-2 Therapeutic potential of non-psychoactive cannabidiol in ischemic stroke

Kazuhide Hayakawa^{1,2}, Kenichi Mishima¹, Eng H. Lo², Katsunori Iwasaki¹, Michihiro Fujiwara¹

¹Dept. Neuropharmacol., Fukuoka Univ., 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan, ²MGH-Harvard, MGH-149, Charlestown, MA02129

Cannabis contains the psychoactive component delta9-tetrahydrocannabinol (delta9-THC), and the non-psychoactive components cannabidiol (CBD), cannabinol, and cannabigerol. It is well-known that delta9-THC and other cannabinoid CB1 receptor agonists are neuroprotective during global and focal ischemic injury. Additionally, delta9-THC also mediates psychological effects through the activation of the CB1 receptor in the central nervous system. In addition to the CB1 receptor agonists, cannabis also contains therapeutically active components which are CB1 receptor independent. Of the CB1 receptor-independent cannabis, the most important is CBD. In the past five years, an increasing number of publications have focused on the discovery of the anti-inflammatory, anti-oxidant, and neuroprotective effects of CBD. In particular, CBD exerts positive pharmacological effects in ischemic stroke. The cerebroprotective action of CBD is CB1 receptor-independent, long-lasting, and has potent anti-oxidant activity. Importantly, CBD use does not lead to tolerance. Among cannabis compounds, CBD may represent a very promising agent with the highest prospect for therapeutic use for ischemic stroke.

S3C33-4 Understanding the mechanisms of actions of neuroprotective compounds in animal stroke models

Kazuya Hokamura, Kazuo Umemura

Dept. Pharmacol., Hamamatsu Univ. Sch. Med., 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, Japan

Stroke is the third leading cause of death in Japan accounting for approximately 10% of all deaths. Intravenous t-PA has been approved for treating acute ischemic stroke, but delayed treatment is associated with increased risk of cerebral haemorrhagic transformation. In light of this background, there is a need for novel drugs for treating stroke. We investigated the effects of two new compounds, which have neuroprotective actions. In this symposium, we will share with you their mechanisms of actions, which we have investigated in animal stroke models. One of the two compounds is GIF-0173, a derivative of prostaglandin J2. GIF-0173 reduced the infarct size by 40% in a cerebral thrombosis model. The neuroprotection was via activation of prostaglandin D1 receptor, which upregulates the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase pump activity in endoplasmic reticulum leading to reduction of free cytoplasmic calcium. Another compound we investigated is Ginkgolide B (GB). The reduction of infarct size by GB was 34% in animal stroke models. It protected neurons by reducing intracellular calcium influx through an NMDA receptor during excitotoxicity. The two compounds are potential candidates for the treatment of stroke.

ネクローシスを抑制する脳保護タンパク質プロサイモシン α

植田 弘師

脳梗塞性脳卒中の(超)急性期には、コアとよばれる梗塞中心部の神経はネクローシス性の細胞死に陥り、神経細胞内からの細胞毒性物質の放出により二次的ネクローシスが誘発される。アポトーシス性の遅延性細胞死が観察されるコア周辺領域(ペナンブラ)が治療標的とされるが、最近ではアポトーシス抑制薬にはあまり顕著な効果が認められないこともあり、血栓溶解剤を用いた(超)急性期治療が重要視されている。アポトーシスに比べてネクローシスのメカニズムに関する研究はあまり多くないため、神経細胞死を標的とした治療には余り注目されてこなかったが、筆者らは培養神経細胞上清からネクローシス抑制タンパク質プロサイモシン α を発見し(1)、このタンパク質が脳梗塞性脳卒中モデルにおいて著効を示すことを見出したので、関連する最近の話題とともに紹介する(2,3)。このタンパク質は細胞核に局在する酸性のタンパク質であるが、ネクローシスを誘発させる無血清飢餓あるいは虚血性ストレス性の細胞ストレス時に細胞質局在を経ずに神経細胞から直接放出される。このようなストレス時には神経細胞膜に局在するグルコーストランスポーター1/4が急速に内在化し、続いてATP酸性低下によるエネルギー危機とそれに続くネクローシスが誘発される。プロサイモシン α を虚血ストレス前に添加すると、G_{i/o}タンパク質受容体、ホスホリパーゼC、プロテインキナーゼCの活性化を介してこのトランスポーター内在化が抑制され、ストレス後添加においても一旦内在化したトランスポーターの再膜局在化、結果としてネクローシス抑制が誘発される。プロサイモシン α は同様な機構を介して、培養条件下では遅延性のアポトーシス様の細胞応答を誘発するが、その意義はカスパーゼ3の活性化によるポリADPリボースポリメラーゼ分解がATP消費抑制につながり結果としてネクローシス抑制に働き、ネクローシス誘発までの時間稼ぎをすることであろうと考えられる(図)。培養条件下ではアポトーシス抑制性の神経栄養因子を添加することで、細胞死は完全に抑制されることから、プロサイモ

シン α は制御不能なネクローシス性細胞死から制御可能なアポトーシスにモード変換させる分子であるとも言えるであろう。In vivoでは虚血時に発現増加するアポトーシス抑制性の神経栄養因子の働きがあるので、プロサイモシン α の全身投与により脳虚血によるネクローシスとアポトーシス性の神経細胞死のいずれもが抑制され、強力な虚血脳保護作用が観察された。その活性は顕著であり、中大脳動脈の結紮後3時間の1回全身投与により脳組織障害や運動障害がほぼ完全に抑制されたという結果が得られている(4)。培養細胞で観察されるような細胞死モード変換と神経栄養因子によるアポトーシス抑制現象は網膜虚血時にも観察され、硝子体内へのBDNF抗体投与によりアポトーシス増加が認められている(5)。またこのモデルにおいてプロサイモシン α 抗体やアンチセンス投与により、網膜虚血障害悪化が観察されることから、プロサイモシン α は虚血時の内在性神経保護分子であることが明らかとなった(5)。

著者らはプロサイモシン α のストレス性非古典的細胞外放出機構や受容体機構などにも手がかりを得ていることから、創薬という視点からさらなる研究発展を計画中である。

文 献

- 1) Ueda H, et al. J Cell Biol. 2007;176:853-862.
- 2) Ueda H. Pharmacol Ther. 2009;123:323-333.
- 3) 植田弘師. Medical Bio. 2008;5:83-89.
- 4) Fujita R, et al. Cell Death Differ. 2007;14:1839-1842.
- 5) Fujita R, et al. Cell Death Differ. 2009;16:349-358.

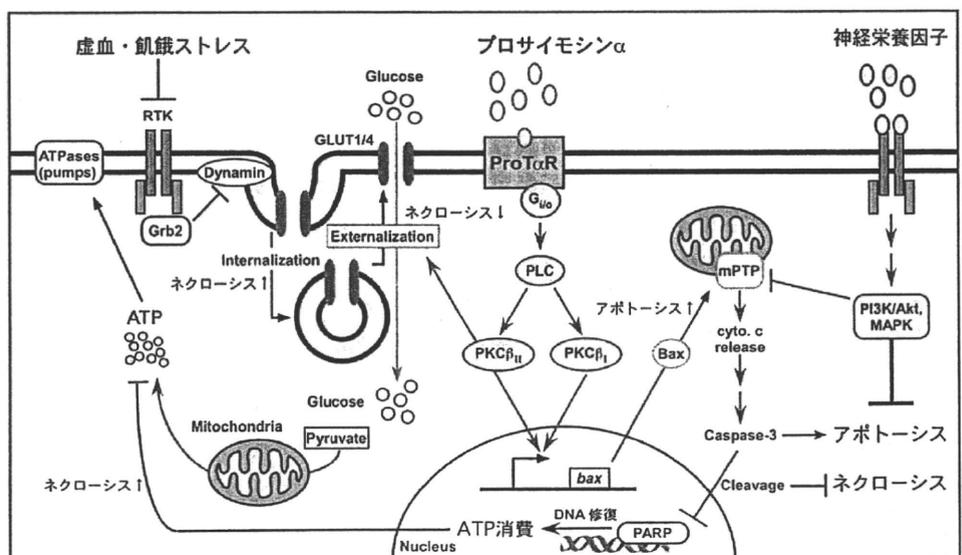


図 プロサイモシン α の神経細胞死保護機構