

平成22年 5月14日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390151
 研究課題名（和文） 老化、脳虚血およびメタボリック症候群におけるメタロチオネインの役割と創薬の研究
 研究課題名（英文） Research on the roles of metallothioneins in aging, brain ischemia and metabolic syndrome and drug discover
 研究代表者
 保住 功 (HOZUMI ISAO)
 岐阜大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号：20242430

研究成果の概要（和文）：メタロチオネイン-III(MT-III)は、メタロチオネイン-I/II(MT-I/II)同様、抗酸化作用、重金属解毒作用を有し、また MT-III は精神行動にも影響を与えていることを提示した。そして、MTs(MT-I/II, MT-III を総称)は血管障害、神経変性疾患、メタボリック症候群、精神疾患さらに老化と幅広い病態に関連していることを見出した。MTs またその関連低分子化合物は特に筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脳虚血の薬物治療薬としてきわめて有望なことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： We have shown that metallothionein-III (MT-III) has metal detoxication and anti-oxidation like MT-I/II, and MT-III has also some effect on psychological behaviors. Then we have found that MTs are very widely related to vascular diseases, neurodegenerative diseases, metabolic syndrome, psychological diseases and moreover senile mechanism. We reveal that MTs and their related low-molecular compounds are very promising agents especially for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and brain ischemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：メタロチオネイン、筋萎縮性側索硬化症、脳虚血、低分子化合物

1. 研究開始当初の背景

メタロチオネイン (MT) は生物界に遍く存在する重金属結合タンパク質で、4つの isoforms が知られている。MT-I と MT-II はヒ

トから赤パンカビに至るまで、かつあらゆる臓器において共存するために MT-I/II と表記される。MT-III は共同研究者の内田が発見した Growth Inhibitory factor (GIF) と同一であ

る。作用機序は、MT- I /II は急性炎症の反応性タンパク質と考えられ、抗炎症、抗酸化作用から脳虚血、動脈硬化症の治療に応用できると考えられる。MT-III は当初、アルツハイマー病(AD)の研究過程において AD 脳で著減しているタンパク質として見出された。

2002 年、MT- I /II のノックアウトマウス、MT-III のノックアウトマウスの各々と ALS のモデルマウスとの掛け合わせで、ALS の発症時期、進行速度がそれぞれ促進されることが報告された (Puttaparthi K et al, J. Neurosci, 22:8790-6, 2002)。

MT-III は脳・脊髄に局在し、強力な hydroxyl radical 除去能を有し、AD、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患において著減しており、その病態の進行にきわめて重要な役割を果たしていることが推測された (Hozumi I et al, J Health Sci, 50: 323-331, 2004)。

また、我々は脳虚血モデルにおいてシロスタゾールが MT-II の誘導を介して虚血病巣の縮小に著効することを報告した。(Wakida K et al, Brain Res, 1116: 187-193, 2006)。

以上のような実験結果から、我々は早々に、ALS など神経変性疾患、脳虚血モデルを用いて、直接 MT- I /II や MT-III などの MT を投与し、治療効果を検証したい考えである。

2. 研究の目的

本研究は MT の MT- I 、MT-III 組換えアデノウイルス、低分子ミメティックの合成、を活用し、特に神経変性疾患(神経難病)で活性酸素の関与が大きい ALS、いわゆる生活習慣病で日本の“国民病”ともいえる脳虚血、そしてメタボリック症候群の中核にある内臓脂肪肥満にターゲットを絞り、各疾患の病態における MT の役割を明確にし、MT の機能を活かした新しい治療薬、治療法の開発を目指すことが目的である。

3. 研究の方法

(1) MT の発現動態に関する検討

- ① MT 遺伝子多型の検索
- ② 髄液中の MT 活性測定
- ③ 剖検材料での検索

(2) 治療への応用

2-1 組換えアデノウイルス (RAV)

- ① MT-I cDNA, MT-III cDNA RAV 培養と精製
- ② ALS モデルマウスへの抗酸化物質投与
- ③ ALS モデルマウスへの RAV 投与
- ④ 脳梗塞モデルマウスへの RAV 投与
- ⑤ 正常マウスの脳室内への RAV 投与

2-2 合成 MT

- ① Pichia 発現システムによる MT 大量作製
- ② ALS モデルマウスへの合成 MT の投与
- ③ 脳梗塞モデルマウスへの合成 MT の投与
- ④ anti-SOD-1 siRNA、anti-MT siRNA の作製
- ⑤ 培養細胞における検索
- ⑥ anti-MT siRNA の投与
- ⑦ MT ノックアウトマウスの検索

2-3 低分子化合物

- ① 低分子関連化合物の合成
- ② ALS、脳梗塞疾患モデル動物への低分子関連化合物の投与
- ③ 安全性の確認
- ④ 臨床応用

4. 研究成果

(1) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における MT の動態を ALS とコントロール各 12 例の剖検材料を用いて抗体を用いて組織検索を行なった。その結果は、MT- I /II、MT-III の染色性は疾患の進行と共に著減するが、低下の動態には MT アイソフォーム間で差異があることなどを見出し、研究成果は ALS の専門英文誌「ALS」に発表した。

(2) 脳虚血における検索では MT- I /II のノ

ックアウトマウスを用いて脳虚血を作成し、その組織障害がコントロールよりも一層悪化することが見出された。エリスロポイエチンにおける脳保護作用効果が MT- I /II を介していることが示された。MT- I /II の上昇を mRNA レベルで検索すると、組織障害によって主に MT-I mRNA が、薬剤投与によって主に MT-II mRNA が上昇していたことは、今後の治療応用を考えると興味深い研究結果であった。これらの研究内容は英文誌「Neuroscience」に発表した。

(3) 疾患に対する治療への応用を考え、MT-1cDNA、MT-3cDNA を組み込んだアデノウイルスを作成、大量培養、精製した。

(4) MT-III の臨床応用を考え、脳、脊髄といった中枢神経系以外の末梢臓器における MT-III の存在を検索し、精巣、前立腺、舌にも存在することを蛋白、mRNA レベルで確認し、研究成果は英文誌「Neuroscience letter」に発表した。

(5) 運動によって MT- I /II のみならず MT-III が誘導されることを明らかにし、英文誌「Neuroscience」に発表した。

(6) 有効かつ低価格の薬剤を開発する目的で、MT-III の構造を解析し、80 万個のデータベースから 20 個の MT-3 結合低分子化合物を見出し、合成した。

(7) ALS モデルマウス(G93ASOD-1Tg マウス)に MT-III cDNA を組み込んだアデノウイルスを筋肉内注射したところ、著明な症状の改善と生存期間の延長を認め、2010 米国神経学会で発表した。

(8) MT-III が脳虚血の再還流時の活性酸素の除去に関与することを英文誌「Brain Research」に発表した。

(9) 自閉症などの精神疾患に関与することを英文誌「Neuroscience Letter」に発表した。

(10) MT-III ノックアウトマウスを用いて腎

臓、精巣のカドミウム毒性に関する関与を明らかにした。

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 10 件)

- ① Honda A, Komuro H, Nagase H, Hozumi I, Inuzuka T, Hara H, Fujiwara Y and Satoh M. Microarray analysis of the liver in MT-III null mice treated with cadmium. J Toxicological Sciences. 2: 271-273, 2010. (査読有)
- ② Honda A, Komuro H, Hasegawa T, Seko Y, Shimada A, Nagase H, Hozumi I, Inuzuka T, Hara H, Fujiwara Y and Satoh M. Resistance of metallothionein-III null mice to cadmium-induced acute hepatotoxicity. J Toxicological Sciences. 2: 209-215, 2010. (査読有)
- ③ Hashimoto K, Hayashi Y, Inuzuka T, Hozumi I. Growth inhibitory factor inhibits the progression of amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 74 Suppl 2, A436, 2010. (査読有)
- ④ Koumura A, Kakefuda K, Honda A, Ito Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Uchida Y, Hozumi I, Satoh M, Inuzuka T, Hara H. Metallothionein-3 deficient mice exhibit abnormalities of psychological behaviors. Neuroscience Letter 467: 11-14, 2009. (査読有)
- ⑤ Koumura A, Hamanaka J, Shimazawa M, Honda A, Tsuruma K, Uchida Y, Hozumi I, Satoh M, Inuzuka T, Hara H. Metallothionein-III knockout mice aggravates the neuronal damage after transient focal cerebral ischemia. Brain Research 1292: 148-154, 2009. (査読有)
- ⑥ Hashimoto K, Honda A, Hayashi Y, Inuzuka

T, Satoh M, Hozumi I. DNA microarray of transcriptional responses of mouse spinal cords to physical exercise. J Toxicological Sciences 34: 445-448, 2009. (査読有)

- ⑦ Hashimoto K, Hayashi Y, Inuzuka T, Hozumi I. Exercise induces metallothioneins in mouse spinal cord. Neuroscience 163: 244-251, 2009. (査読有)
- ⑧ Hozumi I, Suzuki J S, Kanazawa H, Hara A, Saio M, Inuzuka T, Miyairi S, Naganuma A, Tohyama C. Metallothionein-3 (GIF) is expressed in the brain and various peripheral organs of the rat. Neuroscience Letters 438: 54-58, 2008. (査読有)
- ⑨ Hozumi I, Yamada M, Uchida Y, Ozawa K, Takahashi H, Inuzuka T. The expression of metallothionein is diminished in the spinal cords of patients with sporadic ALS. Amyotrophic Lateral Sclerosis 9: 294-298, 2008. (査読有)
- ⑩ Wakida K, Shimazawa M, Hozumi I, Sato M, Nagase H, Inuzuka T, Hara H. Neuroprotective effect of erythropoietin and role of metallothionein-1 and -2 permanent focal cerebral ischemia. Neuroscience 148: 105-114, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 11)

代表的、総括的な学会発表以下 4 演題

- ① Hashimoto K, Hayashi Y, Inuzuka T, Hozumi I. Growth inhibitory factor inhibits the progression of amyotrophic lateral sclerosis. American Academy of Neurology. 平成 22 年 4 月 15 日、Toronto (Canada)
- ② 保住 功 神経疾患におけるメタロチオネインの役割と治療への展望 第 6 回岐阜脳科学研究会 平成 21 年 10 月 31 日 アクティブ G (岐阜市)
- ③ 保住 功 神経疾患におけるメタロチオネイン・

重金属の役割と治療への展望 メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 平成 21 年 10 月 16 日、東京大学山上会館 (東京)

- ④ 保住 功 神経変性疾患におけるメタロチオネインとメタルの役割 メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 平成 19 年 9 月 28 日、徳島文理大学国際会議場 (徳島)

[図書] (計 1)

- ① 保住 功 脳とメタロチオネイン — 新展開するメタロチオネイン研究 — 医学の歩み 224: 300-301, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保住 功 (HOZUMI ISAO)

岐阜大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20242430

(2) 研究分担者

犬塚 貴 (INUZUKA TAKASHI)

岐阜大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50184734

林 祐一 (HAYASHI YUICHI)

岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00392366

原 英彰 (HARA HIDEAKI)

岐阜薬科大・薬学部・教授

研究者番号：20381717

佐藤 雅彦 (SATO MASAHIKO)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20256390

内田 洋子 (UCHIDA YOKO)

東京都高齢者研究所・主任研究員

研究者番号：60133633

(3)連携研究者 なし