

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390139

研究課題名(和文) 脳NO-NCXシグナルの生理病態的意義に関する創薬基盤研究

研究課題名(英文) Study on pathophysiological roles of brain NO-NCX signal

研究代表者

松田 敏夫 (Matsuda, Toshio)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00107103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：脳 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換系(NCX)スプライスバリエーションの安定発現細胞株の作製に成功した。本系で一酸化窒素(NO)による細胞障害を検討したが、培養細胞で見られたNO誘発細胞障害が見られず、NOのNCXに対する作用が間接的であることが示された。脳微小透析法によるNO-NCXシグナルの脳アミン伝達に対する作用解析については、NOが脳アミン遊離に影響を与えないことを示した。さらに、遺伝子・環境要因相互作用における解析では、PACAP遺伝子改変マウスに対する環境負荷の影響の網羅的解析からNCXの関与を検証できなかった。

研究成果の概要(英文)：This study examined the role of the predominant brain-specific NCX splice variant NCX1.5 in NO-induced cytotoxicity in HEK293 cell expression system. Transfection with a plasmid construct pcDNA3.1/V5-His containing full-length rat NCX1.5 cDNA into HEK293 cells increased prominently the protein level of NCX1.5 tagged with C-terminal V5 and (His)6 epitopes (NCX1.5-V5/His). There was no difference in the cytotoxic effects by sodium nitroprusside and S-nitroso-N-acetylpenicillamine between the control and transfected cells. These results suggest that NO cytotoxicity is not dependent on NCX1.5. Microdialysis study showed that NO did not affect monoamine release in the brain. Furthermore, RT-PCR analysis showed that environmental factors did not affect the expression of NCX.

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換系 一酸化窒素 環境要因

## 1. 研究開始当初の背景

Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換系(NCX)は細胞内 Ca<sup>2+</sup>の濃度調節に関わっていることから創薬標的分子として注目されているが、中枢神経系でのその創薬的意義は不明である。我々は種々の疾患において重要な役割を演じている一酸化窒素(NO)が NCX を活性化することを見出しており、脳 NCX の創薬標的分子としての可能性について一連の研究をしている。その中で、NCX が NO 誘発細胞障害の発現のトリガーになっていることをミクログリア、アストロサイト、神経細胞で明らかにし、さらに NO 関連病態であるパーキンソン病モデルマウスのドパミン神経障害に NCX が関与していることを明らかにした。これらの知見は NO-NCX シグナルが創薬標的となることを示唆しているが、NO と NCX の相互作用の分子機構は不明である。一方、我々は神経精神疾患の発症ならびにそれらに対する治療薬の薬効発現における脳アミン神経系の役割について研究している。また、近年、Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)遺伝子改変マウスの表現型解析から、精神疾患発症における遺伝子・環境因子の相互作用の重要性に着目した基礎研究をしている。

## 2. 研究の目的

本研究では、脳 NCX 安定発現細胞系を用い、NO と NCX の相互作用の分子機構を明らかにする。さらに NO-NCX シグナルカスケードの生理病態的意義について、精神疾患と関連している脳アミン神経伝達や環境ストレスとの関連から追究し、脳 NCX の新しい創薬的意義を検証する。

## 3. 研究方法

(1) 脳 NCX 安定発現細胞株の作製:ラット(あるいはヒト)I型 NCX (NCX1)のプライミングバリエーションの全長 cDNA は、市販の cDNA ライブラリーを鋳型として Pfx DNA ポリメラーゼを用いた PCR 法により増幅し、アガロース電気泳動により分離・精製する。部分欠損 NCX の発現にあたっては、得られた全長 cDNA より制限酵素を用いて部分配列欠損 cDNA を作

成する。作成した cDNA の哺乳類細胞発現には、pcDNA3.1D/V5-His-TOPO vector (Invitrogen 社)を用いる。

(2) 脳微小透析法による NO-NCX シグナルの脳アミン伝達に対する作用解析:脳微小透析法による予備検討において、NO が前頭葉ドパミン遊離を増加させることを見出している。本研究では、この作用における NCX の関与を検証し、さらに長期隔離飼育マウスやコルチコステロン慢性投与マウスなどの病態モデルマウスを用い、精神疾患での NO-NCX シグナルの病態的意義をアミン神経伝達の面から検討する。

(3) 脳 NCX 安定発現細胞株での NO と NCX 相互作用の解析:各 NCX スプライシングバリエーション安定発現細胞株において、NO による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度増加作用が生じるか否かを、Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬 fluo-4 を用いたプレートアッセイにより評価する。NO による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度増加作用が認められた場合、NO-cGMP 系による NCX への分子修飾(リン酸化)を、免疫沈降法を利用するイムノプロット解析により解析する。

(4) 遺伝子・環境因子相互作用の NO-NCX シグナルに対する作用解析:精神疾患発症における遺伝子・環境因子相互作用の脳 NCX に対する作用を、mRNA、タンパク質レベルで検討する。

## 4. 研究成果

(1) 脳 NCX 安定発現細胞株の作製:NCX1 の安定発現細胞の作製に成功した。

(2) 脳微小透析法による NO-NCX シグナルのアミン伝達に対する作用解析:脳微小透析での解析から、NO が神経伝達物質遊離に直接関わっていないことが明らかになった。また、NO がジスキネジアの発現に関わっていることを明らかにしたが、この作用には NCX は関わっていなかった。

(3) NCX 安定発現細胞株での NO-NCX 相互作用の解析:NCX 発現細胞で NO 障害について検討したが、NCX 発現による NO 障害の増強

は見られなかった。すなわち、NOのNCXに対する作用が間接的であることが示唆された。また、NCX発現細胞株でのリン酸化について検討したが、NOやcGMPによる作用は見られなかった。

(4) 遺伝子・環境要因相互作用のNO-NCXシグナルに対する作用解析：PACAP欠損マウスの精神異常行動が豊かな環境での飼育により抑制されることを明らかにした。環境要因による行動変化におけるNCXの関与を網羅的にそしてRT-PCRで解析したが、NCX分子は環境要因の作用には関わっていなかった。

(5) その他：NCX選択的阻害薬SEA0400を用いることでNCXの役割について多くの情報を得た（他研究機関との共同研究）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計16件)

Ago Y, Kawasaki T, Nashida T, Ota Y, Cong Y, Kitamoto M, Takahashi T, Takuma K, Matsuda T. SEA0400, a specific  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange inhibitor, prevents dopaminergic neurotoxicity in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 査読有, 61(8):1441-1451, 2011.

Andrikopoulos P, Baba A, Matsuda T, Djamgoz MB, Yaqoob MM, Eccles SA.  $\text{Ca}^{2+}$  influx through reverse-mode  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange is critical for vascular endothelial growth factor (VEGF) mediated - ERK1/2 activation and angiogenic functions of human endothelial cells. *J Biol Chem*, 査読有, 286(44):37919-37931, 2011.

Takuma K, Tanaka T, Takahashi T, Hiramatsu N, Ota Y, Ago Y, Matsuda T. Neuronal nitric oxide synthase inhibition attenuates the development of L-DOPA-induced dyskinesia in hemi-Parkinsonian rats. *Eur J Pharmacol*, 査読有, 683(1-3):166-173, 2012.

Wang F, Smith NA, Xu Q, Fujita T, Baba A, Matsuda T, Takano T, Bekar L, Nedergaard M. Astrocytes modulate neural network

activity by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent uptake of extracellular  $\text{K}^+$ . *Sci Signal*, 査読有, 5(218):ra26, 2012.

Zhao Z, Wen H, Fefelova N, Allen C, Baba A, Matsuda T, Xie LH. Revisiting the Ionic Mechanisms of Early Afterdepolarizations in Cardiomyocytes: Predominant by Ca Waves or Ca Currents? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 査読有, 302(8):H1636-1644, 2012.

Pandit MM, Strait KA, Matsuda T, Kohan DE. Na delivery and ENaC mediate flow regulation of collecting duct endothelin-1 production. *Am J Physiol Renal Physiol*, 査読有, 302(10):F1325-1330, 2012.

Chen Y, Payne K, Perara VS, Huang S, Baba A, Matsuda T, Yu X. Inhibition of the sodium-calcium exchanger via SEA0400 altered manganese-induced T(1) changes in isolated perfused rat hearts. *NMR Biomed*, 査読有, 25(11):1280-1285, 2012.

Wan X, Cutler M, Song Z, Karma A, Matsuda T, Baba A, Rosenbaum DS. New experimental evidence for mechanism of arrhythmogenic membrane potential alternans based on balance of electrogenic INCX/ICa currents. *Heart Rhythm*, 査読有, 9(10):1698-705, 2012.

Morimoto N, Kita S, Shimazawa M, Namimatsu H, Tsuruma K, Hayakawa K, Mishima K, Egashira N, Iyoda T, Horie I, Gotoh Y, Iwasaki K, Fujiwara M, Matsuda T, Baba A, Komuro I, Horie K, Takeda J, Iwamoto T, Hara H. Preferential involvement of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger type-1 in the brain damage caused by transient focal cerebral ischemia in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 429(3-4):186-190, 2012.

Ota Y, Kawanai T, Watanabe R, Nishimura A, Ago Y, Takuma K, Matsuda T. Effect of Overexpression of the Brain-Specific

Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger Splice Variant NCX1.5 on NO Cytotoxicity in HEK293 Cells. *J Pharmacol Sci*, 査読有, 121(4):351-354, 2013.

Chou CC, Chang PC, Wen MS, Lee HL, Chu Y, Baba A, Matsuda T, Yeh SJ, Wu D. Effects of SEA0400 on Arrhythmogenicity in a Langendorff-perfused 1-month myocardial infarction rabbit model. *Pacing Clin Electro-physiol*, 査読有, 36(5):596-606, 2013.

Mera T, Itoh T, Kita S, Kodama S, Kojima D, Nishinakamura H, Okamoto K, Ohkura M, Nakai J, Iyoda T, Iwamoto T, Matsuda T, Baba A, Omori K, Ono J, Watarai H, Taniguchi M, Yasunami Y. Pretreatment of donor islets with the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. *Am J Transplant*, 査読有, 13(8):2154-2160, 2013.

Shi Y, Yuan H, Kim D, Chanana V, Baba A, Matsuda T, Cengiz P, Ferrazzano P, Sun D. Stimulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 promotes microglial migration. *PLoS One*, 査読有, 8(8):e74201, 2013.

Takuma K, Ago Y, Matsuda T. The glial sodium-calcium exchanger: a new target for nitric oxide-mediated cellular toxicity. *Curr Protein Pept Sci*, 査読有, 14:43-50, 2013.

田熊一敞, 吾郷由希夫, 松田敏夫: グリア細胞 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換系の病態生理学的役割. *生体の科学 (医学書院)*, 査読なし, 64(5):384-385, 2013.

Drumm BT, Sergeant GP, Hollywood MA, Thornbury KT, Matsuda T, Baba A, Harvey BJ, McHale NG. The effect of high [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> on spontaneous Ca<sup>2+</sup> waves in freshly isolated

interstitial cells of Cajal from the rabbit urethra. *Physiol Rep*, 査読有, 2(1):e00203, 2014

〔学会発表〕(計7件)

太田友樹, 田熊一敞, 高橋剛士, 吾郷由希夫, 松田敏夫: 神経型一酸化窒素合成酵素阻害剤 7-nitroindazole は 6-hydroxydopamine 神経障害ラットにおいて L-DOPA 誘発ジスキネジアの形成を抑制する. 第 54 回日本神経化学学会大会, 石川, 2011 年 9 月 26-28 日.

太田友樹, 田熊一敞, 高橋剛士, 吾郷由希夫, 松田敏夫: 6-Hydroxydopamine 神経障害ラットにおける L-DOPA 誘発ジスキネジアの形成に対する神経型一酸化窒素合成酵素阻害薬 7-nitroindazole の改善効果. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012 年 3 月 14-16 日.

田熊一敞, 田中辰典, 高橋剛士, 太田友樹, 平松直樹, 吾郷由希夫, 松田敏夫: レボドパ誘発ジスキネジア形成過程における神経型一酸化窒素合成酵素の役割. 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日.

福山留以, 竹本光佑, 中川 光, 新谷紀人, 橋本 均, 吾郷由希夫, 田熊一敞, 松田敏夫. PACAP 欠損マウスの学習記憶障害に対する豊かな環境飼育の影響. 第 121 回日本薬理学会近畿部会, 徳島, 2012 年 6 月 29 日.

中川光, 竹本光佑, 福山留以, 新谷紀人, 橋本 均, 吾郷由希夫, 田熊一敞, 松田敏夫. 幼若期環境強化による PACAP 遺伝子欠損マウス学習記憶障害の発現抑制. 生体機能と創薬シンポジウム 2012, 神戸, 2012 年 8 月 30-31 日.

田中辰典, 吾郷由希夫, 井本絵実奈, 北本真理, 田熊一敞, 松田敏夫. 発育期環境要因のマウス精神機能発達に対する作用. 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 神戸, 2012 年 10 月 20 日.

中川 光, 福山留以, 山口浩史, 新谷紀人, 橋本 均, 吾郷由希夫, 田熊一敞, 松

田 敏夫. PACAP 遺伝子欠損マウスの異常行動に対する自発運動の作用. 第86回日本薬理学会年会, 福岡, 2013年3月21-23日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 敏夫 (MATSUDA, Toshio)  
大阪大学・薬学研究科・教授  
研究者番号: 00107103

### (2) 研究分担者

吾郷 由希夫  
大阪大学・薬学研究科・助教  
研究者番号: 50403027

田熊 一敞 (TAKUMA, Kazuhiro)  
大阪大学・薬学研究科・准教授  
研究者番号: 90289025

### (3) 研究協力者

橋本 均 (HASHIMOTO, Hitoshi)  
大阪大学・薬学研究科・教授  
研究者番号: 30240849