

平成21年6月10日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590248

研究課題名（和文） パーキンソン病マウス神経障害における Na⁺/Ca²⁺交換系の役割研究課題名（英文） Role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in neurodegeneration in a model mouse of Parkinson's disease

研究代表者

伊藤 壮一 (ITOHI SOICHI)

兵庫医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：30193494

研究成果の概要：Na⁺/Ca²⁺交換系(NCX)は細胞内 Ca²⁺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、中枢神経系においてはその創薬的意義は不明である。一方、NCX はパーキンソン病と関連する黒質に局在している。我々は、神経変性疾患の病態に関与している一酸化窒素(NO)が NCX を活性化することを見出し(Asano et al., *J. Neurochem.* 64:2437, 1995)、またNCX の選択的阻害薬SEA0400 を開発している(Matsuda et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:249, 2001)。このような背景から、本研究では、NO 関連病態であるパーキンソン病のモデル動物のドパミン神経障害、NO 誘発神経細胞障害における NCX の関与を検証し、NCX の中枢神経創薬標的分子としての意義の神経科学的基盤を確立する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：Na⁺/Ca²⁺交換系 (NCX)、パーキンソン病、SEA0400、一酸化窒素 (NO)
アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca²⁺濃度調節に関わる重要な膜蛋白、NCX は細胞膜を隔てた Na⁺濃度勾配及び膜電位を駆動力として Ca²⁺を両方向性に輸送する。通常は細胞内 Ca²⁺を排出するが、細胞内 Na⁺濃度が高い病態時等では Ca²⁺を流入

させ細胞内 Ca²⁺濃度の増加を引き起こす。NCX は心筋に多く存在していることから、多くの研究は心筋に集中しており、脳における研究は比較的少ない。NCX の機能解析において、その活性を人為的にコントロールする戦略が重要である。この

目的で遺伝子ターゲティングが検討されてきたが、NCX ノックアウトマウスは胎生期に致死に至るため表現型の解析ができない。一方、その選択的阻害薬はあらゆる面で容易に利用することが可能である。このような背景において、我々は世界に先駆けて NCX の選択的阻害薬として SEA0400 を開発した。SEA0400 は唯一の NCX 選択的阻害薬であり、NCX の機能解析やその創薬的意義の追究に極めて有用で、我々は国内外の研究者と SEA0400 を用いる共同研究を進めており、また多くの研究者に本阻害薬を供与している。また、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、SEA0400 が抗浮腫作用を示すことを見出している。さらに、培養グリア細胞でのカルシウムパラドックス障害における NCX の役割、分子機構を明らかにしている。これらの成績は NCX の創薬標的分子としての可能性を示している。一方、NCX は黒質、海馬などに局在しており、前者はパーキンソン病との関連を示唆する。

2. 研究の目的

本研究では、NCX が NO の作用に関わっていること、NCX の脳局在に着目し、NO 関連病態としてパーキンソン病に焦点をあて、NCX の薬物標的分子としての意義を追究する

3. 研究の方法

(1) パーキンソン病モデルマウス (*1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)*モデル) でのドパミン神経障害への NCX 関与のメカニズム: SEA0400 の抗パーキンソン病作用の詳細、病態発現あるいは障害保護における NCX の関与、NCX の下流シグナル (Ca^{2+} 関連蛋白) の変動について明らかにする。

(2) NO 誘発神経細胞への NCX 関与の分子メカニズム: ドパミン神経由来の SH-SY5Y 細胞の NO 誘発障害に対する SEA0400 の作用解析を通して、NO 障害における Ca^{2+} 及び NCX の関与の創薬的意義を明らかにする。

(3) SEA0400 のラベル化と NCX の病態関連動態: NCX を標識するための SEA0400 ラベル体を作成する。そしてそれを用い、病態時での NCX の

変動、SEA0400 の脳各部位での動態を明らかにする。

(4) カイニン酸障害モデルでの障害発現における NCX の関与の検討: カイニン酸障害モデルでの障害発現における NCX の関与について SEA0400 投与の作用を明らかにする。

4. 研究成果

(1) アストロサイトでの NO 誘発アポトーシスが、カスパーゼ活性の変化を伴っていないこと、AIF 量の増加を伴っていることをウエスタンブロット解析より明らかにした。

(2) アストロサイト NO 障害が MAP キナーゼ阻害薬により抑制されること、また NO 障害が MAP キナーゼの活性化を伴っていることを明らかにした。

(3) アストロサイトにおいては、ミクログリアの場合と異なり、NO 障害が ER ストレスマーカーの発現変化を引き起こさないことを明らかにした。

(4) アストロサイト NO 障害が、NCX 選択的阻害薬 SEA0400 により抑制されることを明らかにした。

(5) MPTP 処置パーキンソン病モデルマウスにおいて、黒質、線条体のドパミン神経が減少していること、ミクログリアが活性化していること、黒質においてのみ酸化ストレスが起こっていることを明らかにした。

(6) ラジカル消去薬エダラボンをを用い、MPTP 誘発黒質ドパミン神経障害が本モデルの運動機能障害と関連していることを明らかにした。

(7) MPTP 処置モデルマウスのドパミン神経障害並びに運動機能障害が、SEA0400 の投与により軽減されることを明らかにした。

(8) NO による細胞内への Ca^{2+} 流入の増加が細胞内小器官の緩衝化により抑制されていることを明らかにした。

(9) MPTP 処置はタンパク質レベルで NCX に影響を与えないことを明らかにし、活性レベルでの変化が起

こっている可能性を示した。

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 1 件)

- ① Toshiyuki Kawasaki, Tatsuya Kitao, Katsuhiko Nakagawa, Hiroko Fujisaka, Yoshimi Takegawa, Ken Koda, Yukio Ago, Akemichi Baba, Toshio Matsuda: Nitric oxide-induced apoptosis in cultured rat astrocytes: protection by edaravone, a radical scavenger. *Glia*, 55, 1325-1333, 2007. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 北尾達也, 川崎俊之, 池原亜紀, 吾郷由希夫, 馬場明道, 松田敏夫: アストロサイト NO 誘発アポトーシスにおける MAP キナーゼ活性と酸化ストレスの関与. Neuro2007 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会, 横浜, 2007 年 9 月 10-12 日.
- ② 川崎俊之, 梨子田哲明, 吾郷由希夫, 馬場明道, 松田敏夫: 神経変性疾患の新規創薬標的分子としての $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の可能性. 生体機能と創薬シンポジウム 2007, 金沢, 2007 年 9 月 13-14 日.
- ③ 北尾達哉, 池原亜樹, 川崎俊之, 吾郷由希夫, 馬場明道, 松田敏夫: アストロサイト NO 誘発細胞障害における $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換系逆モードによる Ca^{2+} 流入の関与. 第 12 回グリア研究会, 名古屋, 2007 年 11 月 17 日.
- ④ 北尾達哉, 池原亜樹, 川崎俊之, 吾郷由希夫, 馬場明道, 松田敏夫: NO 誘発グリア細胞死における Ca^{2+} の関与. 第 1 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 東京, 2007 年 12 月 15-16 日.

- ⑤ 池原亜樹, 北尾達哉, 川崎俊之, 吾郷由希夫, 馬場明道, 松田敏夫: アストロサイトにおける一酸化窒素誘発細胞死への $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換系を介した Ca^{2+} 流入の関与. 第 81 回日本薬理学会年会, 横浜, 2008 年 3 月 17-19 日.

- ⑥ 梨子田哲明, 福田小夜子, 川崎俊之, 北尾達哉, 吾郷由希夫, 田熊一敬, 松田敏夫: 選択的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系阻害薬 SEA0400 のパーキンソン病モデルマウスでの有効性. 生体機能と創薬シンポジウム 2008 生命システムにおける情報ネットワークの重要性を解く, 東京, 2008 年 9 月 5-6 日.

- ⑦ 北尾達哉, 井上由里子, 梨子田哲明, 川崎俊之, 吾郷由希夫, 田熊一敬, 松田敏夫: アストロサイトの NO 誘発 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入への $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換系の関与. 第 13 回グリア研究会, 東京, 2008 年 11 月 8 日

- ⑧ 福田小夜子, 梨子田哲明, 川崎俊之, 北尾達哉, 吾郷由希夫, 田熊一敬, 松田敏夫: SH-SY5Y 細胞における一酸化窒素による $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系を介する Ca^{2+} 流入. 第 114 回日本薬理学会近畿部会, 神戸, 2008 年 11 月 14 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 壮一 (ITO SOICHI)
兵庫医療大学・薬学部・准教授
研究者番号: 30193494

(2) 研究分担者

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