

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390152

研究課題名（和文） 脳防御機構における低分子量生体内機能分子の役割の解明

研究課題名（英文） Roles of low-molecular weight bioactive factors in the protective mechanisms of brain function

研究代表者

赤池 昭紀（AKAIKE AKINORI）

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：80135558

研究成果の概要：

様々な脳疾患の防御に重要な生体内機能分子の役割を解明するため、研究を遂行し下記の成果を得た。胎仔由来神経保護物質であるセロフェンド酸が作用を発現する際に重要な直接のターゲット分子の候補タンパクが見出された。また、セロフェンド酸は末梢投与においても *in vivo* における虚血障害に対して保護的に働くことが明らかとなった。ニコチン受容体関連では、アストロサイトにおける $\alpha 7$ 受容体発現にはニューロンとの接触によるシグナルが重要な役割を果たしていることを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

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：脳神経疾患・生体分子・薬理学

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患に伴うニューロン死に関連した機能分子の探索は、ニューロトロフィンなどの神経栄養因子によるニューロン死制御作用の解析やアポトーシス関連遺伝子産物をはじめとする諸種タンパク群の解析を中心に多くの研究が進められているが、細胞障害性に働くラジカル種や興奮性神経毒性を制御する低分子量機能分子の解析はほとんど進んでいない。本研究の検討課題の中心となるセロフェンド酸をはじめとするウシ胎仔血清由来神経保護活性化化合物や、ニコチン性アセチルコリンの神経保護作用は、申請者の世界に先駆けた発見に基づくものである（Kume et al. PNAS 99: 3288-3293, 2002, Akaike et al. Brain Res 644: 181-187, 1994）。諸種ストレス環境下においてニューロンの生存を促進する生体内機構として機能する低分子量化合物の解析を推進することにより、神経変性疾患の病態の解明と治療法の探索を目的とした研究分野で新しい概念を提出できる可能性が高い。

2. 研究の目的

脳は身体の諸器官の中で最も脆弱な組織であり、老年痴呆、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などをはじめとする諸種難治性神経変性疾患や脳虚血をはじめとする様々なストレスによるニューロンの損傷に対する保護、修復メカニズムを明らかにすることは、脳の機能維持の理解のうえできわめて重要な課題である。本研究では、これらの脳疾患に対する防御機構における低分子生体内機能分子の役割を解明することを目的とする。ニューロン死を制御する内在性保護因子として、セロフェンド酸を代表とする胎児由来低分子量化合物とニコチン性アセチルコリンを中心に、その保護作用メカニズムの解明を目指した研究を実施する。申請者は、グルタミン酸神経毒性の保護因子の解明によってニューロン死を標的とした難治性神経疾患治療薬の探索に重要な基礎的資料を提供できるとの考えに基づき、グルタミン酸により誘発される神経毒性を制御する内在性因子に関する研究を行ってきた。その結果、グルタミン酸受容体刺激による細胞内へのカルシウムイオンの過剰流入が引き起こす細胞死の主要な要因としてNOと活性酸素の関与するラジカル連鎖反応に注目し、ニューロン死を制御する内在性保護因子の機能の解明を計画するに至った。本研究では、これまで報告してきた内在性神経保護因子(Kume et al. *Biol Pharm Bull* 27: 964-967, 2004)のうち、胎仔血清に由来するセロフェンド酸と神経伝達物質であるニコチン性アセチルコリンに注目し、脳保護機構における役割について検討を進める。

3. 研究の方法

グルタミン酸、活性酸素、NOにより惹起されるニューロン死を制御する内在性保護因子の作用を検討する。これまでの研究成果に基づいて、申請者らの発見した内在性神経保護化合物セロフェンド酸の作用の解析、およびニコチン性アセチルコリンの神経保護作用メカニズムの解析を実施する。さらに、胎仔組織からの新たな神経保護化合物の探索と同定にも着手する。

(1) セロフェンド酸の作用スペクトルの解析

①セロフェンド酸を担体に結合させたアフィニティーカラムを作成し、これを用いて脳あるいは培養ニューロン中のセロフェンド酸結合タンパクを精製し、同定を行

う。

②ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて、セロフェンド酸の *in vivo* 脳虚血障害に対する保護作用について検討する。投与方法としては、静脈内注射を行う。末梢投与でも有効な神経保護作用が得られるかについて検討する。

(2) 胎仔組織由来新規神経保護物質の探索

無細胞系において caspase-3 阻害活性を指標として、ウシ胎仔血清の有機溶媒抽出物の HPLC 画分のスクリーニングを行う。2段階以上の HPLC で分画することにより、単一化合物を含む阻害活性の高い画分を同定する。同様の検討を他のカスパーゼについても行い、活性画分を同定する。

(3) ニコチン性アセチルコリンの神経保護メカニズムの解析

培養アストロサイトにおけるニコチン受容体の発現を確認する。発現していることが確認できた細胞を用いて、ニューロンの受容体との機能面での比較を行う。また、活性化グリアからの炎症性サイトカインの遊離調節におけるニコチンの作用についても検討する。

4. 研究成果

(1) セロフェンド酸の作用スペクトルの解析

セロフェンド酸は、申請者らがウシ胎仔血清のエーテル抽出物中より発見した分子量 382 のユニークな構造をもつ環状ジテルペノイドである。

①セロフェンド酸が神経保護作用を発現する際に重要な直接のターゲット分子について検討を行った。PC12 細胞、培養大脳皮質細胞、心筋細胞のホモジネートを用いてセロフェンド酸に特異的に結合するタンパクをプルダウン法にて検討したところ、複数のタンパクがセロフェンド酸結合タンパクの候補として見出された。

②セロフェンド酸の定量法の確立を目指し、蒸発型光散乱検出器 (ELSD) を用いて検討したところ、比較的高感度にセロフェンド酸の検出が可能となった。

③ *in vivo* におけるラット中大脳動脈閉塞モデルを用いた検討において、セロフェンド酸は尾静脈からの末梢投与においても虚血障害に対して保護的に働くことが明らかとなった。

(2) 胎仔組織由来新規神経保護物質の探索

胎仔組織にはセロフェンド酸のみならず胎仔期特有の化合物が存在すると推定されるので、未同定の神経保護活性化化合物の探索を行ったところ、ウシ胎盤のエーテル抽出物に caspase-3 阻害活性を見出した。さらに逆相 HPLC を用いて分画を行い、活性測定を行ったところ、いくつかのフラクションに強い活性をもった画分が得られた。

(3) ニコチン性アセチルコリンの神経保護メカニズムの解析

①ニコチン受容体刺激のニューロン保護効果の詳細な機序について解析したところ、ニコチン受容体刺激による $\alpha 7$ ニコチン受容体アップレギュレーションおよび神経保護作用の増強作用には nAChR-PI3K-Akt 系のシグナル伝達が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

②アストロサイトにおける $\alpha 7$ 受容体発現にはニューロンとの接触によるシグナルが重要な役割を果たしていることを見出した。神経型ニコチン性アセチルコリン受容体がグリア細胞にも発現していることが近年報告されている。グリア細胞における長期間刺激による受容体の機能変化を解析するために、アストロサイトにおける $\alpha 7$ 受容体の発現調節機構について検討した。培養アストロサイトを用いた検討において、ニコチンを 48 時間処置することにより $\alpha 7$ 受容体の発現量が増加する傾向がみられた。培養アストロサイトにおける $\alpha 7$ 受容体の発現調節機構を検討する目的で、培養ニューロン、アストロサイトに発現する $\alpha 7$ 受容体を検討したところ、両培養系においてほぼ全ての細胞において $\alpha 7$ 受容体の発現していた。一方、培養ニューロンと共存するアストロサイトにおいては $\alpha 7$ 受容体の発現は見られなかった。ニューロンとアストロサイトが接触する条件においては、アストロサイトの $\alpha 7$ 受容体の発現が観察されないが、接触がない条件においては、 $\alpha 7$ 受容体の発現抑制は観察されなかった。以上の結果により、グリア細胞の 1 つであるアストロサイトにおける $\alpha 7$ 受容体の発現は、ニューロンとの接触により抑制的な制御を受けることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 17 件)

- ① Takada-Takatori, Y., Kume, T., Ohgi, Y., Izumi, Y., Niidome, T., Fujii, T., Sugimoto, H. and Akaike, A.: Mechanism of neuroprotection by donepezil pretreatment

in rat cortical neurons chronically treated with donepezil. *J. Neurosci. Res.*, 86, 3575-3583 (2008) 査読有

- ② Osakada, F., Ikeda, H., Mandai, M., Wataya, T., Watanabe, K., Yoshimura, N., Akaike, A., Sasai, Y. and Takahashi, M.: Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nature Biotechnol.*, 26, 215-352 (2008) 査読有
- ③ Oda, T., Kume, T., Izumi, Y., Takada-Takatori, Y., Niidome, T. and Akaike, A.: Bromocriptine, a dopamine D_2 receptor agonist with the structure of the amino acid ergot alkaloids, induces neurite outgrowth in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 598, 27-31 (2008) 査読有
- ④ Nakamura, T., Kume, T., Katsuki, H., Niidome, T., Sugimoto, H. and Akaike, A.: Protective effect of serofendic acid on ischemic injury induced by occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 586, 151-155 (2008) 査読有
- ⑤ Izumi, Y., Yamamoto, N., Kume, T., Katsuki, H., Sawada, H. and Akaike, A.: Regulation of intracellular dopamine levels by dopaminergic drugs: involvement of vesicular monoamine transporter. *Eur. J. Pharmacol.*, 582, 52-61 (2008) 査読有
- ⑥ Hama, Y., Katsuki, H., Suminaka, C., Kume, T. and Akaike, A.: Chloride-dependent acute excitotoxicity in adult rat retinal ganglion cells. *Neuropharm.*, 55, 677-686 (2008) 査読有
- ⑦ Fujimoto, S., Katsuki, H., Ohnishi, M., Takagi, M., Kume, T. and Akaike, A.: Plasminogen potentiates thrombin

- cytotoxicity and contributes to pathology of intracerebral hemorrhage in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 28, 506-515 (2008) 査読有
- ⑧ Akasofu, S., Sawada, K., Kosasa, T., Hihara, H., Ogura, H. and Akaike, A.: Donepezil attenuates excitotoxic damage induced by membrane depolarization of cortical neurons exposed to veratridine. *Eur. J. Pharmacol.*, 588, 189-197 (2008) 査読有
- ⑨ Yamamoto, N., Sawada, H., Izumi, Y., Kume, T., Katsuki, H., Shimohama, S. and Akaike, A.: Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 282, 4364-4372 (2007) 査読有
- ⑩ Osakada, F., Ooto, S., Akagi, T., Mandai, M., Akaike, A. and Takahashi, M.: Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J. Neurosci.*, 27, 4210-4219 (2007) 査読有
- ⑪ Okawara, M., Katsuki, H., Kurimoto, E., Shibata, H., Kume, T. and Akaike, A.: Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. *Biochem. Pharmacol.*, 73, 550-560 (2007) 査読有
- ⑫ Ohnishi, M., Katsuki, H., Fujimoto, S., Takagi, M., Kume, T. and Akaike, A.: Involvement of thrombin and mitogen-activated protein kinase pathways in hemorrhagic brain injury. *Experimental Neurology*, 206, 43-52 (2007) 査読有
- ⑬ Oda, T., Kume, T., Katsuki, H., Niidome, T., Sugimoto, H. and Akaike, A.: Donepezil potentiates nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Pharmacol. Sci.*, 104, 349-354 (2007) 査読有
- 有
- ⑭ Katsuki, H., Watanabe, Y., Fujimoto, S., Kume, T. and Akaike, A.: Contribution of endogenous glycine and D-serine to excitotoxic and ischemic cell death in rat cerebrocortical slice cultures. *Life Sci.*, 81, 740-749 (2007) 査読有
- ⑮ Izumi, Y., Sawada, H., Yamamoto, N., Kume, T., Katsuki, H., Shimohama, S. and Akaike, A.: Novel neuroprotective mechanisms of pramipexole, an anti-Parkinson drug, against endogenous dopamine-mediated excitotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.*, 557, 132-140 (2007) 査読有
- ⑯ Fujimoto, S., Katsuki, H., Ohnishi, M., Takagi, M., Kume, T. and Akaike, A.: Thrombin induces striatal Neurotoxicity depending on mitogen-activated protein kinase pathways in vivo. *Neurosci.*, 144, 694-701 (2007) 査読有
- ⑰ Akao, M., Takeda, T., Kita, T., Kume, T. and Akaike, A.: Serofendic Acid, a substance extracted from fetal calf serum, as a novel drug for cardioprotection. *Cardiovasc Drug Rev.*, 25, 333-341 (2007) 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 高鳥悠記, 久米利明, 大木雄太, 泉安彦, 新留徹広, 藤井健志, 岡部進, 杉本八郎, 赤池昭紀 ドネペジル慢性処置による神経保護作用の感受性上昇機序. 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, (2008.12.20) 京都.
- ② 大木雄太, 泉安彦, 久米利明, 赤池昭紀 培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸神経毒性に対する pitavastatin の保護作用. 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, (2008.12.20) 京都.

- ③ 武藤千恵, 水野景太, 久米利明, 泉安彦, 赤池昭紀 培養神経細胞における果汁・野菜エーテル抽出物の酸化ストレスに対する作用の検討. 第114回日本薬理学会近畿部会, (2008.11.14) 神戸.
- ④ Kume, T., Nakamura, T., Izumi, Y. and Akaike, A. Serofendic acid protects ischemic injury by occlusion of the middle cerebral artery in rats. The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, (2008.11. 7) Busan, Korea.
- ⑤ Akaike, A., Kume, T., Izumi, Y. and Takada-Takatori, Y. Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of alpha4 and alpha7 receptors in neuroprotection. XIII International Symposium on Cholinergic Mechanisms, (2008. 8.20) Foz do Iguasu, Brazil.
- ⑥ 久米利明, 森本典子, 泉安彦, 赤池昭紀 培養アストロサイトの $\alpha 7$ ニコチン受容体のニューロンとの相互作用による発現制御. Neuroscience 2008 第31回日本神経科学大会 The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, (2008. 7. 9) 東京都.
- ⑦ 小田徹, 久米利明, 泉安彦, 赤池昭紀 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 阻害薬による PC12 細胞における NGF 誘発性神経突起伸長の抑制. 第113回日本薬理学会近畿部会, (2008. 6.20) 岡山.
- ⑧ Yamamoto, N., Izumi, Y., Kato, F., Kume, T., Sawada, H. and Akaike, A. Heme oxygenase-1 is degraded by ubiquitin-proteasome system and related to neuroprotective role. The 4th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, (2008. 4.24) Kyoto, Japan.
- ⑨ 高木美佳子, 香月博志, 藤本真二, 大西正俊, 久米利明, 赤池昭紀 出血性脳障害におけるポリアミン類の関与. 日本薬学会第128年会, (2008. 3.28) 横浜.
- ⑩ 山本憲幸, 泉安彦, 加藤文彦, 久米利明, 澤田秀幸, 赤池昭紀 ユビキチン-プロテアソーム系の heme oxygenase-1 の分解への寄与:神経保護作用との関係. 第81回日本薬理学会年会, (2008. 3.18) 横浜.
- ⑪ 高鳥悠記, 久米利明, 大木雄太, 新留徹広, 藤井健志, 岡部進, 杉本八郎, 赤池昭紀 ドネペジル慢性処置した大脳皮質ニューロンにおける低濃度ドネペジル前処置の神経保護作用機序. (2008. 3.17) 第81回日本薬理学会年会, 横浜.
- ⑫ 水野景太, 久米利明, 武藤千恵, 泉安彦, 赤池昭紀 酸化ストレスに対するイソチシアネート類の神経保護作用機序. 第81回日本薬理学会年会, (2008. 3.17) 横浜.
- ⑬ 久米利明, 高田宜則, 水野景太, 赤池昭紀 グルタミン酸誘発ニューロン死に対する sulforaphane の神経保護作用機序. 第81回日本薬理学会年会, (2008. 3.17) 横浜.
- ⑭ 赤池昭紀 神経細胞死を制御する内在性保護因子と低分子化合物. 第7回福岡大学高機能物質研究所研究成果報告会, (2008. 1.23) 福岡.
- ⑮ 小田徹, 久米利明, 泉安彦, 赤池昭紀 PC12細胞におけるプロモクリプチンの神経突起伸長作用. 第112回日本薬理学会近畿部会, (2007. 11.16) 大阪.
- ⑯ 泉安彦, 澤田秀幸, 山本憲幸, 久米利明, 香月博志 赤池昭紀 グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死における内在性ドパミンの関与. Neuro2007, (2007. 9.10). 横浜.
- ⑰ 黒須真介, 香月博志, 久米利明 赤池昭紀 脱分極性刺激あるいは発火抑制による視床下部オレキシンニューロンの選択的消失.

第111回日本薬理学会近畿部会, (2007. 6.15) 名古屋.

- ⑮ 浜康博, 香月博志, 角中ちひろ, 久米利明 赤池昭紀. Cl⁻流入に依存した興奮毒性による網膜神経節細胞死. 第111回日本薬理学会近畿部会, (2007. 6.15) 名古屋.
- ⑯ 香月博志 赤池昭紀 中脳ドパミンニューロンの炎症性変性における NO の役割. 第7回日本NO学会学術集会, (2007. 5.17) 大津市.
- ⑰ 久米利明, 高田宜則, 水野景太, 香月博志 赤池昭紀 培養大脳皮質ニューロンにおける sulforaphane の神経保護作用. 日本ケミカルバイオロジー研究会 第2回年会, (2007. 5. 9) 京都.

[図書] (計4件)

- ① 赤池昭紀, 石井邦雄, 越前宏俊 金子周司 他16名, 廣川書店, 最新薬物治療学 第8章 血液および造血器疾患 第10章 感覚器疾患, 2008, p294-304, 365-387
- ② 香月博志, 赤池昭紀, 浜康博 渡辺佳典, 眼薬理, 内在性グリシン結合部位リガンドによるNMDA誘発網膜障害の制御, 2007, 21: p41-43
- ③ 赤池昭紀, 木村喜代史 FOONG, A. F., イメックスジャパン株式会社, 科学英語論文作成・投稿の基礎知識, 2007, 221p
- ④ 木村邦彦, 赤池昭紀 他46名, 廣川書店, 薬科学大辞典 第4版, 2007, 2364p

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤池 昭紀 (AKAIKE AKINORI)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号：80135558

(2) 研究分担者

久米 利明 (KUME TOSHIAKI)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：10303843

(3) 連携研究者
なし