

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14857

研究課題名(和文)新規「細胞外」ポリADPリボースレセプターの同定と神経保護効果の解明

研究課題名(英文) A neurotrophic role of extracellular poly (ADP-ribose) in neurological disorders

研究代表者

竹内 正吉 (Takeuchi, Tadayoshi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00171611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規「細胞外」ポリADPリボース(EC-PAR)レセプターの同定と脳神経疾患における役割について研究を実施した。EC-PARはグリア細胞からグリア細胞株神経栄養因子(GDNF)の合成を特異的に促進することを発見した。また、ラット6-OHDAパーキンソン病モデルにおいて、EC-PARの脳病巣部への直接投与は、脳内グリア細胞からのGDNF産生も促進し、異常行動を抑制したことから、神経栄養シグナル分子であることを明らかにした。これらの成果により、これまで不明であったEC-PARの病態生理学的役割(神経保護効果)が解明され、また、パーキンソン病における新規創薬標的を提示することが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of extracellular poly(ADP-ribose) (EC-PAR) in the pathophysiology of neurodegenerative disorders. PAR is synthesized by PAR polymerase-1 (PARP-1) and released into the extracellular space during PARP-1-induced cell death. In vitro, treatment of rat astrocytes with EC-PAR increased the synthesis and release of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) but not other neurotrophic factors. In vivo, topical injection of EC-PAR into the striatum of a Parkinson disease rat model upregulated GDNF levels in activated astrocytes and improved pathogenic rotation behavior. Because GDNF is known to be neuroprotective in cases of Parkinson disease, administration of EC-PAR could potentially be used to treat this devastating disease.

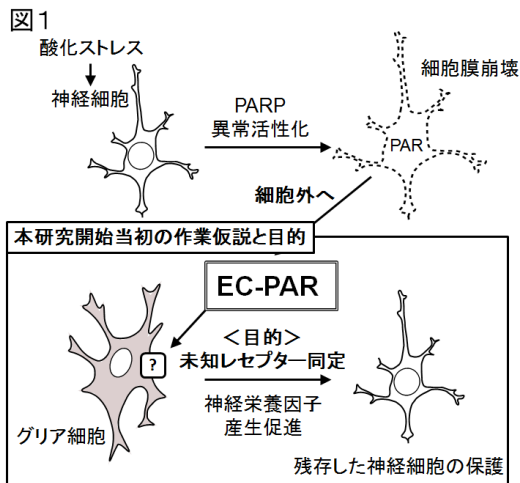
研究分野：獣医薬理

キーワード：薬理 神経科学 シグナル伝達 脳神経疾患 獣医学

1. 研究開始当初の背景

(1) ポリ ADP リボース合成酵素(PARP)は、DNA 損傷に反応して活性化される核酵素である。脳卒中などの病態において、酸化ストレスは神経細胞の PARP を異常活性化する。その結果、ポリ ADP リボース (PAR) が細胞内に大量に合成され、神経細胞死を誘導する (図1 上段)。

(2) 申請者らはこれまでに、脳卒中治療薬として PARP 阻害薬の創薬研究 (Nakajima et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005,312(2):472-81.) を実施する中で、酸化ストレスによる神経細胞死に、なぜ大量の PAR が合成されるのだろうか? という疑問を抱いた。また、グリア細胞 PARP の脳内炎症反応に関する研究 (Nakajima et al. J. Biol. Chem. 2004, 279(41):42774-86) において、神経細胞で大量合成された PAR は、細胞膜崩壊により細胞外に放出され (細胞外ポリ ADP リボース: Extracellular PAR: EC-PAR)、近傍のグリア細胞に作用するのではないかと考え、予備検討を行った。その結果、EC-PAR は、培養グリア細胞におけるグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) の産生を著明に促進するという新知見を得た (図2)。以上の経緯から、神経細胞死に伴い大量合成される PAR は、EC-PAR として細胞外に放出され、グリア細胞の未知レセプターを介して神経栄

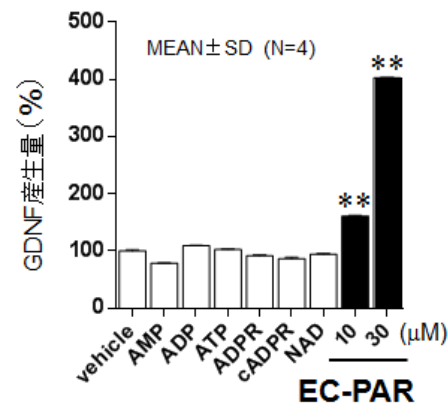


養因子産生を促進し、残存する神経細胞を保護する役割を持つという研究作業仮説を提唱するに至った (図1 下段)。

2. 研究の目的

(1) 先述したように、先行知見として EC-PAR は、培養グリア細胞におけるグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) の産生を著明に促進するという新知見を得ていたことから (図2)、本研究では、研究申請時 (平成26年10月) の以下の2つの研究目標を設定した。

図2. C6グリア細胞株における各種アデニンヌクレオチドのGDNF産生促進作用



各アデニンヌクレオチド(10 μM)または Ecto-PARを、培養細胞に48時間処置し、上清中のGDNF量をELISAにより測定した。

【2つの目的】

グリア細胞に存在が示唆される EC-PAR レセプターの同定

EC-PAR レセプターを介した神経栄養因子産生による神経保護効果を解明すること

(2) しかしながら、本申請研究が採択された平成27年の研究開始直後の4月に、Cell Press から中枢神経系グリア細胞と同様の性質を示す末梢系炎症細胞マクロファージにおいて、EC-PAR という我々と同じ概念での論文が出版され、またそのレセプターも Toll-like レセプター2と4であることが報告された (Krukenberg et al. 2015, Chem Biol.

2015 Apr 23;22(4):446-52.Extracellular poly(ADP-ribose) is a pro-inflammatory signal for macrophages.)

(3)以上のことから、本研究目的を以下の3つ項目に変更した。

【3つの目的】

本申請研究で我々が得ていた先行知見であるEC-PARによるグリア細胞からのGDNF産生の特異性の検討(他神経栄養因子促進作用への影響)。

EC-PARによるグリア細胞からのGDNF産生促進作用の細胞内シグナル伝達機序の薬理的解析。

GDNFの神経栄養因子活性効果が最も期待されている難治性脳神経疾患パーキンソン病のラット病態モデルを作製し、個体レベルでもEC-PARの治療効果検討。

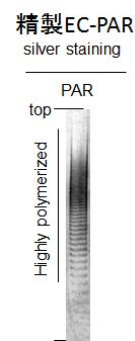
以上の3つの目的を達成することで、EC-PARの中枢神経系におけるイニシアティブを獲得することを主眼とし、EC-PARの病態生理学的意義および治療応用の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

特に記載の無い限り、試薬は特級を使用した(全て和光純薬株式会社)

(1) EC-PARの調製: EC-PARは申請者らの方法(Nakajima et al. J. Biol. Chem. 2004, 279(41):42774-86)を参考に調製した。即ち、ヒトリコンビナント PARP-1 (100 ng) と反応バッファーA (100 mM Tris 塩酸塩: pH 8.0), 2 mM 塩化マグネシウム, 1 mM DTT, 1.25 micro g/mL salmon activated sperm DNA に酵素基質である 500 micro M ベータ NAD を添加し、30 で 30 分間インキュベートして反応生成物である EC-PAR を合成した。次に、遠心分離 (22,000 x g, 10 分間) により、EC-PAR を含む沈澱を回収し、溶解バッファー

(1 M KOH + 50 mM EDTA) を加えることで、EC-PAR を水溶性画分に溶解した。この EC-PAR を含む水溶性画分から EC-PAR を精製する為に、EC-PAR 精製用カラム (Bio-Rex カラム: バイオラッド社) を添加し、バッチ法にて EC-PAR を精製した。さらに、精製過程で混入するエンドトキシンを除去する為に、精製 EC-PAR を Detxi-Gel Endotoxin Removing column (サーモフィッシャーサイエンス社) に添加し、溶出液をリムルス試験で精査し、エンドトキシンフリーの精製 EC-PAR を調製した(右図)。



(2) グリア細胞初代培養系の調製: 申請者らの方法(Nakajima et al. J. Biol. Chem. 2004, 279(41):42774-86)に準じて調製した。即ち、胎齢 19-20 日の Wistar ラット胎児の大脳皮質を実態顕微鏡下で採取し、滅菌ハサミで脳をミンスした後、トリプシン溶液で細胞を分散し、10 cm² シャーレに播種した。培地は 10%ウシ胎児血清に抗生物質を添加したダルベッコモディファイド培地 (DMEM) を使用した。3 日毎に 2 週間培養し、水平方向に 5 分間振盪することで、死滅した神経細胞とミクログリアを除去した。この操作を 3 回繰返し、再度培養ディッシュからトリプシンで細胞を浮遊させ、6.4 x 10⁴ cells/cm² の細胞密度で新しい培養ディッシュに細胞を播種し、さらに 1-2 週間培養した。本細胞は、アストロサイトのマーカーである GFAP 陽性細胞が 95%以上であり、アストロサイト初代培養系として用いた。細胞培養は全て飽和水蒸気下/5% CO₂/37 の細胞培養インキュベーター内で実施した。

なお、本動物実験は公立大学大阪府立大学動物倫理委員会の承認を得た機関承認実験である。

(3) グリア細胞初代培養系における EC-PAR の神経栄養因子促進活性の測定 (ELISA 法): 上記 (2) で調製したグリア細胞初代培養系 (初代アストロサイト培養系) に、(1) で精製した EC-PAR (10 micro M) を添加し、48 時間、培養インキュベーターで EC-PAR を作用させた。溶媒は滅菌リン酸バッファー (PBS) を用いた。48 時間後、培地を除去し、滅菌 PBS で細胞を 3 回洗浄した。ディッシュの細胞から抽出バッファー (キット添付: 後述) を用いて、細胞内の神経栄養因子の細胞内量を ELISA 法にて測定した。測定した神経栄養因子は、神経成長因子 (NGF, 測定キット: DuoSet rat beta-NGF ELISA kits: R&D システム社より購入)、脳由来神経栄養因子 (BDNF, プロメガ社)、ニューロトロフィン-3 (NT-3, プロメガ社) およびグリア細胞株神経栄養因子 (GDNF, プロメガ社) の 4 つのアストロサイトが産生する主要な因子を選択した。ELISA は、各キットに添付してある作業手順書に従い実施した。

(4) グリア細胞株 C6 細胞における EC-PAR の細胞内シグナル伝達経路の薬理的解析: ラットグリア細胞株 C6 細胞を 96-well プレートに $3.0 \times 10^5/cm^2$ の細胞濃度で播種し、37 °C 培養インキュベーター内で 24 時間培養した。24 時間後、無血清培地である Opti-MEM に培地交換し、さらに 24 時間培養した。翌日、精製 EC-PAR 処置 30 分前に DMSO に溶かした各種阻害剤 (PKA 阻害剤: H-89, PKC 阻害剤: Ro-32-0432, PKG 阻害剤: ODQ, ERK 阻害剤: U0126, p38 阻害剤: SB203580, JNK 阻害剤: SP600125, PTK 阻害剤: Genistein, NF-kappa B 阻害剤: APDC) を、各阻害剤の最大効果を発揮する濃度 (H-89: 1 micro M, RO-32-0432: 1 micro M, ODQ: 1 micro M, U0126: 10 micro M, SB203580: 1 micro M, SP600125: 30 micro M, Genistein: 100 micro M, APDC: 20 micro M) で処置し、48 時間培

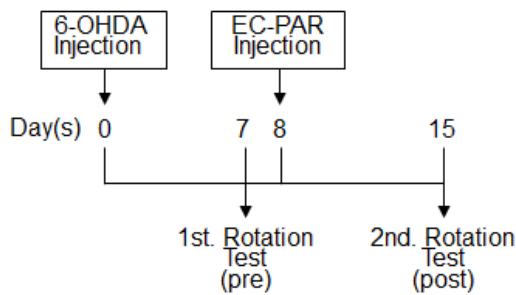
養した後の培地中の GDNF 量を GDNF Emax® Immunoassay system を用いて測定した。

(5) ラット 6-OHDA パーキンソン病モデルの作製と EC-PAR の異常回転行動および体重変化測定:

ラット 6-OHDA パーキンソン病モデルの作製: 0.01% アスコルビン酸を含む生理食塩水に溶かした 5 mg/mL の 6-OHDA (ドーパミン細胞神経毒) を 1 micro L/min で 4 micro L を調製し、使用するまで暗所で氷冷保存した。9-10 週齢 Wistar ラットを 2% イソフルラン吸入麻酔下で脳固定装置に保定した。頭部の皮膚を切開した後、歯科用ドリルを用いて、脳組織を破損しないように注意しながら、軟膜まで頭蓋骨穴 (1 mm) を開口した。続いて、横穴式ハミルトンマイクロシリンジを用いて線条体内に上記で調製した 6-OHDA を実質内投与した。投与個所は、ワトソンとパキシノスの脳地図に従い、プレグマを基準として次の座標に投与した; AP: +1 mm, ML: +3 mm, DV: +5 mm。6-OHDA 投与 1 週間後に、メタンフェタミン (3 mg/kg, i.p.: 大日本住友製薬) を処置し、30 分間、異常回転行動を観察した (360 度完全回転を一回転としてマニュアルでカウントした)。1 週間目の回転行動評価試験 (1nd. rotation test (Pre) と呼称する) で右側への回転数が 50 ~ 250 回の個体をパーキンソン病モデル作製成功ラットとして実験に供した。なお、各処置群は平均回転数が均等になるように 3 グループに群分けを行った。

メタンフェタミン投与翌日、精製 EC-PAR を と同部位に線条体内投与し、さらにその 1 週間後、メタンフェタミンを投与して と同様の方法で異常回転行動数をカウントし、有効性評価試験 (2nd. rotation test (Post) と呼称する) を実施した。以上の実験スケジュールを図 3 に示す。

図3 ラットパーキンソン病モデル作製および有効性評価スケジュール

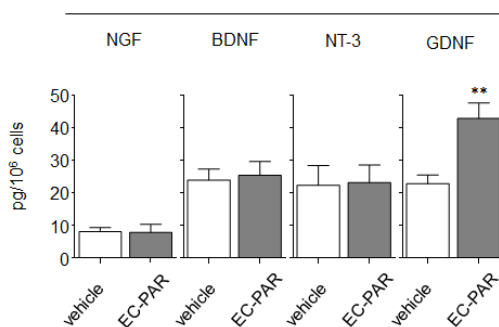


なお、本動物実験は公立大学大阪府立大学動物倫理委員会の承認を得た機関承認実験である。

4. 研究成果

(1) ラットグリア細胞初代培養細胞系を用いた EC-PAR 誘発性 GDNF 産生促進作用の特異性の検討 (他神経栄養因子促進作用への影響): ラットグリア細胞初代培養細胞系において、アストロサイトが豊富な培養系を確立し、EC-PAR 処置による 4 つの神経生存性に重要な神経栄養因子含有量に及ぼす影響を、ELISA 法にて測定した。その結果、GDNF のみ、EC-PAR による有意な含有量増加が認められた (図 4)。

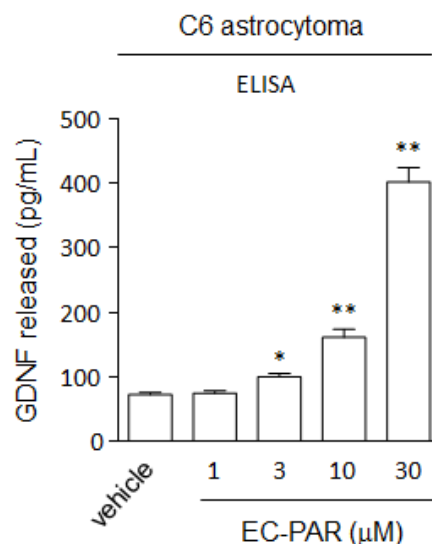
図4 ラットグリア細胞初代培養系における精製EC-PARのGDNF産生促進作用
Rat primary astrocyte



精製 EC-PAR はエンドトキシン不含であることはリムルス試験で確認済みであるため、この GDNF 産生促進作用は、EC-PAR 特異的な影響であることが確認された。

(2) ラットグリア細胞株 C6 細胞を用いた EC-PAR 誘発性 GDNF 産生促進作用における細胞内シグナル伝達経路の解明: GDNF を産生する細胞で有名なラットグリア細胞株 C6 細胞に、方法の節で示した手順で精製 EC-PAR を処置したところ、用量依存的な GDNF 産生促進作用が認められた (図 5)。

図5 ラットグリア細胞株C6における精製EC-PARのGDNF産生促進作用



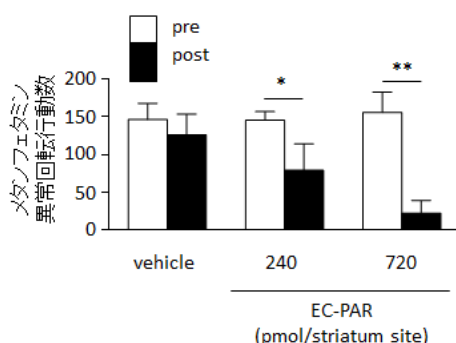
次に、この EC-PAR 誘発性 GDNF 産生促進作用の細胞内シグナル伝達経路を調べる為に、各種シグナル伝達阻害剤を用いて検討した。

その結果、JNK 阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤および NF-kappa B 阻害剤で 30% 程度の有意な GDNF 産生促進作用の抑制が認められた (データ非提示)。本結果より、少なくとも C6 細胞では、JNK 活性化、チロシンキナーゼ活性化および NF-kappa B 活性化のいずれか、あるいは混合的経路が関与する可能性が示唆された。しかし、阻害剤は特異性の問題もあるため、本結果のみでは正確な経路の特定は困難であり、さらにどの阻害剤も 30% 程度の阻害剤作用しかなく、別経路の可能性も考えられた。今後は他のシグナル伝達経路にも着目し、特に先行論文でマクロファージでは Toll-like 受容体 2 および 4 が関与していることから、本受容体の特異的阻害剤

を用いた検討が必要である。

(3)ラット6-OHDAパーキンソン病モデルにおけるEC-PAR誘発性GDNF産生促進作用における治療効果の検討：最後に、生体レベルでの検討を実施した。方法の節および図3に示した実験手順でラットパーキンソン病モデルにおけるメタンフェタミン誘発性異常回転行動を、精製EC-PAR投与前と投与後で比較した。その結果、精製EC-PARの線条体内直接投与は、用量依存的にメタンフェタミン誘発性異常回転行動を有意に抑制した(図6)。

図6ラット6-OHDAパーキンソン病モデルにおける精製EC-PARの治療効果



本結果は、生体内でもEC-PARがGDNF産生促進作用を発揮し、神経毒で破壊されたドーパミン神経経路の改善効果を示したことが示唆された。実際、精製EC-PARの線条体内直接投与はグリア細胞(主としてアストロサイト)のGDNF産生促進を有する可能性がある結果を免疫染色法で得ている(データ非開示)。

以上、(1)~(3)の結果から、EC-PARは細胞レベルおよび個体レベルにおいてGDNF産生促進作用を有し、ラットパーキンソン病モデルで治療効果を発揮したことから、EC-PARが神経栄養因子様活性を発揮すること、パーキンソン病の新規創薬候補物質となることを示すことが、本申請課題により達成出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Nakajima H, Itakura M, Sato K, Nakamura S, Azuma YT, Takeuchi T. Extracellular poly(ADP-ribose) is a neurotrophic signal that upregulates glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) levels in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 292(11):4727-4742.

DOI: 10.1074/jbc.M116.759084 (査読有)

[学会発表](計2件)

(1)佐藤啓志、中嶋秀満、板倉正典、東泰孝、竹内正吉(2016)細胞外ポリADPリボース(EC-PAR)のグリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)産生機構の解明. 第159回日本獣医学会学術集会、9月6日、藤沢.

(2)佐藤啓志、中嶋秀満、板倉正典、東泰孝、竹内正吉(2016)細胞外ポリADPリボース(EC-PAR)のグリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)産生に及ぼす影響. 第129回日本薬理学会近畿部会、6月24日、広島.

[その他]

ホームページ URL:

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/pham/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

竹内 正吉 (Takeuchi Tadayoshi)

研究者番号: 00171611

(2)研究分担者(2名)

(1)大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

中嶋 秀満 (Nakajima Hidemitsu)

研究者番号: 30405360

(2)大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

東 泰孝 (Azuma Yasu-taka)

研究者番号: 50298816