

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893178

研究課題名(和文) プロサイモシン 欠損に起因する運動機能不全の治療ターゲット分子群の同定

研究課題名(英文) Identification of therapeutic targets for motor impairment resulting from Prothymosin alpha deficiency

研究代表者

佐々木 恵太 (SASAKI, Keita)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・研究員

研究者番号：80711598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：プロサイモシンアルファ(ProTa)の脳線条体領域における役割について解明すべく、線条体特異的なProTa欠損(ProTa cKO)マウスを作出した。ProTa cKOマウスは、加齢に伴い運動障害を示すことが明らかになった。また、本病態にはドパミンD1受容体作動薬が有効であることを明らかにした。さらに、本マウスの脳梗塞性脳傷害に対する脆弱性を評価ところ、ProTa cKOマウスの生存率は野生型マウスと比較して有意に低下するという新規の知見を得ることに成功した。本研究により、線条体神経細胞に発現するProTaが、運動機能調節に関連した神経の生存と機能維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Prothymosin alpha (ProTa) is widely expressed in the brain and plays multiple functions including cell survival. But, it has remained to identify the intrinsic neuroprotective roles of ProTa. Here, I attempted to characterize the physiological, pathological, and neuropharmacological features of mice-specific deficiency of ProTa in the striatum (ProTa cKO mice). ProTa cKO mice exhibited age-dependent deficiency in rotarod behavior. I hypothesized that dopamine D1 receptor agonist SKF38393 would reverse the behavioral abnormality caused by aging in cKO mice. Indeed, the rotarod deficiency was reversed by SKF38393 under single administration. Moreover, ProTa cKO mice have been shown to display increased brain injury and decreased survival ratio following transient middle cerebral artery occlusion. These findings suggest that ProTa has a key role in maintaining motor function, and lack of ProTa is more susceptible to ischemic neuronal damage in the striatum.

研究分野：創薬薬理学

キーワード：Cerebral ischemia 一過性中脳動脈閉塞 線条体 ドパミン 神経保護 運動障害 病態モデル動物 加齢

### 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は主要な脳血管の閉塞により引き起こされる疾患であり、発症初期には運動麻痺や知覚障害、言語障害などの症状を示し、それらの症状が後遺症として残るケースが多い。現在、治療薬として血栓溶解剤 tissue plasminogen activator (t-PA) が、脳梗塞急性期治療に限定し適用されているが、脳梗塞後遺症を改善するための効果的な治療法については十分ではなく、その開発が囁望されている。そのため、脳梗塞後遺症に対する新規治療薬の導出、病態分子基盤の詳細な解明や、適切かつ効率的な治療薬物スクリーニング動物の確立は必須の課題である。これまで国内外の研究においては、動物の外科的手術により脳梗塞の急性病態を誘導したモデル動物が確立されており、治療法の開発が試みられてきた。しかし、従来のこれらのモデル動物では、再現性のある後遺症病態を発現することは極めて困難であるという問題点をはらんでいた。本申請者が所属する研究室では、脳梗塞病態を改善する新規の治療薬候補の探索を進めてきた結果、神経保護機能を有する核内タンパク質「プロサイモシン $\alpha$ : ProT $\alpha$ 」が脳梗塞モデル動物の急性期脳虚血病態を有意に改善することを明らかにしていた。さらに、本申請者は ProT $\alpha$ を脳領域特異的に欠損したコンディショナルノックアウトマウス群3系統を作出し、脳梗塞後遺症である運動障害、認知機能障害、うつ病態の病態責任部位と考えられる脳領域特異的な ProT $\alpha$ 欠損マウスを作出することに成功していた。とりわけ、運動機能調節を司る線条体領域が ProT $\alpha$ を欠損した場合、脳梗塞の後遺症で見られる運動障害に類似した加齢進行性の運動機能障害を示唆する予備的データを得ることに成功していた。

### 2. 研究の目的

本研究では、線条体特異的 ProT $\alpha$ 欠損マウスを「脳梗塞後遺症としての運動障害の自然発症型モデル」として活用し、その線条体組織から障害を誘導する分子群を網羅し、そのなかから障害を改善する治療標的を同定することで、最終的に薬剤の探索および開発に繋げることを目指し、以下の項目について研究を実施することとした。

- 1) 予備的検討から見出されている線条体特異的 ProT $\alpha$ 欠損マウスが示す、運動障害の発症時期とその特性を詳細に解析する。
- 2) さらに、運動障害に対し治療標的となりうる分子を見出し、行動薬理学的に治療効果を検証する。
- 3) 線条体特異的 ProT $\alpha$ 欠損マウスの脳梗塞処置による神経脆弱性、および運動機能障害の増悪について評価することで、本マウスが示す運動障害と脳梗塞病態との関連性を検討する。
- 4) 本マウスの脳梗塞処置後の病態につい

て、運動機能に関連した薬剤の治療効果を検討することで、加齢進行性に重篤化する運動機能不全の発症機序と、脳梗塞病態時との相関性を行動薬理学的手法により解析する。

### 3. 研究の方法

#### 実験動物

本研究開発で用いたマウスは、恒温(22 ± 2°C)恒湿(50 ± 10%)の飼養室で、12時間毎の昼夜自然管理下のもと、自由行動可能なケージ内で滅菌水道水、一般小動物(マウス)用固形飼料(MF, オリエンタル酵母、東京、日本)の自由摂取環境下の条件で飼養し、実験に用いられた。なお、以下に示す全ての動物実験は長崎大学動物実験指針で定める方法に準じて行い、本研究開発に関連する動物実験計画書「神経細胞保護因子の有効性解析」(承認番号: 1104190914)の元で実施された。また、線条体特異的 ProT $\alpha$ 欠損マウスは、*Gng7-Cre<sup>wt/Cre</sup>*マウスに対し、*Ptma<sup>Flox/Flox</sup>*を交配させることで *Gng7-Cre<sup>wt/Cre</sup>; Ptma<sup>Flox/Flox</sup>* (ProT $\alpha$  cKO)マウスとして作出した。対照群には遺伝的背景を考慮し、*Gng7-Cre<sup>wt/Cre</sup>*マウス(Controlマウス)を使用した。

#### Rota-rod 法による運動協調性障害の評価

連続した3日間の Rota rod 訓練の後、Rota rod 試験における本試験を1日4回、10、20、30、40 rpmで実施し、その平均値を算出することで運動機能のうち運動協調性の障害について解析を行った。解析に使用したマウスは10週齢、もしくは20週齢で使用した。

#### 中大脳動脈閉塞(MCAO)モデル

マウスを吸入麻酔薬イソフルランで全身麻酔した後、顕微鏡下で左手前側の外頸動脈を露出し、二か所を軟質絹糸で結紮した。さらに、二箇所の間を切開して塞栓子を挿入することで左中大脳動脈を閉塞した。一過性中大脳動脈閉塞(tMCAO)モデルの場合、再灌流する任意の時間(15-60分)で胸部を縫合した軟質絹糸を除去、塞栓子を抜去し、胸部の切開部を縫合することで tMCAO モデルを作製した。

#### Clinical score を指標とした脳虚血性病態重症度の評価

Clinical score の評価は、0: 障害なし、1: 右前肢の麻痺、2: 一方向性の行動、3: 体勢を保てず傾く、4: 自発運動の消失、5: 死亡、の評価項目に従い判定した。なお、score 1-4 までは、顕著に観察された場合、0.5点を加算し判定した。また、その判定はマウス脳梗塞モデル作成後、1日1回判定することとした。また、1日1回、1週間の clinical score 判定に併せて、survival ratio (生存率)についても評価を実施した。

#### TTC 染色による脳傷害領域の測定

PIT 処置または偽手術を施したマウスの脳を処置後 24 時間で摘出し、氷冷 PBS 中で余分な脳表面の血液を除去し、Brain slicer (室町機械)を用いて、厚さ 1 mm の冠状脳切片を Bregma を挟む形で、Bregma より嗅球側 2.5 mm の位置から、Bregma より小脳側へ 4.0 mm の位置までの 6.5mm の範囲で 5 枚作成した。脳切片 1 枚につき、予め氷冷 500 $\mu$ l の PBS を加えた 24 well プレートの 1 well に移し洗浄操作後、2% の 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC, SIGMA, cat# T8877-100G) 溶液 (溶媒 PBS) 500  $\mu$ l に置換し、遮光条件下で 15 分間室温にて反応させた。その後氷上で PBS を用い 3 回 (1 回につき 5 分間) 洗浄操作を行い、500  $\mu$ l の 4% PFA / PBS に最終置換後、4 で一晩静置し脳切片を固定した。翌日、スキャナー (GT-9700F, Canon)で脳切片画像を取得し、ImageJ ソフトウェアを用い、脳梗塞巣面積及び左大脳半球面積を測定し、台形法にて左脳半球体積に対する脳梗塞巣の割合を脳梗塞率 (%)として算出した。

#### 薬物投与

Pramipexole (Sifrol 錠), SKF38393, Selegiline (エフピーOD 錠)を使用した。錠剤薬に関しては、粉碎後生理食塩水に溶解し、懸濁液として腹腔内投与した。

#### タンパク質定量解析

脳線条体組織における ProT $\alpha$  の欠損を確認するため、acidic immunoblot 法によるタンパク質発現解析を実施した (Ueda H, JCB, 2007)。

#### PCR 解析

*Gng7*-Cre<sup>wt/Cre</sup>, *Ptma*<sup>Flox/Flox</sup> (ProT $\alpha$  cKO) マウスの genotype の確認には、PCR 法によるマウスゲノムを用いた genotyping を実施した。使用した primer は、*Gng7*-Cre に対して、

G7NR: 5'-GGCGACGTTGTTAGTACCTGAC-3',  
 CreMetR: 5'-ATCCCTGAACATGTCCATCAGGTTC-3',  
 KpEco: 5'-TATAGGTACCCAGAAGTGAATTCGGT CGC-3',

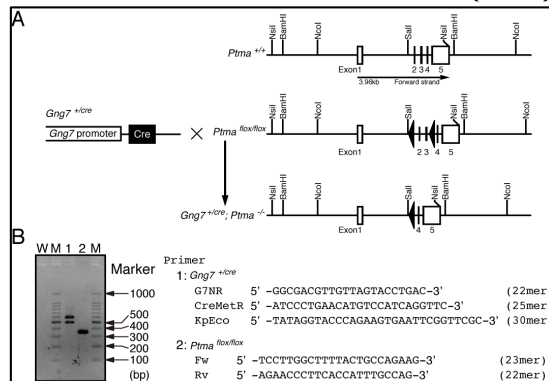
*Ptma*<sup>Flox/Flox</sup> に対して、  
 Fw: 5'-TCCTGGCTTTTACTGCCAGAAG-3',  
 Rv: 5'-AGAACCCTTCACCATTTGCCAG-3' を使用した。

#### 4. 研究成果

線条体特異的 ProT $\alpha$  欠損 (ProT $\alpha$  cKO) マウスの作出

ProT $\alpha$  cKO マウスを作出するため、線条体中型有棘細胞に特異的な発現を示すことが知られている、*Gng7* に着目した。本遺伝子 promoter 下流に Cre 組換え酵素を導入した *Gng7*-Cre<sup>wt/Cre</sup> マウスに対し、ProT $\alpha$  遺伝子である *Ptma* の exon2, および exon3 を Loxp 配列で挟みこむように設計された *Ptma*<sup>Flox/Flox</sup> を交配させ、線条体特異的

ProT $\alpha$  欠損 (ProT $\alpha$  cKO) マウスを作出することとした。その結果、以下の図に示す ProT $\alpha$  cKO マウスの作出に成功した (図 1)。

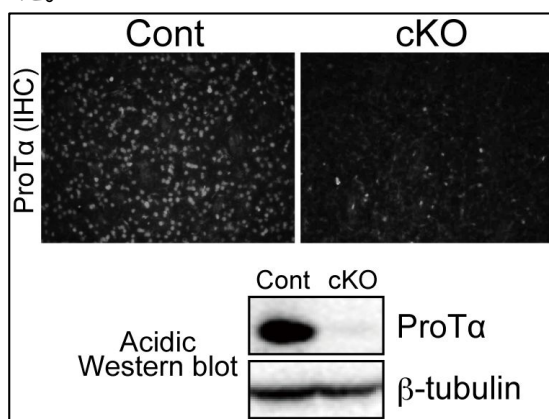


(図 1) 線条体特異的 ProT $\alpha$  欠損 (ProT $\alpha$  cKO) マウスの作出

A. マウスの genome 配列と Cre/loxP システムによる遺伝子欠損の模式図。

B. PCR 法による *Ptma* 遺伝子欠損の確認。

さらに、線条体領域でタンパク質レベルで ProT $\alpha$  が欠損しているか、免疫組織化学手法、および Acidic Western blot 法を用いて確認を実施した。その結果、マウス脳線条体組織において、control マウスで観察された ProT $\alpha$  陽性細胞シグナルが cKO マウスで劇的に減少することが明らかになった。また、cKO マウスでわずかに観察される ProT $\alpha$  陽性細胞シグナルは、Cre 発現用に使用した *Gng7* の発現様式が線条体における神経細胞の約 8 割を占める中型有棘細胞に特異的であることから、その他大型無棘神経細胞や各種グリア細胞由来のものであると推察された (図 2)。また、Western blot による発現定量解析の結果でも同様に、cKO マウスで劇的なタンパク質発現量の減少を認めた。

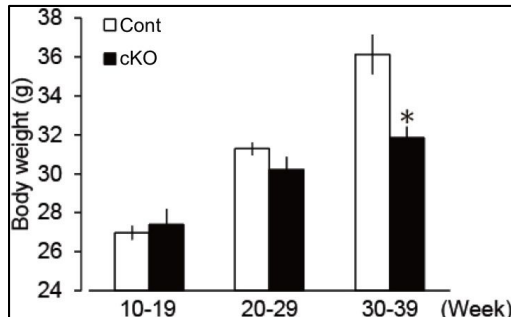


(図 2) ProT $\alpha$  cKO マウス線条体における ProT $\alpha$  発現

免疫組織化学染色 (上段) および Western blot による ProT $\alpha$  の発現を確認したところ、ProT $\alpha$  cKO マウス線条体では劇的に ProT $\alpha$  のタンパク質量が減少していることが明らかになった。また、残存する ProT $\alpha$  陽性シグナルは、大型無棘神経細胞や各種グリア細胞由来のものであると推察された。

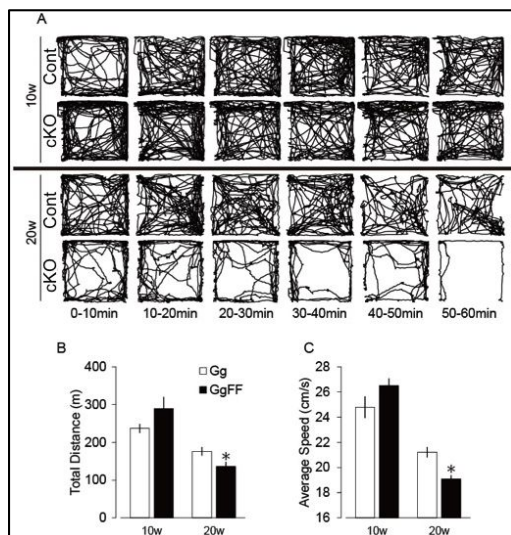
ProTα cKO マウスが示す「自然発症型運動機能障害」の解析

まず始めに、Control マウスと ProTα cKO マウスの一般性状について、比較したところ有意な変動は見られなかった。しかし、Control マウスと比較し、週齢が経過した場合の ProTα cKO マウス体重が有意に減少することが明らかになった(図3)。



(図3) ProTα cKO マウスの体重変動  
Control マウスと比較し、週齢が経過するに従い体重が有意に減少した。

ProTα cKO マウスは、生後 20 週齢より体重減少傾向が示されたため、10 週齢の場合と 20 週齢における自発行動量について解析を進めた結果、Open field 試験において 20 週齢時点での有意な活動量低下と移動速度の低下を見出した(図4)。

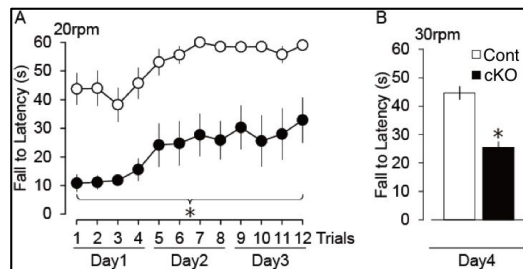


(図4) ProTα cKO マウスの自発行動変化

- A. Open field 試験における軌跡
- B. 総移動距離 (cm)
- C. 平均移動速度 (cm/s)

ProTα cKO マウスは高週齢にて自発行動低下を示した。

また、自発行動低下を示した 20 週齢において、運動協調性試験について Rota rod 試験法を用いた解析を実施したところ、Training 開始時点から本試験に至るまで落下潜時の短縮、つまり運動機能の低下を示唆する結果を得た(図5)。



(図6) Rota rod 試験法を用いた運動協調性評価

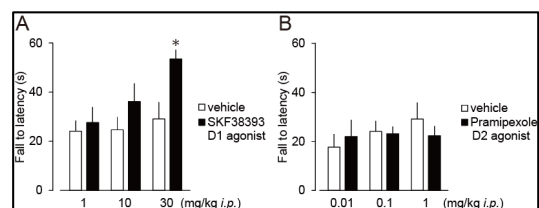
ProTα cKO マウスは生後 20 週齢において、運動協調性低下を有意に示した。

A. Rod 回転速度 20 rpm における Rota rod 試験 Training (3 日間連続、1 日 4 回)。

B. Rota rod 本試験における 30 rpm での Rod 滞在時間。

ProTα cKO マウスが示す「自然発症型運動機能障害」に対する薬物治療

ProTα cKO マウスは、*Gng7* を発現する dopamine D1 receptor (D1R) 陽性の線条体中型有棘細胞に、特異的な ProTα 欠損を示すことから、ProTα の欠損が運動機能制御に関わる D1R 機能を障害している可能性が考えられた。そこで、D1R の選択的アゴニストとして知られる SKF38393 について生後 20 週齢の ProTα cKO マウスに 1, 10, 30 mg/kg を腹腔内投与し、運動機能の改善効果を薬物投与 5 時間後に、Rota rod 試験にて検証したところ、10 mg/kg より運動協調性の改善傾向を示し、30 mg/kg で有意な改善効果を示すことが明らかになった(図7A)。また、Dopamine D2 receptor (D2R) の選択的アゴニストである Pramipexole (Sifrol錠) の腹腔内投与での有効性をあわせて検討したところ、0.01-1 mg/kg の用量範囲で有効性を示すことはなかった(図7B)。これらの結果より、線条体中型有棘細胞に発現する ProTα は、特に D1R 機能制御に関わり、ProTα を欠損することで運動機能障害を引き起こすことが明らかになった。



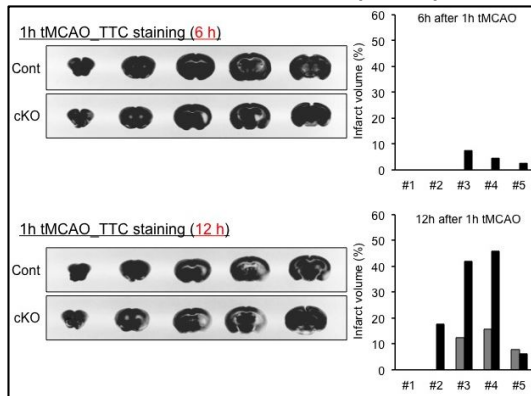
(図7) 生後 20 週齢より観察される ProTα cKO マウスの自然発症型運動機能障害に対する、各種ドパミンアゴニストの治療効果検証 (Rota rod 試験法)

A. D1R アゴニスト: SKF38393 の投与による運動機能改善効果の検討。

B. D2R アゴニスト: Pramipexole の投与による運動機能改善効果の検討。

線条体特異的 ProTα cKO マウスの脳虚血脆弱性の検討

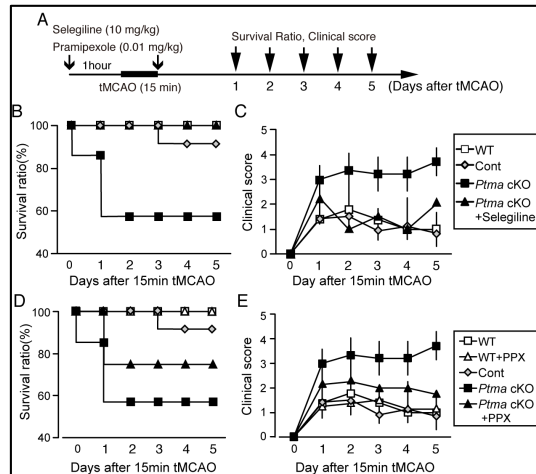
ProTα cKO マウスの高週齢における「自然発症型運動障害」について、幼若期-青年期の段階から神経機能の脆弱性・機能不全を示すか検討を行うため、脳虚血処置を実施することとした。10 週齢の ProTα cKO マウスに対し、60 分間の一過性中大脳動脈閉塞 (tMCAO) を実施した。その結果、Control マウスでは、TTC 染色による脳傷害領域は極めて限定された領域でしか認められなかった事に対し、ProTα cKO マウスでは、線条体を含む広域の脳領域で脳傷害を引き起こすことが明らかになった (図 8)。



(図 8) TTC 染色による脳傷害増悪の検討  
60 min tMCAO 処置 6, 12 時間後の Control マウス、および ProTα cKO マウスの脳切片画像。ProTα cKO マウスでは脳傷害を示す白色のエリアが拡大した。

また、正常 (Control) マウスでは無症候性 (脳梗塞に由来する重度の麻痺、生存率等の影響がない) の脳梗塞条件である 15 分間の tMCAO にて clinical score, ならびに生存率について比較を実施したところ、Control マウスでは、15 min tMCAO 処置後脳梗塞層の反対側前肢に軽度の麻痺症状が認められる程度であったが、ProTα cKO マウスの場合、処置後 24 時間後ですでに体勢を保てず傾く clinical score 3 を示し、5 日後には自発運動の消失 (clinical score 4) から死亡 (clinical score 5) する症例を示した。本結果は、内在性の神経保護機構の一端を担う ProTα を欠損する、線条体中型有棘細胞が脳虚血傷害に対し脆弱性を示した結果であると考えられた。そのため、ProTα を欠損する D1R 陽性中型有棘細胞の機能改善を目指した「自然発症型運動機能障害」とは異なる行動薬理的介入法として、MAO-B 阻害剤である Selegiline を用いた脳内ドパミン量増加、あるいは残された D2R 陽性の神経細胞に対する機能増強を目的とした Pramipexole の治療効果について検討することとした。その結果、10 mg/kg Selegiline を 15 min tMCAO 処置の 1 時間前ならびに再灌流直後の計 2 回投与した場合、1, 2, 3, 4, 5 日後の Survival ratio および Clinical score を改善することが明らかになった。また、同様に 0.01 mg/kg Pramipexole を投与した場合も、Survival ratio および Clinical score

を改善することが明らかになった。本結果は、ProTα cKO マウスの脳梗塞性傷害に対する脆弱性を証明するとともに、本病態に対する治療効果は「自然発症型運動機能障害」とは異なり、錐体外路系間接路に該当する D2R 機能の改善により見出されることが明らかになった (図 9)。



(図 9) ProTα cKO マウスが示す、脳梗塞による脳傷害脆弱性に対する各種薬剤の有効性検討

- A. 実験スケジュール
- B. Selegiline 投与による Survival ratio の改善効果検討
- C. Selegiline 投与による Clinical score の改善効果検討
- D. Pramipexole (PPX) 投与による Survival ratio の改善効果検討
- E. Pramipexole (PPX) 投与による Clinical score の改善効果検討

これら本研究課題で得られた新規知見により、線条体中型有棘細胞のうち Dopamine D1 receptor 陽性細胞に発現する ProTα は、運動機能調節に関連した神経生存とドパミン機能の維持に重要な役割を果たすことが示唆された。また、本マウスが脳虚血に脆弱性を示す、新規のモデル動物として確立する上で重要なプロファイルを得ることに成功し、ProTα cKO マウスが示す「自然発症型運動機能障害」とともに、脳梗塞性運動障害の増悪に対する、治療ターゲット分子を同定するに至った。本成果をもとに、現在は論文を執筆中である。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 前田詩織、近藤秀春、佐々木恵太、植田弘師  
演題名：プロサイモシン $\alpha$ の脳血管保護作用の検討  
学会名：第67回日本薬理学会西南部会、演題番号：A1-3、場所：産業医科大学(福岡県北九州市)、日時：11月23日、2014年
- (2) 佐々木恵太、前田詩織、近藤秀春、久保泰隆、植田弘師  
演題名：中枢性脳卒中後疼痛におけるLPAシグナルの関与と治療戦略  
学会名：第36回日本疼痛学会、演題番号：B10-4、場所：KKRホテル大坂(大阪府大阪市)、日時：6月20-21日、2014年
- (3) 佐々木恵太、植田弘師  
演題名：海馬神経細胞特異的 HB-EGF 欠損マウスが示す精神症状の解析  
学会名：第30回日本薬学会九州支部大会、演題番号：1-B-18、場所：長崎国際大学(長崎県佐世保市)、日時：12月7-8日、2013年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

受賞歴：

第30回日本薬学会九州支部大会、優秀口頭発表賞 受賞、12月、2013年

受賞者名：佐々木恵太

演題名：海馬神経細胞特異的 HB-EGF 欠損マウスが示す精神症状の解析

所属研究室(長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 創薬薬理学分野)ホームページ：

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/soyakuri/index-j.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
佐々木 恵太 (SASAKI, Keita)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)  
・ 研究員  
研究者番号：80711598