

平成21年 4月 8日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19790191
 研究課題名(和文) 海洋微生物ライブラリー由来の神経性ネクロシス抑制活性を有する低分子物質の探索
 研究課題名(英文) Research of ischemic damage prevention by prothymosin alpha and screening of anti-necrosis factor from marine microbes laibrary.
 研究代表者
 藤田 亮介 (FUJITA RYOUSUKE)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号： 70380855

研究成果の概要：

本研究では、これまで治療標的に成り得なかった神経性ネクロシスの分子基盤に細胞膜上の GLUT の内在化によるグルコース取り込みが減少することが一因であることを示すと共に、核蛋白質である ProTα は、この内在化した GLUT を G_i-PLC-PKCβ を介して積極的に表在化させることで神経性ネクロシスを抑制する事を明らかにした。さらに ProTα はミクログリアに働きかけ、神経栄養因子の発現増加を引き起こすことで虚血時に誘導されるアポトーシスをも抑制することが示された。一方、ProTα 同様、神経性ネクロシス抑制活性を有する物質の存在が海洋微生物培養上清に見出され、未精製ではあるものの動物個体での虚血傷害において、ネクロシスを抑制することで強力な保護効果を示したことから、中枢神経系における虚血性神経傷害保護の新たな可能性を提示する研究であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

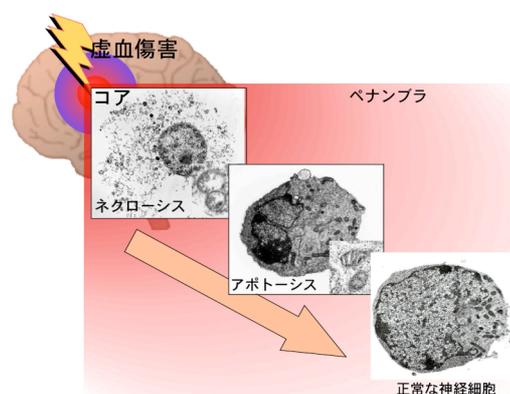
研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎薬学・薬理学一般

キーワード：生理活性物質、ネクロシス、海洋微生物ライブラリー

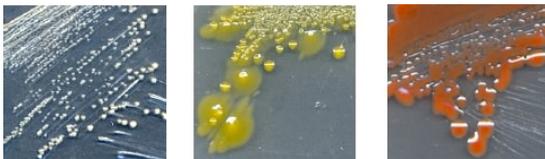
1. 研究開始当初の背景

脳卒中は、がん、心疾患と並ぶ3大疾患にあげられ、治療法確立が急務とされている。昨今の外科的治療法の進歩などにより、脳卒中による死亡率は減少傾向にあるものの、重度の後遺症が発症後の QOL の維持を困難なものにしている。脳卒中では、急性期に傷害中心部位においてネクロシスが引き起こされ、その周辺部において遅延的にアポトーシスによる神経細胞死が引き起こされる。



これまでアポトーシスについては、多くの研究がなされ、その分子基盤が明らかになってきているが、一方のネクローシスについてはほとんど研究が進んでいない。本申請者らは、これまでのネクローシス研究から神経細胞培養液中に脳卒中に有効性を示す蛋白質プロサイモシン α (ProT α)を見出した (J. Cell Biology 2007, 176: 853-62.)。ProT α は、仮定される同一受容体を介し、ネクローシスを抑制するとともに、アポトーシスに対しても抑制的に働く蛋白質であった。その結果、脳虚血モデル動物への投与によって急性期及び遅延型細胞死の両方から保護することを明らかにしている。この知見は、これまで殆ど解明されなかったネクローシス抑制を可能とする分子の存在を示唆するものである。ProT α によるネクローシスおよびアポトーシス抑制のメカニズムは、**A)**神経細胞に対する直接的なネクローシス抑制作用と**B)** 神経およびグリア細胞に対する、神経栄養因子産生増加に起因するアポトーシス抑制効果である。

しかしながら、蛋白質 ProT α の臨床使用を考える際、生体内での耐性・抗体形成の問題があり、更に大量合成の観点からも類似機能を有する非ペプチド性低分子化合物を探索する必要がある。申請者らはこれまでに、海洋土壌微生物資源から有用菌体および活性物質の候補分子を見出している。



海洋微生物ライブラリーの一部

本研究で使用する海洋土壌微生物は、すでにライブラリー化されており、有用物質産生菌体の同定システムも確立している。各クローン株上清には数種類の化合物が含まれており、それらはあらゆる評価系をカバーする物質群である。しかも大量培養により、ほぼ均一な材料を再現性よく調製できるので、新しい治療薬シーズを求める為の有用性が高い。

従って、本研究では ProT α によるネクローシスおよびアポトーシス抑制機構を指標スクリーニングする事で、新規神経保護物質の探索とその分子機構の解明をおこなう。さらに得られた非ペプチド性低分子化合物の性質並びにネクローシス・アポトーシス抑制機構を明らかにする事で、ネクローシスの分子基盤並びにアポトーシス抑制機構の解明につなげていく。

2. 研究の目的

重篤な疾患である脳卒中に対して、現状では十分な治療薬開発が進んでいるとは言い難い。その一つの理由には、脳卒中急性期に傷害中心部位において誘導されるネクローシスについて、その分子基盤解明が進んでいないことが挙げられる。申請者らはこれまでに、核蛋白質である ProT α が、ストレスにより細胞外に遊離することで、想定される細胞膜受容体に結合し、虚血ストレスによって誘導されるネクローシス及び脳卒中時傷害中心の周辺領域で観察されるアポトーシスを抑制することを見出した。そのメカニズムについても、**A)**神経細胞に対する直接的なネクローシス抑制作用と**B)** 神経およびグリア細胞に対する、神経栄養因子産生増加に起因するアポトーシス抑制効果である事を明らかにした。しかしながら、蛋白質 ProT α の臨床使用を考える際、生体内での耐性・抗体形成の問題があり、更に大量合成の観点からも類似機能を有する非ペプチド性低分子化合物を探索する必要がある。そこで本研究では ProT α によるネクローシスおよびアポトーシス抑制機構の詳細を解明することで、新たな創薬標的を提案していく。さらに同時に、現有する海洋微生物ライブラリーから非ペプチド性低分子化合物をスクリーニングし、その性質並びにネクローシス・アポトーシス抑制機構を明らかにする事で、ネクローシスの分子基盤並びにアポトーシス抑制機構の解明につなげていく。

3. 研究の方法

本研究では、I. ProTαによるネクローシス抑制機構の解明、II. ProTαによるアポトーシス抑制機構の解明、III. 動物個体レベルでの虚血モデルに対するProTαの保護機構の解明、IV. ProTα様のネクローシス抑制作用を有する活性物質を海洋微生物ライブラリーから探索していくことで、ネクローシスの分子基盤解明と、新たな脳卒中治療薬シーズの提案をする。

I. ProTαによるネクローシス神経細胞死抑制機能解析

- ① 電子顕微鏡による微細形態変調:ネクローシス時に変動する神経細胞の形態変化を電子顕微鏡による小器官及び細胞膜レベルで観察し、ネクローシス保護について形態的変動の観点から解析を進める。
- ② GLUT 表在化機構の解明:ProTαの主たるネクローシス抑制機構と考えられるグルコーストランスポーター(GLUT)の細胞膜表在化機構の解明のため、阻害剤及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた検討により分子基盤解明を行うほか、蛍光タンパク質を融合したGLUTを発現させた細胞株において、ProTαにより、虚血ストレスによって一旦内化したGLUTを表在化させ得るかを検討する。

これらの検討は初代培養大脳皮質神経細胞及び網膜神経細胞由来株化細胞(N18-RE105)細胞を用いて行う。

II. アポトーシス抑制物質産生能の解析

ProTαは、神経におけるネクローシス抑制のみならず、ミクログリア細胞に作用してBDNF等の神経栄養因子を放出し、神経でのアポトーシスをも抑制する。

- ① ミクログリア培養系による遺伝子発現:ミクログリア培養において、サイトカインや神経栄養因子の発現上昇をリアルタイムRT-PCR法(装置現有)並びに免疫細胞化学、Western blot法にて測定する。
- ② 遊離物質による神経保護作用:神経細胞とミクログリア細胞の共培養系あるいはミク

ログリア培養上清において、ProTαで見られるような、ミクログリアのみならず神経細胞においても、神経栄養因子の発現上昇することを免疫細胞化学法にて測定する。

III. In vivo 虚血モデル動物に対する神経保護効果

- ① マウス網膜虚血モデルに対する神経細胞死抑制効果の解析:すでに技術習得しているマウス網膜虚血モデルに対して、ProTαによる神経保護効果を細胞死マーカーによる組織化学的解析並びに、網膜電位測定による機能的解析を行い、有用性を明らかにする。さらに、BDNF等の神経栄養因子の発現増加について、個体レベルでの解析を行う。
- ② ラット脳虚血モデルに対する神経細胞死抑制効果の解析:すでに技術習得しているラット一過性脳虚血モデルに対して、ProTαによる神経保護効果を細胞死マーカーによる組織化学的解析並びに、運動機能解析を行い、有用性を明らかにする。また、一過性脳虚血だけではなく永久梗塞モデル動物でも同様の検討を行う。
- ③ マウス脳虚血モデルに対する神経細胞死抑制効果の解析:すでに技術習得しているラット脳虚血モデルに対して、ProTαによる神経保護効果を細胞死マーカーによる組織化学的解析並びに、学習・記憶による機能的解析を行い、有用性を明らかにする。

IV. 海洋微生物ライブラリーからのネクローシス神経細胞死抑制活性物質の探索

- ① 低分子ネクローシス抑制物質の単離・精製:3クローンの培養上清を、定法に従い分離し、PI染色によるネクローシス抑制活性を指標に活性本体を同定する。さらに、各種阻害剤を用いた薬理的検討から、当該物質の性質を明らかにする。
- ② 動物個体レベルでの組織保護効果の検討:マウス網膜虚血モデルに対して、培養上清による神経保護効果を細胞死マーカーによる組織化学的解析を行い、有用性を

明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、これまで創薬標的とされてこなかった神経性ネクロシスに着目し、ネクロシス抑制物質を海洋微生物ライブラリーより探索すると共に、そのリード分子として見いだした核蛋白質である ProTα の分子基盤解明を行うことを目的としている。

I. ProTα によるネクロシス神経細胞死抑制機能解析に関して、初代培養神経細胞並びに N18-RE105 細胞に対する低酸素・低グルコース処置により、電子顕微鏡観察での細胞膜破綻とミトコンドリア膨潤を伴うネクロシス誘導を見出すと共に ProTα 処置により、これら細胞内形態異常の改善が認められた。この効果は一過性の低酸素・低グルコース処置の後、血清を含む培養液に戻した際に認められており、ProTα 発見当初の無血清飢餓ストレスでのネクロシスからアポトーシス形態への変化とは異なる結果であった。次にグルコース取り込みを担う GLUT の局在変化について、同ストレス下で検討したところ細胞膜上に局在する GLUT4 が、細胞内に内在化することが明らかになった。一方、ProTα 処置では、GLUT4 が細胞膜に表在化しており、この機能は G_{i/o}-PLC-PKCβ2 の活性化が必須であることが明らかになった。さらに蛍光蛋白質を融合させた GLUT4-EGFP を発現させ、リアルタイムで可視化可能とした N18-RE105 細胞での検討では、無血清処置により内在化した GLUT4 を 30 分程度で表在化させることが明らかとなり、ProTα による積極的なグルコース取り込み増加機構がネクロシス抑制に寄与することが明らかになった。

II. アポトーシス抑制物質産生能の解析に関して、ProTα を初代培養神経細胞に添加した系では神経栄養因子の発現が遺伝子レベル、蛋白質レベルで増加することは認められなかったが、培養マイクログリア細胞に処置することで、神経栄養因子の発現及びマイクログリアの形態変化(活性化)を見いだした。培養マイクログリア細胞では ProTα の添加数

分後からマイクログリア細胞膜の ruffling が観察され、30 分で定常状態に達し、3 時間後にはほぼ添加前の状態に戻った。一方、神経栄養因子は数時間後に最大の発現になった。ProTα によるこの様な神経栄養因子の発現上昇は、マイクログリアにおいてのみ観察され、神経細胞及びアストロサイトでは認められなかったが、両者をマイクログリアと共培養すると、マイクログリアのみならず神経細胞、アストロサイト両細胞でも神経栄養因子の発現が増加することが明らかになった。さらに ProTα を処置したマイクログリア培養上清を神経細胞に処置することでも、神経細胞でも神経栄養因子を発現増加が観察された。(論文投稿準備中)

III. In vivo 虚血モデル動物に対する神経保護効果に関して、脳卒中モデルとしてラット中大脳動脈結紮 (1h) に対して、ProTα を再灌流後 3 時間以内に全身投与することで虚血によって誘導される脳組織傷害及び運動機能障害を抑制することを見いだした。この際、ProTα は、脳虚血で誘導されるネクロシス及びアポトーシスの両方を抑制することが、PI 染色と TUNEL 染色の応用によって明らかになった。ProTα によるアポトーシスの抑制のメカニズムは内在性の BDNF 及び erythropoietin が関与している事が吸収抗体を用いた検討によって明らかとなった。以上の結果、脳卒中傷害に対して ProTα は直接神経細胞に作用し、虚血によって減少したグルコースの取り込みを促進することで神経ネクロシスを抑制すると同時に、アポトーシス誘導因子である Bax 発現を増加し、アポトーシス経路を活性化する。しかしながら、誘導したアポトーシスは内在的に存在する神経栄養因子の働きを利用することで結果としてネクロシスとアポトーシスの両方を抑制する事が示唆された。(Cell Death & Differentiation 14, 1839-1842 (2007))

一方、脳と同じ中枢神経である網膜神経細胞を標的とした、網膜虚血モデル(45 分虚血後再灌流)を用いた虚血性網膜神経細胞死に対する ProTα の効果を検討し、虚血・再灌流処置 24 時間後の全身投与でも有

意な保護効果を示すことを見出した。また、この保護機構は光に対する網膜の電気応答を検出す **Electroretinogram** 法においても改善がみられ、機能的にも保護していることが示唆された。一方で、これまで考えていた内因的な神経栄養因子に依存した **ProTα** 誘導性のアポトーシス抑制機構に関して、**ProTα** の処置により、虚血負荷依存的に **BDNF** 及び **erythropoietin** の発現が増加することが見出された。この結果は、先に記載した培養細胞での詳細な解析に繋がる成果であった。従って動物個体での **ProTα** による虚血傷害保護機構には、直接的な神経ネクローシスの抑制と神経細胞及びグリア細胞からの **BDNF** 等の神経栄養因子の発現上昇による間接的なアポトーシス抑制機構があることが明らかになった。(Death & Differentiation 16, 349-358 (2009))

IV. 海洋微生物ライブラリーからのネクローシス神経細胞死抑制活性物質の探索に関して、これまでに確立した初代培養神経細胞に対する無血清飢餓ストレスの負荷によってネクローシスを誘導する系を用いて、保有する海洋微生物ライブラリーよりネクローシス抑制活性を有する培養上清のスクリーニングを行った。これまでのスクリーニングで有効性を見出していた十数種類の海洋微生物の培養上清の中から特に活性の強かった培養上清 8 種類を用いて、初代培養神経細胞に対する無血清ストレスによって誘導されるネクローシスをヨウ化プロピジウム (PI) 染色によるネクローシス評価法により検証し、4 種類の極めて強い活性を有する上清を産生する微生物クローンを見出した。さらに、この培養上清を網膜虚血処置したマウスの硝子体内に 1% の濃度で投与したところ、網膜虚血によって誘導される外顆粒層、内顆粒層及び視神経細胞の PI 染色によって評価されるネクローシスを有意に抑制する事も見いだした。

以上の結果から本研究の遂行により、これまで治療標的に成り得なかった神経性ネクローシスの分子基盤に細胞膜上の GLUT が内在化し、細胞へのグルコース取り込みが減少することが一因であることが示され、

さらに **ProTα** はこの内在化した GLUT を **G_i-PLC-PKCβ** を介して積極的に表在化させることで神経性ネクローシスを抑制する事を見いだした。さらに **ProTα** はミクログリアに働きかけ、神経栄養因子の発現増加を引き起こすことで虚血時に誘導されるアポトーシスをも抑制する活性を有することが示され、その創薬標的としての可能性を見出された。また、**ProTα** 同様、神経性ネクローシス抑制活性を有する物質の存在が海洋微生物培養上清に見出され、未精製ではあるものの動物個体での虚血傷害において、ネクローシスを抑制することで強力な保護効果を示したことから、中枢神経系における虚血性神経傷害保護の新たな可能性を提示する研究であった。

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 2 件)

1. Fujita R., Ueda M., Fujiwara K. & Ueda H., Prothymosin-alpha plays a defensive role in retinal ischemia through necrosis and apoptosis inhibition. Cell Death & Differentiation 16, 349-358 (2009) 査読有り
2. Fujita R. & Ueda H., Prothymosin-alpha prevents necrosis and apoptosis following stroke. Cell Death & Differentiation 14, 1839-1842 (2007) 査読有り

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 藤村一輝、畠山有理、藤田亮介、植田弘師、神経細胞における Prothymosin α による PKCβ を介した GLUT4 膜移行促進機構の解明、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
2. 植村朋香、藤田亮介、植田弘師、Prothymosin α による PKCβ を介した初代培養ミクログリアの活性化、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
3. 山崎達朗、藤田亮介、植田弘師、新規脳保護分子 Prothymosin α によるラット

- 一過性脳卒中傷害の改善、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
4. 米窪沙織、藤田亮介、植田弘師、Prothymosin α による虚血依存的なミクログリア活性化、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
 5. 神崎めぐみ、高濱和弘、藤田亮介、植田弘師、脳卒中治療薬としての Prothymosin α の可能性、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
 6. 藤田亮介、水間広、和田康弘、渡辺恭良、植田弘師、PET 解析を用いた Prothymosin- α による PKC β 活性化を介したグルコース取込み促進、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12/9-12 2008, 神戸ポートアイランド
 7. 藤田亮介、植田弘師：Identification of prothymosin-alpha, the necrosis-apoptosis switch molecule in the cortical neuron culture. 第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
 8. 米窪沙織、藤田亮介、植田弘師：Prothymosin α prevents necrosis and apoptosis following stroke. 第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
 9. 藤田亮介、植田弘師：神経ネクロシス保護分子プロサイモシン α 、第 60 回日本薬理学会西南部会、2007 年 11 月 22 日、シーガイア (宮崎市)
 10. 高濱和弘、藤田亮介、植田弘師：マウス一過性中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおけるプロサイモシン α の脳保護効果、第 60 回日本薬理学会西南部会、2007 年 11 月 22 日、シーガイア (宮崎市)
 11. 早田知永、高濱和弘、藤田亮介、植田弘師：虚血脳に対するプロサイモシン α のネクロシス保護機構、第 60 回日本薬理学会西南部会、2007 年 11 月 22 日、シーガイア (宮崎市)
 12. Ueda H., Fujita R., Matsunaga H., Yoshida A. and Ueda M., Identification of prothymosin-alpha1, the necrosis-apoptosis switch molecule under the *in vitro* ischemia condition. Neuroscience 2007, 2007 年 11 月 3 日サンディエゴ (米国)
 13. Fujita R. and Ueda H., Prothymosin-alpha1 prevents neuronal necrosis by reversing the

decreased membrane localization of GLUT. Neuroscience 2007, 2007 年 11 月 3 日サンディエゴ (米国)

14. Takahama K., Fujita R. and Ueda H., Prothymosin-alpha switches from an uncontrollable necrosis to a controllable apoptosis. Neuroscience 2007, 2007 年 11 月 3 日サンディエゴ (米国)
15. 藤田亮介、植田弘師：Prothymosin-alpha prevents neuronal necrosis by reversing the decreased membrane localization of GLUT. Neuro 2007, 2007 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
16. 高濱和弘、藤田亮介、植田弘師：Prothymosin-alpha switches from an uncontrollable necrosis to a controllable apoptosis. Neuro 2007, 2007 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
17. Ueda H., Fujita R., Matsunaga H., Yoshida A. and Ueda M., Identification of prothymosin-alpha1, the necrosis-apoptosis switch molecule under the *in vitro* ischemia condition. 第 5 回国際受容体シンポジウム (IRS2007), 2007 年 5 月 10 日、静岡コンベンションアーツセンター (静岡市)

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 亮介 (FUJITA RYOUSUKE)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70380855

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし