

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460634

研究課題名(和文) 糖尿病における海馬機能低下の腎不全による修飾：小胞体ストレスの関与

研究課題名(英文) Modifications of hippocampal dysfunction in diabetic mice by chronic kidney failure: Involvement of endoplasmic reticulum stress

研究代表者

小菅 康弘 (KOSUGE, Yasuhiro)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：70383726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、慢性腎臓病(CKD)が認知機能低下に関連することが報告されている。海馬は記憶形成において重要な役割を演じている。本研究では、CKDマウス海馬におけるストレス関連タンパク質の発現変化を検討した。脂質過酸化マーカーである4-hydroxynonenal付加タンパク質のCKDマウス海馬における発現レベルは、5/6腎摘出8週間後に有意に増加した。また、小胞体ストレスマーカーである78-kDa glucose-regulated proteinの発現が、CKDマウス海馬では増加した。以上より、酸化ストレスだけでなく、小胞体ストレスも、CKDマウスの認知機能障害に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have demonstrated that Chronic kidney disease (CKD) contributes to cognitive dysfunction. The hippocampus has been shown to play a critical role in the formation of new memories. The present study investigated the expression of stress-associated proteins in the hippocampus of CKD mice. The levels of 4-hydroxynonenal-adducted proteins, the makers of lipid peroxidation, in the hippocampus of CKD mice were significantly increased at 8 weeks after 5/6 nephrectomy. Moreover, an increase of 78-kDa glucose-regulated protein, an indicator of Endoplasmic Reticulum (ER) stress, was detected in the hippocampus. These results suggest that not only oxidative stress but also ER stress contributes to cognitive dysfunction in CKD mice.

研究分野：神経化学・薬理学

キーワード：小胞体ストレス 海馬 脂質過酸化物質 慢性腎不全 シャペロンタンパク質 Blood Urea Nitrogen Creatinine

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、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検証が進み、糖尿病は鬱病や認知症といった海馬の機能低下が関与する疾患を誘発あるいは増悪する要因のひとつとなることが明らかにされつつあるが、そのメカニズムについては不明なままである。

研究代表者は、これまでに、糖尿病モデルマウスの海馬において、慢性的な高血糖がシナプスの変性を誘発すること、extracellular signal-regulated kinaseの活性化が選択的に抑制されていることを明らかにした(若手研究(B)平成21~22年度)。また、糖尿病モデルマウスで想定された病態をヒト神経芽腫細胞で再現し、17 β -estradiol (E2)に顕著な改善作用があることを見出ししている(若手研究(B)平成24~25年度)。しかし、このE2の改善効果は、糖尿病モデルマウスでは一部しか認められず、糖尿病による海馬機能低下には、慢性的な高血糖以外の他の病態修飾(増悪)因子も関与することが示唆された。そこで、研究代表者は、その因子(機構)の候補として、腎機能の低下による病態修飾が関与するのではないかと考えるに至った。

近年、腎機能障害は認知症の危険因子となることが指摘されている。特に、慢性腎臓病(CKD)患者の約80%に認知機能の異常が見られ、CKDが重症化するにつれて認知機能障害が増加するとの報告もある(Murray AM et al., 2008)。また、CKDによる脳機能障害の発症メカニズムについては、酸化ストレスとの関連から治療薬の検討が行われているものの、いまだ顕著な治療効果を示すものは報告されていない。そこで、この問題を打破するためには、小胞体の機能異常によって生じる小胞体ストレスの関与を明らかにする必要があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、streptozotocin (STZ) 投与により作製した糖尿病モデルマウス(DMマウス)および5/6腎臓摘出マウス(CKDマウス)を用い、これらの病態モデルで生じる認知機能障害発症機構における小胞体ストレスの関与を比較検討することで、糖尿病マウスの海馬機能障害における腎不全の及ぼす影響について、生体レベルで明らかにすることを目的とする。特に、記憶の形成に重要な役割を演じている海馬神経細胞における変化について重点的に解析することをポイントとした。また、低分子化合物

を用いた治療薬開発の可能性についても検証することとした。

3. 研究の方法

(1) 病態モデルマウスの作成法

糖尿病モデルマウス

8週齢のC57BL/6J雄性マウスを18時間絶食させた後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、生理食塩水を腹腔内投与した。

5/6腎臓摘出モデルマウス

8週齢のC57BL/6J雄性マウスを3種混合麻酔(塩酸メドミジン0.3 mg/kg、ミダゾラム4 mg/kg、酒石酸ブトルファンール5 mg/kg)下にて左腎臓の2/3を摘出し、9週齢時に同麻酔下で右腎臓を全摘出した。偽処置マウスでは、皮膚および筋肉の切開のみを行った。

なお、全ての動物実験は、日本大学動物実験運営内規に基づいて行った。

(2) 使用細胞

HT22細胞

マウス海馬神経細胞由来のHT22細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)で、5% CO₂/95% air、37 °C、加湿条件下のインキュベーター内で培養した。

初代培養海馬神経細胞

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 (Iwaki)に5.0×10⁵個/cm²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% CO₂/95% air、37 °C、加湿条件下のインキュベーター内で培養した。

(3) 細胞生存の評価

細胞の生死の評価にはMTT法を用いた。薬物処理終了後、MTT (250 μ g/mL)を添加し、37 °C、3時間インキュベートした後、SDS溶解液(50% dimethylformamide、20% SDS、pH 4.7)を加えた。室温で一晩静置した後、マイクロプレートリーダー(SH-1000 Lab Microplate Reader, Corona Electric)により吸光度(吸光極大570 nm、Reference 640 nm)を測定した。

(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、RIPA buffer [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、TBST (Tris-buffered saline, 0.5% Tween 20)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、TBST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

4% Paraformaldehyde (PFA) /PBS により灌流固定し、摘出した脳はエタノールおよびキシレンにより脱水処理し、パラフィン包埋した。ミクロトームにより作製したパラフィン切片は、キシレンおよびエタノールにより脱パラフィン処理した後、1.5 % normal goat serum を含む PBS-T (Phosphate-buffered saline, 0.5% Tween 20)を用いて室温で1時間ブロッキングし、抗-4-hydroxy-2-nonenal (HNE) 抗体 (日本老化研究所)を4で一晩反応させた。PBS-T で洗浄後、Goat anti-mouse IgG 647 (Invitrogen)と反応させた後、500/525 green fluorescent Nissl stain (Invitrogen)で染色した。Fluor Save Reagent にて封入した後、共焦点レーザー顕微鏡 (CarlZeiss, LSM-710) にて観察した。

(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 SAC 関連化合物および recombinant human μ-calpain を加えたサンプル 50 μL を混合し、室温で10分間反応させた後に、ルミノメーター (FlexStation3, Molecular Devices)により発光強度を測定した。

4. 研究成果

(1) HT22 細胞を用いた小胞体ストレス抑制薬の検索

小胞体ストレスの誘導薬の1つである Tunicamycin (TM)が誘発する細胞死に対して、多様な生理活性を持つことが知られ

ている化合物である Indirubin を基本骨格とする誘導体 (51 種)が及ぼす影響を検討した。その結果、8つの化合物 (6-hydroxyindirubin (5), 5-bromoindirubin 3'-oxime (17), 5-bromoindirubin (23), 5, 5'-dibromoindirubin (26), 5-methylindirubin (28), N-acetylindirubin (40), 5,5'-dimethoxyindirubin (41), 5'-ethylindirubin (44))に細胞死抑制効果があることが明らかとなった(Fig. 1)。

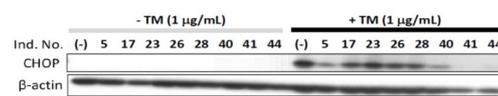


Fig. 1 CHOP 発現に及ぼす Indirubin 誘導体の影響

そこで、これらの保護メカニズムについて検討したところ、小胞体ストレス誘発細胞死に関連する転写因子である C/EBP homologous protein (CHOP)の発現誘導を抑制する作用が、その細胞保護効果に少なくとも一部関与することが示唆された。

同様に、この細胞死誘発モデルを用いて、化学合成により天然にはない光学異性体も新規に分離・作製した30種類のフラボノイド誘導体の小胞体ストレス誘発細胞死に及ぼす影響についても検討した。その結果、2種類の化合物(No24, 28)に保護効果があることを見出した (Fig. 2)。

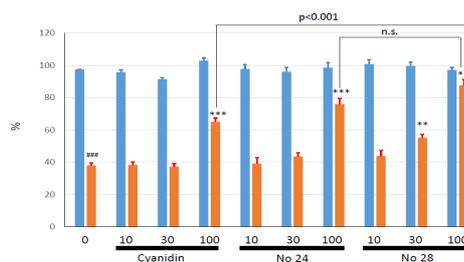


Fig. 2 フラボノイド誘導体が TM 誘発細胞死に及ぼす影響

p<0.001 vs control, **p<0.01, ***p<0.001 vs Tm

(2) 培養海馬神経細胞を用いた小胞体ストレス抑制薬の開発

これまで、研究代表者は、成熟ニンニクエキス中に含まれる S-allyl-L-cysteine (SAC)が小胞体ストレスによって誘導される Calpain の活性化を抑制することで細胞保護効果を持つことを報告している (Imai et al 2014)。そこで、SACの細胞保護効果の増大を目的として、SACの化学修飾体を新たに20個合成し、その細胞死抑制効果を検討した。SACの3-alkylthio groupに化学修飾をした化合物である S-propyl-L-cysteine (SPC), S-ethyl-L-cysteine (SEC), S-methyl-L-cysteine (SMC)の細胞保護効果は、

SAC の細胞保護により増強した。また、SAC はカルパインの活性化を顕著に抑制したのに対し、最も強力な細胞死抑制作用を示した SPC ではカルパイン活性化抑制作用は認められなかった。以上の結果より SPC は SAC とは異なるメカニズムで小胞体ストレス抑制作用を示すことが示唆された。なお、SPC などの SAC の誘導体の細胞保護メカニズムについては今後の詳細な検討が必要である。

(3) DM モデルマウスでの検証

抗 single-stranded DNA (ssDNA) 抗体を用いて、STZ 投与 8 週間後の DM マウス海馬におけるアポトーシス細胞の変化を検討したが、CA1、CA2、CA3、DG のいずれの領域でも ssDNA 陽性細胞は認められなかった。また、ヘマトキシリン・エオジン染色およびクレジール・バイオレット染色にてコントロールマウスと STZ 投与マウスの海馬の形態変化を観察したが、いずれの領域においても顕著な変化はなく、神経細胞の脱落も認められなかった。そこで、glucose regulated protein 78 (GRP78) の発現レベルを Western blot 法を用いて検討したところ、DM マウス海馬における GRP78 の発現レベルは、コントロールマウスの海馬と比較して、有意に増加した。さらに、培養海馬神経細胞を用いて、高グルコース負荷が及ぼす影響を検討したが、グルコース負荷による GRP78 の発現レベルの変化は認められなかった。以上より、DM マウスの海馬で認められた小胞体ストレスの増加には、慢性的な高血糖とは異なる病態修飾因子が関与することが示唆された。

(4) CKD モデルマウスでの検証

5/6 腎臓摘出 CKD モデルマウスの腎機能を検証するために、血清を用いた血液生化学検査を行った。血清 BUN 値、血清 CRE 値、血清 Ca 値において、偽処置マウス群 (Sham 群) と比較して CKD モデルマウスでは有意な増加が認められた。また、HE 染色により腎臓の組織学的な検討を行ったところ、CKD モデルマウスの糸球体面積は、Sham 群と比較して、有意に増大した。一方、右腎臓摘出 1 週間後から 8 週間後まで、体重と平均血圧の測定を行ったが、Sham 群と CKD 群との間に顕著な変化は認められなかった。

認知機能障害が発症する直前の腎臓摘出 8 週間後の海馬における酸化ストレスの関与について検討した。酸化ストレスのマーカーの一つである 4-hydroxynonenal (HNE) 付加タンパク質の発現量を、Western blot 法を用いて定量したところ、CKD マウスの HNE 付加タンパク質発現は、Sham と比較して、有意に増加した。そこで、HNE 付加タンパク質の発現レベ

ルと血清 BUN 値または血清 CRE 値の相関性の検討を行った。HNE 付加タンパク質の発現レベルと血清 BUN 値の相関係数は $r=0.7648$ ($p<0.01$) と、血清 CRE 値の相関係数は $r=0.6923$ ($p<0.05$) となり、いずれも正の相関を示した (Fig. 3)。さらに、

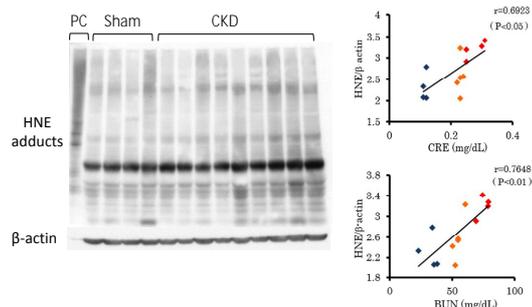


Fig. 3 HNE 付加タンパク質の発現変化

HNE 付加タンパク質の発現が増加する細胞の同定を行ったところ、HNE 付加タンパク質を発現した細胞は、Nissl 陽性の神経細胞であることが明らかとなった。そのため、HNE 付加タンパク質の増加は、海馬神経細胞で生じることが明らかとなった。

次に、腎臓摘出 8 週間後の海馬における小胞体ストレスの関与について検討した。小胞体ストレスマーカータンパク質の GRP78 の発現レベルを Western blot 法を用いて検討したところ、CKD 群の GRP78 の発現レベルは、Sham 群と比較して、有意に増加した。そこで、GRP78 の発現レベルと血清 BUN 値または血清 CRE 値の相関性の検討を行った。その結果、GRP78 発現と血清 BUN 値との相関係数は $r=0.7823$ ($p<0.01$)、血清 CRE 値との相関係数は $r=0.6215$ ($p<0.05$) となり、いずれも正の相関を示した (Fig. 4)。同様に、大脳

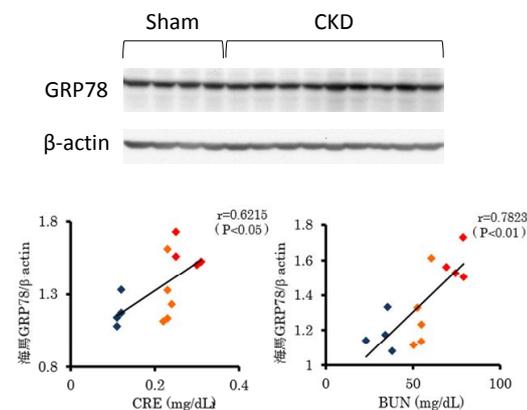


Fig. 4 GRP78 の発現変化

および小脳の GRP78 の発現も検討を行ったが、これらの脳部位では顕著な発現の変化は認められなかった。さらに、腎臓摘出 8 週間後の海馬におけるシナプス構成タンパク質の発現変化についても検討を行った

が、PSD95、SNAP25、synaptophysin の発現レベルには、いずれの群でも顕著な変化は認められなかった。以上の結果より、CKD モデルマウスの海馬では、酸化ストレスだけでなく小胞体ストレスが誘導されていることが示唆された。また、CKD における認知機能障害の発症には酸化ストレスだけでなく小胞体ストレスも関与することが明らかとなった。

まとめ

本研究成果により、糖尿病で生じる海馬機能低下には、腎機能低下による小胞体ストレスの増加が関与する可能性が明らかとなった。また、本研究では、小胞体ストレスを抑制薬となり得る 3 種類 (Indirubin 誘導体、フラボノイド誘導体、SAC 誘導体) の化合物を見出すことに成功した。今後、これらの化合物の *in vivo* モデルでの解析を進めることで、治療薬の開発へと繋げていきたいと考えている。

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 4 件)

Miyagishi H, Kosuge Y, Takano A, Endo M, Nango H, Yamagata-Murayama S, Hirose D, Kano R, Tanaka Y, Ishige K, Ito Y. Increased expression of 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase in spinal astrocytes during disease progression in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Neurobiol.* 2017 37(3):445-452. doi: 10.1007/s10571-016-0377-9. (査読有り)

Kiguchi Y, Aono Y, Watanabe Y, Yamamoto-Nemoto S, Shimizu K, Shimizu T, Kosuge Y, Waddington JL, Ishige K, Ito Y, Saigusa T. In vivo neurochemical evidence that delta1-, delta2- and mu2-opioid receptors, but not mu1-opioid receptors, inhibit acetylcholine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Eur J Pharmacol.* 2016 789:402-410. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.07.028. (査読有り)

Imai T, Kosuge Y, Saito H, Uchiyama T, Wada T, Shimba S, Ishige K, Miyairi S, Makishima M, Ito Y. Neuroprotective effect of

S-allyl-L-cysteine derivatives against endoplasmic reticulum stress-induced cytotoxicity is independent of calpain inhibition.

J Pharmacol Sci. 2016 130(3):185-188. doi: 10.1016/j.jphs.2016.03.004. (査読有り)

Ishiuchi K, Kosuge Y, Hamagami H, Ozaki M, Ishige K, Ito Y, Kitanaka S. Chemical constituents isolated from *Juncus effusus* induce cytotoxicity in HT22 cells.

J Nat Med. 2015 69(3):421-426. doi: 10.1007/s11418-015-0898-4. (査読有り)

[学会発表](計 7 件)

南郷拓嗣、小菅康弘、須川晃資、Seikwan Oh、伊藤芳久、石毛久美子 運動神経様株化細胞 NSC-34 における Prostaglandin E2 による神経突起伸長の促進。
第 90 回日本薬理学会年会
2017 年 3 月 16 日 長崎ブリックホール (長崎、長崎)

Hiroshi Nango, Yasuhiro Kosuge, Kumiko Ishige, Yoshihisa Ito Prostaglandin E2 promotes neurite outgrowth via EP2-cAMP signaling pathway in NSC-34 cells, a motor neuron-like cell line.
The Society for Neuroscience's 46th annual meeting, Neuroscience 2016
2016 年 11 月 15 日 San Diego Convention Center (San Diego, USA)

小菅康弘、石毛久美子、伊藤芳久 沖縄産植物由来エキスをを用いた筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 治療薬の開発。
第 18 回 応用薬理シンポジウム
2016 年 8 月 6 日 名古屋大学 (愛知、名古屋)

下村晃子、長田暢弘、小菅康弘、石毛久美子、伊藤芳久 5/6 腎摘慢性腎不全モデルマウスの海馬におけるストレス関連因子の発現変化。
第 134 回日本薬理学会関東部会
2016 年 7 月 9 日 国際医療福祉大学 (栃木、大田原)

兼古絵里菜、小菅康弘、鈴木里実、南郷拓嗣、石毛久美子、伊藤芳久 抗腫瘍性抗生物質 Mithramycin の筋萎縮性側索硬化症治療薬としての可能性。
第 134 回日本薬理学会関東部会

2016年7月9日 国際医療福祉大学(栃木、大田原)

日本大学・薬学部・准教授
研究者番号：70383726

木口友里、青野悠里、渡邊由梨子、山本晴子、清水邦彦、**小菅康弘**、石毛久美子、伊藤芳久、三枝禎

1 および 2 受容体は無麻酔非拘束ラットの側坐核のアセチルコリン放出を抑制的に制御する。

第 89 回日本薬理学会年会

2016年3月11日 パシフィコ横浜(神奈川、横浜)

小菅康弘、今井徹、石毛久美子、伊藤芳久

S-allyl-L-cystein 誘導体の小胞体ストレス誘発細胞死に対する神経保護効果。

第 89 回日本薬理学会年会

2016年3月10日 パシフィコ横浜(神奈川、横浜)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：神経変性疾患治療薬

発明者：**小菅康弘**、石毛久美子、伊藤芳久

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-137590

出願年月日：2016年1月29日

国内外の別：国内

名称：小胞体ストレスによる細胞死抑制剤、小胞体ストレス制御剤、および該制御剤を有効成分とする予防・治療剤

発明者：**小菅康弘**、飯島洋、石内勘一郎、北中進、石毛久美子、伊藤芳久、蔣文君

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-137590

特開 2017-019737

出願年月日：2015年7月9日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

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

<https://www.pha.nihon-u.ac.jp/research/about/activity/case-study28/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小菅 康弘 (KOSUGE, Yasuhiro)