

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590110

研究課題名（和文）

遺伝子改変動物を用いた筋萎縮性側索硬化症の発症と病態進行に関する研究

研究課題名（英文）

Research on the onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using genetically modified animals

研究代表者

前田 定秋 (MAEDA SADA AKI) 摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：00135732

研究成果の概要（和文）：

遺伝性 ALS のモデルマウスである SOD1 (G93A) マウスとアペリン欠損マウスから、ダブルミュータントマウスを作製し、ALS の病態進行について解析した。その結果、アペリンが ALS の運動神経細胞死に対し保護作用を有すること、その保護作用には、血管内皮増殖因子 (VEGF) との強制的な作用が重要であることを明らかにし、アペリンが ALS の有用な創薬標的分子となりうることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We examined whether apelin is an endogenous neuroprotective factor using SOD1(G93A) mouse model of ALS. Double mutant apelin-deficient and SOD1(G93A) displayed the disease phenotypes earlier than SOD1(G93A) littermates. In addition, the number of motor neurons was decreased in the spinal cord of the double mutant mice. Furthermore, we showed that apelin enhanced the protective effect of VEGF on hydrogen peroxide-induced neuronal death in primary neurons. These results suggest that apelin/APJ system in the spinal cord has a neuroprotective effect against the pathogenesis of ALS, and that apelin may be a useful therapeutic target for ALS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：筋萎縮性側索硬化症、アペリン、活性酸素種、神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経細胞が選択的に障害される進行性の神経変性疾患であり、発症から 3-5 年で死に至る。ALS には著効を示す薬物が存在せず、また、

その原因も明らかではないため、原因究明とともに ALS 発症後に病態進行を抑制する効果的な治療薬の開発につながる研究が求められている。

アペリンはオーファン GPCR の APJ の内因

性リガンドとして発見されたペプチドである。我々は、アペリンが血管形成に関与すること、ALS に対し神経保護作用を示す血管内皮増殖因子 (VEGF) と共に網膜血管形成を促進させる重要な因子であることを明らかにしてきた。

ALS の病態進行には、酸化ストレス、小胞体ストレス、神経保護因子といった様々な要因が複雑に絡み合っており、これらの因子のクロストークを詳細に解析することにより、ALS の病態解明および新規創薬標的分子の探索が可能になると考えられた。

2. 研究の目的

遺伝性 ALS の発症と病態進行におけるアペリンの関与を詳細に解析し、さらに VEGF などの既知の神経保護因子とのクロストークを明らかにすることで、ALS の病態における神経保護因子の重要性、および創薬標的分子としての意義を確立する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

B6SJL 系マウスにヒト変異型 SOD1 を発現させた B6SJL-Tg (SOD1-G93A) 雄性マウスと C57BL/6N 系雌性マウスを交配させて第 1 世代の雄性マウスを得た。本研究には、この第 1 世代の雄性マウスに、さらに C57BL/6N 系雌性マウスを交配させる戻し交配を 5 世代以上繰り返し行って得た雄性マウスを ALS モデルマウス (SOD1 (G93A) マウス) として用いた。また、C57BL/6N 系のアペリンヘテロ接合型雌性マウスと雄性 SOD1 (G93A) マウスを交配させることでアペリン欠損 SOD1 (G93A) マウスを得た。動物実験の飼育、実験等はすべて摂南大学薬学部動物実験ガイドラインにしたがって実施した。

(2) Real-time RT-PCR

PARIS™ Kit (Ambion) を用いて各組織から total RNA を抽出し、M-MLV を用いて逆転写反応を行った。SYBR premix Ex Taq II (Takara) を用いて ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) により real-time PCR を行い、各遺伝子産物の定量を行った。beta-actin を用いて cDNA 量を標準化した。

(3) 免疫組織化学的染色法

マウスを灌流固定した後、腰髄 (L2-4) を摘出し、パラフィン包埋後、マイクロトームにより切片を作製した。抗原の賦活化処理を行った後、抗 NeuN 抗体、抗 APJ 抗体を用いて、蛍光二重免疫染色を行なった。封入後、蛍光顕微鏡 (AZ-100M, Nikon) にて観察した。また、マウスの腰髄を 100 μm おきに 3 μm で薄切した 8 切片を、抗コリンアセチルトランスフェラーゼ抗体を用いて蛍光免疫染色

後、陽性細胞数を計測し、個体あたりの運動神経細胞数とした。

(4) 運動機能の評価

SOD1 (G93A) マウスと同腹の野生型 (WT) 雄性マウスの後肢の状態 (スコア 4~0 の 5 段階で評価) を週 2 回測定した。後肢の 5 段階評価は、スコア 4: 尻尾を持ち上げたとき後肢を広げることができる, 3: 尻尾を持ち上げたとき後肢を広げることができない, または振戦する, 2: 歩行に異常がみられる, 1: 後肢に麻痺が現れる, 0: 仰向けにしたあと 30 秒以内に起き上がれない (死亡と判定) とした。

(5) 初代培養神経細胞の調製

初代培養神経細胞は、妊娠 18-19 日目のラットから胎児海馬を摘出した。摘出した組織を裁断後、酵素処理により細胞を懸濁した。レンズペーパーに通した後、polyethylenimine でコーティングしたプレートに細胞を播種した。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系におけるアペリンと APJ の発現

中枢神経系におけるアペリン及び APJ mRNA の発現量を real-time RT-PCR 法により検討したところ、アペリンと APJ の発現量は、脊髄に最も多いことが明らかになった (図 1)。

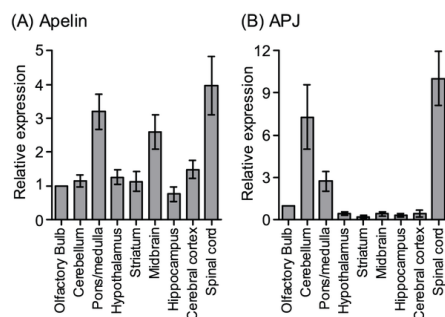


図 1 中枢神経系におけるアペリン及び APJ の発現

さらに、脊髄におけるアペリンの標的細胞を明らかにする目的で、APJ の発現細胞を免疫組織化学的染色法により検討したところ、APJ は NeuN 陽性の神経細胞に局在していることが明らかになった (図 2)。また、この切片の隣接切片を、運動神経に特異的に発現しているコリンアセチルトランスフェラーゼに対する抗体を用いて染色した結果、運動神経細胞に APJ が発現していることが明らかになった (data not shown)。

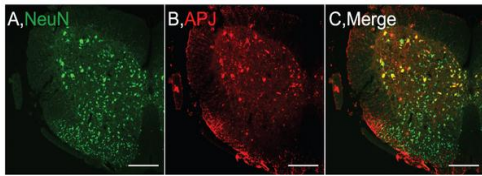


図2 脊髄における APJ 発現細胞

(2) ALS の病態進行に伴うアペリン及び APJ の発現量の変動

ALS モデルマウスである SOD1 (G93A) transgenic マウスにおける、体重、後肢の運動機能障害、運動神経細胞数の経時変化について検討した (図 3)。WT マウスの体重は、7-23 週齢にかけて経時的に増加したのに対し、SOD1 (G93A) マウスでは、10 週齢ぐらいから体重の増加がみられなくなった。また、WT マウスでは、後肢の運動機能障害はみられなかったが、SOD1 (G93A) マウスでは、10 週齢ぐらいから障害がみられ始め、23 週齢では、非常に強い障害がみられた。WT マウスでは、コリンアセチルトランスフェラーゼ陽性の運動神経細胞数に大きな変化はみられなかったが、SOD1 (G93A) マウスでは、14 週齢で有意な減少がみられ、18 週齢では WT マウスの約 1/3 にまで減少した。

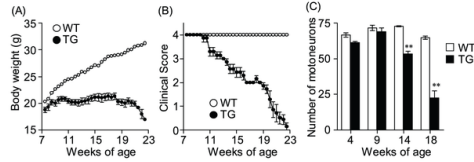


図 3 SOD1 (G93A) マウスにおける ALS の病態進行

次に、SOD1 (G93A) マウスの脊髄におけるアペリン及び APJ の発現量の経時変化について検討したところ、APJ の発現量は WT マウスとの間に有意な差はみられなかったものの、アペリンの発現量は、14 週齢で有意な減少がみられ、18 週齢ではさらに著明な減少がみられた。(図 4)。

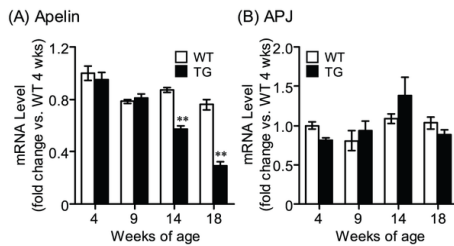


図 4 SOD1 (G93A) マウスにおけるアペリン及び APJ の発現量の経時変化

(3) ALS の病態進行におけるアペリン欠損の影響

アペリン欠損 SOD1 (G93A) マウスにおける運動機能障害及び運動神経細胞数を、SOD1 (G93A) マウスと比較検討した。14 週齢のアペリン欠損 SOD1 (G93A) マウスの運動神経細胞数は、同週齢の SOD1 (G93A) マウスに比べ、有意に減少していた (図 5)。また、アペリン欠損 SOD1 (G93A) マウスにおいて、運動機能障害は増悪する傾向がみられた。これらのことから、アペリンは ALS における運動神経細胞死に対し保護作用を有することが明らかになった。

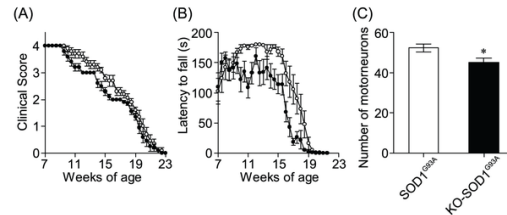


図 5 ALS の病態進行に対するアペリン欠損の影響

(4) 培養神経細胞におけるアペリンの保護作用

アペリンが直接神経細胞に対し保護作用を示すか否かについて、ラット初代培養神経細胞を用いて検討した (図 6)。代表的な活性酸素種である過酸化水素誘発細胞死に対し、アペリン単独では有意な保護作用はみられなかったが、VEGF と併用することにより有意な保護作用がみられた。これらのことから、アペリンの神経保護作用には VEGF との強調的な作用が重要であることが明らかになった。

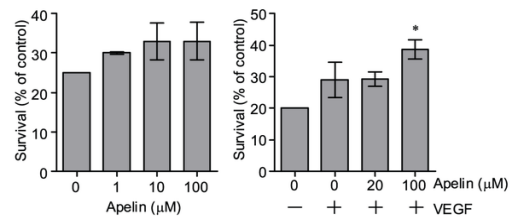


図 6 初代培養神経細胞に対するアペリンの保護作用

(5) 総括

本研究は、アペリンが ALS の運動神経細胞死に対し保護作用を有すること、その保護作用には、VEGF との強調的な作用が重要であることを示し、アペリンが ALS の有用な創薬標的分子となりうることを明らかにした。

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3件)

- ① 笠井淳司、石丸侑希、吉岡靖啓、山室晶子、前田定秋、他5名、Apelin deficiency accelerates the progression of amyotrophic lateral sclerosis.、PLoS One.、査読有、Vol.6、No.8、2011、e23968、DOI:10.1371/journal.pone.0023968
- ② 山室晶子、吉岡靖啓、笠井淳司、前田定秋、他4名、Caspase-4 Directly Activates Caspase-9 in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells.、J Pharmacol Sci.、査読有、Vol.115、No.2、2011、pp239-243、DOI:10.1254/jphs.10217SC
- ③ 吉岡靖啓、武田存央、山室晶子、笠井淳司、前田定秋、Nitric oxide inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression and its own production through the cGMP signaling pathway in murine microglia BV-2 cells.、J Pharmacol Sci.、査読有、Vol.113、No.2、2010、pp153-160、DOI:10.1254/jphs.10060FP

[学会発表] (計37件)

- ① 杉野佑太、ミクログリアにおいてドパミンはNF-κB p65の核移行の抑制を介してサイトカイン産生を抑制する、日本薬学会第132年会、平成24年3月30日、札幌
- ② 前田定秋、アストロサイトにおいてノルアドレナリンはbeta3受容体を介してGSHを産生誘導する、日本薬学会第132年会、平成24年3月30日、札幌
- ③ 吉岡靖啓、ノルアドレナリンはアストロサイトを介して神経細胞内GSH量を増加させ過酸化水素誘発細胞死を抑制する、日本薬学会第132年会、平成24年3月30日、札幌
- ④ 東野功典、血管成熟化に対するapelin siRNAの促進作用、日本薬学会第132年会、平成24年3月30日、札幌
- ⑤ 吉岡靖啓、Noradrenaline protects neurons from H2O2-induced cell death by increasing the supply of glutathione from astrocytes. 第85回日本薬理学会年会、平成24年3月16日、京都
- ⑥ 杉野佑太、Dopamine attenuates LPS-induced expression of cytokine by inhibiting the nuclear translocation of NF-κB p65 in microglial cells. 第85回日

本薬理学会年会、平成24年3月14日、京都

- ⑦ 山室晶子、Proteasome inhibitor induces apoptosis through the induction of NOX5 expression via transcriptional factor GATA2. 第85回日本薬理学会年会、平成24年3月14日、京都
- ⑧ 石丸侑希、Effect of apelin siRNA on the maturation of blood vessels. 第85回日本薬理学会年会、平成24年3月14日、京都
- ⑨ 石丸侑希、Apelin siRNAによる血管成熟化の促進、第120回日本薬理学会近畿部会、平成23年11月11日、京都
- ⑩ 吉岡靖啓、ノルアドレナリンによるアストロサイトのbeta3受容体を介した神経保護作用、第120回日本薬理学会近畿部会、平成23年11月11日、京都
- ⑪ 吉岡靖啓、ノルアドレナリンによるアストロサイトのグルタチオン産生誘導を介した神経保護作用、第61回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成23年10月22日、神戸
- ⑫ 森下あみ、アストロサイトにおけるノルアドレナリンによるβ3受容体を介したグルタチオン産生誘導機構、第61回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成23年10月22日、神戸
- ⑬ 杉野佑太、ドパミンはNF-κB p65の核移行を抑制することにより活性化ミクログリアによるサイトカイン産生を抑制する、第54回日本神経科学学会大会、平成23年9月26日、加賀
- ⑭ 吉岡靖啓、アストロサイトにおいてノルアドレナリンはbeta3受容体を介してH2O2誘発細胞死を抑制する、日本薬学会第131年会、平成23年3月30日、静岡
- ⑮ 杉野佑太、ミクログリアにおけるLPS刺激によるサイトカインの発現誘導に対するドパミンの抑制作用、日本薬学会第131年会、平成23年3月30日、静岡
- ⑯ 吉岡靖啓、Noradrenaline protects astrocytes from H2O2-induced cell death via β3-receptor stimulation. 第84回日本薬理学会年会、平成23年3月24日、横浜
- ⑰ 山室晶子、Proteasome inhibitor induces apoptosis through ROS production by NOX5. 第84回日本薬理学会年会、平成23年3月23日、横浜
- ⑱ 吉岡靖啓、Dopamine attenuates

LPS-induced cytokine expression in microglia cells. 第 84 回日本薬理学会年会、平成 23 年 3 月 23 日、横浜

- ①9 茂木俊樹、アストロサイトにおけるノルアドレナリンによる beta3 受容体を介した H₂O₂ 誘発細胞死抑制作用、第 118 回日本薬理学会近畿部会、平成 22 年 11 月 19 日、大阪
- ②0 吉岡靖啓、ドパミンはミクログリアにおいて LPS 刺激によるサイトカインの発現誘導を抑制する、第 118 回日本薬理学会近畿部会、平成 22 年 11 月 19 日、大阪
- ②1 山室晶子、プロテアソーム経路破綻による NADPH oxidase/NOX5 の発現誘導、第 118 回日本薬理学会近畿部会、平成 22 年 11 月 19 日、大阪
- ②2 山室晶子、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞におけるプロテアソーム阻害剤による NADPH oxidase/NOX5 の発現誘導、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 22 年 10 月 30 日、大阪
- ②3 茂木俊樹、ノルアドレナリンによるアストロサイトのグルタチオン合成・放出を介した神経保護作用、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 22 年 10 月 30 日、大阪
- ②4 杉野佑太、ミクログリアにおける LPS 刺激によるサイトカイン産生に対するドパミンの影響、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 22 年 10 月 30 日、大阪
- ②5 吉岡靖啓、Noradrenaline protects neurons from H₂O₂-induced cell death by increasing the release of glutathione from astrocytes via beta-adrenoreceptor stimulation. Neuro2010、平成 22 年 9 月 4 日、神戸
- ②6 笠井淳司、Apelin is involved in the progression of amyotrophic lateral sclerosis. Neuro2010、平成 22 年 9 月 2 日、神戸
- ②7 茂木俊樹、Noradrenaline protects neurons against hydrogen peroxide toxicity by increasing the release of glutathione from astrocytes. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, IUPHAR、平成 22 年 7 月 19 日、コペンハーゲン、デンマーク
- ②8 前田定秋、Dopamine inhibits NO production by LPS-activated microglia through the formation of quinoprotein. 16th World Congress of Basic and

Clinical Pharmacology, IUPHAR、平成 22 年 7 月 19 日、コペンハーゲン、デンマーク

- ②9 吉岡靖啓、Noradrenaline attenuates hydrogen peroxide-induced cell death of astrocyte through the increase in the level of intracellular glutathione. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, IUPHAR、平成 22 年 7 月 19 日、コペンハーゲン、デンマーク
- ③0 吉岡靖啓、神経細胞とミクログリアの培養系における LPS 誘発神経細胞死に対するドパミンの保護作用、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月 30 日、岡山
- ③1 北本忠弘、活性化ミクログリアから産生された NO による神経細胞死に対するドパミンの保護作用、第 83 回日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 17 日、大阪
- ③2 茂木俊樹、ノルアドレナリンによるアストロサイトのグルタチオン放出を介した神経保護作用、第 83 回日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 17 日、大阪
- ③3 金城俊彦、筋萎縮性側索硬化症における apelin の関与、第 116 回薬理学会近畿部会、平成 21 年 11 月 13 日、大津
- ③4 井山拓海、ユビキチン-プロテアソーム経路破綻による神経細胞死における NADPH oxidase/NOX5 の関与、第 116 回薬理学会近畿部会、平成 21 年 11 月 13 日、大津
- ③5 山室晶子、ユビキチン-プロテアソーム経路破綻による神経細胞死における NADPH oxidase/NOX5 の関与、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2009、平成 21 年 8 月 24 日、東京
- ③6 吉岡靖啓、ノルアドレナリンのアストロサイトを介した神経保護作用、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2009、平成 21 年 8 月 24 日、東京
- ③7 吉岡靖啓、Noradrenaline のアストロサイトを介した神経保護作用、第 115 回薬理学会近畿部会、平成 21 年 6 月 26 日、金沢

[その他]

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-yakuch/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 定秋 (MAEDA SADA AKI)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：00135732

(2)研究分担者

吉岡 靖啓 (YOSHIOKA YASUHIRO)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：40330360

山室 晶子 (YAMAMURO AKIKO)

摂南大学・薬学部・助手

研究者番号：20340862

石丸 侑希 (ISHIMARU YUKI)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：80611067

笠井 淳司 (KASAI ATSUSHI)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：40454649

(H22→H23：連携研究者)