

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790097

研究課題名(和文)パーキンソン病モデルにおけるエズリンの病態生理的機能の解明

研究課題名(英文)The study of the role of ezrin in a model mouse of Parkinson's disease

研究代表者

位田 雅俊 (INDEN, MASATOSHI)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70512424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系において、スキャホールドタンパク質であるエズリンの生理的や病態生理的機能は不明である。本研究では、神経細胞におけるエズリンの生理的機能とパーキンソン病(PD)モデルマウスにおける機能を検討した。空間認知機能に障害が起きているPDモデルマウスの海馬においてのみ、エズリンの増加が確認できた。一方で、エズリンはRhoAの活性を抑制することで、神経突起生成に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ezrin, radixin and moesin are collectively known as ERM proteins. We found that ezrin was only increased in the hippocampus of the microinjected mice with 6-hydroxydopamine (6-OHDA), a model mouse of Parkinson's disease (PD). These results suggest that excessive ezrin may be related to visuo-spatial memory impairments. We also performed studies on the roles of ezrin in the cultured cortical neurons prepared from the ezrin knockdown (EKD) mice embryo. We demonstrated that the cultured cortical neurons prepared from the EKD mice embryo exhibited impairment of neuritogenesis, not neurite and axon outgrowth. Moreover, we observed increased RhoA activity and phosphorylation of myosin light chain 2 (MLC2). In addition, treatment of Y-27632 rescued the abnormalities in neuritogenesis in the EKD neurons. These data suggest a novel role of ezrin in the neuritogenesis of the cultured cortical neurons via down-regulation of RhoA/Rho kinase/MLC2 pathway.

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：Ezrin Moesin Radixin Parkinson's disease

1. 研究開始当初の背景

Parkinson's disease (PD) は慢性進行性の神経変性疾患で、安静時振戦、無動、筋固縮、姿勢歩行障害の四大臨床症候を特徴とする。主に中年以降に発症し、神経変性疾患の中では Alzheimer's disease (AD) に次いで高頻度で、人口の高齢化に伴い患者数は増加しつつある。罹患人口は、国内では少なくとも 15 万人、米国ではおおよそ 100 万人、さらに最近の国連による統計では、世界的にその患者数は 400 万人以上とされる。PD には、その治療薬の主流として、ゴールドスタンダードと位置づけられる L-2,3-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) があり、他の神経変性疾患と比較すると治療薬はあるものの、そのすべてが対症療法薬である。一方では、PD は四大臨床症候を特徴とする運動症状が主症状ではあるが、うつや認知機能の低下などを含む非運動症状も深刻な課題である。非運動症状発現には、PD の主要変性部位である黒質・線条体だけでなく、脳高次機能を司る海馬・前頭前野などのドパミン神経系への影響を考慮する必要があるが、その詳細は不明な点が多い。

2. 研究の目的

エズリンは、スキャホールドタンパク質であり ERM タンパク質ファミリーに含まれる。中枢神経系において、エズリンの生理的、病態生理的機能は不明である。申請者は、これまでの PD 研究の過程で、エズリンが生理的だけでなく、PD 病態においてドパミン神経活動に重要な役割を果たし、その機能不全が脳高次機能へ悪影響を及ぼす可能性を見出した。本研究では、エズリンとドパミン神経との関連性や生理機能を解明し、さらにモデル動物を用いた PD 様脳環境でも検証することで、臨床応用へと展開するため基盤研究を確立する。

3. 研究の方法

(1) PD モデルマウスの作製

C57BL/6J Jcl マウスをネンブタール (50 mg/kg, i.p.) 深麻酔下で脳定位置に固定後、頭皮に 1 cm 程切れ目を入れ、線条体 (bregma を基準に左へ 0.7 mm、前へ 0.8 mm、深さ 2.7 mm) 上の頭蓋骨にドリル (motor handpiece, Uhobby) で穴をあけた。続いてドパミン神経毒である 6-hydroxydopamine (10 µg/µl, 0.02 %アスコルビン酸含有) をハミルトンシリンジを用いて 10 µg/min の速度で線条体へ 2 µl 投与した。5 分間静置後、ゆっくりとシリンジを引き上げて頭皮を縫合し、麻酔から覚醒するまで監視を行った。同様に、このマウスの対照群として vehicle (生理食塩水) を投与したものを作製した。

なお、ノルアドレナリン神経系の保護のために、6-OHDA 投与 30 分前にデシプラミン (50 mg/kg, i.p.) を投与した。

(2) モーリス水迷路実験

モーリス水迷路実験は、6-OHDA および vehicle 投与した群を、投与 6 週間後と 18 週間後の計 2 回実施した。この実験は、予備訓練セッション、訓練セッション、プローブテストの 3 段階で行った。

まず、訓練セッションを行う前日に、マウスの遊泳機能の確認を目的とした予備訓練セッションを行った。円形プール (直径 100 cm) の中央に、足場となるプラットホーム (直径 10 cm、透明色) を設置し、プラットホーム下 2 cm の高さまで水 (24 ± 1 °C) を浸した。マウスを一度プラットホーム上にのせた後、水面に放ち 15 秒間泳がせた。15 秒後、マウスを手でプラットホームへ誘導し、プラットホーム上で 10 秒間待機させた。この操作を 1 匹につき 3 回繰り返した。

空間認知機能の確認を目的とした訓練セッションを行った。円形プールを、と 4 分割し、そのうちの 3 区画の中央、水面下 1 cm にプラットホームを設置した。

区画にはプラットホームの視覚的なランドマークとして、10 cm 四方の立方体を天井から吊り下げた。そして、スタート地点を 4 区画から無作為に選択しマウスを水面に放ち、最大 60 秒間の遊泳運動 (プラットホームに到達するまでの時間、速度、軌跡) を SMART ビデオトラッキングシステム (バイオリサーチセンター株式会社) を用いて解析した。本実験ではマウスがプラットホーム上に 10 秒間留まった場合のみ、プラットホームに到達したと認めた。この操作を 1 匹につき 2 回ずつ 7 日間繰り返し、遊泳運動の経時変化を二群間で比較した。

訓練セッションの最終日に記憶維持能力の試験であるプローブテストを行った。プラットホームを取り除き、訓練セッションと同様にマウスを水面に放ち、60 秒間の遊泳運動を記録した。仮想プラットホーム上の通過回数、プラットホームを置いていた 3 区画の滞在割合 (%) を二群間で比較した。

(3) 生化学的解析

マウスを頸椎脱臼により致死させ速やかに脳を摘出した。摘出した脳から薬物投与した側の黒質、線条体および海馬を分離し、湿重量を測定した。湿重量の 10 倍量の 1 mM EGTA、1 mM EDTA、320 mM Sucrose、1×プロテアーゼ阻害剤 (nacalai tesque) 1×ホスファターゼ阻害剤 (nacalai tesque) を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジナイズした。懸濁液を 800 × g、4 °C で 10 分間遠心し、上清と沈殿した核画分とに分離した。そして再び上清を 18,000 × g、4 °C で 20

分間遠心し、上清の細胞質画分と沈殿の膜画分とに分離した。本実験では細胞質画分を使用した。

タンパク質を 7.5 %ポリアクリルアミドゲルにて 40 mA で 60 分間 SDS-PAGE 後、転写緩衝液 (25 mM Tris、192 mM glycine、20 % methanol、0.02 % SDS) 中で、PVDF 膜 (MILLIPORE) に 4 、100 V で 90 分間転写した。その後、PVDF 膜は 5 %スキムミルクおよび 0.05 % Tween20 を含むトリス塩酸緩衝化生理食塩水 (10 mM Tris、150mM NaCl、pH 8.0) で 1 時間反応させ、非特異結合を防止した。そして一次抗体として、抗 TH 抗体 (Sigma 1:5,000)、抗 ERM 抗体 (EPITOMICS 1:1,000)、抗 Ezrin 抗体 (Cell signaling 1:1,000)、抗 Radixin 抗体 (大阪大学月田研究室より供与 1:10)、および抗 Moesin 抗体 (1:10) を用いて室温で 1 時間反応させた。二次抗体にはそれぞれヤギ抗マウス抗体 (MILLIPORE 1:1,000)、ヤギ抗ウサギ抗体 (MILLIPORE 1:1,000) を用いて 30 分間反応させた。タンパク質の検出には ECL (Enhanced chemiluminescent) キット (GE healthcare) を用いた。定量解析は ImageJ 画像処理ソフトウェアを用いて行った。

(4) HPLC 解析

線条体組織サンプルを EDTA (50 mg/L)、DHVA (3,4-dihydroxybenzylamine hydrobromide) 含む 0.1 N PCA (perchloric acid) 中でホモジナイズした。懸濁液を 4 、15,000×g で 15 分間遠心し、上清を 0.2 μm 膜フィルターを通しフィルタリングした。そして、一定分量内の dopamine、3,4-dihydroxyondoleacetic acid (DOPAC) 量を測定した。

(5) 大脳皮質初代培養神経細胞

エズリンノックダウン (EKD) マウスマウスは、大阪大学大学院生命機能研究科個体機能学講座/医学系研究科病理学講座の月田早智子教授より譲渡して頂いた、EKD ヘテロマウスの雄と C57BL/6J Jcl の雌の体外受精卵を、親マウスとなる ICR マウスに着床させ、生まれたマウスを繁殖させたものである。胎生 14.5 日齢のマウス胎仔から大脳皮質を取り出し、0.25% trypsin-EDTA 溶液を加えて 15 分間インキュベートした。FBS を加えた後に 15,000 rpm で 5 分間遠心し、パスツールピペットで懸濁した。神経細胞は 0.1 mg/ml の poly-L-lysine 溶液でコーティングしたディッシュに、形態の観察の場合は 1000 個、ウェスタンブロッティングの場合は 2×10^6 個を撒いた。

(6) 免疫細胞染色

4% PFA/PBS 溶液を用いて 30 分間固定した後、

PBS-Glycine 溶液で洗浄した。次に 0.1% TritonX-100 溶液および 10% BSA 溶液をそれぞれ 15 分間インキュベートし、一次抗体を 4 で一晩反応させた。一次抗体は Anti-Ezrin Mouse monoclonal antibody (3C12、Acris Antibodis GmbH、1:1000)、Anti-Ezrin Rabbit polyclonal antibody (3145、Cell Signaling Technology、1:1000)、Anti-Radixin Rat monoclonal antibody (R21、1:1)、Anti-Moesin Mouse Monoclonal antibody (2287、1:1)、Class III b-tubulin Rabbit monoclonal antibody、Anti-GFAP Mouse Monoclonal antibody (Chemicon、1:3000) を用いて、Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes、1:500) および Alexa Fluor 546 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes、1:500) で検出した。蛍光は共焦点レーザー顕微鏡 FLUOVIEW FV1000 (OLYMPUS、Japan) で検出した。神経突起の数、長さは ImageJ ソフトウェアの NeuronJ プラグイン (<http://www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/>) を用いて測定した。

(7) 統計学的解析

実験結果は平均値 ± 標準誤差 (standard error of mean, SEM) で表示した。比較群と対照群の有意差検定には、分散分析法 (analysis of variance, ANOVA) を用い、後検定には Bonferroni/Dunn 検定法を行った。危険率は、統計学的に 5 %未満を有意差があると判定した。

4. 研究成果

選択的ドパミン神経毒である 6-OHDA により黒質線条体ドパミン神経の細胞死を引き起こし、線条体のドパミン含有量を低下させた PD モデルマウス (以後 6-OHDA 群と表記) の空間認知機能の解析を行った。解析は空間認知機能を調べる指標であるモーリス水迷路実験により行った。結果、6-OHDA 群は 7 日間のモーリス水迷路実験においてランドマークを便りにプラットホームの位置を記憶することができず、空間を認識して情報を記憶するという空間認知機能に障害が起きていることが確認できた。

HPLC により黒質線条体ドパミン神経障害を解析した結果、パーキンソン病の初期段階の患者と同程度までドパミン含有量が減少していた。また、ウェスタンブロッティングにより空間認知障害時の海馬におけるエズリン、ラディキシン、モエシンの発現量を調べた。その結果、ラディキシンとモエシンは変化が見られなかったが、エズリンは約 3 倍増加していた。一方で、大脳皮質において、そのようなエズリンの増加は認められなかった。これらの結果より、空間認知機能を司る海馬において、ドパミン障害によるエズリン発現量の変動が見られたことから、パーキ

ンソン病における空間認知障害にエズリンが関与している可能性が示唆された。

野生型マウスの大脳皮質神経細胞(WT 神経細胞)の培養を行い、各発達ステージの神経細胞におけるエズリンの発現を観察した。各ステージにおいて細胞体における発現が観察された。特にステージ1およびステージ2の神経細胞は、それぞれフィロポディアや成長円錐でエズリンは強く発現していた。しかしながら、ステージ3においては細胞体以外での発現は観察されなかった。次に、ウエスタンプロットティングを用いて、神経細胞におけるエズリンの発現の経時的な変化について定量的に解析した結果、培養1日目と比較して、4日目および7日目はエズリンの発現が約10%まで減少していた。

EKD マウスの大脳皮質神経細胞(EKD 神経細胞)の形態を、rhodamine phalloidin と class III b-tubulin の二重染色で解析した。ステージ2のEKD 神経細胞を観察した結果、成長円錐の形態異常が観察された。EKD 神経細胞からエズリンタンパク質の発現は検出されなかった。神経突起の数はWT 神経細胞が約5.5本に対してEKD 神経細胞は約4本まで減少していた。しかし、平均の長さに変化は見られなかった。次にEKD 神経細胞におけるRhoA、Rac1、Cdc42の活性を測定した結果、RhoAの活性が上昇していることを確認した。Rac1やCdc42の活性に変化はみられなかった。一方、ラディキシンノックアウトマウスおよびモエシンノックアウトマウスから調整した神経細胞に関してはRhoA、Rac1、Cdc42いずれの活性にも顕著な差は観察されなかった。さらに、EKD 神経細胞においては、RhoA/Rho kinase の下流で突起生成を抑制するとされているmyosin light chain 2のリン酸化が亢進していた。Rho kinaseの阻害剤であるY-27632の添加によって神経突起生成の異常が回復したことから、EzrinはRhoAの制御を介して神経突起の生成に関与していることが明らかになった。これらの結果は論文投稿中である。

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 0 件)
なし。

〔学会発表〕(計 5 件)

松本洋亮、位田雅俊、田村淳、波多野亮、月田早智子、浅野真司 Role of ezrin in neurogenesis in cultured cortical neurons Neuro2014 (2014年9月11-13日、横浜)

松本洋亮、位田雅俊、波多野亮、田村淳、月田早智子、浅野真司 神経細胞の形態形成

におけるERMタンパク質の機能解析 日本膜学会第36年会(2014年5月12-13日、横浜)

位田雅俊、松本洋亮、浅野真司 パーキンソン病モデルマウスの海馬におけるERMタンパク質の変動と空間認知記憶との関連性 第87回日本薬理学会年会(2014年3月19-21日、仙台国際センター)

松本洋亮、位田雅俊、田村淳、月田早智子、浅野真司 神経細胞における細胞骨格関連タンパク質エズリンの機能解析 日本膜学会第35年会(2013年5月20日、東京)

松本洋亮、位田雅俊、田村淳、月田早智子、浅野真司 神経細胞の形態形成におけるエズリンの機能解析 第60回生化学会近畿支部例会(2013年5月18日、大阪)

〔図書〕(計 0 件)
なし。

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
なし。

取得状況(計 0 件)
なし。

〔その他〕
ホームページ等
http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/yakuchi/Me d_Mol_Therp/Home.html (岐阜薬科大学・薬物治療研究室)

6. 研究組織

(1)研究代表者
位田 雅俊 (INDEN MASATOSHI)
岐阜薬科大学・助教
研究者番号：70512424

研究者番号：

(2)研究分担者
なし。

(3)連携研究者
なし。