

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590111

研究課題名(和文) 損傷脳における PEDF の神経保護作用、及び神経再生促進作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of neuroprotective effect of pigment epithelium derived factor

研究代表者

矢部 武士 (YABE, TAKESHI)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：40239835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

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うとともに、グリア系細胞に対する効果を *in vitro*、*in vivo* の両面から検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is a 50-kDa secreted glycoprotein and a non-inhibitory member of the serine protease inhibitor (SERPIN) gene family. PEDF is detected in a broad range of human tissues, including almost all brain areas, and has been shown to have strong neuroprotective properties for various types of neurons including cerebellar granule neurons, hippocampal neurons, striatal neurons, retinal neurons and spinal cord motor neurons. These observations raise the possibility that application of PEDF may be helpful in designing new therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. In this study, we tested neuroprotective effect of PEDF *in vivo* and *in vitro*.

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 神経細胞死 神経新生

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

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、酸化的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、これまで検討がほとんど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うことにより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。また、グリア系細胞や神経幹細胞に対する PEDF 作用を解析し、中枢神経系における PEDF の役割を明らかとしたい。

3. 研究の方法

PEDF リコンビナントタンパクの調整

His-tag をつけたヒト PEDF cDNA を組み込んだ pCEP4 発現ベクターを 293 細胞にトランスフェクションし、培養上清中の PEDF を TALON Resin を用いた affinity column により調整した。

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。

線条体へのキノリン酸の投与

100 nmol のキノリン酸を右側線条体 (bregma より ML 3mm; DV 6mm) に注入し、線条体の神経細胞死を誘導した。

グルタミン酸取り込み能の検討

アストロサイト培養上清中のグルタミン酸濃度は酵素反応を用いた吸光度法により測定を行った。すなわち、アストロサイト培養上清と酵素反応液 (glutamate dehydrogenase, NAD, MTT, 1-Methoxy-5-methyl-phenazinium methyle sulfate, 0.1 % Triton X-100)を室温で 20 分間のインキュベーション後、反応停止液 (DMF/SDS, pH4.7)を加え、570 nm における吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1) 神経変性疾患モデル動物を用いた *in vivo* での神経保護作用の解析

変異型 PEDF 蛋白を用いた神経保護活性発現ドメインの解析

PEDF は 418 個のアミノ酸より構成される蛋白であるが、神経保護作用にはアミノ酸残基 78-121 の 44mer のペプチドが、血管新生阻害作用にはアミノ酸残基 44-77 の 34mer のペプチドが重要な役割を担っていることが *in vitro* の実験系により明らかとされている (Filleur et al., *Cancer Res.* 2005)。そこでこれらのペプチド領域が実際に *in vivo* での効果に関連しているかどうかを明らかとするために、各活性発現ドメインを欠損させた変異型 PEDF 蛋白の過剰発現系を構築し、活性発現部位の有無による神経保護効果への影響について神経変性疾患モデルラットを用いた *in vivo* の系で評価した (Fig. 1, 及び 2)。

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、及び変異型 PEDF が高発現していることを western blot により確認できた (Fig. 2)。

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の投与により

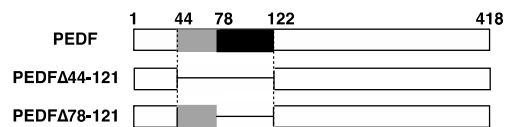


Fig. 1 変異型 PEDF 蛋白の構造

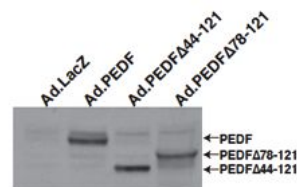


Fig.2 アデノウイルスベクターを用いたラット脳への変異型 PEDF 遺伝子の導入

変異型 PEDF を過剰発現させたラットに NMDA 受容体のアゴニストであるキノリン酸を投与し各種解析を行った。キノリン酸投与後の

神経細胞死は NeuN 陽性神経細胞数をカウントすることにより行った。Fig. 3 に示したように PEDF 44-121 を過剰発現させた動物では、野生型の PEDF に比べて神経保護活性は低下していた。一方、PEDF 78-121 の過剰発現により、キノリン酸による神経毒性は野生型と同程度に抑制された。またアポモルフィン誘発回転運動を指標にした行動薬理的解析においても PEDF 78-121 を過剰発現させた動物において回転行動が抑制されたものの PEDF 44-121 には効果が認められなかった。(Fig.3)

これらの結果は、従来、培養細胞を用いた検討により推定されていた結果と相反するものであり、これらの領域の作用に関しては今後さらなる検討が必要と考えられた。

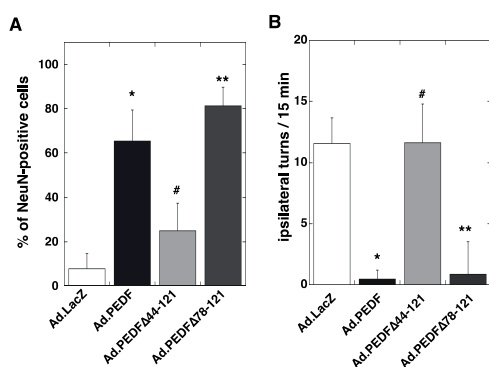


Fig. 3 変異型 PEDF の作用

- A. キノリン酸による神経毒性に対する変異型 PEDF の作用
 B. アポモルフィン誘発回転行動に対する変異型 PEDF の作用

(2) 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

アストロサイトは GLAST や GLT-1 といったグルタミン酸トランスポーターを介して、シナプス間隙中のグルタミン酸を積極的に取り込み、グルタミン酸毒性からニューロンを保護しているものと考えられている。PEDF によるグルタミン酸毒性軽減作用にグルタミン酸トランスポーターを介した作用があるかについて検討を行った。

PEDF による GLAST 発現増強作用

生後3日目のラットより調整したアストロサイトにリコンビナント PEDF を作用させ、24時間後に細胞を4% PFA で固定し、免疫染色法にて GLAST, 及び GLT-1 の発現を調べた。Fig.4 に示すように PEDF を作用させた細胞でグルタミン酸トランスポーターの発現が増加していることを確認できた。

PEDF によるグルタミン酸取り込み促進作用

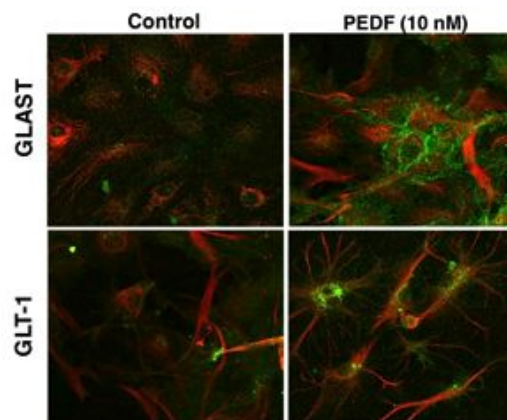


Fig. 4 PEDF によるグルタミン酸トランスポーター発現増強作用

- (上段) 緑; GLAST, 赤; GFAP
 (下段) 緑; GLT-1, 赤; GFAP

培養アストロサイトに 200 μ M のグルタミン酸を添加し、1 時間後に培養上清を回収し、培養上清中の残存グルタミン酸量を調べた。Fig. 5 に示したように PEDF を作用させた細胞では、有意にグルタミン酸残存量が減少し、グルタミン酸取り込み能が亢進されていることが示唆された。

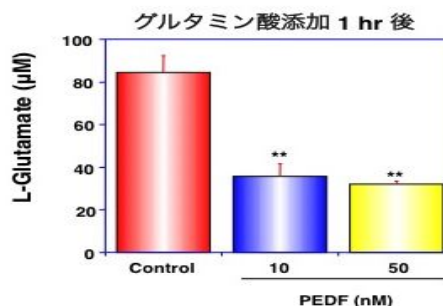


Fig. 5 PEDF によるグルタミン酸除去能亢進作用

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)

(1) Becerra SP, Dass CR, Yabe T, Crawford SE. Pigment epithelium-derived factor: chemistry, structure, biology, and applications. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:830975. doi: 10.1155/2012/830975.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢部 武士 (Yabe Takeshi)

摂南大学・薬学部・教授

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