

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25年 5月29日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580339

研究課題名（和文）酸化ストレス性疾患へ GAPDH ドミナントネガティブ分子を治療応用する為の基盤研究

研究課題名（英文）Research for therapeutic application of dominant negative GAPDH molecule on oxidative stress-induced disorder

研究代表者

中嶋 秀満（NAKAJIMA HIDEMITSU）

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：30405360

研究成果の概要（和文）：本研究では、GAPDH 凝集が関与する酸化ストレス誘発細胞死カスケードにおいて、我々が新規に同定した GAPDH ドミナントネガティブ分子（C152A-GAPDH）の治療効果を個体レベルで検討する目的で、C152A-GAPDH のコンディショナル・トランスジェニックマウスの作製を行った。結果、2 系統のテトラサイクリン誘導型 C152A-GAPDH トランスジェニックマウスを確立した。現在、酸化ストレス性疾患モデルとして、メタンフェタミン誘発性パーキンソン様モデルと脳卒中モデル（中大脳動脈閉塞モデル）を用いて、確立したテトラサイクリン誘導型 C152A-GAPDH トランスジェニックマウスでの効果を検討しており、酸化ストレス性疾患への治療応用の可能性について検証中である。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we aim to establish a conditional transgenic mice containing mutant GAPDH (C152A-GPDH), which inhibits oxidative stress-induced cell death mediated by GAPDH aggregation dominant negatively, and to investigate whether therapeutic benefits of C152A-GAPDH might be showed *in vivo*. As a result, we have succeeded two strains of mice in which the expression of C152A-GAPDH is under the control of a tetracycline-inducible system. And then, we are examining the possibility for therapeutic application of C152A-GAPDH on oxidative stress-induced disorders such as stroke model or methamphetamine-elicited Parkinson disease-like model using the established transgenic mice, compared to that of wild-type mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012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：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎家畜学

キーワード：薬理・神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

GAPDH は解糖系酵素として同定された古典的蛋白質であるが、近年、様々な機能を有す

る多機能蛋白質であることが報告されている。特に、酸化ストレス性神経細胞死において、GAPDH は核内移行し p53 や PUMA などのアポトーシス関連遺伝子の発現を誘導す

ることから、細胞死のイニシエーターである可能性が示唆されている。一方で、GAPDH が多くの神経変性疾患の病巣部において蓄積していることが報告されている。我々は GAPDH が酸化ストレスによりアミロイド様線維を形成し、細胞死を引き起こすことを明らかにした。さらに GAPDH 凝集の詳細な解析を行う過程で、GAPDH 凝集の責任アミノ酸残基として 152 番目のシステイン残基 (Cys152) を同定した。このアミノ酸残基を変異させた C152A-GAPDH を発現する SH-SY5Y 細胞を作製し解析したところ、① GAPDH 酵素活性を全く有さないこと、②細胞の生存性、増殖性、解糖系及び ATP 合成に全く影響を与えないこと、及び③酸化ストレスで誘発される内在性 GAPDH のアミロイド様線維形成を抑制することが明らかになった。以上から、C152A-GAPDH は内在性 GAPDH を介する細胞死を特異的に抑制するドミナントネガティブ分子であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、我々が新規に同定した GAPDH ドミナントネガティブ分子 (C152A-GAPDH) のトランスジェニックマウスを作製し、酸化ストレス性疾患モデル (脳卒中モデル及びパーキンソン病様モデル) での病理解析及び生化学解析を実施することで、酸化ストレス誘発性細胞死における GAPDH ドミナントネガティブ分子の効果を個体レベルで検討し、酸化ストレス性疾患への治療応用の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

1. pTRE vector に搭載した C152A-GAPDH (myc タグ付加) から、CMV ie エンハンサー、Tet-operator、ニワトリ β アクチンプロモーター、翻訳領域およびウサギ β グロビンターミネーター (ポリ A 付加) を含むトランスジーンを作製し、定法に従い B6 マウス前核期受精卵にインジェクトして胚移植後、仔マウスを得た。サザンブロッティングと PCR によるジェノタイプングでファウンダーの選択を行い、選抜された系統のマウスの線条体に、Tet-trans activator (tTA) 発現遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを投与した。その 4 週間後、マウスをペントバルブیتال麻酔下で瀉血安楽死後、4% パラホルムアルデヒドを用いて還流固定を行い、脳を取り出し凍結切片を作製した。この切片を薄切し、抗 myc 抗体を用いて免疫染色を行い導入遺伝子の発現の確認を行った。

2. 個体レベル (動物モデル) での検討
イソフルラン麻酔下で内頸動脈よりシリコン被覆ナイロン栓子を挿入し、左中大脳動脈起始部の血流を遮断することで局所脳虚血を負荷する。60-120 分間の閉塞処置後に栓子を抜去し、再還流処置を施す。再還流 24 時間後、ネンブータル深麻酔下にて瀉血安楽致死を施し、全脳を取り出す。厚さ 1 mm の冠状脳スライスを作製し、TTC 染色により脳梗塞体積を定量評価する。また、脳スライスをホルマリン浸漬後、薄切標本を作成し、HE 染色により主として大脳皮質および線条体領域の病理解析を、抗 GAPDH 抗体免疫染色とコンゴレッド染色により GAPDH の細胞内局在とアミロイド様線維形成を評価する。また、大脳皮質および線条体領域ホモジェネートを作製し、Triton-X100 不溶性画分を調製し、ウエスタンブロッティングにより GAPDH の凝集体形成を評価する。

メタンフェタミン (15 mg/kg) を 2 回、2 時間間隔で腹腔内投与する。投与 4 日後、ネンブータル深麻酔下にて瀉血安楽致死を施し、氷上にて線条体及び中脳を取り出す。冠状脳切片を作製し、ドーパミン神経細胞マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ免疫染色および神経細胞死を病理学的に評価する。また、過塩素酸で除蛋白した脳サンプル中のドーパミン及びその代謝物 (DOPAC 及び HVA) を ECD-HPLC で定量する。更に、線条体及び中脳ホモジェネートを作製し、Triton-X100 不溶性画分を分取し、ウエスタンブロッティングにより GAPDH の凝集体形成を評価する。

4. 研究成果

今回、我々は時間的、空間的に C152A-GAPDH 発現制御が可能な Tet インデュシブルトランスジェニックマウスの作製を目指した。つまり、CMV ie エンハンサーの上流に tTA によって発現制御を受ける Tet-operator を付加した C152A-GAPDH 遺伝子をトランスジーンとして導入したマウスに、tTA 遺伝子を含む AAV ベクターを投与した。この結果、AAV の投与場所により発現部位が選択でき、またテトラサイクリン投与の有無により時間的に発現制御が可能となる。

pTRE2 vector に C152A-GAPDH 遺伝子を搭載し、制限酵素処置を行いトランスジーンを作製し、定法に従い B6 マウス前核期受精卵にインジェクトして胚移植後、仔マウス (153 個体) を得た。得られた仔マウスに対し、トランスジーン内の配列を増幅する primer を用いてジェノタイプングを行い、16 個体を選別した。この 16 個体に対し、サザンブロット及び半定量的なリアルタイム PCR を行い、

より高発現の期待できる 4 個体を選別した。これら 4 個体をそれぞれ 1 系統として繁殖・維持しつつ、実際に C152A-GAPDH 発現の確認を行った。8 週齢マウスの線条体に、マイクロシリencingを用いて tTA 遺伝子を含む AAV を投与し、4 週間後に線条体部を抗 myc 抗体を用いて免疫染色を行った結果、2 系統のマウスで myc 抗体陽性反応が認められた。以上の結果から、2 系統のテトラサイクリン誘導型 C152A トランスジェニックマウスの作製を完了した。現在、酸化ストレス性疾患モデルとして、メタンフェタミン誘発性パーキンソン様モデルと脳卒中モデル（中大脳動脈閉塞モデル）を用いて、確立したテトラサイクリン誘導型 C152A-GAPDH トランスジェニックマウスでの効果を検討しており、酸化ストレス性疾患への治療応用の可能性について検証中である。

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)

Hidemitsu Nakajima, Takeya Kubo, Yuko Semi, Masanori Itakura, Mitsuru Kuwamura, Takeshi Izawa, Yasu-Taka Azuma and Tadayoshi Takeuchi (2012)

A rapid, targeted, neuron-selective, in vivo knockdown following a single intracerebroventricular injection of a novel chemically modified siRNA in the adult rat brain.

J. Biotechnol. 157(2), 326-333. (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

① The 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Diseases, 2013 年 3 月 8 日、イタリア、フィレンツェ (ポスター発表)

Hidemitsu Nakajima, Takeya Kubo, Ayano Fukuhara, Masanori Itakura, Mitsuru Kuwamura, Yasu-Taka Azuma, Takashi Inui, Tadayoshi Takeuchi

「Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase act as a seed of alfa-synuclein amyloidogenesis in oxidative stress-induced neurotoxicity both in vitro and in vivo」

② The 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Diseases, 2013 年 3 月 7 日、イタリア、フィレンツェ (ポスター発表)

Takeya Kubo, Hidemitsu Nakajima, Yuko Semi, Satoshi Kume, Masanori Itakura,

Shusaku Higashida, Mitsuru Kuwamura, Yasu-Taka Azuma, Takashi Inui and Tadayoshi Takeuchi

「Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregates accelerates amyloidogenesis of amyloid-β40 and promotes amyloid-β40-induced cell death」

③ 第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 15 日、盛岡 (口頭発表)

久保岳也、中嶋秀満、Shahani Neelam、東泰孝、竹内正吉、澤 明 (2012)

「ラット MCAO モデルにおいて、核移行した GAPDH は PARP-1 に直接結合し活性化させる」

④ Bio tech 2012 アカデミックフォーラム、2012 年 4 月 25 日、東京 (口頭発表)

中嶋秀満

「GAPDH ペプチドのアミロイド凝集抑制効果」

⑤ 第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14 日、京都 (口頭発表)

久保岳也、瀬見優子、中嶋秀満、田島久男、東 泰孝、竹内正吉

「Amyloid-like fibril of GAPDH enhances aggregation and neurotoxicity of α-synuclein」

⑥ 第 64 回日本薬理学会西南部会、2011 年 11 月 20 日、福岡 (口頭発表)

瀬見優子、中嶋秀満、久保岳也、板倉正典、東 泰孝、竹内正吉

「アミロイド β のアミロイド化と細胞死に対する GAPDH アミロイド様線維の増強効果」

⑦ 第 64 回日本薬理学会西南部会、2011 年 11 月 20 日、福岡 (口頭発表)

久保岳也、中嶋秀満、桑村 充、井澤武史、東 泰孝、竹内正吉

「新型 siRNA のラット側脳室内単回投与による in vivo 脳内蛋白質ノックダウンの有効性」

⑧ 第 54 回日本神経化学学会大会、2011 年 9 月 27 日、加賀 (口頭発表)

久保岳也、中嶋秀満、瀬見優子、桑村 充、井澤武史、東 泰孝、竹内正吉

「Accell siRNA の単回脳室内投与による脳内の遺伝子サイレンシング効果」

⑨ 第 54 回日本神経化学学会大会、2011 年 9 月 27 日、加賀 (口頭発表)

瀬見優子、中嶋秀満、久保岳也、板倉正典、東 泰孝、竹内正吉

「GAPDH凝集物はアミロイドβの線維化を促進する」

⑩第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月20日、堺（口頭発表）

久保岳也、中嶋秀満、桑村 充、井澤武史、東 泰孝、竹内正吉

「Accell™ siRNA のラット側脳室内投与による脳内遺伝子発現のサイレンシング」

⑪第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月20日、堺（口頭発表）

瀬見優子、中嶋秀満、久保岳也、板倉正典、東 泰孝、竹内正吉

「GAPDHアミロイド様線維はアミロイドβの凝集を促進する」

⑫大阪府立大学メディカルバイオフィオーラム、2011年1月29日、泉佐野（口頭発表）

中嶋秀満

「多機能性酵素 GAPDH の脳神経疾患における機能的役割と創薬ターゲットとしての可能性」

⑬第118回日本薬理学会近畿部会、2010年11月19日、豊中（口頭発表）

三崎翔平、中嶋秀満、東 泰孝、一條秀憲、竹内正吉

「GAPDH と ASK1 の機能的相互作用」

⑭創薬薬理フォーラム第18回シンポジウム「神経細胞保護」、2010年2月17日、東京（口頭発表）

中嶋秀満

「多機能性酵素 GAPDH の神経細胞死における機能的役割と創薬標的としての可能性」

⑮第150回日本獣医学会学術集会、2010年9月16日、帯広（口頭発表）

久保岳也、瀬見優子、中嶋秀満、田島久男、東 泰孝、竹内 正吉

「GAPDHアミロイド様繊維とα-synucleinのクロストークと神経細胞死」

⑯第150回日本獣医学会学術集会、2010年9月16日、帯広（口頭発表）

三崎翔平、中嶋秀満、東 泰孝、竹内正吉

「新規酸化ストレスカスケード：GAPDH-ASK1経路の病態生理学的意義の解明」

⑰Neuro2010（第33回日本神経科学大会第53回日本神経化学会大会第20回日本神経回路学会大会合同大会）、2010年9月2日、神戸（口頭発表）

久保岳也、中嶋秀満、東 泰孝、竹内正吉

「GAPDH凝集特異的ドミナントネガティブ分子による酸化ストレス誘導性神経細胞死の抑制」

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 秀満 NAKAJIMA HIDEMITSU

（大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：30405360

(2) 研究分担者

桑村 充 KUWAMURA MITSURU

（大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授）

研究者番号：20244668

(3) 連携研究者

疋田 貴俊 TAKATOSHI HIKIDA

（(財)大阪バイオサイエンス研究所・システムズ生物学部門・研究員）

研究者番号：70421378