

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460349

研究課題名(和文)シクロフィリンA-CD147シグナルを基盤とした脳血管性認知症の白質病変形成機構

研究課題名(英文)Function of CD147 in white matter lesions

研究代表者

西奥 剛(Nishioku, Tsuyoshi)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：90435115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管性認知症の発症・進展機構に迫る新機軸としてCypAとCD147に着眼し、小血管性認知症において大きな病理学的特徴である白質病変の発症におけるCypA-CD147の役割について検討を行った。CD147の発現は生後1日目より観られ、白質の形成に伴いCD147の発現も増大することが示された。次に白質病変モデル動物を作製し、CD147の発現について検討したところ、白質領域である脳梁と線条体においてCD147の発現増加が示された。現在CypAの発現とともにCD147の発現局在について検討中である。認知、運動、言語機能に関わる白質領域の障害にCD147が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ischemic white matter lesions are the characteristic pathological changes in subcortical ischemic vascular dementia, a common form of vascular dementia. Demyelination of the central nervous system leads to progressive cognitive and motor dysfunction. CD147, a membrane glycoprotein of the immunoglobulin superfamily, is highly upregulated during dynamic cellular events including tissue remodelling. In this study, we studied expression of CD147 and a novel involvement of CD147 in white matter lesion animal model, cuprizone-induced demyelination. Mice were fed a diet containing 0.2% cuprizone for 5 weeks. Cuprizone treatment induces severe demyelination and microglial activation. We also found CD147 levels to be upregulated in the brain of cuprizone-induced demyelination mouse. These results provide new insights suggesting CD147 is a potential therapeutic target to inhibit white matter lesions.

研究分野：薬理学

キーワード：CD147 白質

1. 研究開始当初の背景

脳血管性認知症は脳梗塞・脳出血などの脳血管性病変によって生じる認知症である。脳血管性認知症は多発梗塞性認知症、局在病変型梗塞認知症と小血管性認知症の三つに分類される。なかでも小血管性認知症は、白質病変を主体とし、脳血管性認知症の過半数を占める最も多い病型であるが、これまで脳血管性認知症病態において、血管塞栓による大小の空洞性病変だけに焦点が当たり、小血管性認知症病変の首座である大脳白質変性の重要性は看過されてきた。しかし、「脳卒中治療ガイドライン 2009」ではじめて深部白質病変が項目として記載され、「小血管性認知症の予防ならびに治療は、要介護者を減少させるために最も注目されるべき、最も対応が重要な部分の一つである」と注目されるようになった。

小血管性認知症において白質病変は大きな病理学的特徴であり、認知症以外に運動障害や言語障害など多彩な神経症状を呈する。大脳白質は神経細胞の軸索とこれを覆うミエリン(髄鞘)から構成される。ミエリン形成の主役はオリゴデンドロサイトであり、前駆細胞よりミエリンを産生する成熟型に分化し、軸索に巻きつく。オリゴデンドロサイトは、軸索のミエリン化により神経伝導速度の高速化に寄与しているが、最新の報告で、オリゴデンドロサイトはミエリン形成とは異なる機序により軸索の機能を支持しており、その機能異常は軸索変性へと導くことが示された。この変性機構として、モノカルボン酸輸送体 1 (MCT1) を介する乳酸輸送の障害が挙げられている。ミエリン化された軸索は、エネルギーが枯渇した場合、乳酸を利用することができる。MCT1 はオリゴデンドロサイトにきわめて豊富に存在しており、MCT1 の欠損は軸索の損傷と神経細胞の消失をもたらすことが明らかにされ、オリゴデンドロサイトが神経細胞と軸索を支持する新たな機構が発見された。すなわち、MCT1 を発現するオリゴデンドロサイトの脱落(脱髄)は、神経伝達速度低下や微弱化だけではなく神経細胞と軸索の致命的破綻を誘導することが示唆されている。

2. 研究の目的

シクロフィリン A (CypA) はイムノフィリンファミリーに属するシクロスポリン(免疫抑制薬)結合タンパク質である。CypA は細胞質に局在するタンパク質であるが、炎症病態時には細胞外へ遊離される。この細胞外 CypA の受容体として同定された分子が CD147 である。CD147 はイムノグロブリンファミリーに属する 1 回膜貫通型の糖タンパク質であり、細胞外マトリックスメタロプロテアーゼ誘導因子でもある。さらに、CD147 はオリゴデンドロサイトに豊富に存在する MCT1 を細胞膜上に輸送するシャペロンタンパク質としても機能する。従って、十分量の CD147 がオ

リゴデンドロサイトに局在することが推測される。最近、心筋虚血再還流時の心筋障害や脳虚血時の神経細胞死に CypA - CD147 シグナル系が関与することが報告された。しかし、白質病変における CypA-CD147 の役割は不明である。本研究は脳血管性認知症の発症・進展機構に迫る新機軸として、CypA と CD147 に着目し、脳血管性認知症発症の分子機構を明らかにすることにより、新たな治療戦略ならびに新規認知症治療薬開発への活路を開く実験証拠を提示することを目指すものである。本研究では、白質病変発症における CypA-CD147 シグナルの役割について検討する。

3. 研究の方法

(1) 白質病変モデルマウスの作成

12 週齢の C57BL/6N 雄性マウスを用いた。麻酔下で頸部を正中線で切開し、右総頸動脈を迷走神経から分離後、4-0 縫合糸を用いて約 5 mm の間隔を空けて右総頸動脈の 2 カ所を結紮した。右総頸動脈の結紮を行う以外全く同じ処置を行った動物を対照群(偽手術群)として使用した。クプリゾン(CPZ)誘発脱髄モデル動物の作製には 8 週齢の C57BL/6N 雄性マウスを用いた。CPZ 含有飼料は、CPZ [Bis(cyclohexanone)oxalaldihydrazone] と、飼育繁殖粉末飼料を混和して調整した(最終濃度 0.2%w/w)。0.2%CPZ 含有飼料をマウスに 5 週間投与し、脱髄を誘導させた。また、CPZ を投与していないマウスを対照群として使用した。

(2) ウェスタンブロッティング

白質病変モデルマウスおよび対照群マウスの脳を採出し、大脳皮質、海馬、線条体、脳梁にわけ試料とした。また、生後 1 日、3 日、7 日、14 日、21 日齢の ICR マウスの脳を取出し、その全脳を試料とした。各試料を、1%プロテアーゼインヒビターカクテルを含む RIPA 緩衝液中でホモジナイズし、超音波破碎処理後、遠心し、上清を組織溶解液とした。組織溶解液にサンプルバッファーを入れ、5 分間煮沸し、試料溶液とした。試料溶液中のタンパク質は、SDS アクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、PVDF メンブレンに転写した。転写後、メンブレンはブロッキングバッファーでブロッキングを行った後、1 次抗体と 4 で一晩反応させた。1 次抗体はウサギ抗 CypA 抗体、ウサギ抗 CD147 抗体、ウサギ抗 α -Tubulin 抗体、マウス抗 Myelin Basic Protein 抗体を用いた。1 次抗体処理後、メンブレンを十分洗浄し、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体を室温で 1 時間反応させた。2 次抗体は HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を、HRP 標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体を用いた。2 次抗体処理後、メンブレンを十分洗浄し、ECL 法により可視化した。高感度 CCD 画像解析システムにて、画像イメージを取り込み解析した。

(3) 免疫染色

白質病変モデルマウスおよび対照群マウスを、4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液で灌流固定し、摘出した脳を試料とした。クリオスタットで厚さ10μmの凍結冠状切片を作成した。酵素抗体法にはDAKO EnVision™ System-HRPを使用した。試料切片をブロッキング処理後、1次抗体で一晩処理した。1次抗体は、ウサギ抗CD147抗体(abcam)、ラット抗マウスCD147抗体(serotec)、マウス抗Myelin Basic Protein抗体、ウサギ抗Iba-1(ミクログリアの特異的マーカー)抗体を用いた。

(4)ラットオリゴデンドロサイト培養法
生後1日のラットより脳を摘出し、メスで細断後、ピペティングにて細胞を分散させて、14日間培養した。14日間培養後、14時間振盪後、培養液を回収しオリゴデンドロサイト前駆細胞を採取した。オリゴデンドロサイト前駆細胞はNeurobasal™ MediumにB-27 Serum-free SupplementとGlutaMAX™-1サプリメント、Penicillin/Streptomycin Solution、PDGF-AA(10ng/ml)、FGF-basic(10ng/ml)を添加した培養液中で、37、5%CO₂条件下で4日間培養した。培養4日目に培養液にT3を加え、オリゴデンドロサイトへの分化誘導を行った。

4. 研究成果

(1)CD147の発現に発達的变化があるか検討するため、生後1日、3日、7日、14日、21日齢のマウスの脳におけるCD147の発現を、ウエスタンブロッティングにより解析した。CD147は生後1日目より発現がみられ、生後14日目、21日目で発現が増加した。CD147発現の発達の増加が白質形成と関連しているか検討するため、ミエリンを構成するタンパク質の1つであるミエリン塩基性タンパク質(MBP)の発現変化をウエスタンブロッティングにより解析した。MBPの発現はCD147発現が増大する生後14日目から発現が認められた(図1)。

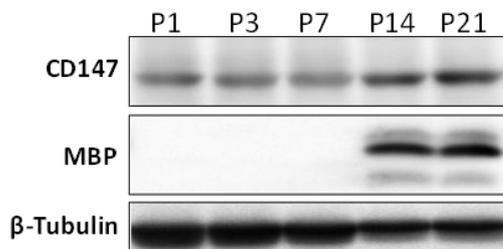


図1 生後1日から21日齢のマウス脳におけるMBPとCD147の発現変動

(2)片側総頸動脈永久閉塞マウスを作製し、白質病変について解析を行った。MBPの発現をウエスタンブロッティングにより検討した結果、総頸動脈を結紮した側である右脳

においてMBPの発現減少が観察された。また、片側総頸動脈永久閉塞により、閉塞側の白質領域(脳梁ならびに線条体)においてMBPの発現減少が示された。つぎに片側総頸動脈永久閉塞によるCypAならびにCD147の発現変動について解析を行ったところ、非閉塞側の左脳と閉塞側の右脳で大きな差は観られなかった。また対照群と比較してもCypAならびにCD147の発現に大きな変化は観られなかった。現在、免疫染色にてCD147の局在に変化があるか検討中である。片側総頸動脈永久閉塞マウスは処置後に死亡することがあること、また白質病変(MBPの発現低下)にばらつきがあることから、白質病変モデル動物としてCPZ誘発脱髄モデルマウスを作製しCD147の発現について検討することとした。まず、MBPの免疫染色により白質障害について解析した。対照群と比較し、クプリゾン投与群の脳梁ならびに線条体においてMBPの発現が著明に減少している箇所が観られ、脱髄が起きていることが確認された。また、Iba1によりミクログリアを染色したところMBPの発現が減少している箇所にミクログリアの集積が観られた(図2)。

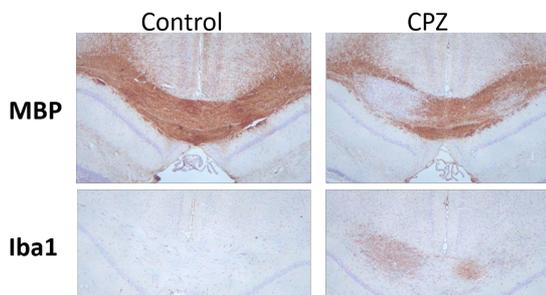


図2 CPZ投与による脱髄の誘発とミクログリアの集積

次にCPZ誘発脱髄モデルマウスにおけるCD147の発現について検討した。CPZ投与5週間後、脳梁ならびに線条体におけるMBPの発現をウエスタンブロッティングにより解析し、脱髄の確認を行った。MBPの発現はCPZ投与群の脳梁において対照群と比較して有意に減少していた(図3)。脱髄時における線条体と脳梁のCD147の発現変化を検討したところ、CD147の発現は有意に増加していた(図3)。ミクログリアにおけるCD147発現も視野に入れ検討を行う必要がある。

(3)次に、ラットの脳より初代培養オリゴデンドロサイトを調整し、CD147の発現について検討を行った。まずオリゴデンドロサイト前駆細胞を調整し、T3処理によりオリゴデンドロサイトに分化させた。オリゴデンドロサイト前駆細胞ではMBPの発現が観られないが、オリゴデンドロサイトではMBPの著明な発現が確認できた。CD147の発現について検討したところ、オリゴデンドロサイト

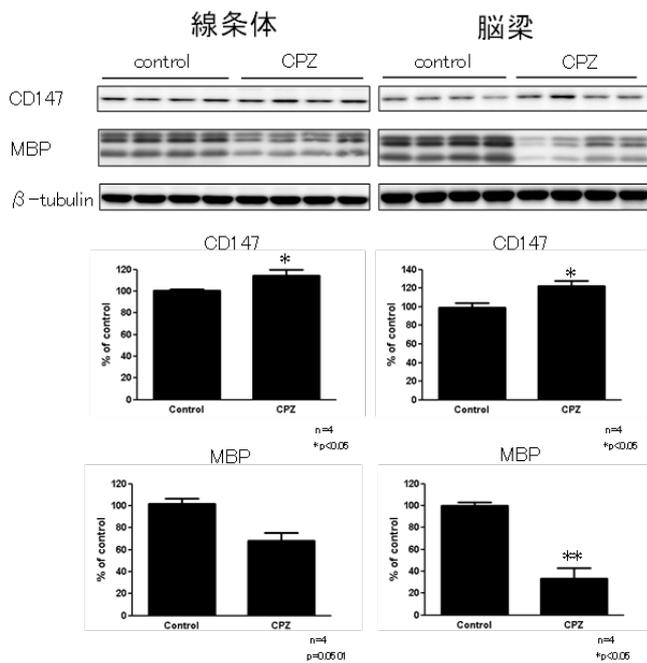


図3 CPZ投与による白質領域におけるCD147の発現変動

前駆細胞とオリゴデンドロサイトにおいて発現に変化は観られなかった。例数が少ないため、現在確認実験を行っており、図1で見られる生後14日目からのMBPとCD147の発現増加との関連について検討中である。

(5) 以上、認知機能や運動、言語機能に関わる白質領域の障害にCD147が関与している可能性が示唆された。今後、白質領域ならびに白質病変におけるCD147の発現局在について、また、オリゴデンドロサイトの分化ならびに細胞障害時におけるCD147の細胞内局在について検討を続けていく必要がある。

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 3件)

Nishioku T, Terasawa M, Baba M, Yamauchi A, Kataoka Y. CD147 promotes the formation of functional osteoclasts through NFATc1 signalling. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有, 2016, 473(2):620-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.147.

Koga M, Yamauchi A, Kanaoka Y, Jige R, Tsukamoto A, Teshima N, Nishioku T, Kataoka Y. BMP4 is increased in the aortas of diabetic ApoE knockout mice and enhances uptake of oxidized low density lipoprotein into

peritoneal macrophages. *J Inflamm (Lond).* 査読有, 2013, 10(1):32. doi: 10.1186/1476-9255-10-32.

Watanabe T, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y. Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biol Pharm Bull.* 査読有, 2013, 36(3):492-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449334>

[学会発表](計 1件)

西奥剛、寺澤真理子、馬場美咲、山田勝士、片岡泰文、破骨細胞分化におけるCD147の役割、日本薬学会第135年会、2015年3月28日、デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西奥剛 (NISHIOKU, Tsuyoshi)
長崎国際大学・薬学部・准教授
研究者番号: 90435115

(2) 研究分担者

山内 淳史 (YAMAUCHI, Atsushi)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号: 90341453

古賀 允久 (KOGA, Mitsuhsa)
福岡大学・薬学部・助教
研究者番号: 60570801