

201008006B

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20～22年度 総合研究報告書

研究代表者 植田 弘師

平成23(2011)年 5月



目次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	19

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総合研究報告書

## 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（Pro $\alpha$ ）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Pro $\alpha$ 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Pro $\alpha$ 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。本研究の成果は、主に以下12点からなる。

1. 線条体領域特異的Pro $\alpha$ 欠損マウス（Pro $\alpha^{\text{flox/flox}}$ ;Gng7-Cre）を作製し、Pro $\alpha$ が発現消失すること、および一般行動に以上がないことを明らかにした。
2. 大脳皮質・海馬領域特異的Pro $\alpha$ 欠損マウス（Pro $\alpha^{\text{flox/flox}}$ ;Emx1-Cre）を作製し、Pro $\alpha$ が発現消失すること、および一般行動に以上がないことを明らかにした。
3. 塞栓子または血栓生成による無症候性虚血の条件、およびLTP減少評価法を確立した。
4. 中枢神経系における内在性Pro $\alpha$ の発現分布を明らかとした。
5. Pro $\alpha$ 欠損マウス（Hetero）における知覚受容閾値を評価した。
6. 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を行った。
7. 線条体および視床領域特異的Pro $\alpha$ 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に成功した。
8. 線条体領域特異的Pro $\alpha$ 欠損マウス（Pro $\alpha^{\text{flox/flox}}$ ;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。
9. 線条体領域特異的Pro $\alpha$ 欠損マウス（Pro $\alpha^{\text{flox/flox}}$ ;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。
10. 大脳皮質・海馬領域特異的Pro $\alpha$ 欠損マウス（Pro $\alpha^{\text{flox/flox}}$ ;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。また血栓生成による無症候性虚血では、虚血依存的な精神異常を観察した。
11. Pro $\alpha^{\text{flox/flox}}$ 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Pro $\alpha$ 欠損マウスを作製した。このマウス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悪化が認められた。
12. Pro $\alpha^{\text{flox/flox}}$ 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、視床領域特異的Pro $\alpha$ 欠損マウスを作製した。このマウス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、神経障害性疼痛様の疼痛閾値の変調が観察された。

## 分担研究者

藤田 亮介 (H20年度)

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 (H20年度)

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

内田 仁司 (H21年度)

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 (H21年度)

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  
技能補佐員

黒須 洋 (H22年度)

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～急性期に神経を強力に保護する核蛋白質プロサイモシン・アルファ (Prothymosin  $\alpha$ : ProT $\alpha$ ) 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 ProT $\alpha$ 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 ProT $\alpha$ 欠損マウスの作製、②部位特異的 ProT $\alpha$ 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 ProT $\alpha$ 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)、ProT $\alpha$ <sup>flx/flx</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。

ProT $\alpha$  (Hetero) マウス

ProT $\alpha$ <sup>flx/flx</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) 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。

#### 4) 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 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)、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、人工脳脊髄液あるいはアデノウイルスの空ベクターを投与した。

#### 5) MED 解析装置を用いた海馬切片における LTP 減少解析

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 $\mu$ 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。

#### 6) 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。

#### 7) 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。

#### 8) 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。

#### 9) 行動機能学的解析法

##### 9-1. 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。

##### 9-2. 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当て、機械刺激からの逃避反応を起こす閾値 (Paw Withdrawal Latency;PWL) を測定した。実験には、正常な動物で 10-12g 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 20g に設定した。

### 9-3.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 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。

### 9-4. 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。

### 9-5. 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。

### 9-6. 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 回繰り返す、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にない状態を freezing と定義した。

### 10) 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 ProTα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。

### 11) 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、ネクロー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1mmの環状切片を作成し、PI/DMEM(10 $\mu$ g/ml)で37 $^{\circ}$ 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 $\mu$ 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。

### 12) 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'

### 13) 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)

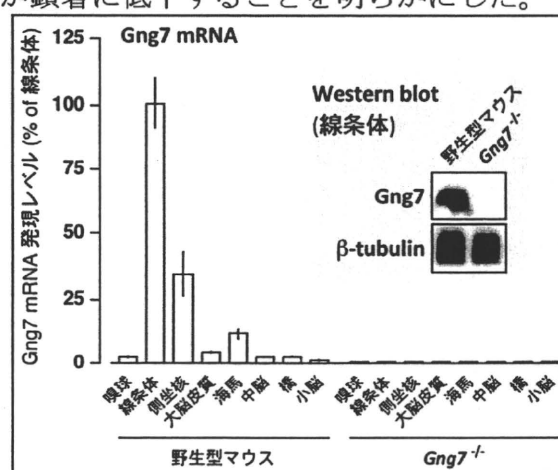
本実験は長崎大学動物実験委員会の承認(承認番号0706130596)および、長崎大学組換えDNA実験委員会の承認(承認番号0705070877)を受け、実施している。

## C. 研究結果

1) 線条体領域特異的 ProT $\alpha$ 欠損マウス (ProT $\alpha$ <sup>flx/flx</sup>;Gng7-Cre)を作製し、ProT $\alpha$ が発現消失すること、および一般行動に以上がないことを明らかにした。

Gng7-Cre ノックインマウスと ProT $\alpha$ <sup>flx/flx</sup>の交配を行い、Gng7-Cre; ProT $\alpha$ <sup>flx/+</sup>の出生を確認した。さらにGng7-Cre; ProT $\alpha$ <sup>flx/+</sup>同士を交配し、得られた仔の解析を行い、ProT $\alpha$ <sup>flx/flx</sup>;Gng7-Creの出生を確認した。解析にはPCR法による解析を用い、ProT $\alpha$ 欠損を確認している。以後はProT $\alpha$ <sup>flx/flx</sup>;Gng7-Creマウスの増産と維持を行った。

また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、ProT $\alpha$ <sup>flx/flx</sup>;Gng7-Creマウスの線条体では、ProT $\alpha$ の蛋白質発現が顕著に低下することを明らかにした。



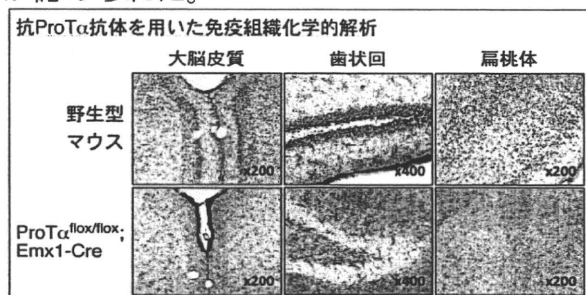
さらに、非虚血時のProT $\alpha$ <sup>flx/flx</sup>;Gng7-Creマウスでは、1)自発運動を含む一般行動、2)フットプリント法により評価した歩行機能、3)Rota-rodトレッドミル法により

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。

2) 大脳皮質・海馬領域特異的 ProTα欠損マウス (ProTα<sup>flox/flox</sup>;Emx1-Cre) を作製し、ProTαが発現消失すること、および一般行動に以上がないことを明らかにした。

Emx1-cre トランスジェニックマウスと Floxed ProTα ノックインマウス (ProTα<sup>flox/flox</sup>) の交配を行い、Emx1-Cre;ProTα<sup>flox/+</sup> の出生を確認した。さらに Emx1-Cre;ProTα<sup>flox/+</sup> 同士を交配し、得られた仔の解析を行い ProTα<sup>flox/flox</sup>;Emx1-Cre の出生を確認した。解析には PCR 法を用い、ProTα 欠損を確認している。以後は ProTα<sup>flox/flox</sup>;Emx1-Cre マウスの増産と維持を行った。

また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。

3) 塞栓子または血栓生成による無症候性虚血の条件、および LTP 減少評価法を確立した。

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。

また血栓生成に伴う中大脳動脈閉塞モデルも確立した。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。

一方、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ている 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出来た。

4) 中枢神経系における内在性 ProTαの発現分布を明らかとした。

抗 ProTα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 ProTαタンパク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 ProTαタンパク質の発現を確認した。さらに、ヘキスト染色を用いてカウンターステインを行い、ProTα発現と比較しながら再評価を行った所、全細胞において ProTαタンパク質の発現を認めることが出来た。

#### 5) ProTα欠損マウス (Hetero) における知覚受容閾値を評価した。

部位特異的 ProTα欠損マウスの作製に先立って、ProTα (Hetero) 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 ProTα (Hetero) 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。

#### 6) 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を行った。

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。

#### 7) 線条体および視床領域特異的 ProTα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に成功した。

視床領域特異的 ProTα欠損マウスの作製に必要な 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高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み替えを終了し、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 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。

#### 8) 線条体領域特異的 ProTα欠損マウス (ProTα<sup>flox/flox</sup>; 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<sup>flox/flox</sup>; 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)。

#### 9) 線条体領域特異的 ProTα欠損マウス (ProTα<sup>flox/flox</sup>; 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<sup>flox/flox</sup>; 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)。

#### 10) 大脳皮質・海馬領域特異的 ProTα欠損マウス (ProTα<sup>flox/flox</sup>; 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。また、血栓生成による無症候性虚血では虚血依存的な精神異常を観察した。

ProTα<sup>flox/flox</sup>; 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。

また、ProTα<sup>flox/flox</sup>; 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<sup>flox/flox</sup>; 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)。

**11) ProTα<sup>flox/flox</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。

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 (図8)。

**12) ProTα<sup>flox/flox</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、神経障害性疼痛様の疼痛閾値の変調が観察された。

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疼痛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。

また3年目には詳細な解析のため、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、疼痛閾値の変調を観察した。上述のアデノウイルス投与2週間後に虚血をした際と同様、Neurometer<sup>®</sup>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

当該年度をもって、当初計画していた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を全て完了した。部位特異的 ProTα欠損マウスの作製と同時に、脳梗塞後遺症解析に必要となる無症候性虚血や Fear conditioning test 等の手法も確立することが出来た。

線条体特異的 ProTα欠損マウスにおいては、無症候性虚血時の障害悪化を明らかとし、更に薬剤投与による生存率の回復、運動機能の改善効果を見出した。この結果から、



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。

大脳皮質・海馬特異的 ProT $\alpha$ 欠損マウスにおいては、無症候性虚血時の精神症状を明らかにし、視床領域特異的 ProT $\alpha$ 欠損マウスにおいては、無症候性虚血時の神経因性疼痛様の疼痛閾値の変調を明らかにした。これらの結果は、脳梗塞後遺症である情緒障害や慢性疼痛と一致する。

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 ProT $\alpha$ 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を全て完了した。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治療により改善効果を見出した。このことはこれらのモデル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法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; ネクロシスを抑制する脳保護タンパク質プロサイモシン $\alpha$ ; *日薬理誌* 2010, 135(5) 219
2. 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.
3. 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, 17(11): 1760-1772.

4. Ueda H; Prothymosin alpha and cell deathmode switch, a novel target for the prevention of cerebral ischemia-induced damage. *Pharmacol Ther* 2009, 123: 323-33.
5. Fuhita R, Ueda M, Fujikawa K, Ueda H. Prothymosin-alpha plays a defensive role in role in retinal ischemia through necrosis and apoptosis inhibition. *Cell Death Differ* 2009, 16(2):349-358

### 2. 学会発表

1. Ueda H, Matsunaga H; Prothymosin a: novel neuroprotective polypeptide against ischemic damages, The 84<sup>th</sup> 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 $\alpha$ , 第2回 Neuroprotective Meeting for Young Researcher (NMYR), 東京, 2010.10
3. 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)
4. 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 $\alpha$ , 九州薬学フォーラム, 東京都渋谷区, 2009.11
5. 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 $\alpha$ の脳保護作用, 第62回薬理学会西南部

- 会, 松山, 2009.11
6. 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 $\alpha$ の長時間型有用性, 第 62 回薬理学会西南部会, 松山, 2009.11
  7. 黒須 洋、植村 朋香、藤村 一輝、植田 弘師 ; プロサイモシン $\alpha$ によるミクログリア活性化機構の解析, 第 62 回薬理学会西南部会, 松山, 2009.11
  8. 植田 弘師 ; Prothymosin  $\alpha$ によるアポトーシス誘導を介した神経ネクローシス抑制, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学大会 合同大会 (BMB2008), 神戸ポートアイランド, 2008.12
  9. 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  $\alpha$ による PKC $\beta$ 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 回日本生化学大会 合同大会 (BMB2008), 神戸ポートアイランド, 2008.12
  10. 植村 朋香、藤田 亮介、植田 弘師 ; Prothymosin  $\alpha$ による PKC $\beta$ 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 回日本生化学大会 合同大会 (BMB2008), 神戸ポートアイランド, 2008.12
  11. 山崎 達朗、藤田 亮介、植田 弘師 ; 新規脳保護分子 Prothymosin  $\alpha$ によるラット一過性脳卒中障害の改善, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学大会 合同大会 (BMB2008), 神戸ポートアイランド, 2008.12
  12. 米窪 沙織、藤田 亮介、植田 弘師 ; Prothymosin  $\alpha$ 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 回日本生化学大会 合同大会 (BMB2008), 神戸ポートアイランド, 2008.12
  13. 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  $\alpha$ の可能性, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学大会 合同大会 (BMB2008), 神戸ポートアイランド, 2008.12

14. 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  $\alpha$ による PKC $\beta$ 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 回日本生化学大会 合同大会 (BMB2008), 神戸ポートアイランド, 2008.12

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

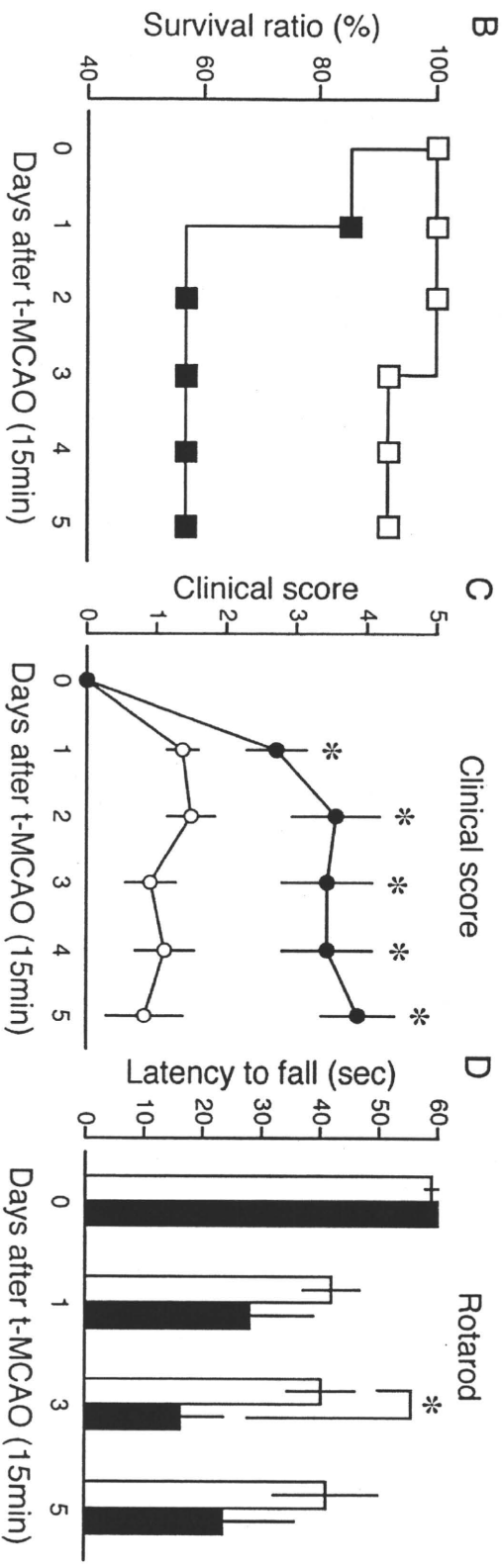
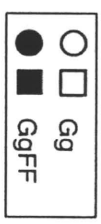
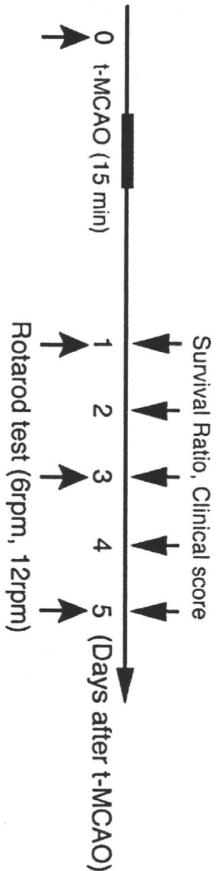
##### 1. 特許取得

1. 「虚血障害脆弱性モデルマウス」  
特許出願準備中
2. 「血液脳関門障害改善薬」  
特願 2009-185816

##### 2. 実用新案登録 なし

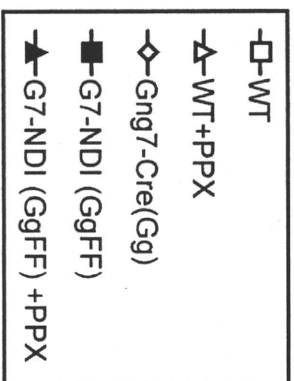
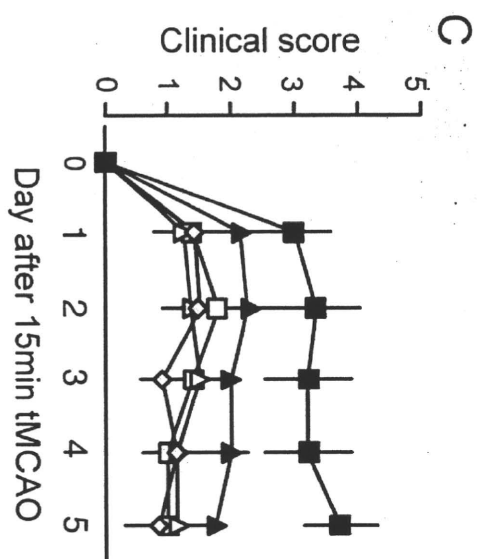
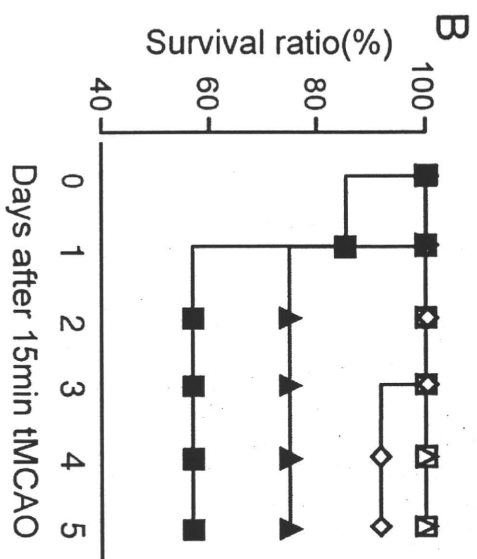
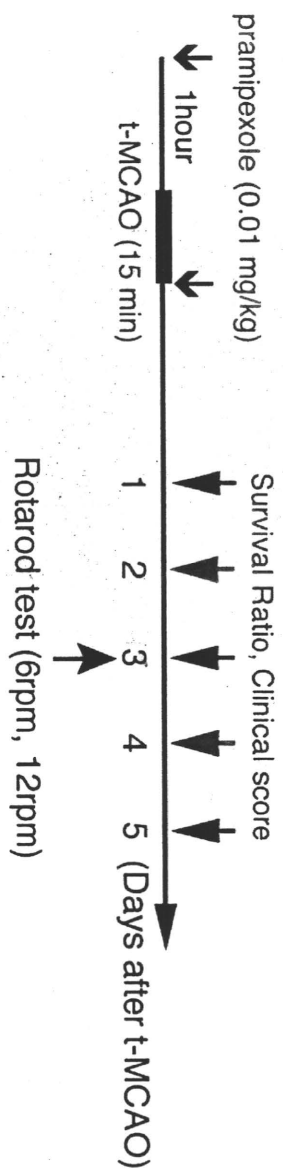
##### 3. その他 なし

**A**  
Time schedule

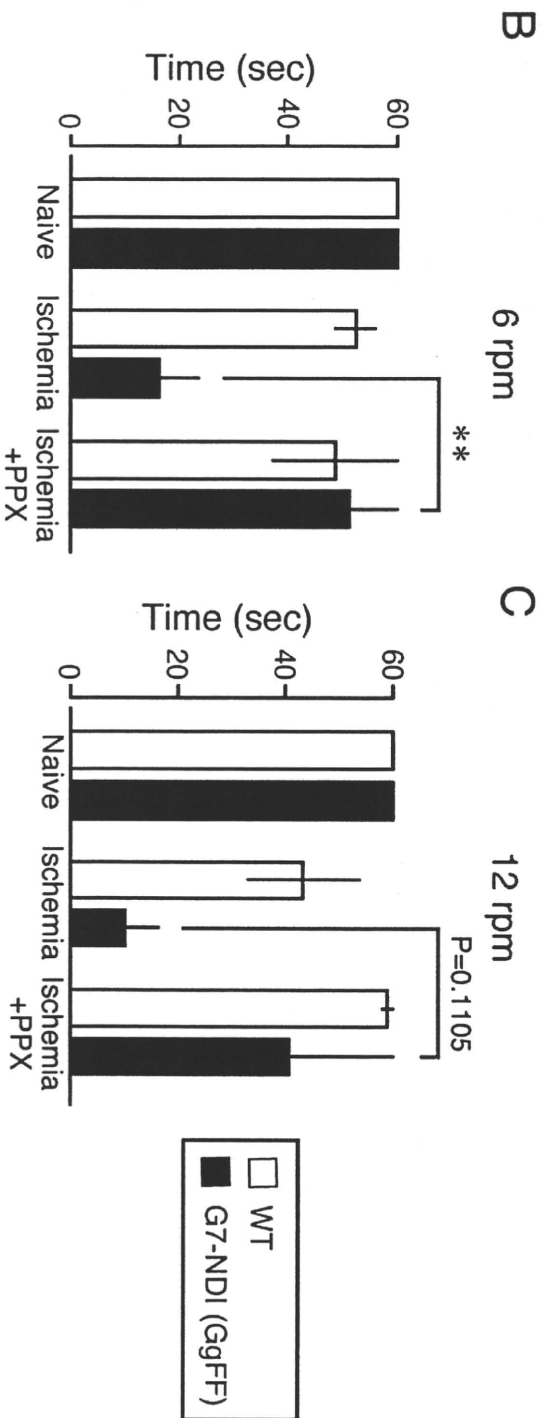
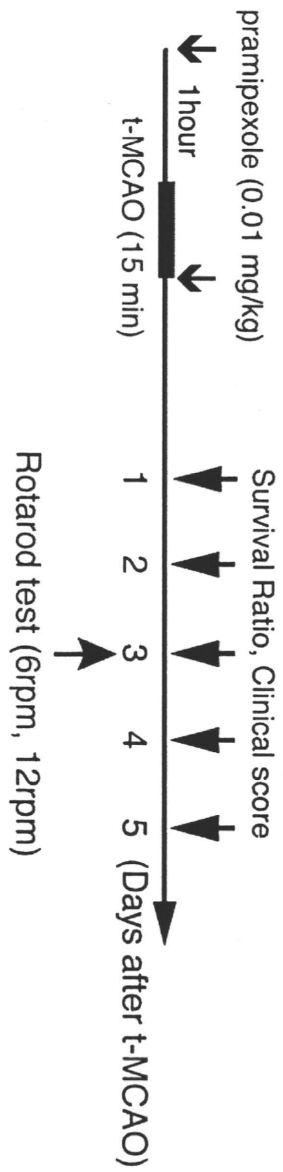




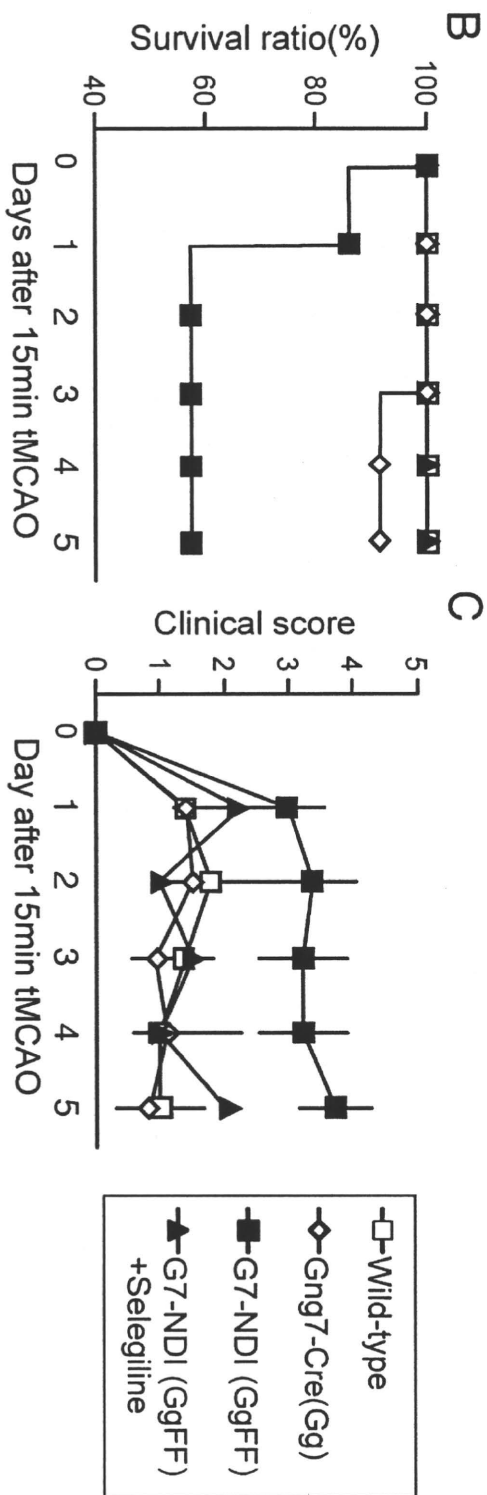
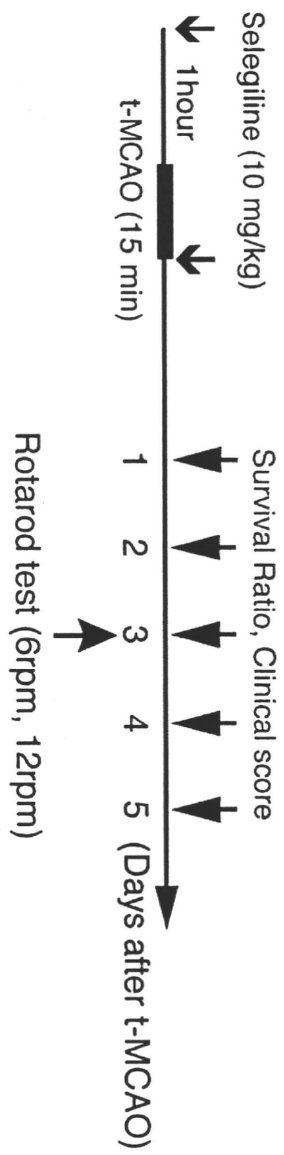
### A Time schedule



### A Time schedule

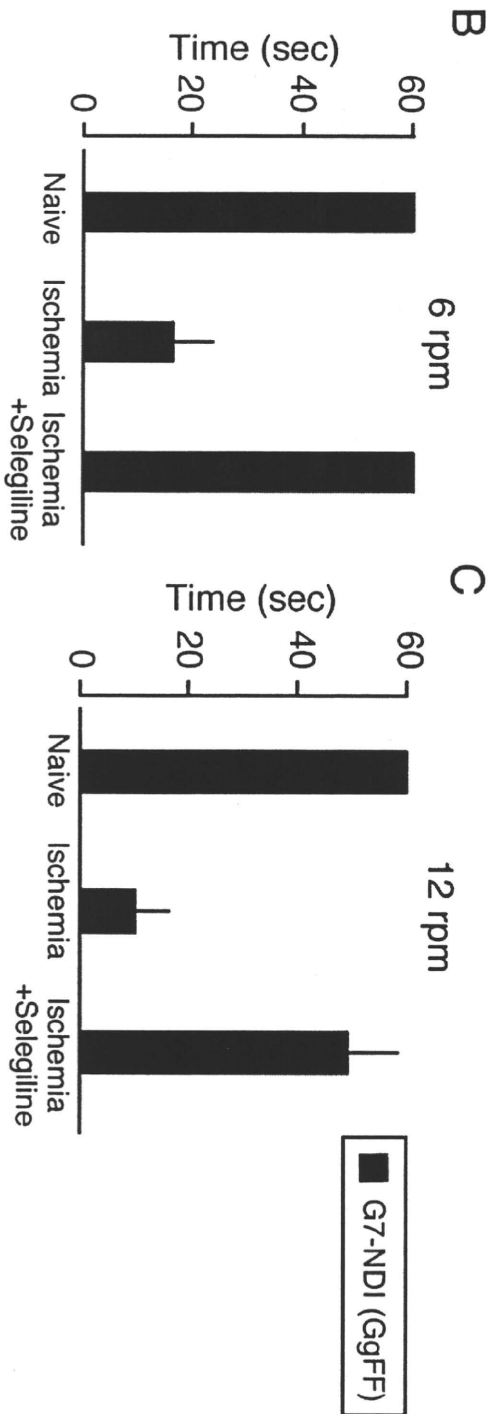
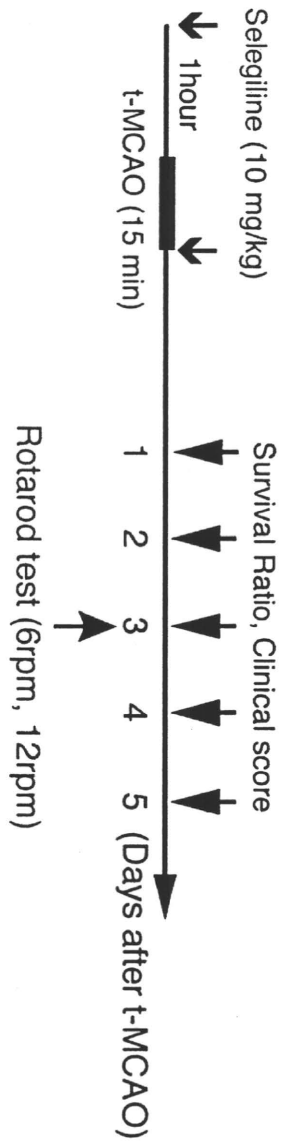


### A Time schedule

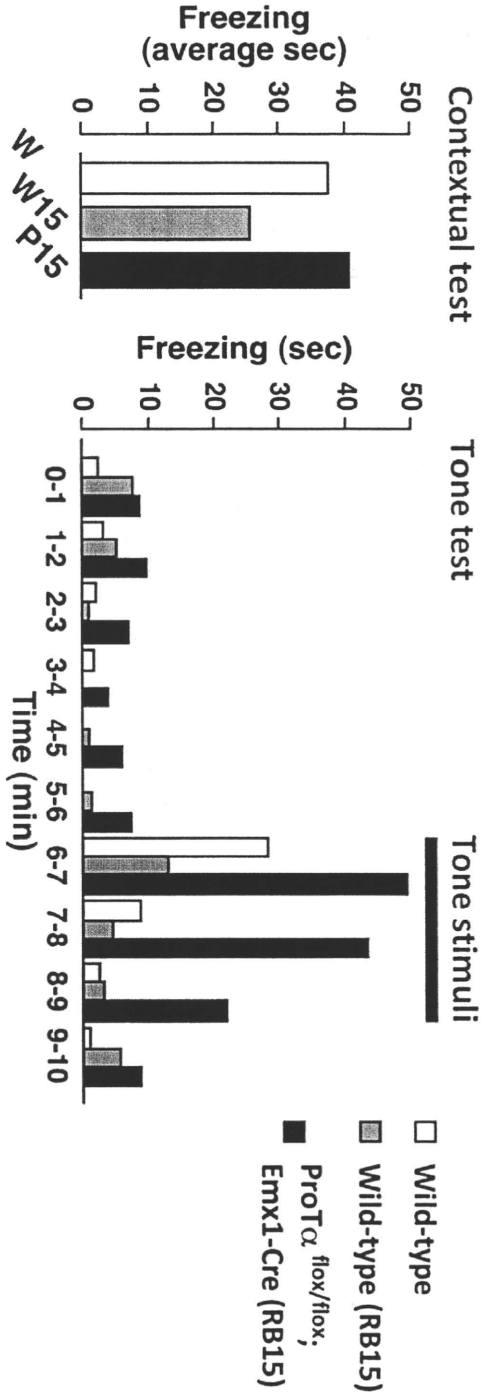




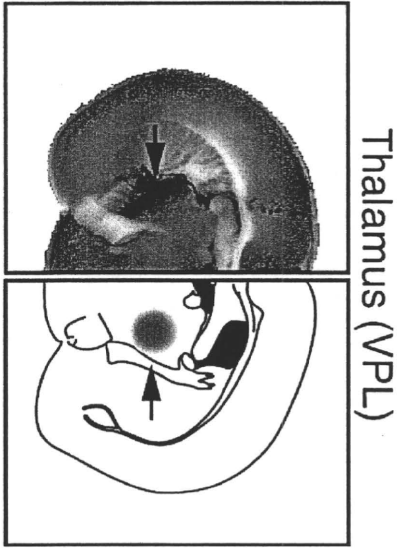
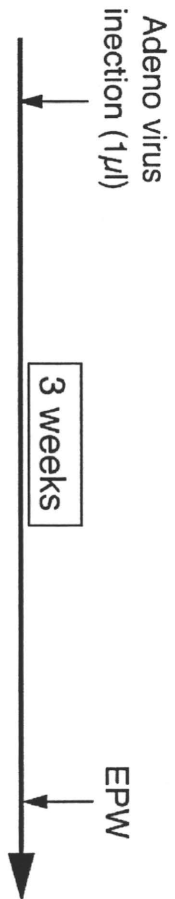
### A Time schedule



**Fear-conditioning test**



# Microinjection



Thalamus (VPL)

Evans Blue (1mg/ml), 1μl injection

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

