

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590121

研究課題名(和文)パーキンソン病におけるPGE2受容体の役割

研究課題名(英文)The role of PGE2 receptors in Parkinson's disease

## 研究代表者

松尾 由理 (Ikeda-Matsuo, Yuri)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：10306657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は膜結合型プロスタグランジンE合成酵素-1(mPGES-1)が6-OHDA誘導パーキンソン病(PD)モデルマウスの黒質ドパミン神経細胞脱落に寄与することを見出してきた。本研究では、mPGES-1が黒質ドパミン神経細胞で発現誘導すること、また、これがPGE2産生を介して神経細胞死に寄与するだけでなく、ドパミン量の低下、黒質線条体軸索投射の損傷、四肢の行動異常にも寄与することが明らかになった。さらに、PGE2の4つの受容体のうち、EP3受容体がドパミン神経細胞死に寄与することが、in vitro、in vivo PDモデルにて示唆された。Giを介したPKAの不活性化が寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have found that microsomal PGE synthase (mPGES)-1 plays a crucial role in dopaminergic neurodegeneration in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) model of parkinson's disease (PD). mPGES-1 was expressed in dopaminergic neurons, but not in microglia and astrocytes, in substantia nigra (SN). We found that mPGES-1 contributes not only to dopaminergic neuronal death through production of PGE2, but also to reduction in dopamine content, impairment of nigro-striatal projection and behavioral disorder assessed by Rotarod test. Furthermore, using in vitro and in vivo PD models, we found that EP3 receptors may have crucial role in mPGES-1 neurotoxicity. Results from excitotoxicity model in SH-SY5Y cells suggest that activation of EP3 receptor deteriorates Glutamate-induced apoptosis by inactivating PKA through Gi activation, followed by activation of caspases with modulation of Bcl-2. Thus EP3 receptor may have the key role in neuronal apoptosis after brain ischemia and also in PD.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：パーキンソン病 性疾患 神経細胞死 ノックアウトマウス  
 プロスタグランジンE2 EP受容体 プロスタグランジンE合成酵素 炎症 神経変

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) パーキンソン病と炎症反応

パーキンソン病 (PD) はふるえと歩行障害を伴う疾病で、人口の高齢化に伴い有病率は増加している。しかし、現在の治療は、枯渇したドパミン等を補充する対症療法であり、進行を遅らせることが出来ないだけでなく、精神・神経症状などの副作用の問題点が多い。より有効な治療薬の開発のためには、中脳黒質でのドパミン神経の脱落機序を解明することで、原因・増悪因子を同定し、それをターゲットとする必要がある。近年、PD の神経変性悪化に、炎症反応、即ち、ミクログリアの活性化や、サイトカイン、活性酸素等が寄与することが数多く報告され、炎症と神経変性の関係が注目されてきている。そこで我々は、PD 患者黒質での炎症性メディエーター、中でもプロスタグランジン  $E_2$  ( $PGE_2$ ) に着目した。

### (2) パーキンソン病と $PGE_2$

$PGE_2$  は PD 患者の黒質にて産生されることが知られているが、その機序や役割は不明であった。 $PGE_2$  は、アラキドン酸から 2 段階の酵素反応、即ち、COX と  $PGE_2$  合成酵素 (PGES) により合成され、4 つの受容体 (EP1-EP4) に作用する (図 1)。ドパミン神経毒である MPTP を用いた PD モデル動物において、ドパミン神経細胞死に COX-2 が寄与することが示唆されていた (Teismann et al., 2003)。しかし、COX-2 は  $PGE_2$  だけでなく、 $PGI_2$  や  $PGD_2$ 、 $TXA_2$  等の共通の合成酵素であり、COX-2 欠損型マウスの結果は  $PGE_2$  抑制によるものとは限らない。我々はこれまでに、脳梗塞をはじめとする脳炎症モデルにおいて、 $PGE_2$  産生の末端酵素である膜結合型  $PGE_2$  合成酵素 (mPGES-1) が病態増悪因子であることを、世界に先駆けて明らかにしてきた (Ikeda-Matsuo et al. 2005, 2006)。さらに、我々は脳梗塞モデルにおいて、mPGES-1 が上流酵素 COX-2 の毒性発揮に必須であること、即ち、mPGES-1 と COX-2 が共役的に作用して、大量の  $PGE_2$  を産生することが、脳梗塞障害悪化に寄与することを明らかにした (Ikeda-Matsuo et al. 2010a)。しかし、PD における mPGES-1 の役割は、それまで全く分かっていなかった。PD における  $PGE_2$  の役割を明らかにする目的で、まず、神経毒 6-OHDA を用いた PD モデル動物にて、黒質での mPGES-1 の誘導を確認するとともに、mPGES-1 欠損マウスにてドパミン神経脱落が野生型マウスに比べ低値であることが分かった。本研究では、PD モデル動物における mPGES-1 の更なる役割の解明と下流効果器について検討した。

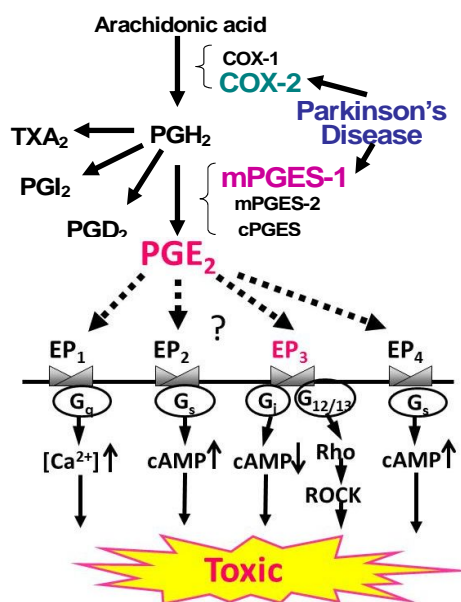


図 1.  $PGE_2$  生成経路と受容体

### (3) パーキンソン病と EP 受容体

mPGES-1 から産生される  $PGE_2$  が作用する下流効果器には、4 つの異なる細胞内情報伝達系を持つ受容体 (EP1-EP4) がある (図 1)。我々はこの中でも、EP3 受容体が脳虚血後の神経細胞死に寄与することを、脳梗塞モデルにて明らかにした (Ikeda-Matsuo et al. 2010b, 2011)。そこで、PD モデルでのドパミン神経脱落にも、EP3 受容体が寄与するのではないかと考え検討を試みた。

## 2. 研究目的

本研究では、PD の神経変性機序の解明、及び、有効な治療薬ターゲット分子の同定を最終目標として、 $PGE_2$  の PD における役割の解明を試みた。我々は既に、PD において  $PGE_2$  合成酵素 mPGES-1 がドパミン神経細胞死を促進することを明らかにしていたので、本研究では、mPGES-1 の役割の更なる解明とその下流効果器の同定を試みた。

- (1) *In vivo* マウス PD モデルを用いた mPGES-1 役割の解析
- (2) *In vivo* マウス PD モデルを用いた EP 受容体発現の解析
- (3) ドパミン神経細胞・神経芽細胞腫を用いた EP 受容体役割の解析
- (4) *In vivo* マウス PD モデルを用いた EP 受容体役割の解析
- (5) ドパミン神経芽細胞腫 (SH-SY5Y 細胞) を用いた EP 受容体下流毒性機序の解析

mPGES-1 阻害や受容体阻害により黒質神経変性が改善されれば、新たな PD 治療法に結びつくこと確信している。

### 3. 研究の方法

#### (1) PD モデル動物の作成

雄性 C57BL/6 マウス (22-27 g) に戻し交配した mPGES-1 欠損型マウス (mPGES-1 KO)、EP3 受容体欠損型マウス (EP3 KO)、或いは野生型マウス (WT) を用い、1.5% イソフルラン麻酔下、脳定位固定装置を用いて線条体内に 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  6-OHDA を 2  $\mu\text{l}$  投与した。Sham は同様に溶媒を投与した。

#### (2) mPGES-1 mRNA の解析

黒質を採取し、mRNA を抽出した。DNase 処理後、逆転写キットを用いて cDNA を作成した。さらに、SYBR Green 法により、Real-time PCR を行った。

#### (3) Western blotting 法による蛋白質発現解析

黒質或いは培養細胞をホモジナイズ後、15% アクリルアミドゲルにて電気泳動した。PVDF 膜に転写し、ブロッキング後、特異的抗体にて抗原抗体反応を行った。HRP 標識二次抗体を反応させ化学発光を検出した。

#### (4) 脳切片の蛍光染色

全身還流固定後、脳を摘出し、クリオスタットにて黒質部位を 20  $\mu\text{m}$  で薄切した。透過処理、ブロッキング後、特異的抗体にて一次抗体反応を行った。蛍光標識二次抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

#### (5) PGE<sub>2</sub> 量の測定

黒質よりプロスタノイドをメタノール抽出し、或いは、細胞の培養上清を用いて、市販の EIA キットにて、PGE<sub>2</sub> 量を測定した。

#### (6) ドパミン、DOPAC、HVA の測定

線条体を採取し、除タンパク後、HPLC にて、ドパミン、DOPAC、HVA の量を測定した。

#### (7) ローターロッド法

6-OHDA 投与したマウスの運動能力をローターロッドにて経時的に測定した。6-OHDA 投与前日に馴化を 3 回行った後、投与 14 日後に 16 rpm 1 分、20 rpm 4 分での試行時間のうち落下するまでの時間を計測した。

#### (8) 中脳神経細胞の初代培養法

胎生 14 日齢のラットまたはマウスより中脳を摘出し分散した後、N<sub>2</sub> supplement 含有 RBNM 培地を用いて、poly-L-lysine コーティングした dish, glass, または plate に 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> で播種し、37<sup>o</sup>, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後 3 日ごとに培地を 1/2 ずつ交換し、7 日間培養後 6-OHDA にて刺激し、各時間後回収して各検討に用いた。

#### (9) SH-SY5Y 細胞の培養

SH-SY5Y 細胞は、10%FBS 含有 DMEM 培地にて継代維持した。グルタミン酸や 6-OHDA 等の薬物刺激の 3 時間前より無血清培地に変更し、刺激 24~72 時間後に実験に用いた。

#### (10) MTT assay

250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  MTT となるように細胞培養液に加え、3 時間 37<sup>o</sup> で反応させた。その後、細胞を溶解し、プレートリーダーにて OD (570/655 nm) を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) *In vivo* マウス PD モデルを用いた mPGES-1 役割の解析

6-OHDA 線条体投与 14 日後には、WT で黒質のドパミン神経が脱落した。そこで、この時の mPGES-1 の発現を調べたところ、チロシン水酸化酵素 (TH) 陽性のドパミン神経細胞にて mPGES-1 が発現誘導することが、各種マーカー抗体との二重免疫染色法にて示された。Real-time PCR 法の結果より、mPGES-1 の mRNA が発現誘導したことから、転写促進を介して蛋白質発現が増加することが示唆された。mPGES-1 KO では黒質の PGE<sub>2</sub> 増加が消失するだけでなく、黒質ドパミン神経細胞の脱落が WT に比べ弱かった。そこで、線条体のドパミン量を測定したところ、WT に比べ mPGES-1 KO では、ドパミン量の低下が抑えられていた。さらに、線条体内に逆行性トレーサーである FluoroGold を投与し、黒質の染色細胞を検討したところ、WT では 6-OHDA 投与により顕著に低下したのに対し、mPGES-1 KO では Sham とほとんど変わらなかった (図 2)。そこで、ローターロッド法にて四肢の運動障害を両遺伝子間で比較したところ、WT では 6-OHDA 投与 14 日後には Sham の約半分の時間でバーから落下したのに対し、mPGES-1 KO は Sham とほぼ同レベルであった。従って、mPGES-1 はドパミン神経細胞に発現誘導し、ドパミン神経脱落とそれによる行動障害に寄与することが明らかとなった。

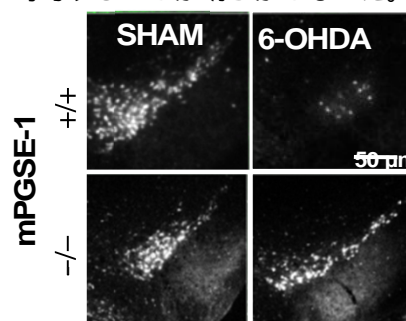


図 2. 6-OHDA による線条体 - 黒質軸索投射障害



(2) In vivo マウス PD モデルを用いた EP 受容体発現の解析

EP 受容体の発現については検討を行ったが、感度と特異性の高い EP 受容体抗体が入手できず、EP3 受容体の発現細胞を同定するには至らなかった。いくつかの抗体を購入して試したが、評価できる染色を得ることが出来なかったため、さらに他の抗体を用いて検討するとともに、バックグラウンドの染色を弱める工夫をする必要がある。

(3) ドパミン神経細胞・神経芽細胞腫を用いた EP 受容体役割の解析

まず、培養が簡便なヒトドパミン神経芽細胞腫の SH-SY5Y 細胞を用いて、EP 受容体の関与の解析を行った。この細胞に 6-OHDA を 72 時間暴露すると、濃度依存的な細胞死が認められた。次にこの細胞に EP1 - EP4 の受容体 mRNA が発現していることを確認した。そこで、6-OHDA 毒性に対する EP 受容体アゴニスト・アンタゴニストの作用を検討した。6-OHDA による毒性は、EP1-EP4 受容体アゴニストのうち、EP3 アゴニストによってのみ濃度依存的に促進された(図3)。一方、EP1、EP3、EP4 アンタゴニストのうち、EP3 アンタゴニストのみが、有意に毒性を軽減させた。従って、6-OHDA による神経毒性に、EP3 受容体が寄与する可能性が示唆された。そこで、ラット中脳神経細胞を初代培養し 6-OHDA 暴露すると、やはり濃度依存的な神経細胞死が認められた。6-OHDA による毒性は、内因性の PGE<sub>2</sub> 産生を抑制する NS398 により軽減する傾向があったが、ここに各種アゴニストを併用すると、EP1 と EP3 アゴニストによってのみ毒性が促進された。従って、ドパミン神経細胞で発現誘導する mPGES-1 は EP3 受容体を介して、毒性促進することが示唆された。

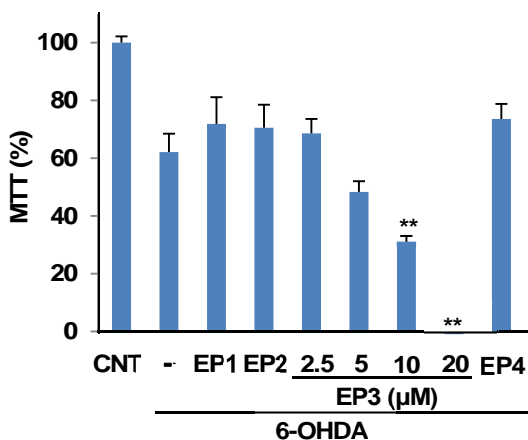


図3. 6-OHDA 毒性への EP アゴニスト併用効果

(4) In vivo マウス PD モデルを用いた EP 受容体役割の解析

6-OHDA 線条体投与 *in vivo* マウス PD モデルにて、14 日後のドパミン神経細胞脱落を WT と EP3 KO で比較検討した。WT では、6-OHDA 投与により、顕著な黒質の TH 陽性細胞数の減少がみられたが、EP3 KO では WT に比べ 6-OHDA 投与後も陽性細胞数が多かった(図4)。今後、線条体ドパミン量やローターロッド法による四肢の行動異常を両遺伝子型間で比較検討する予定である。本結果より、*in vivo* PD モデルにおいても、EP3 受容体が黒質ドパミン神経脱落を促進する可能性が示唆された。

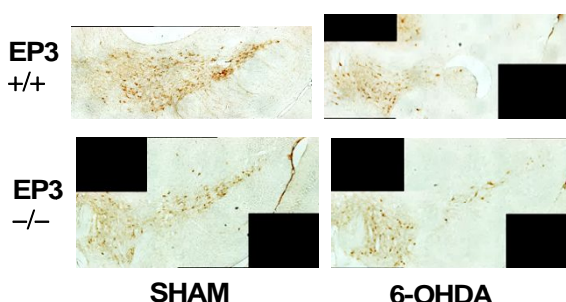


図4. 6-OHDA 誘発黒質ドパミン神経細胞脱落における EP3 受容体の寄与

(5) ドパミン神経芽細胞腫 (SH-SY5Y 細胞) を用いた EP 受容体下流毒性機序の解析

SH-SY5Y 細胞を用いて、EP3 受容体アゴニストによる毒性促進機序の薬理的解析を試みた。6-OHDA 毒性の促進の前に、まず以前より明らかにしていた、グルタミン酸による興奮毒性モデルを用いて検討を行った。グルタミン酸による興奮毒性は、各種 EP アゴニストのうち、EP3 アゴニストによってのみ悪化した。EP3 アゴニストによる毒性促進作用は、EP3 アンタゴニストによってのみ改善した。従って、興奮毒性においても、6-OHDA 毒性と同様に、EP3 受容体が毒性促進することが示唆された。EP3 毒性は、Gi 蛋白質阻害薬である百日咳毒素により抑制された(図5)。

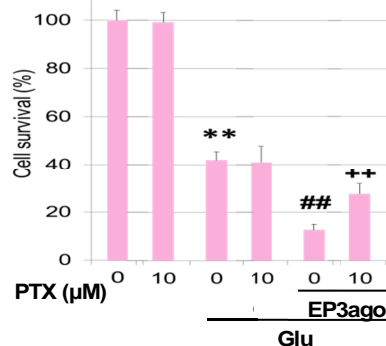


図5. EP3 アゴニストによる興奮毒性促進への Gi の関与

そこで Gi の下流シグナルであるプロテインキナーゼ A (PKA) の阻害薬 H89 並びにその非活性類似体 H85 の効果を検討した。EP3 毒性は H89 の共添加により、濃度依存的且つ顕著に促進されたのに対し、H85 では有意な促進は見られなかった。グルタミン酸と EP3 アゴニスト併用により顕著な caspase-3 及び caspase-9 の活性化と Bcl-2 の発現抑制が生じた (図 6)。グルタミン酸による caspase-3 及び caspase-9 の活性化も H89 でのみ有意に促進され、H85 では作用がなかった。以上より、EP3 活性化は、Gi 蛋白質の活性化を介して PKA を不活性化し、Bcl-2 の不活性化に続く caspase カスケードの活性化により、神経アポトーシスを促進する可能性が考えられた。

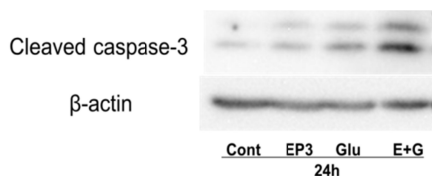


図 6. グルタミン酸と EP3 アゴニスト併用による caspase-3 の活性化

#### (6) まとめ

本研究より、*in vitro*, *in vivo* PD モデルにおいて、黒質ドパミン神経細胞の mPGES-1 発現誘導により生じた PGE<sub>2</sub> が EP3 受容体に作用することで、ドパミン神経変性を促進することが示唆された (図 7)。

今後、6-OHDA 毒性における EP3 受容体の関与について、詳細に検討する必要があるが、mPGES-1 ならびに EP3 受容体の役割がさらに明らかになれば、PD 治療の新たなターゲットになるものと期待される。

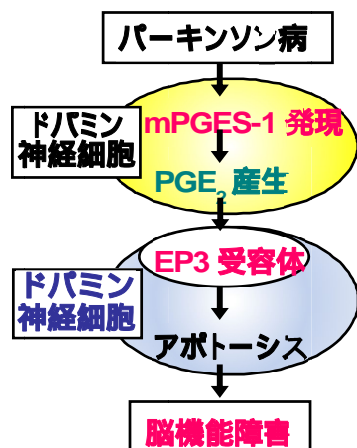


図 7 本研究結果のまとめ

#### <引用文献>

Ikeda-Matsuo Y, Ikegaya Y, Matsuki N, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microglia-specific expression of microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 contributes to lipopolysaccharide-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production. *J. Neurochem.*, 94(6): 1546-1558 (2005)

Ikeda-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103(31): 11790-11795 (2006)

Ikeda-Matsuo Y, Hirayama Y, Ota A, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenase-2 are both required for ischaemic excitotoxicity. *Br. J. Pharmacol.*, 159: 1174-1186 (2010a)

Ikeda-Matsuo Y, Tanji H, Ota A, Hirayama Y, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 contributes to ischaemic excitotoxicity through prostaglandin EP<sub>3</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 160: 847-859 (2010b)

Ikeda-Matsuo Y, Tanji H, Narumiya S, Sasaki Y. Inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> EP<sub>3</sub> receptors improves stroke injury via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms. *J. Neuroimmunol.*, 238(1-2):34-43 (2011)

Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9):5473-5478 (2003).

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ikeda-Matsuo Y. Role of prostaglandin E synthase and EP receptors in ischemic brain injury. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 144(3):110-114 (2014). (査読有り)

Ikeda-Matsuo Y. The role of prostaglandin E<sub>2</sub> in stroke-reperfusion injury. *Yakugaku Zasshi*, 133(9):947-954 (2013). (査読有り)

Young SZ, Taylor MM, Wu S, Ikeda-Matsuo Y, Kubera C, Bordey A. NKCC1 Knockdown Decreases Neuron Production through GABAA-Regulated Neural Progenitor Proliferation and Delays Dendrite Development. *J Neurosci.*, 32(39):13630-13638 (2012). (査読有り)

〔学会発表〕(計7件)

松尾由理 虚血性脳障害におけるプロスタグランジン E<sub>2</sub> の役割. 第 56 回 薬学会関東部会(招待講演), 2012 年 10 月 13 日, 昭和大学, 東京

Yuri Ikeda-Matsuo, Yuri Hirayama, Hayato Tanji, Yasuhito Naito, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Mitsuo Tanabe, Yasuharu Sasaki. mPGES-1 and COX-2 are coordinately contribute to ischemic excitotoxicity through EP3 receptors. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, 2012 年 10 月 01 日, 神戸国際会議場, 神戸

Yuri Ikeda-Matsuo, Tomoko Mizoguchi, Satoshi, Uematsu, Shizuo Akira, Mitsuo Tanabe, Yasuharu Sasaki. Microsomal prostaglandin E synthase-1 contributes to dopaminergic neuronal death in 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. Neuroscience 2012 (The Annual Meeting of the Society for Neuroscience), 2012 年 10 月 17 日, New Orleans Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans

Yuri Ikeda-Matsuo, Tomoko Mizoguchi, Naito, Yasuhito, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Mitsuo Tanabe, Yasuharu Sasaki. Microsomal prostaglandin E synthase-1 contributes to dopaminergic neurodegeneration in a 6-OHDA lesioned mouse. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 03 月 23 日, 福岡国際会議場, 福岡

Yuri Ikeda-Matsuo, Tomoko Mizoguchi, Yasuhito Naito, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Mitsuo Tanabe, and Yasuharu Sasaki. Microsomal prostaglandin E synthase-1 contributes to dopaminergic neuronal death induced by 6-hydroxydopamine in primary mesencephalic neurons. Neuroscience 2013 (The annual meeting of the Society for Neuroscience), 2013 年 11 月 13 日, San Diego Convention Center, San Diego

Yuri Ikeda-Matsuo. The Role of Prostaglandin E<sub>2</sub> in ischemic brain injury. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 日, 仙台国際センター, 仙台

松尾由理、江成郁美、国恵健、岩井孝志、渡辺俊、内藤康仁、田辺光男、神経芽細胞腫での PGE<sub>2</sub> EP3 受容体アゴニストによるグルタミン酸細胞死増悪機序の解析. 第 88 回日本薬理学会, 2015 年 3 月 18 日,

名古屋国際会議場, 名古屋

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/pharmacology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 由理 (IKEDA-MATSUO, Yuri)

北里大学・薬学部・薬理学教室・講師

研究者番号: 10306657