

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590644

研究課題名(和文) 脳梗塞治療薬開発に向けた新戦略 - 虚血性神経細胞障害における亜鉛シグナルの意義 -

研究課題名(英文) New strategy for drug development of cerebral ischemia; zinc signal is a potential target

研究代表者

原 宏和 (Hara, Hirokazu)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30305495

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)：脳梗塞時に神経終末から多量に放出される亜鉛が神経細胞死を引き起こすことから、亜鉛は虚血性脳障害の増悪因子の一つと考えられている。本研究では、亜鉛誘導性の神経細胞死の分子機構の解明に取り組み、亜鉛がアポトーシス促進因子Bimの選択的スプライシングを変化させることによりその発現を調節していることを明らかにした。また、亜鉛誘導性の神経細胞死を抑制する低分子化合物を見出し、その作用機序を解明した。

研究成果の概要(英文)：There is increasing evidence that excessive zinc release from presynaptic terminals following cerebral ischemia induces neuronal cell death. It was reported that the blockade of free zinc by zinc chelators abolishes the neurodegeneration induced by cerebral ischemia. These findings support the concept that zinc is one of mediators of ischemic neuronal cell death. However, the mechanism is not fully understood. In this study, we addressed molecular mechanisms of zinc-induced neurotoxicity. We demonstrated here that zinc-induced apoptosis might be regulated, at least in part, through alterations in splicing pattern of pro-apoptotic factor Bim. To our knowledge, this is first report showing a novel function of zinc as a splicing regulator. In addition, we provided evidence that apomorphine, a dopamine receptor agonist, protects against zinc-induced neurotoxicity independently of dopamine receptors.

研究分野：応用薬理学

科研費の分科・細目：臨床薬理学

キーワード：亜鉛 脳梗塞 神経細胞死 アポトーシス スプライシング

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は日本の死亡原因上位の疾患であり、そのうち、脳梗塞による死亡者数は、脳血管疾患の約6割を占める。脳梗塞の死亡者数は減少傾向にあるが、脳梗塞患者では脳組織障害が大きく、一命を取り留めたとしても重篤な後遺症が残る可能性が高いため、患者のQOLや医療費増加の観点から大きな社会的問題となっている。超高齢化社会が進行する日本において、今後も脳梗塞の総患者数、脳梗塞の後遺症による要介護者数は増加すると推察される。現在、本疾患の急性期の治療に血栓溶解薬組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)投与の治療効果が期待される反面、その使用は限定的であり頭蓋内出血の危険性も伴う。現在でも有効な治療薬は少なく、脳梗塞に対する十分な治療が提供されているとはいえない。それゆえ、脳梗塞の治療に有効な医薬品の開発が望まれている。

近年、脳内に豊富に存在する亜鉛が脳梗塞により惹起される虚血性神経細胞障害に関与していることが報告されたが、その詳細なメカニズムには不明な点が多い。亜鉛は脳内に豊富にする金属であり、通常はグルタミン酸作動神経の神経終末の小胞中に局在しているが、神経活動により神経終末に放出され、神経機能を調節している。しかし、脳梗塞の動物モデルにおいて、脳梗塞後に脳内において遊離亜鉛が増加すること、亜鉛キレーターが虚血性脳血管障害時の神経細胞死を抑制することなどから、脳内の亜鉛恒常性の破綻が脳組織障害の悪化と密接に関連していると推察される。それゆえ、亜鉛による神経細胞障害の分子機構を理解することは、本疾患の治療薬を開発する上で極めて重要であると考えられている。

2. 研究の目的

脳梗塞時に神経終末から多量に放出される亜鉛が神経細胞死を引き起こすことから、亜鉛は虚血性脳血管障害の増悪因子の一つと考えられている。これまでに、亜鉛がミトコンドリアや解糖系などを阻害することから、亜鉛による神経細胞死の機序としてエネルギー産生障害が挙げられている。

一方で、亜鉛による神経細胞死がアポトーシスにより引き起こされることも報告されている。しかし、亜鉛により惹起されるどのようなシグナルが神経細胞のアポトーシスを導くのかは十分に理解されていない。そこで、我々は、アポトーシス促進因子BH3-onlyタンパク質(PUMA、Bimなど)に着目し、亜鉛によるこれら分子の発現調節機構に焦

点を当て解析を行ってきた。その結果、亜鉛によるPUMAの発現がp53に調節されていること、亜鉛によりBimの選択的スプライシングが変化し、最もアポトーシス活性の強いバリエーションBimSの産生が亢進することを明らかにした。しかし、亜鉛がBimの選択的スプライシングのパターンを変化させる機序については不明である。これまでに、亜鉛が選択的スプライシングを制御するという報告はなく、本現象は亜鉛の新規作用と考えられる。そこで、我々は、亜鉛がBimのスプライシングを調節する分子機構について解析を行った。

また、本研究では、脳梗塞の治療薬の開発に向けて亜鉛による神経細胞死を抑制する化合物の探索とその作用機序の解明にも取り組んだ。

3. 研究の方法

(1)細胞培養：ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞、ラット大脳皮質から調製した初代培養神経細胞、ラットミクログリア細胞株HAPI細胞を使用した。

(2)mRNAの測定：細胞から総RNAを抽出した後、cDNAを作製した。このcDNAを鋳型として各遺伝子に特異的なプライマーを用いPCRを行った。

(3)Bimミニ遺伝子の構築：ヒトゲノムDNAを鋳型とし、Bim遺伝子のエクソン2からエクソン4の3'末端側に隣接したイントロンの一部の領域およびエクソン5の5'末端側に隣接したイントロンの一部からエクソン5の領域のDNAをPCR法により増幅した。各DNA断片を結合させた後、pEGFP-N1ベクターにサブクローニングし、Bim-EGFPミニ遺伝子を構築した。また、このミニ遺伝子を基に種々の変異体を作製した。

(4)RNA結合実験：核抽出物とビオチン標識RNAプローブを氷上で30分放置した後、氷上で反応混合物にUVを照射した。その後、RNA-タンパク質複合体を12% SDS-PAGEで分離した後、PVDF膜に転写した。この膜をアビジン標識ペルオキシダーゼと反応させた後、化学発光法によりRNA-タンパク質複合体を検出した。

(5)ウエスタンブロット：細胞を可溶化した後、12% SDS-PAGEにて分離した。その後、PVDF膜に転写し、一次抗体、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いてウエスタンブロットを行った。検出は化学発光により行った。

(6)NAD⁺測定：24穴プレートに培養した神経細胞に亜鉛を1時間曝露させた後、さらに1.5時間培養した。その後、NAD⁺を抽出し測

定した。

(7) 亜鉛イメージング: 3.5 cm ディッシュに培養した神経細胞に亜鉛蛍光プローブ FluoZin-3, AM を取り込ませた後、亜鉛を 1 時間曝露させた。その後、培地を交換し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて亜鉛を検出した。

4. 研究成果

(1) 亜鉛による Bim スプライシングの調節機構

亜鉛による Bim スプライシング調節領域の同定: 最もアポトーシス活性の強い Bim のスプライシングバリエーション BimS の産生が亜鉛により優先的に亢進する。BimS ではエクソン 4 が Bim mRNA 前駆体から排除されることから、エクソン 4 およびその近傍のイントロンにエクソン 4 の認識に関わるエクソンあるいはイントロスプライシングエンハンサー (ESE あるいは ISE) が存在すると考えられる。そこで、BimS のスプライシングを調節する ESE/ISE を同定するために、Bim ミニ遺伝子の欠失変異体を作製し検討した。その結果、エクソン 4 に隣接したイントロンの一部を欠損させたとき、BimS-EGFP (ミニ遺伝子由来の転写物) の産生が亢進したことから、この領域にエクソン 4 の認識に関与する ISE が存在すると推察された。そこで、ESE finder によりこの領域を解析したところ、RNA 結合タンパク質である SR タンパク質 SRSF6 の推定結合配列が多数認められた。

亜鉛による SRSF6 機能制御: 推定された ISE と SRSF6 の関連性を明らかにするために、ISE 内の塩基を置換したミニ遺伝子の変異体を作製し、Bim スプライシングに対する影響を解析した。その結果、この変異体ではエクソン 4 の排除 (BimS-EGFP の産生) が促進されること、亜鉛による Bim-EGFP の産生亢進が認められないことが判明した。そこで、実際に SRSF6 がこの ISE に結合するかどうかを確かめるために、この ISE に相当する合成 RNA を作製し、細胞から調製した核画分を用いて結合実験を行ったところ、SRSF6 がこの配列に結合することが明らかとなった。また、亜鉛を曝露した細胞から調製した核画分を用いたとき、SRSF6 とこの合成 RNA の結合は抑制された。このとき、リン酸化タンパク質である SRSF6 が高リン酸化されている状態であることも判明した。

以上より、亜鉛による BimS の優先的な産生亢進は、以下の機序により引き起こされると考えられた。すなわち、亜鉛により SRSF6 の高リン酸化が亢進し、エクソン 4 近傍の ISE

に SRSF6 が結合できなくなる。その結果、エクソン 4 の認識ができなくなり、エクソン 4 の排除が促進されることにより BimS の産生亢進が引き起こされると考えられた (図 1)。

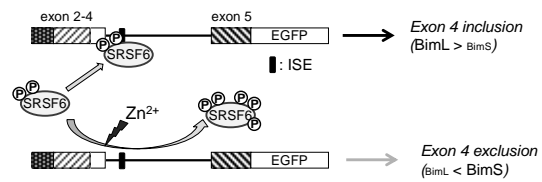


図 1 亜鉛による惹起される BimS の優先的な産生亢進の分子機構

(2) 亜鉛による神経細胞毒性を抑制する化合物の探索

初代培養した神経細胞に亜鉛を曝露させたとき、神経細胞死が引き起こされる。以前、我々は、このような亜鉛誘導性の神経細胞死を抑制する化合物の探索を行い、ドパミン受容体アゴニストのアポモルフィン (Apo) が亜鉛誘導性の神経細胞死を抑制することを見出した。そこで今回、Apo の神経保護作用の分子機構について検討した。亜鉛による神経細胞死は、Apo の前処理により Apo 濃度および処理時間依存的に抑制された。亜鉛曝露時に生じる神経細胞内 NAD^+ 量や ATP 産生の低下も Apo の前処理により回復した。Apo の神経細胞毒性に対する保護作用はドパミン受容体アンタゴニスト存在下においても影響を受けなかった。

一方、Apo は自己酸化により活性酸素種 (ROS) やキノン体を生成することが報告されているため、これら分子が Apo の保護作用に及ぼす影響について検討したところ、N-アセチルシステインが部分的に Apo の保護作用を阻害した。これらのことから、Apo の亜鉛神経細胞毒性に対する保護作用はドパミン受容体を介した作用ではなく、Apo の自己酸化により生成する Apo のキノン体などが保護作用発現に関与している可能性が示唆された。

また、亜鉛曝露により生じる神経細胞内亜鉛蓄積を Apo は抑制した。Apo は神経細胞において、細胞内亜鉛の恒常性に関するメタロチオネインや亜鉛トランスポーター ZnT1 の発現を亢進したことから、Apo は神経細胞における亜鉛恒常性を是正することにより保護作用を制御している可能性が示唆された。

(3) ミクログリアの活性化を抑制する化合物の探索

ミクログリアは脳内の免疫担当細胞であり、定常状態では神経機能の維持に関与している。しかし、脳梗塞や神経変性疾患などの病巣ではミクログリアの活性化が認められること、活性化ミクログリアが神経細胞障害を悪化させていることなどが報告されている。我々も、活性化ミクログリアから産生される一酸化窒素(NO)誘導体パーオキシナイトライト(ONOO⁻)が神経細胞死を引き起こすことを明らかにしている。それゆえ、我々は脳梗塞による神経障害の抑制には、活性化ミクログリアにおいて亢進する誘導型NO合成酵素(iNOS)の発現を抑制することが重要と考え、リポ多糖(LPS)により誘導されるiNOSの発現を抑制する化合物の探索を行ってきた。以前、岐阜県産の赤かぶ由来のカルコンが抑制作用を示すことを明らかにしており、今回は、この構造を基に10種類の誘導体を作製し、構造活性相関を解析した。その結果、IC₅₀値が数μMの強いiNOS誘導阻害作用を有する化合物を得ることができた。また、その分子機構の解明にも取り組み、この化合物はLPSにより活性化されるSTATシグナルを阻害することによりiNOS誘導抑制作用を発揮することを明らかにした。

(4) まとめ

BimSはBimのバリエーションの中で最もアポトーシス活性が強いことから、亜鉛によるBimSの優先的な産生亢進が、亜鉛による神経細胞死を制御している可能性が示唆された。また、亜鉛誘導性の神経細胞死を抑制する化合物や活性化ミクログリアを抑制する化合物を見出すことができた。これらの成果は、亜鉛をターゲットとした脳梗塞の治療薬を開発する上で重要な知見になると考える。

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4件)

- Hara H, Ikeda R, Ninomiya M, Kamiya T, Koketsu M, Adachi T: Newly synthesized 'hidabeni' chalcone derivatives potently suppress LPS-induced NO production via inhibition of STAT1, but not NF-κB, JNK, and p38, pathways in microglia. *Biol Pharm Bull* **37**, 1042-1049, 2014. 査読有
DOI: 10.1248/bpb.b14-00116
- Hara H, Takeda T, Yamamoto N, Furuya K, Hirose K, Kamiya T, Adachi T: Zinc-induced modulation of SRSF6 activity alters

Bim splicing to promote generation of the most potent apoptotic isoform BimS. *FEBS J* **280**, 3313-3327, 2013. 査読有

DOI: 10.1111/febs.12318

Hara H, Maeda A, Kamiya T, Adachi T: Protective effects of apomorphine against zinc-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Biol Pharm Bull* **36**, 585-591, 2013. 査読有

DOI: 10.1248/bpb.b12-00962

Hara H, Nakamura Y, Ninomiya M, Mochizuki R, Kamiya T, Aizenman E, Koketsu M, Adachi T: Inhibitory effects of chalcone glycosides isolated from *Brassica rapa* L. 'hidabeni' and their synthetic derivatives on LPS-induced NO production in microglia. *Bioorg Med Chem* **19**, 5559-5568, 2011. 査読有

DOI: 10.1016/j.bmc.2011.07.036

[学会発表](計12件)

木元大, 原 宏和, 梶田実穂, 高田知里, 神谷哲朗, 足立哲夫: ミクログリアにおけるLPS誘導性IL-23発現に対するアポモルフィンの抑制作用, 日本薬学会第134年会, 熊本(2014, 3/27-30)

Hirokazu Hara, Tetsuro Kamiya, Tetsuo Adachi: Pretreatment with apomorphine protects cultured cortical neurons from zinc-induced neurotoxicity, Neuroscience 2013, San Diego, USA (2013, 11/9-13)

原 宏和: 脳内亜鉛の恒常性破綻と神経細胞死, メタルバイオサイエンス 2013, 静岡(2013, 9/26-27)

土井卓也, 原 宏和, 梶田実穂, 神谷哲朗, 足立哲夫: ミクログリアにおける亜鉛誘導性IL-23発現にはATF4が関与している, 第86回日本生化学会大会, 横浜(2013, 9/11-13)

梶田実穂, 原 宏和, 土井卓也, 神谷哲朗, 足立哲夫: ミクログリアにおいて亜鉛はIL-23発現を誘導する, 第59回日本薬学会東海支部大会, 名古屋(2013, 7/6)

原 宏和, 前田明日香, 神谷哲朗, 足立哲夫: 亜鉛神経毒性に対するアポモルフィンの保護作用, 第66回日本酸化ストレス学会, 名古屋(2013, 6/13-14)

廣瀬和也, 原 宏和, 鳥居 薫, 神谷哲朗, 足立哲夫: 亜鉛によるSRSF6の活性低下がBim遺伝子のスプライシング変化を惹起する, 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 名古屋(2013, 5/25)

原 宏和, 武田樹也, 古谷佳祐, 神谷哲朗, 足立哲夫: 亜鉛によるBimのスプライシングパターン変化におけるSRp55

の関与，第 85 回日本生化学会大会，福岡（2012,12/14-16）

池田諒子，原 宏和，神谷哲朗，二ノ宮真之，瀨藤 守，足立哲夫：飛騨紅かぶカルコン誘導体のミクログリアにおける抗炎症作用とその構造活性相関，第 58 回日本薬学会東海支部大会，静岡（2012，7/7）

原 宏和，池田諒子，神谷哲朗，二ノ宮真之，瀨藤 守，足立哲夫：ミクログリアにおける iNOS 発現誘導を阻害する飛騨紅かぶカルコンの構造活性相関，第 65 回日本酸化ストレス学会，徳島（2012，6/7-8）

原宏和，足立哲夫：酸化・ニトロ化ストレス細胞障害を抑制する保護物質の探索研究，日本酸化ストレス学会東海支部設立シンポジウム，名古屋（2012，2/18）
前田明日香，原 宏和，神谷哲朗，足立哲夫：亜鉛による神経細胞障害に対するアポモルフィンの保護作用．第 84 回日本生化学会大会，京都（2011,9/21-24）

〔図書〕（計 1 件）

Hirokazu Hara, Elias Aizenman: Oxidative Stress and Neuronal Zinc Signaling; Zinc Signals in Cellular Functions and Disorders, Springer (in press)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：アポトーシス促進因子 Bim のスプライシングパターン変化を指標とした新規抗がん剤のスクリーニング法

発明者：原 宏和、足立哲夫

権利者：岐阜薬科大学

種類：特許

番号：特許願 2012-048222 号

出願年月日：2012 年 3 月 5 日

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research_rinya.html

6．研究組織

(1)研究代表者

原 宏和（HARA, Hirokazu）

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30305495

(2)研究分担者

足立哲夫（ADACHI, Tetsuo）

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40137063

神谷哲朗（KAMIYA, Tetsuro）

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40137063