

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590254

研究課題名(和文) 蛍光標識タイムラプス記録法を用いたプロサポシンの細胞内動態の追跡

研究課題名(英文) Intracellular dynamics of prosaposin using time-lapse recording in cultured cells.

研究代表者

小林 直人 (KOBAYASHI, Naoto)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50234836

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)：プロサポシンは524個のアミノ酸からなる分子で、もともと脂質代謝に関係するサポシンA、B、C、Dの前駆物質として発見された。一方で、プロサポシンには強い栄養因子活性があり、特にプロサポシン由来合成ペプチドは末梢投与により中枢神経系にも効果があることから、分子標的治療薬としても注目される。本研究では、培養細胞における生理活性物質の細胞内動態を研究し、特に形態計測による細胞伸展や細胞骨格形成を指標とした定量的評価方法を開発した。本研究の結果として、プロサポシン遺伝子を導入した培養細胞では、導入しない細胞に比べ、神経毒による細胞障害が軽減されることが判明し、治療薬開発の可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Prosaposin is composed of 524 amino acids, and originally described as the precursor of saposin A, B, C and D, which are responsible to intracellular lipid metabolism. On the other hand, prosaposin is known to show strong neurotrophic activity, and a prosaposin-derived synthetic peptide has neuroprotective effect in the central nervous system. Therefore, prosaposin could be a candidate for therapeutic molecule. The present study has revealed intracellular dynamics of prosaposin by its gene induction into cultured cells to chase the traffic route and synthesis/degradation of prosaposin. Degradation of prosaposin has been accelerated, when cultured cells with prosaposin gene induction were treated with MPP+, a drug to establish a model of Parkinsonism. Furthermore, compared with the effect of mock-transfection, prosaposin gene induction has reduced the neurotoxic effects of drugs including kainic acid. These results suggest the prosaposin's potential as a drug for central nervous system.

研究分野：解剖学一般、細胞生物学

キーワード：神経栄養因子 神経保護作用 プロサポシン プロサポシン受容体 培養細胞 細胞内動態 遺伝子導入 パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

プロサポシンは524個のアミノ酸からなる分子量約66kDaの分子で、もともと脂質代謝に関係するサポシンA,B,C,Dの前駆物質として発見されたが、強い栄養因子活性を有し、特にプロサポシン由来合成ペプチドは末梢投与により中枢神経系にも効果があることから、分子標的治療薬として注目されている。プロサポシンノックアウトマウスは致死的であり(Fujita et al., Hum Mol Genet 5:p711,1996)、Gaucher病類似の11才少女死亡例でプロサポシン欠損症の可能性が報告されている(Chiao et al., Proc Natl Acad USA 75:p2448, 1978)。申請者のグループは脂質代謝関連蛋白プロサポシンが強力な神経栄養作用も有することを世界に先駆けて発表した。また、プロサポシンの神経栄養因子活性を有する配列の合成ペプチドを生体投与し、虚血脳や内耳障害に効果が有ることを報告したが、その細胞内伝達経路等は不明のままである。

2. 研究の目的

申請者は、タイムラプス記録法により生理活性物質の細胞内動態を研究してきた。特に形態計測による細胞伸展や細胞骨格形成を指標とした統計学的比較が可能な定量的評価方法を開発した。

本研究では、このプロサポシン由来合成ペプチドに蛍光色素を結合させ、培養海馬神経細胞を用いて、タイムラプス記録法により神経細胞での動態を明らかにし、その細胞内伝達機構解明の一助としたい。

3. 研究の方法

プロサポシンの蛍光標識合成ペプチド(PS18-FAM)を培養神経細胞の培養液に加え、細胞内の移動を経時的に追跡する。プロサポシンは通常ライソゾームに存在し、分泌されることも分かっているので、下記のような検討を行い細胞内輸送機構について明らかにしたい。

- 1) 受容体に結合し取り込まれたPS18FAMもライソゾームに入るのか。
- 2) それ以外にミトコンドリアや核内にも移行するのか。
- 3) さらに、それが分泌されることがあり得るのか。
- 4) 神経細胞毒性を有するカイニン酸の添加により、PS18-FAMの動態がどのように

変化するか。

- 5) 各種細胞内情報伝達経路の阻害剤を添加した際のPS18-FAMの動態や、PS18-FAMに結合する分子の解析から、プロサポシン受容体の性質を明らかにする。

培養海馬神経細胞や神経由来細胞株にPS18-FAMを投与し、その動態を観察するが、特にライソゾームや核への移行を小器官特異マーカーとの二重染色で追跡する。神経細胞毒性を有するカイニン酸の添加により、PS18-FAMの動態が変化するか否かを明らかにし、プロサポシンの神経保護メカニズムについても検討する。

4. 研究成果

本研究ではヒトSH-SY5Y neuroblastoma cellの培養系を用い、神経毒性のあるMPP+を投与することによりパーキンソン病のモデルを作製し、これにPS-18FAMを投与して細胞内への取り組みや細胞内での動態をタイムラプス記録法により検討した。その結果、PS-18FAMは神経細胞に取り込まれ、コントロールとして用いたスクランブル配列のPS-18FAM(scPS-18FAM)に比較して多くの取り込みが認められた。さらに、興味深いことはMPP+を投与した細胞では、取り込まれたPS-18FAMの細胞内濃度が急激に減少しており、このことは、障害を受けた神経細胞内ではPSは急激に消費されることを示しているものと思われる。

さらに外部から投与したS-18FAMのみならず、遺伝子導入によりPS-FAMを強制発現させた細胞を用いて、PSの細胞内動態を研究した。その結果、PS遺伝子を導入した細胞では導入しない細胞に比べ、カイニン酸等の障害が軽減されることが判明した。

PSの受容体についても研究する予定であったが、2013年についてMeyerらが以下のようにGPR37とGPR37L1が受容体であることを発見した。そこで、申請者らはこれらの受容体の抗体を購入及び作成に成功したので、これらを用いて研究を進めている。

(Meyer RC et al. 2013. GPR37 and GPR37L1 are receptors for the neuroprotective and glioprotective factors prosaptide and prosaposin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110, 9529-9534)

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
に下線)

[雑誌論文](計 10 件)

A prosaposin-derived peptide alleviates kainic acid-induced brain injury. H Nabeka, T Shimokawa, T Doihara, S Saito, H Wakisaka, F Hamada, N Kobayashi, S Matsuda. PLOS ONE, 2015 *in press* (査読あり)

Prosaposin overexpression following kainic acid-induced neurotoxicity. H Nabeka, K Uematsu, H Takechi, T Shimokawa, K Yamamiya, C Li, T Doihara, S Saito, N Kobayashi, S Matsuda. PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0110534, 2014 (査読あり)

Temporal Changes in Prosaposin Expression in the Rat Dentate Gyrus after Birth. M Morishita, H Nabeka, T Shimokawa, K Miyawaki, T Doihara, S Saito, N Kobayashi, S Matsuda. PLOS ONE 9(5): e95883, 2014 (査読あり)

Differential expression of the alternatively spliced forms of prosaposin mRNAs in the rat choroid plexus. S Saito, K Saito, H Nabeka, T Shimokawa, N Kobayashi, S Matsuda, Cell Tissue Res 356:231-242, 2014 (査読あり)

Prosaposin expression in the regenerated muscles of mdx and cardiotoxin-treated mice. C Li, H Gao, T Shimokawa, H Nabeka, F Hamada, H Araki, Y Cao, N Kobayashi, S Matsuda. Histol Histopathol, 28:875-892, 2013 (査読あり)

Distribution of prosaposin in rat lymphatic tissues, T Shimokawa, H Nabeka, K Yamamiya, H Wakisaka, T Takeuchi, N Kobayashi, S Matsuda, Cell Tissue Res, 352:685-693, 2013 (査読あり)

Prosaposin expression in the regenerated muscles of mdx and cardiotoxin-treated mice, C Li, H

Gao, T Shimokawa, H Nabeka, F Hamada, H Araki, Y Cao, N Kobayashi, S Matsuda, Histol Histopathol, 28:875-892, 2013 (査読あり)

Decrease in prosaposin in the dystrophic mdx mouse brain. H Gao, C Li, H Nabeka, T Shimokawa, N Kobayashi, S Saito, ZY Wang, YM Cao, S Matsuda, PLOS ONE 8(11):e80032, 2013 (査読あり)

Prosaposin-derived peptide alleviates ischaemia-induced hearing loss. T Terashita, S Saito, H Nabeka, N Hato, H Wakisaka, T Shimokawa, N Kobayashi, K Gyo, S Matsuda, Acta Oto-laryngology 133:462-468, 2012 (査読あり)

Lectin binding pattern of gastric mucosa of pacific white-sided dolphin, Lagenorhynchus obliquidens. T Shimokawa, T Doihara, M Makara, K Miyawaki, H Nabeka, H Wakisaka, N Kobayashi, S Matsuda. J Vet Med Sci 74:155-160, 2012 (査読あり)

[学会発表](計 20 件)

Chronological Changes of Prosaposin in the Dentate Gyrus after Birth. Seiji Matsuda, Midori Morishita, Hiroaki Nabeka, Tetsuya Shimokawa, Takuya Doihara, Kimiko Yamamiya, Naoto Kobayashi, Fumihiko Hamada, 120th Annual Meeting of the JAA, March 21-23, 2015, Kobe

Prosaposin and its receptors in the spleen. Mitsuaki Takezawa, Tetsuya Shimokawa, Hiroaki Nabeka, Khan MSI, Takuya Doihara, Kimiko Yamamiya, Fumihiko Hamada, Naoto Kobayashi, Seiji Matsuda, 120th Annual Meeting of the JAA, March 21-23, 2015, Kobe

Chronological changes in prosaposin receptors immunoreactivity in rat brain after birth. Aika Yorozuya, Hiroaki Nabeka, Tetsuya Shimokawa, Khan MSI, Xuan Li, Takuya Doihara, Kimiko

Yamamiya, Fumihiko Hamada, Naoto Kobayashi, Seiji Matsuda, 120th Annual Meeting of the JAA, March 21-23, 2015, Kobe

Prosaposin and its receptors in the facial nucleus after facial nerve transection. Jyoji Kunihiro, Hiroaki Nabeka, Tetsuya Shimokawa, Xuan Li, Takuya Doihara, Kimiko Yamamiya, Fumihiko Hamada, Naoto Kobayashi, Seiji Matsuda. 120th Annual Meeting of the JAA, March 21-23, 2015, Kobe

Prosaposin and its receptors in the kidney. Haruka Watanabe, Tetsuya Shimokawa, Hiroaki Nabeka, Khan MSI, Takuya Doihara, Kimiko Yamamiya, Fumihiko Hamada, Seiji Matsuda, Naoto Kobayashi, 120th Annual Meeting of the JAA, March 21-23, 2015, Kobe

Age- and sex-dependent changes in prosaposin and its receptors in the lacrimal glands of rats. Farzana Islam, MSI Khan, Xuan Li, Tetsuya Shimokawa, Hiroaki Nabeka, Takuya Doihara, Kimiko Yamamiya, Fumihiko Hamada, Naoto Kobayashi, Seiji Matsuda, 120th Annual Meeting of the JAA, March 21-23, 2015, Kobe

Prosaposin and its receptors in the cerebellum after kainic acid injection Xuan Li, Hiroaki Nabeka, Tetsuya Shimokawa, Takuya Doihara, Kimiko Yamamiya, Fumihiko Hamada, Naoto Kobayashi, Seiji Matsuda, 120th Annual Meeting of the JAA, March 21-23, 2015, Kobe

Distribution of prosaposin and its receptors in rat uterus. Tetsuya Shimokawa, Hiroaki Nabeka, MSI Khan, Takuya Doihara, Naoto Kobayashi, Seiji Matsuda, 120th Annual Meeting of the JAA, March 21-23, 2015, Kobe

腎臓におけるプロサポシンの分布
渡部 遙, 鍋加 浩明, 下川 哲哉, 土居原 拓也, 小林 直人, 松田 正司(日本解剖学会第119回学術集会、自治医科大学キャンパス、栃木県下野市、2014年3月27-29日)

カイニン酸投与後のプロサポシンとその受容体の変化. Li Xuan, 李成、高 慧玲、鍋加 浩明, 下川 哲哉, 山宮 公子, 小林 直人, 松田 正司(日本解剖学会第119回学術集会、下自治医科大学キャンパス、栃木県下野市、2014年3月27-29日)

精巣発生段階におけるプロサポシンの変化. 山宮 公子, 下川 哲哉, 鍋加 浩明, 土居原 拓也, 小林 直人, 松田 正司(日本解剖学会第119回学術集会、自治医科大学キャンパス、栃木県下野市、2014年3月27-29日)

タイムラプス顕微鏡を用いたプロサポシンの細胞内動態の観察. 定成 裕子, 鍋加 浩明, 土居原 拓也, 下川 哲哉, 小林 直人, 松田 正司(日本解剖学会第119回学術集会、自治医科大学キャンパス、栃木県下野市、2014年3月27-29日)

prosaposin attenuates the effect of Ab1-42 intracerebroventricular injection on hippocampal neurogenesis and memory deficit. 高 慧玲、李成、下川 哲哉, 鍋加 浩明, 土居原 拓也, 小林 直人, 松田 正司(日本解剖学会第119回学術集会、自治医科大学キャンパス、栃木県下野市、2014年3月27-29日)

培養細胞を用いたプロサポシンの神経保護作用の解析. 鍋加 浩明, 土居原 拓也, 下川 哲哉, 小林 直人, 松田 正司(日本解剖学会第119回学術集会、自治医科大学キャンパス、栃木県下野市、2014年3月27-29日)

Differential expression of prosaposin in the spinal cord and dorsal root ganglion in mdx mouse. 李成、高 慧玲、下川 哲哉, 鍋加 浩明, 土居原 拓也, 小林 直人, 松田 正司(日本解剖学会第119回学術集会、自治医科大学キャンパス、栃木県下野市、2014年3月27-29日)

ラット卵管および子宮におけるプロサポシンの分布, 下川 哲哉, 鍋加 浩明, 土居原 拓也, 小林 直人, 松田 正司(日本解剖学会第118回学術集会、サンポートホール高松、香川県高松市、2013年3月28-30日)

プロサポシン及びサポシンの神経保護作用の機能解析 鍋加 浩明, 土居

原 拓也, 下川 哲哉, 小林 直人, 松田 正司 (日本解剖学会第 118 回学術集会、サンポートホール高松、香川県高松市、2013 年 3 月 28-30 日)
顕顕微鏡用培養装置を使用したプロサポシンの経時的観察 定成 裕子, 鍋加 浩明, 土居原 拓也, 下川 哲哉, 小林 直人, 松田 正司 (日本解剖学会第 118 回学術集会、サンポートホール高松、香川県高松市、2013 年 3 月 28-30 日)

Differential expression of prosaposin in the central nervous system of juvenile and dystrophic mdx mice. 高 慧玲、李成、下川哲哉、鍋加浩明、土居原拓也、小林直人、松田正司 (日本解剖学会第 118 回学術集会、サンポートホール高松、香川県高松市、2013 年 3 月 28-30 日)
Prosaposin expression in the regenerated muscles of mdx and cardiotoxin-treated mice. 李成、高慧玲、下川 哲哉、鍋加 浩明、濱田文彦、荒木博陽、曹雅明、小林 直人、松田正司 (日本解剖学会第 118 回学術集会、サンポートホール高松、香川県高松市、2013 年 3 月 28-30 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 直人 (Kobayashi, Naoto)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50234836

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし