

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月25日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659056

研究課題名（和文） 新規二元性脳保護 DAMP の戦略的スクリーニング

研究課題名（英文） Screening of binary neuroprotective DAMPs activity

研究代表者

植田 弘師 (UEDA HIROSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00145674

研究成果の概要（和文）：核タンパク質プロサイモシン α (ProT α)は、核内、細胞質、細胞外とそれぞれの存在場において、自己保護に寄与する多機能性を有している。我々は、ProT α が虚血性ストレスに応じて非小胞性に神経細胞から遊離し、ネクローシスを抑制する保護分子であることを明らかとしてきた。さらに、細胞外 ProT α は、神経免疫系を介してアポトーシスも抑制する。細胞ストレス誘発性遊離分子であることから、ProT α は新規の神経保護性の DAMPs として分類される。虚血誘発性障害に対する細胞外 ProT α 神経保護は、二種の異なった細胞膜受容体を介するものである。本研究ではこれらの受容体を介した ProT α の作用機構を明らかとした。さらに、脳梗塞治療薬の創薬標的として有望なこれら受容体に対する ProT α の作用ドメインをペプチドレベルで明らかにすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Prothymosin α (ProT α), a nuclear protein plays multi-functional roles in the nucleus, cytosol, and extracellular environment in terms of auto-protection. We have already revealed that ProT α is released from neurons on ischemic stress through non-vesicular manner and exerts a unique form of neuroprotection through an anti-necrotic mechanism. In addition, extracellular ProT α also exerts an anti-apoptosis through neuroimmunological system. Regarding manner of stress-induced release, ProT α is categorized as novel neuroprotective damage-associated molecular patterns (DAMPs). The extracellular role of ProT α against ischemia-induced damages is mediated through different two plasma membrane receptors. In the present study, we revealed mechanism of ProT α for the neuroprotection via these receptors. Furthermore, we successfully identified functional domains of ProT α as a peptide level on receptor, a candidate druggable target in the treatment of brain infarct.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

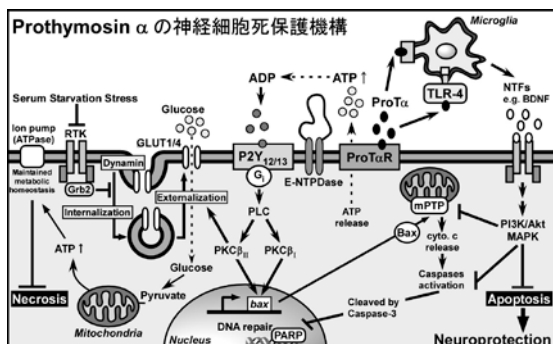
科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：生物活性物質、神経創薬

1. 研究開始当初の背景

DAMPs (Damage-associated molecular patterns) は、自然炎症時に細胞死を介して受動的に細胞外遊離され病原体センサーに認識される秩序制御分子群である。また、病態時における慢性炎症への寄与が明らかとなっており、その制御基盤の解明は重要な課題となっている。

本研究代表者らは、脳神経系において、神経細胞のネクローシスからアポトーシスへの細胞死モードスイッチ機構、特にネクローシス抑制機構に関心を持ち、虚血性の培養神経細胞上清からネクローシス抑制蛋白質プロサイモシン α (ProT α) を発見した。既に著明な時空間的虚血保護機構を見出しており、ProT α が脳コミュニティを維持する責任ロバスタネス分子であるという視点を獲得に至った。さらには、ProT α のストレス誘発性に駆動する能動的遊離の全容をほぼ明らかとしており、脳保護性新規 DAMPs と位置づけている。ProT α は種々の生物において高度に保存された核蛋白質であり、核、細胞質、細胞外と存在場において多様な活性を有している。代表研究者らは、ProT α の細胞外神経保護機構の解明から、細胞膜受容体を介した精巧なその機構を明らかとしてきた。しかしながら、保護機構駆動に必須の受容体の同定が残された大きな課題であった。近年、申請者らは ProT α 結合性膜蛋白質の探索から、細胞外 ATP 量制御受容体の同定に成功した。また、他の研究グループが、HIV 感染ストレスに伴い ProT α が細胞外遊離し Toll-like receptor (TLR)-4 を介して HIV 複製を抑制することを報告した。申請者らも独自の調査から ProT α が TLR-4 に結合活性を有することを明らかとしており、「ProT α は二元性に異なる受容体を介して脳神経保護機構を駆動させる」という仮説機構を得るに至った（下図参照）。



その特徴は、神経細胞においては細胞外 ATP 量制御受容体を介した ATP の ADP への変換、ADP の ATP 受容体への作用といった複雑な制御機構であり、ミクログリアにおいては ATP 連続反応・TLR-4 を介した神経栄養因子

発現と栄養因子の神経細胞への作用という点にある。すなわち、神経細胞に発現している細胞外 ATP 量制御受容体への直接作用と、グリア細胞に発現している自然免疫受容体 TLR-4 を介した神経免疫系賦活化による間接作用による脳秩序維持機構である。

本研究の特色は、ProT α が細胞特異的に異なる二種の細胞膜受容体に作用することに着目した点にある。本点は、一般的なりガンド受容体の特異性と異なる点であり、自己保護機構や分子進化の点からも興味深い。ProT α が多機能性分子であることから、結合・活性制御領域をペプチドレベルで明らかとし、マッピングする点も重要な視点となる。ストレス依存的に細胞外遊離する DAMPs は多岐に渡り、細胞の秩序の運命決定を担っている。本研究の発展研究により得られるであろう ProT α 受容体標的化合物群は、基礎研究において脳 DAMPs ワールドにおける ProT α の役割を明確に評価できる有用性を有する。さらに、創薬におけるシード・リード化合物となることから病態制御に繋がり、ProT α が内在性分子であることから先制医療における治療薬開発に貢献できると考え、本研究を開始したものである。

2. 研究の目的

細胞コミュニティの秩序維持機構として、細胞外リガンドとその受容体（センサー分子）を介した情報伝達機構が重要であることは周知の事実である。ProT α の脳保護機構は、細胞特異的に発現する二種の細胞膜受容体を介したものである。本研究は、「化合物ライブラリーより ProT α 受容体に対する作用分子の網羅的探索」を行うことを大目標に据えた。創薬研究は、シード・リード化合物を同定し、個体レベルを含めた正当且つ戦略的な評価を行い、立体構造解析・*in silico* 解析・化合物合成を含めた大規模研究が必須である。本研究は、創薬研究の準備と位置づけ以下の項目を目標とした。

(1) 内在性リガンドである ProT α の神経保護活性中心ドメインをペプチドレベルで同定する。

(2) 受容体に対する ProT α 結合ドメイン、もしくは活性化ドメインをペプチドレベルで同定する。

(3) ProT α 由来活性ペプチドの神経保護効果の検証を個体レベルで明らかとする。

(4) 化合物ライブラリーを用いたハイスクリーン・アウトスクリーニングに耐える系を構築する。

3. 研究の方法

1) ProTαの神経保護活性中心ドメインのペプチドレベル同定

1-1) 活性中心ドメインの決定

ProTαの部分欠損変異体を作製し、初代培養大脳皮質神経細胞に対する細胞死抑制効果にて変異体の保護活性を測定した。

1-2) 活性中心ドメインのペプチド化

活性ドメインのアミノ酸をアラニンに置換するアラニンスキャニングを行い、活性に必須のアミノ酸を同定した。本結果を基に短鎖のProTα由来ペプチドを合成し、神経保護活性を測定した。

2) ProTαの受容体結合ドメインの同定

二種のProTα受容体との相互作用解析をバイオセンサーである水晶発振子：Quartz Crystal Microbalance (QCM)、もしくは表面プラズモン共鳴：Surface Plasmon Resonance (SPR)にて動力的に解析し、結合ドメインを決定した。また、TLR-4については、Protein Thermal Shift Assay (TSA)にて、ProTα由来ペプチドとの結合を確認した。

3) 受容体活性化ドメインの同定

神経保護活性に主要な経路となる細胞外ATP量制御受容体に対する活性をProTα、並びにProTα由来ペプチドについて解析を行った。

4) ProTα由来活性ペプチドの神経保護効果の個体レベル検証

1)にて同定されたProTα由来活性ペプチドの神経保護効果を緑内障モデルでもある網膜虚血モデル、脳梗塞モデルである一過性脳虚血モデル、血栓性モデルを用いて評価を行った。

5) ハイスループットスクリーニング系の構築

化合物の一斉スクリーニングに耐えうるS/N比の高い系の構築を試験管レベル、並びに、細胞レベルで試みた。

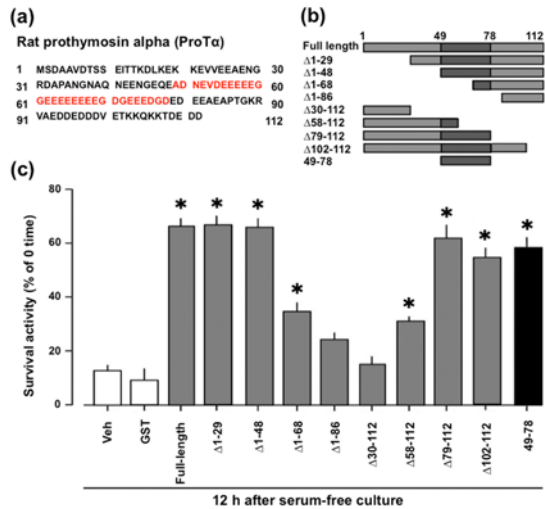
4. 研究成果

1) ProTαの神経保護活性中心ドメインのペプチドレベル同定とその保護作用

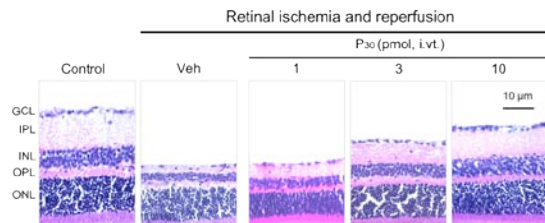
1-1) 30アミノ酸活性ドメイン

GST融合ProTα部分欠損変異体を8種作製し、血清除去ストレスによる初代培養大脳皮質神経細胞の細胞死抑制効果を検討した。その結果、49-78アミノ酸部分を欠損した変異

体では、細胞死保護効果が顕著に減弱した。対して、GST融合49-78変異体は、GST融合全長ProTαと同程度の保護効果を有していた(下図参照)。

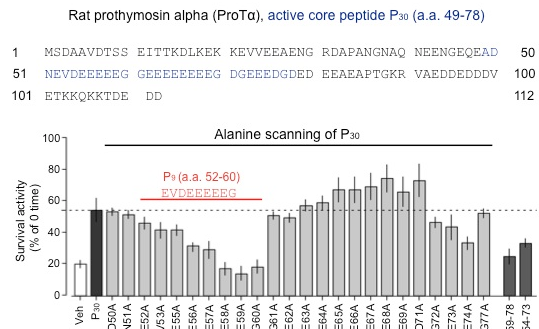


ProTαの49-78の30アミノ酸部分を合成(P₃₀)し、個体レベルにおける神経保護効果について検討した。網膜虚血モデル(下図参照)、一過性脳虚血モデル、血栓性脳梗塞モデルにおいて、顕著な神経保護効果が認められた。脳梗塞モデルにおいては、1 mg/kgの静脈内全身投与にて保護効果が認められ、虚血による運動障害の改善も認められた。

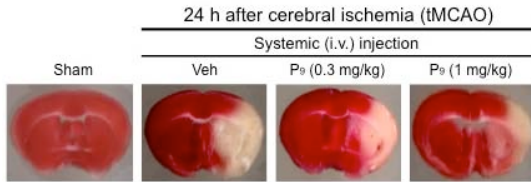


1-2) 9アミノ酸活性ドメイン

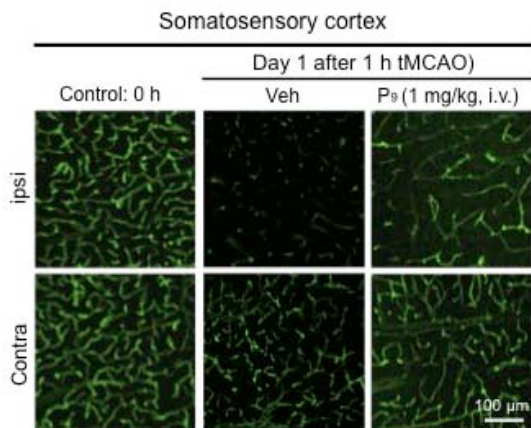
P₃₀からより短鎖の活性ドメインを決定するため、P₃₀のアラニンスキャニングを行ったところ、52-60の9アミノ酸が神経細胞死保護活性に重要であることが明らかとなった(下図参照)。



この9アミノ酸を合成 (P₉) し、同様に個体レベルにおける神経保護効果について検討した。網膜虚血モデル、一過性脳虚血モデル (下図参照) において、顕著な神経保護効果が認められた。P₉ についても、1 mg/kg の静脈内全身投与にて保護効果が認められた。



加えて、一過性脳虚血による血管障害までもが、P₉ により保護されることを見出した (下図参照)。

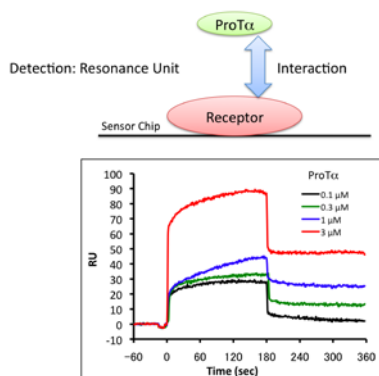


2) 受容体への作用とスクリーニング系構築

2-1) 細胞外 ATP 量制御受容体

ProTα との相互作用を SPR にて動力学解析を行い、結合することを確認し、本手法がスクリーニングの系として成立することを確認した。(下図参照)。

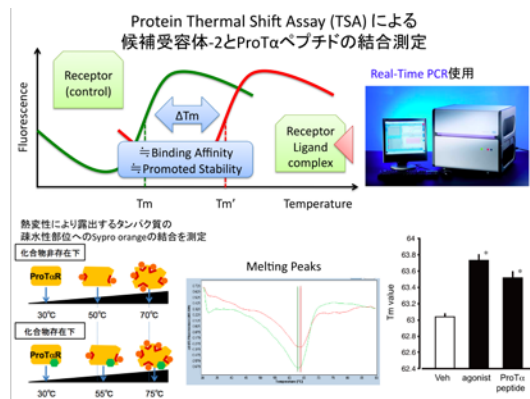
ProTα と候補受容体-1 の PPI (Protein-protein interaction) 測定



さらには、本受容体の有する ATP 量制御に関して、ProTα とその由来ペプチドが機能増強させることも確認している。

2-2) TLR4 受容体

本受容体と ProTα の相互作用を QCM を用いて動力的に解析し、ProTα の結合ドメインの決定にも成功した。さらに、本結合ペプチドのみで、受容体に結合することを TSA にて確認した (下図参照)。



当初、ProTα の TLR-4 を介したシグナルは、多くの TLR-4 リガンドの様に、MyD88-NFκB の系が主に駆動すると予想されたが、本シグナルのレポータージーンアッセイでは、優位なシグナルが認められなかった。また、個体レベルの実験により、他の下流シグナルが優位に動くことが予想される結果を得た。TLR はパターン認識受容体であり、SPR、QCM や TSA の様な結合実験では、ProTα の活性を模倣するような化合物のスクリーニングは困難であると考えられる。よって、レポータージーンアッセイのような、受容体下流シグナルまで含めたスクリーニング系の構築が不可欠であると考え、現在細胞レベルのスクリーニング系を構築中である。

本研究により、細胞外 ProTα 活性の標的である受容体への結合とその作用を ProTα のペプチドレベルで明らかとした。本ペプチドを基にしたペプチド創薬やペプチド構造から化合物を合成する創薬も期待され、現在研究を遂行中である。また、本研究により、確立した相互作用実験を基にしたスクリーニング手法は、他の創薬標的にも適応可能である。今後、二種の ProTα 受容体を標的とした化合物ライブラリーからの大規模スクリーニングを行う予定である。

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5件)

(1) Halder, S. K. & Ueda, H. Regional distribution and cell type-specific subcellular localization of Prothymosin alpha in brain. *Cell Mol Neurobiol* 32, 59-66 (2012). 査読有

(2) Halder, S. K., Matsunaga, H. & Ueda, H. Neuron-specific non-classical release of prothymosin alpha: a novel neuroprotective damage-associated molecular patterns. *J Neurochem* 123, 262-275 (2012). 査読有

(3) Ueda, H., Matsunaga, H. & Halder, S. K. Prothymosin α plays multifunctional cell robustness roles in genomic, epigenetic, and nongenomic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1269, 34-43 (2012). REVIEW 査読有

(4) Halder, S. K., Matsunaga, H., Yamaguchi, H. & Ueda, H. Novel neuroprotective action of prothymosin alpha-derived peptide against retinal and brain ischemic damages. *J Neurochem* (2013) in press. 査読有

(5) Halder, S. K., Sugimoto, J., Matsunaga, H. & Ueda, H. Therapeutic benefits of 9-amino acid peptide derived from prothymosin alpha against ischemic damages. *Peptides* 43C, 68-75 (2013). 査読有

[学会発表] (計3件)

①山口晴佳、Sebok Kumar Halder、松永隼人、植田弘師、脳梗塞における神経特異的なプロサイモシン α の遊離、第65回日本薬理学会西南部会、2012年、(熊本)

②松永隼人、植田弘師、神経保護性 DAMPs: プロサイモシン α の非小胞性遊離機構、第65回日本薬理学会西南部会、2012年、(熊本)

③ 松永隼人、植田弘師、Mechanism of non-vesicular release of neuroprotective DAMPs、第86回日本薬理学会年会、2013年、(福岡)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称: 血液脳関門障害改善剤

発明者: 植田弘師

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-028918

出願年月日: 2012年2月13日

国内外の別: 国内

名称: 血液脳関門障害改善剤

発明者: 植田弘師

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-262007

出願年月日: 2012年11月30日

国内外の別: 国内

名称: 血液脳関門障害改善剤

発明者: 植田弘師

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: (国際) PCT/JP2013/053436

出願年月日: 2013年2月13日

国内外の別: 国際

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

所属研究室ホームページ

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/neuro/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 弘師 (UEDA HIROSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00145674

(2) 研究分担者

松永 隼人 (MATSUNAGA HAYATO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 20437833

(3) 連携研究者

該当研究者無し