

機関番号：32607

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590089

研究課題名 (和文) 脳傷害時における PEDF の役割の解明、及びその臨床応用に関する基礎的検討

研究課題名 (英文) The role of PEDF in injured brain

研究代表者

矢部 武士 (YABE TAKESHI)

北里大学・大学院感染制御科学府・講師

研究者番号：40239835

研究成果の概要 (和文)：本研究では、種々の培養神経細胞に対して抗アポトーシス作用、グルタミン酸毒性軽減作用、酸化ストレス軽減作用などが報告されている PEDF (色素上皮由来因子) に関して、これまで検討が行われてこなかった *in vivo* での神経保護作用を PEDF 組換えアデノウイルスを用いた PEDF 脳内過剰発現系を用いて検討を行った。PEDF を過剰発現させた動物では、一過性脳虚血後の梗塞体積や脳浮腫率が低下するとともに、変性ニューロン数の減少が認められた。また Ischemic core 領域では、アストロサイトやオリゴデンドロサイトの変成が観察されたが、PEDF を過剰発現させた動物では変成の程度が強く減弱された。以上の結果より、PEDF が脳内における内因性の神経保護因子として機能する可能性を推定した。

研究成果の概要 (英文)：Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is a 50-kDa glycoprotein that protects various types of cultured neurons against neurotoxic stimuli, but its precise role in the CNS is not fully elucidated. In this study, we used rats whose brains were transfected to over-express human PEDF in order to elucidate the neuroprotective effect of PEDF following transient middle cerebral artery occlusion (MCAO). A replication-defective adenoviral vector containing the human PEDF gene (Ad.PEDF) or *E. coli* β -galactosidase (Ad.LacZ) was directly injected into the right striatum at 7 days prior to 70 min of MCAO in rats. Infarct volume and degree of edema of the Ad.PEDF-treated group were significantly reduced compared to the Ad.LacZ-treated group 24 h after MCAO. Degeneration of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes caused by MCAO were attenuated by over-expression of PEDF. The up-regulation of certain pro-inflammatory genes and water channel aquaporin 4 after MCAO was significantly reduced in Ad.PEDF-injected striatum. In conclusion, the results from this study provide the first *in vivo* evidence that PEDF is effective in protecting CNS neurons from ischemic insult, suggesting that PEDF may have a role as an endogenous neuroprotectant in the CNS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：PEDF、グリア細胞、グルタミン酸毒性、神経保護作用、脳虚血

1. 研究開始当初の背景

PEDF (Pigment Epithelium-derived Factor; 色素上皮由来因子)は、セリンプロテアーゼインヒビターファミリーに属する約 50kD の分泌性糖蛋白質であり、脳を含む多くの組織で発現していることが明らかとされている。PEDF の発見は当初、眼球組織より行われたという歴史的背景から、その作用の解析は、血管新生阻害作用を中心に検討が行われてきており、加齢性黄斑変性症に対しては既に臨床試験が実施されるなど眼科系疾患に対する治療への応用は現実となりつつある。しかしながら PEDF の脳内での役割については不明な部分が多く、脳神経疾患への臨床応用には更なる基礎的な検討の蓄積が必要とされている。

2. 研究の目的

近年の急速な高齢化社会への移行により、認識支障、身体的支障、視覚減弱などを伴う様々な神経疾患の発症率が年々高まっている。しかしながらこれらの疾患に対する現在の治療法は満足できるレベルにはほど遠く、根本的治療や発症の遅延には至っていないのが実情である。特に神経疾患に対する治療薬は治療レベルにあるものすら少なく、効果的な治療法・治療薬の開発が急がれる状況にある。そこで本研究では、種々の培養神経細胞に対して抗アポトーシス作用、グルタミン酸毒性軽減作用、酸化ストレス軽減作用などが報告されている PEDF (色素上皮由来因子)に関して、これまで検討が行われていなかった *in vivo*での神経保護効果について検討を行い、神経変性疾患の治療や予防への応用の可能性を探りたい。

3. 研究の方法

組換えアデノウイルスの調整

組換えアデノウイルスは、Virapower™ adenoviral Gateway™ Expression Kit (Invitrogen)を用いて調整した。すなわち human PEDF 遺伝子の全長を、pENTR™ 2B エントリーベクターのマルチクローニングサイトに挿入した後、Gateway™ Technology を利用した組換え反応により、pAd/CMV/V5-DEST™ に組み、pAd.PEDF を調製した。PacI 消化により ITR を露出させた後に、293A 細胞にトランスフェクションした。組換えアデノウイルスは塩化セシウム密度勾配遠心法を用いて精製した後に実験に供した。

一過性脳虚血モデルラットの作製

麻酔下の SD ラット (日本 SLC) の中大脳動

脈をナイロンフィラメントにて閉塞した。70 分後にナイロンフィラメントを引きぬくことで再灌流を行い、24 時間後に実験に用いた。

梗塞巣及び脳浮腫率の算出

70 分間の虚血及び 24 時間の再灌流後に脳を摘出し、1 mm 厚の切片を 2 % TTC 溶液にて染色した。測定した梗塞面積の値に切片の厚さをかけたものを梗塞体積とし、全脳に対する梗塞巣の割合を算出した。また、左右半球の体積を測定し、以下の計算式より脳浮腫率を算出した。

脳虚血による脳機能障害の判定

脳虚血による行動障害を以下のスコア表に従い評価した。(Grade 1; 症状無し、Grade 2; 片麻痺、Grade 3; 回旋歩行、Grade 4; 無動)

脳血流量 (cerebral blood flow, CBF) の測定

レーザードップラー法により、ラットの脳血流量を測定した。麻酔下のラットを脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨を露出させた。レーザードップラープローブを bregma から後方に 1 mm、外側に 5 mm の右側頭蓋骨に置き、虚血前、虚血中、及び再灌流中の脳血流量を測定した。

PEDF 発現細胞の同定

正常脳、あるいは損傷脳 (脳虚血、カイン酸投与) における PEDF の発現を蛍光 2 重免疫法や *in situ* hybridization 法により解析を行った。

4. 研究成果

(1) 脳内 PEDF 産生細胞の同定

PEDF が脳の様々な領域で発現していることは既に報告されているが (Tombran-Tink et al., 1996)、PEDF 産生細胞の同定はこれまで行われておらず、これらを明らかとすることは PEDF の役割・機能を考える上で重要である。そこで抗 PEDF 特異抗体を作製し、各種細胞マーカーとの二重染色により PEDF 産生細胞の同定を行った。正常ラット脳において発現量が高かった小脳、大脳皮質及び線条体について解析を行ったところ、小脳では神経細胞 (プルキンエ細胞) で (Fig. 1)、大脳皮質及び線条体では神経細胞とアストロサイトが PEDF を産生していることが明らかとなった。またカイン酸の投与や中大脳動脈閉塞 (MCAO) により傷害を受けた脳においては反応性アストロサイトが主な産生細胞であった。

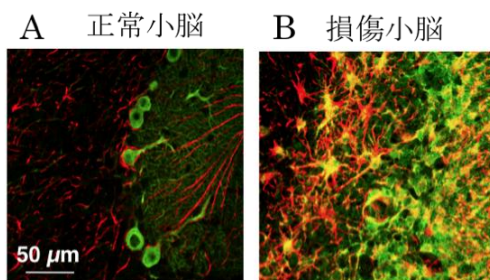


Fig. 1 PEDF 産生細胞の同定
 蛍光免疫2重染色によりPEDF(緑)、及びGFAP陽性アストロサイト(赤)を検出した。正常小脳ではプルキンエ細胞(ニューロン)が、キノリン酸投与により傷害を受けた小脳では反応性アストロサイトがPEDF産生細胞として同定された。

(2) アデノウイルスベクターによる脳内 PEDF 過剰発現系の構築

PEDF 遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルス (Ad. PEDF; 2×10^{10} pfu) を右側線条体に投与したラットにおいて、human PEDF 蛋白が高発現していることを確認できた (Fig. 2)。また、PEDF を過剰発現させた脳における遺伝子発現パターンの変化を RT-PCR 法により解析したところ、Mn-SOD、GLT-1、GLAST mRNA

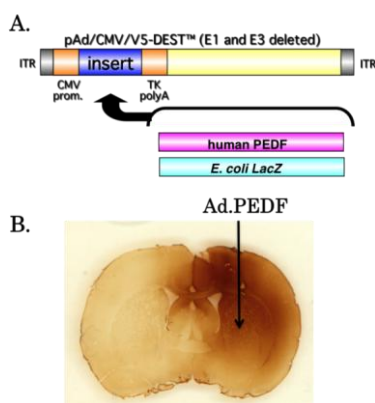


Fig. 2 アデノウイルスベクターを用いたラット脳への PEDF 遺伝子の導入
 (A) ViraPower™ Adenoviral Gateway Expression Kit (Invitrogen) を用いて組換えアデノウイルス Ad. PEDF 及び Ad. LacZ を調製した。(B) ラットの右側線条体に PEDF 組換えアデノウイルス (Ad. PEDF) を投与し、一週間後に脳を摘出し、抗 PEDF 抗体を用いて免疫染色を行った。ベクターを投与した右側の脳で強い PEDF 蛋白の発現が観察された。

の発現誘導が観察された。

(3) 一過性脳虚血モデルラットに対する作用

PEDF の *in vivo* での神経保護作用を検討するため、組換えアデノウイルス Ad. PEDF を投与し PEDF を過剰発現させたラットに中大脳動脈閉塞 (MCAO) による一過性脳虚血を負荷し各種解析を行った。TTC 染色により MCAO 負荷 24 時間後の脳を解析したところ、Ad. LacZ 投与群 (対照群) では大脳皮質及び線条体において広範囲にわたる梗塞巣が認められた

が、Ad. PEDF 投与群では梗塞巣の有意な減少が観察された (Fig. 3)。また Ad. PEDF 投与群では、MCAO 負荷による神経細胞死が著明に減少していることが TUNEL 法などを用いた解析から明らかとなるとともに、脳機能障害に基づく異常行動に対する改善作用も観察され、脳虚血による神経細胞死に対する PEDF の防御作用が確認された。さらに虚血によるマイクログリアの活性化やオリゴデンドロサイト細胞死の抑制が Ad. PEDF 投与群において認められた。虚血負荷後の種々の炎症関連遺伝子の発現誘導も Ad. PEDF 投与群では有意に抑制されており、脳虚血後の炎症反応を PEDF が抑制する可能性が示唆された。MCAO 後に生じる脳浮腫もまた Ad. PEDF 投与群において有意に抑制されていたが、アストロサイトに主に発現する水チャンネルであり脳浮腫形成への関与が指摘されている aquaporin 4 の発現誘導が Ad. PEDF 投与群では抑制されており、PEDF による脳浮腫抑制メカニズムの一部に aquaporin 4 の発現調節が関与している可能性が推測された。

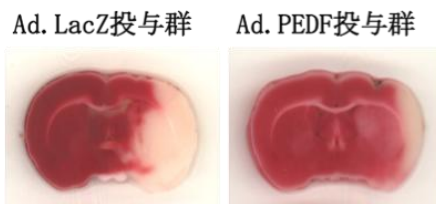


Fig. 3 PEDF による梗塞巣減少効果
 Ad. LacZ あるいは Ad. PEDF を投与後、70 分間の MCAO 負荷と 24 時間の再灌流を行い、TTC 染色を行った。Ad. PEDF 投与群における梗塞巣は対照群 (Ad. LacZ 投与群) に比べて明らかに縮小していた。

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 10 件)

- (1) Namba T, Yabe T, Gonda Y, Ichikawa N, Sanagi T, Arikawa-Hirasawa E, Mochizuki H, Kohsaka S, Uchino S. PEDF up-regulation induced by memantine, an NMDA receptor antagonist, is involved in increased proliferation of hippocampal progenitor cells. *Neuroscience* 167 :372-83, 2010
- (2) Yabe T, Hirahara H, Harada N, Ito N, Nagai T, Sanagi T, Yamada H. Ferulic acid induces neural progenitor cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience* 165(2) 522-531, 2010
- (3) Sanagi T, Yabe T, Yamada H. Adenoviral gene delivery of pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects

striatal neurons from quinolinic acid-induced excitotoxicity. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 69:224-33, 2010

(4) Yabe T, Sanagi T, Yamada H. The neuroprotective role of PEDF; Implication for the therapy of neurological disorders. *Current Mol. Med.* 10: 259-66, 2010

(5) Ito N, Yabe T, Nagai T, Oikawa T, Yamada H, Hanawa T. A possible mechanism underlying an antidepressive-like effect of kososan, a Kampo medicine, via the hypothalamic orexinergic system in the stress-induced depression-like model mice. *Biol. Pharm. Bull.* 32(10):1716-1722, 2009

(6) Ito N, Yabe T, Gamo Y, Nagai T, Oikawa T, Yamada H, Hanawa T. I.c.v. administration of orexin-A induces an antidepressive-like effect through hippocampal cell proliferation. *Neuroscience.* 157(4):720-32, 2008

(7) Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M, Nakagawa K, Kohno R, Miyazaki M, Hisatomi T, Nakamura M, Yabe T, Hasegawa M, Ishibashi T, Sueishi K. Inhibition of nuclear translocation of apoptosis-inducing factor is an essential mechanism of the neuroprotective activity of pigment epithelium-derived factor in a rat model of retinal degeneration. *Am. J. Pathol.* 173(5):1326-38., 2008

(8) Ito N, Yabe T, Gamo Y, Nagai T, Oikawa T, Yamada H, Hanawa T. Rosmarinic acid from *Perillae Herba* produces an antidepressant-like effect in mice through cell proliferation in the hippocampus. *Biol. Pharm. Bull.* 31(7):1376-1380. 2008

(9) Sanagi T, Yabe T, Yamada H. Gene transfer of PEDF attenuates ischemic brain damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *J. Neurochem.* 106(4):1841-54. 2008

(10) Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Stahlberg A, Aprico K, Larsson K, Yabe T, Moons L, Fotheringham A, Davies I, Carmeliet P, Schwartz JP, Pekna M, Kubista M, Blomstrand F, Maragakis N, Nilsson M, Pekny M. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 28(3):468-81. 2008

[学会発表] (計5件)

(1) Hata K, Sanagi T, Yabe T, Yamada H. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) induces glutamate transporters expression

in rat cultured astrocytes. 第53回日本神経化学学会大会 (Neuro2010) 2010.9.2-4 神戸

(2) 畑憲太郎, 佐柳友規, 矢部武士, 山田陽城. Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) によるグルタミン酸トランスポーター発現増強作用の解析 日本薬学会第130年会 2010.3.28-30 岡山

(3) 難波隆志, 前川素子, 矢部武士, 湯浅茂樹, 内野茂夫, 高坂新一. メマンチンにより発現が亢進する PEDF は成体海馬神経新生の促進に関与する. 第32回日本神経科学学会大会, 2009.9.16-18, 名古屋

(4) Yabe T, Sanagi T, Yamada H. PEDF protects against ischemic injury in the rat middle cerebral artery occlusion model. 北米神経科学学会 2008.11.15-19 (Washington DC, U.S.A.)

(5) 村上祐介, 鬼丸満穂, 米満吉和, 中川和憲, 池田康博, 中村誠, 矢部武士, 長谷川護, 石橋達朗, 居石克夫: "網膜変性モデル動物における pigment epithelium-derived factor (PEDF) の作用に関する病態学的検討" 第97回日本病理学会総会. 2008.05.15-18. 金沢市

[その他]

ホームページ等

http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/bio_pharm/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢部 武士 (YABE TAKESHI)

北里大学・大学院感染制御科学府・講師

研究者番号: 40239835

(2) 研究分担者

山田 陽城 (YAMADA HARUKI)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号: 60096691