

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790539

研究課題名(和文) 糖尿病によるスパイン形態変性における ERK の機能的役割の解明と新規治療薬開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathological role of ERK in diabetic spine dysmorphogenesis and development of new drug therapy

研究代表者

小菅 康弘 (Yasuhiro, Kosuge)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：70383726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は海馬の機能低下を誘発するが、そのメカニズムについては不明なままである。本研究は、シナプス可塑性の調節因子である ERK に着目し、糖尿病によるスパインの形態異常について検討した。ERK 活性の減少は、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウスと高グルコース処置細胞で認められた。高グルコース処置細胞では、インスリンシグナルの障害が認められた。17 $\beta$ -estradiol (E2) およびその誘導体 (E2A) は、ERK を活性化させた。以上より、インスリン受容体の機能不全が糖尿病による海馬機能低下に重要な役割を演じていること、E2 は糖尿病によるスパイン形態変性にも有効な治療薬となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：There is evidence that diabetes condition is associated with hippocampal impairment, although how this occurs is not clear. In this study we investigated pathological roles of ERK, an important component in the regulation of synaptic plasticity, in diabetes-induced spine dysmorphogenesis. The inhibition of ERK activity was observed in streptozotocin-induced diabetic mice and high glucose-treated neuron. Chronic high-glucose treatment impaired insulin signaling in vitro models of diabetes. Administration of 17 $\beta$ -estradiol (E2) and its derivative (E2A) led to activation of ERK both in vivo and in vitro. These results suggest that Insulin receptor dysfunction may play a role in chronic hyperglycemia-induced hippocampal impairment, and that E2 is a promising therapeutic drug for diabetic spine dysmorphogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：糖尿病 海馬 シナプス インスリン受容体 スパイン 17 $\beta$ -estradiol

### 1. 研究開始当初の背景

食生活や生活習慣の急激な変化により、糖尿病の患者数は世界的に増大し、21世紀最大の疾患のひとつと考えられている。糖尿病は、細胞内への糖の取り込みに重要なインスリンの分泌不足のために糖代謝、タンパク質代謝、脂質代謝に異常が生じ、慢性的な高血糖の結果、特有の糖尿病合併症をもたらす病気である。なかでも、網膜症、腎症、神経障害は三大合併症として知られており、これらの合併症の予防が、患者の生命予後や生活の質(QOL)に大きな影響を及ぼすことは周知の事実である。近年、糖尿病が中枢神経系に及ぼす影響についても解析が進み、糖尿病モデルマウスではシナプス伝達や記憶・学習に深く関連すると考えられている海馬の長期増強現象(LTP)を抑制することやシナプス可塑性において重要な役割を演じているシナプス後部の構成タンパク質の発現が変化することなどが報告されている。このように、糖尿病による慢性的な高血糖は、海馬の神経突起の萎縮やシナプスの減少を誘発・増悪するリスクファクターになる可能性が示唆され、患者の生命予後や生活の質に大きな影響を及ぼすことが考えられるものの、その詳細なメカニズムについては不明な点が多く、これらを治療・予防するような方法も皆無である。一方、網膜症、腎症、神経障害の三大合併症については病態メカニズムの解明が進み、mitogen-activated protein kinase (MAPK)の異常活性化が注目されつつある。しかし、糖尿病による慢性的な高血糖が海馬のMAPKの活性化に及ぼす影響や、糖尿病による神経突起の萎縮やシナプスの減少にMAPKの活性化の変化が及ぼす影響について検討を行っている例は皆無であった。研究代表者は、糖尿病モデルマウスの海馬や長時間高グルコース処置したヒト神経芽腫細胞(SH-SY5Y)において、シナプスの構成タンパク質の1つであるPSD-95の発現低下とともに、MAPKの1つであるextracellular signal-regulated kinase (ERK)の活性化が選択的に抑制されていることを見出した。また、研究代表者は、このSH-SY5YにおけるERKの活性化レベルの減少は、17 $\beta$ -estradiol (E2)を併用することで改善されるとともに、E2には高グルコース処置によるPSD-95の発現減少を抑制する作用も認められた。これらの結果から、E2によるERKの活性化は糖尿病による記憶・学習障害に対して治療効果を示すことが示唆されるが、このE2が糖尿病モデルマウス(*in vivo*レベル)に及ぼす影響については不明のままである。また、興味深いことに、糖尿病モデルマウスの腎臓や網膜の細胞では、ERKの異常活性化が生じることが報告されている。そのため、目的とする部位(中枢神経)以外でのERKの活性化は網膜症、腎症、神経障害などの合併症

を悪化させる可能性がある。これらの学的背景から、本研究では、中枢移行性の高いE2誘導体を用いて糖尿病モデルマウスにおける学習・記憶機能障害に及ぼす影響について検討することで、糖尿病におけるシナプスの形成異常におけるERKの役割が個体レベルで明らかになるとともに、網膜症、腎症、神経障害の進行に影響を及ぼさない治療薬の開発が可能性ではないかという考えに至った。

### 2. 研究の目的

本研究は、ストレプトゾトシン(STZ)投与により作成したマウスおよび高グルコース条件で培養した初代海馬培養細胞またはSH-SY5Y(*in vitro*モデル)を用いて、糖尿病による海馬記憶障害の発症メカニズムについて明らかにする。特に、記憶の形成に重要な役割を演じているスパインでの変化に焦点を絞って解析を行うことをポイントとした。なかでも、これまでに、研究代表者が見出しているERKの活性化を改善するE2を用いることで、*in vitro*および*in vivo*モデルにおいて、高血糖が誘発するスパインの減少に及ぼす影響を組織学的に検討するとともに、構成タンパク質の変化についても生化学的に解析する。また、中枢移行性を改良したE2誘導体を合成し、これらの化合物が*in vivo*モデルに及ぼす影響を組織学・生化学的手法により検討する。さらに、高血糖状態の持続化がどのようなシグナルカスケードを介してERKの活性化を抑制しているのかについても検討する。以上の解析により、糖尿病マウスのシナプス形成異常におけるERKの役割を総合的に解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糖尿病モデルマウスの作成

8週齢のマウスに18時間絶食させた後streptozotocin(STZ)を100 mg/kgで腹腔内投与した。投与後一定期間ごとに血糖値を自己検査用グルコースキット(バイエル薬品株式会社)を用いて測定し、血糖値が400 mg/dL以上のマウスを糖尿病モデルマウスとした。なお、対照群には、生理食塩液を腹腔内投与した。

#### (2) *in vitro* 糖尿病モデルの作成

10%ウシ胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)中で培養したヒト神経芽腫細胞SH-SY5Yを使用した。高glucose(HG)処置として、DMEM中に100mM glucoseを曝露した。なお、対照群には、同濃度のmannitolを処置した。

#### (3) 初代培養海馬神経細胞の調製

胎生18日齢のWistar系ラットより海馬を摘出し、trypsin/EDTAおよびDNaseにより酵素処理した後、等量のFBSを添加し反応を停止し、1000 rpm、10分間遠心分離した。

上清を除去した後、poly-L-lysine 処置した culture plate (Corning) に  $5.0 \times 10^5$  個/cm<sup>2</sup> の密度で細胞を播種した。播種後 48 時間までは B27 supplement を含む DMEM/F12 で、その後は、10% FBS を含む Neurobasal medium で、5% CO<sub>2</sub> / 95% air、37 °C、加湿条件下のインキュベーター内で 5~6 日間培養した。培養期間中は 2~3 日毎に medium の交換を行った。高 glucose (HG) 処置として、Medium 中に 50mM glucose を曝露した。なお、対照群には、同濃度の mannitol (M) を処置した。

#### (4) タンパク質の発現解析

##### Western Blot 法

各処置後の脳部位および培養細胞は、RIPAbuffer[150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH7.6)、2.5% NP-40、0.1% SDS、0.5% Triton-X、complete™ mini 1 Tab]を用いて、細胞抽出液を作成した。Sample buffer[80 mM Tris-HCl (pH 6.8)、3% SDS、10% glycerol、5% 2-mercapto ethanol、0.2% bromophenol blue]を用いて SDS 化した後、5%~12.5% polyacrylamide gel を用いて電気泳動した。泳動終了後に Immobilon™-P Transfer Membrane (Millipore) に転写し、室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、TTBS で洗浄し、各種の一次抗体と 4 で一晩反応させ、HRP で標識された二次抗体を室温で 1 時間反応させた。終了後、TTBS で洗浄し、ECL により発色させた。得られた各バンドは、scion image soft ware を用いて解析した。

##### 免疫組織化学染色法 (蛍光抗体法)

0.1 M Phosphate buffer、4.5 % sucrose を含む 4 % PFA で 30 分固定し、PBS で洗浄した後、0.4 % Triton-X-100 を含む PBS を用い 4 で一晩反応させた。その後 2 % 正常血清を含む PBST (PBS + 0.1 % TritonX-100) を用い室温で 1 時間ブロッキングし、各種の一次抗体を 4 で一晩反応させた。一次抗体処置終了後、PBST で洗浄し、蛍光標識された二次抗体を 4 で一晩反応させた。その後、PBST で洗浄した後、カバーガラスに移し、共焦点レーザー顕微鏡 (CarlZeiss, LSM-510) を用いて観察した。

#### (5) Calpain 活性の測定

Calpain 活性の測定は、スクシニル化 calpain 基質を使用した Calpain-Glo™ Protease Assay kit (Promega) を用いて測定した。Calpain-Glo™ Reagent 50 μL とシステイン関連化合物、calpain 阻害薬および Ca<sup>2+</sup> の終濃度が μ-calpain は 1μM、m-calpain は 1mM になるように CaCl<sub>2</sub> を加えたサンプル 50 μL を混合した。10 分後に、ルミノメーター (FlexStation3, Molecular Devices) により発光強度を測定した。Curve fitting は、GraphPad Prism を使用し、IC<sub>50</sub> を算出した。

#### 4. 研究成果

本研究では、はじめに、研究代表者がこれまでに SH-SY5Y を用いた *in vitro* 糖尿病モデルにおいて ERK の活性化作用を持つことを見出している 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) を基本骨格として、中枢移行性を増加させた 38 種類の誘導体を合成した。次に、100mM glucose (HG) 条件で培養した SH-SY5Y における ERK の活性化に及ぼす影響を Western blot 法によりを検討した。その結果、E<sub>2</sub> の持つ ERK 活性化作用を超える化合物を見出すことはできなかったが、E<sub>2</sub> と同程度の ERK 活性化作用を持ち、E<sub>2</sub> よりも持続的に ERK を活性化する化合物を 5 種類見出した。同様に、SH-SY5Y を用いて、本学化合物ライブラリーに収載されている生薬エキス成分 50 種類についても検討したが、顕著な ERK 活性化作用を示すものは認められなかった。しかし、一部の成分には、記憶・学習に關与する Akt の活性化を上昇する作用や細胞死に關与する Calpain 活性化抑制作用があることが明らかとなった。なかでも、成熟ニンニクエキスに含まれるチオアリル化合物である S-allyl-L-cysteine (SAC) については、詳細な検討を行った。SAC および SAC と構造類似性が高い L-cysteine (CYS) または N-acetylcysteine (NAC) が calpain 活性に及ぼす影響について検討するため、*in vitro* の calpain 活性測定系において、既知の calpain 阻害薬である calpeptin の阻害効果を調べたところ、μ-calpain および m-calpain 活性に対して濃度依存的な阻害を認め、IC<sub>50</sub> 値も既報と同程度の値が得られた (Fig. 1A, B)。そこで、この評価系を用いて検討した結果、SAC は μ-calpain および m-calpain の活性を濃度依存的に阻害したが、calpeptin と比較して緩やかな阻害作用を示し、高濃度におい

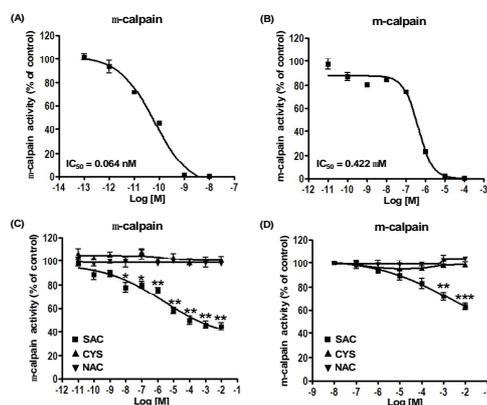


Fig. 1. Effects of calpeptin (A, B) and cysteine derivatives (C, D) on μ-calpain and m-calpain activity. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 as compared with control (vehicle).

ても完全には阻害しなかった (Fig. 1C, D)。さらに、SAC が calpain のどの領域を作用点としているかを明らかにするために、calpain の活性中心に作用する阻害薬である ALLN および Ca<sup>2+</sup> 結合部位に作用する阻害薬である

PD150606 の作用を SAC の存否において検討した。両阻害薬が  $\mu$ -calpain を最大に阻害する濃度において、SAC は ALLN の阻害作用に対しては影響を及ぼさなかったが、PD150606 の阻害作用を有意に抑制した。以上の結果より、SAC は calpain の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位との相互作用により、calpain の活性化を抑制する可能性が示唆された。

また、HG 処置で培養した SH-SY5Y において、PSD-95 の発現が、ERK のリン酸化体の発現とともに低下すること、また、これらの減少は、17  $\beta$ -Estradiol (E2) により顕著に抑制されることを見出している。そこで、HG 処置および E2 暴露が SH-SY5Y の神経突起の形態学的変化に及ぼす影響について検討するため、Normal glucose (NG; 25 mM Glucose)、HG 及び M 処置 24 時間後に 10 nM E2 (E2(+)) または DMSO (E2(-)) を 24 時間曝露し、位相差顕微鏡を用いて形態学的変化を観察した。各処置した細胞の神経突起の全長、分岐の長さ、主な神経突起数、分岐数および細胞面積を Scion Image を用いて解析した結果、いずれの群との間にも顕著な変化は認められなかった。さらに、免染組織学的手法を用い、SH-SY5Y の主な神経突起に発現した PSD-95 の発現レベルの変化について共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。E2(+) または E2(-) の暴露は、NG、HG および M 処置 24 時間後から 24 時間行った。また、発現レベルの解析は、細胞体から約 20  $\mu\text{m}$  離れた神経突起の約 10  $\mu\text{m}$  を Scion Image を用いて解析した。その結果、E2(-) を暴露群では、NG および M 処置細胞に比べて、HG 処置細胞の PSD95 の発現レベルは、低下する傾向が認められた。また、この HG 処置による PSD95 の発現レベルの減少は、E2(+) 暴露により顕著に抑制された。以上の結果より、持続的な高グルコース状態により誘発される PSD-95 の発現低下には、神経突起数の減少ではなく、神経突起に分布する PSD-95 の発現量低下が関与することが明らかとなった。また、ERK 活性化薬である E2 は神経突起の形態に影響を及ぼすことなく、PSD-95 の発現低下を抑制するため、高血糖症によるシナプスの機能不全を改善する治療薬になる可能性が示された。

さらに、SH-SY5Y を用いた検討のなかで、最も ERK 活性化作用が認められた化合物 (E2A) について培養海馬神経細胞を用いた検討を行った。10 nM E2 または E2A の曝露は、細胞生存率に影響を及ぼさなかった。そこで、これらの濃度の化合物を用いて、ERK 活性化に及ぼす影響を検討したところ、E2 および E2 とともに、曝露 2 時間後までは持続的な活性化作用を持つことが明らかとなった。同様に、E2 または E2A の投与がマウスの脳内の ERK 活性化に及ぼす影響を検討するため、E2 または E2A を 7 日間腹腔投与し、マウスの各脳部位におけるリン酸化 ERK1/2 タンパク質および ERK1/2 タンパク質の発現

レベルを調べた。その結果、海馬では、E2 または E2A はともに、リン酸化 ERK1/2 タンパク質の発現レベルを上昇させたものの、その効果は E2A よりも E2 が強力であった (Fig.2)。

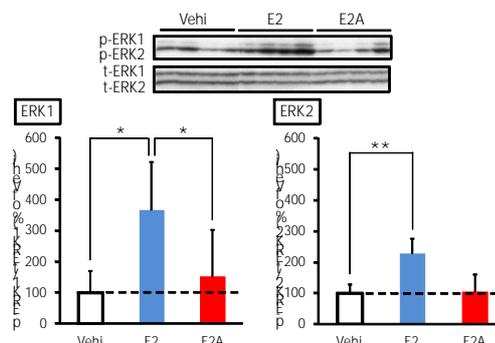


Fig. 2. E2 and E2A activates ERK1/2 in the mouse hippocampus. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01

最後に、高血糖あるいは HG 刺激が誘発する ERK の活性化抑制のメカニズムについて検討を行った。ERK の活性化は MAPK カスケードだけでなく、Insulin のシグナル伝達系からの制御も受けるため、SH-SY5Y を用いて、これらのシグナル伝達に關与する分子の変化について解析を行った結果、Insulin 受容体および insulin receptor substrate (IRS) の活性化 (リン酸化) レベルが低下する傾向が認められた。以上の結果より、高血糖刺激が誘発する ERK の活性化抑制機構の一部に、インスリン受容体の機能不全が関与するかの可能性が示唆された。

## 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 1 件)

- 1 Imai T, Kosuge Y, Endo-Umeda K, Miyagishi H, Ishige K, Makishima M, Ito Y. Protective effect of S-allyl-L-cysteine against endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death is mediated by inhibition of calpain. *Amino Acids*. 2014 46(2):385-393 (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

- 1 小菅康弘, 端山真奈美, 石毛久美子, 伊藤芳久  
高グルコース処置がヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y のシナプス形成に及ぼす影響  
日本薬学会第 134 年会  
2014 年 3 月 28 日 熊本
- 2 小菅康弘, 今井徹, 石毛久美子, 伊藤芳久  
S-allyl-L-cysteine は  $\text{Ca}^{2+}$  binding domain との相互作用により calpain 活性を抑制する

第 87 回日本薬理学会年会  
2014 年 3 月 20 日 仙台

3 今井徹, 小菅康弘, 石毛久美子, 伊藤芳久  
成熟ニンニク由来成分 S-allyl-L-cysteine  
は calpain の活性化を阻害する  
第 15 回応用薬理シンポジウム  
2013 年 9 月 28 日 東京

4 今井徹, 小菅康弘, 梅田香織, 石毛久美子,  
榎島誠, 伊藤芳久  
S-allyl-L-cysteine の小胞体ストレス誘発  
神経細胞死抑制効果には calpain 阻害作用  
が関与する  
日本薬学会第 133 年会  
2013 年 3 月 28 日 横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/pharmacol.html/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小菅 康弘 (Kosuge Yasuhiro)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：70383726