

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390159

研究課題名（和文） 脳NCXの創薬的意義に関する基盤研究

研究課題名（英文） Basic studies on drug development targeting for brain NCX

研究代表者

松田 敏夫 (MATSUDA TOSHIO)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00107103

研究成果の概要（和文）：細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度調節に関わっている  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換系（NCX）の中  
 枢神経系での病態的意義について NCX の選択的阻害薬を用い検討した。培養細胞の系での一  
 酸化窒素（NO）誘発細胞障害、また NO 関連の病態であるパーキンソン病モデルマウスでの  
 ドパミン神経障害において、NCX が関わっていることを明らかにした。これらの成績は、NCX  
 が中枢神経系の NO 関連病態に関わっていることを示しており、その創薬的意義を明らかにし  
 た。

研究成果の概要（英文）：The present study was performed, using a specific inhibitor of NCX,  
 to clarify the pathological role of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX), which is involved in the  
 regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. We found that NCX is involved in nitric  
 oxide (NO)-induced cytotoxicity in cultured cells and in dopaminergic dysfunction in a  
 mouse model of Parkinson's disease. These findings suggest that NCX has a potential as a  
 candidate molecule for treatment of NO-related disorders.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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、薬理学、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系（NCX）、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  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節に関わる重要な膜蛋白、NCX は細胞膜を隔てた  $\text{Na}^+$  濃度勾配及び膜電位を駆動力として  $\text{Ca}^{2+}$  を両方向性に輸送する。通常は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を排出するが、細胞内  $\text{Na}^+$  濃度が高い病態時等では  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させ細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  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 (Matsuda et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 298:249, 2001)。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 を用いる多くの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。これらの研究の一つの成果として、NCX が腎性高血圧に関わっていることが示された。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(Asano et al., J. Neurochem. 64:2437, 1995)、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(Takuma et al., J. Biol. Chem. 276:48093, 2001)。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

パーキンソン病などの神経変性疾患における NCX の創薬標的分子としての意義を明らかにする目的で、選択的阻害薬 SEA0400 を用い、パーキンソン病モデル(MPTP モデル)マウスでのドパミン神経障害、カイニン酸誘発海馬障害への NCX の関与を検討する。また、細胞レベルで分子機構解明のため、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞の NO 誘発細胞障害における NCX の関与を検討する。さらに、SEA0400 のラベル体を作成し、SEA0400 の中枢動態や病態と関連する NCX の動態を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) パーキンソン病モデルマウスでのドパミン神経障害への NCX 関与の検証

NCX 阻害薬 SEA0400 は *in vitro* での MPP<sup>+</sup>誘発神経細胞障害に影響を与えなかった。このことは、SEA0400 が MPTP 投与によるドパミン神経障害においてミクログリア活性化以降の過程に作用していることを示唆する。MPTP 投与モデルでの NCX の関与について、タンパク質、活性レベルで検討し、NCX 発現が変化していないことを明らかにした。一方、細胞内 Ca<sup>2+</sup>増加を反映する ERK リン酸化は MPTP 投与により活性化し、この活性化は SEA0400 で抑制された。本成績は、MPTP 誘発ドパミン障害に NCX が関わっていることを示す。また、MPTP モデルでのドパミン神経障害の評価に関して、*in*

*vivo* 脳透析法を用いた機能面からの新しい解析法の有用性を示した。

### (2) NO 誘発ドパミン神経由来 SH-SY5Y 細胞への NCX 関与の分子メカニズム解析

本研究では、ドパミン神経由来 SH-SY5Y 細胞およびアストロサイトにおいて、NO 誘発神経細胞死における細胞外 Ca<sup>2+</sup>の関与、NCX 依存性の Ca<sup>2+</sup>流入の重要性を明らかにした。また、細胞内 Ca<sup>2+</sup>の関与について、Ca<sup>2+</sup>流入以後の下流シグナルについて検討し、カルモジュリン、カルパイン、MAP キナーゼ系の関与を明らかにした。

### (3) SEA0400 のラベル化と NCX の病態関連動態の解析

SEA0400 は NCX の選択的阻害薬であり、その放射ラベル化体は NCX を標識する有効なプローブとなる。本研究では、世界初の [<sup>3</sup>H]SEA0400 を合成し、脳切片を用い [<sup>3</sup>H]SEA0400 結合実験を行った。その結果、免疫組織学的検討での NCX の脳部位局在と一致して、[<sup>3</sup>H]SEA0400 の特異的結合を認めた。この成果を基に、NCX の PET プローブの開発に取り組んだが、期間内に成功に至らなかった。

### (4) siRNA 法での、NCX 関与の検討

siRNA システムによる NCX 発現低下細胞系(培養アストロサイト)を用いることで、NO 誘発細胞障害における NCX の関与の上述の結果を支持した。

### (5) MPTP 誘発パーキンソン病モデルマウスでの SEA0400 の治療効果

本研究では、パーキンソン病モデル動物において SEA0400 の保護作用を明らかにしたが、障害発現後の投与による改善作用は認められなかった。

### (6) 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

ラットでのカイニン酸障害モデルに対して SEA0400 は保護作用を示さなかった。また他の障害モデル、L-ドパ誘発ジスキネジアモデル、メタンフェタミン誘発ドパミン神経障害モデルにおいて SEA0400 は影響を与えなかった。これらの結果は、SEA0400 の有効性がモデルにより異なることを示しており、NCX が Ca<sup>2+</sup>輸送を両方向性に調節していることと関連しているかもしれない。

## 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 7 件)

- ① Tetsuaki Nashida, Kazuhiro Takuma, Sayoko Fukuda, Toshiyuki Kawasaki, Teisuke Takahashi, Akemichi Baba, Yukio Ago, Toshio Matsuda: The specific Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitor SEA0400 prevents nitric oxide-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Neurochem. Int.* (査読有) in press.
- ② Douglas B. Kintner, Xinzhi Chen, Julia Currie, Vishal Chanana, Peter Ferrazzano, Akemichi Baba, Toshio Matsuda, Mike Cohen, John Orłowski, Shing-Yan Chiu, Jack Taunton, Dandan Sun: Excessive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in disruption of dendritic Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mitochondrial dysfunction following in vitro ischemia. *J. Biol. Chem.* (査読有) 285(45), 35155-35168, 2010.
- ③ Tatsuya Kitao, Kazuhiro Takuma, Toshiyuki Kawasaki, Yuriko Inoue, Aki Ikehara, Tetsuaki Nashida, Yukio Ago, and Toshio Matsuda: The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger-mediated Ca<sup>2+</sup> influx triggers nitric oxide-induced cytotoxicity in cultured astrocytes. *Neurochem. Int.* (査読有) 57, 58-66, 2010.
- ④ Xinzhi Chen, Douglas B. Kintner, Akemichi Baba, Toshio Matsuda, Gary E. Shull, Dandan Sun: Protein aggregation in neurons following OGD: a role for Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ionic dysregulation. *J. Neurochem.* (査読有) 112(1), 173-182, 2010.
- ⑤ Ryo Saito, Erina Kaneko, Yusuke Tanaka, Kenji Honda, Toshio Matsuda, Akemichi Baba, Issei Komuro, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto, Yukio Takano: Involvement of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in pentylentetrazol-induced convulsion by use of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger knockout mic. *Biol. Pharm. Bull.* (査読有) 32(11), 1928-1930, 2009.
- ⑥ Yuta Inokuchi, Masamitsu Shimazawa, Yoshimi Nakajima, Issei Komuro, Toshio Matsuda, Akemichi Baba, Makoto Araie, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto, Hideaki Hara: A Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger isoform, NCX1, involves in retinal cell death after N-methyl-D-aspartate and ischemia-reperfusion. *J. Neurosci. Res.* (査読有) 87(4):906-917, 2009.
- ⑦ Toshiyuki Kawasaki, Yukio Ago, Tatsuya Kitao, Tetsuaki Nashida, Akiko Takagi, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda: A neuroprotective agent, T-817MA (1-{3-[2-(1-benzothio-phen-5-yl)ethoxy]propyl}azetid-3-ol maleate), prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in mice. *Neuropharmacology* (査読有) 55(5), 654-660, 2008.
- [学会発表] (計 18 件)
- ① 梨子田哲明, 太田友樹, 吾郷由希夫, 川崎俊之, 高橋禎介, 田熊一徹, 松田敏夫: MPTP 誘発酸化ストレスおよび中脳ドパミン神経変性に Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 交感系を介する ERK 活性化が関与する. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日. (地震)
- ② Yana Cong, 高橋剛士, 吾郷由希夫, 田熊一徹, 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. 第 84 回日本薬理学会年会, 横浜, 2011 年 3 月 22-24 日. (地震)
- ③ 太田友樹, 梨子田哲明, 吾郷由希夫, 川崎俊之, 高橋禎介, 田熊一徹, 松田敏夫: 選択的 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 交感系阻害薬 SEA0400 は MPTP による ERK 活性化を介した参加ストレスを抑制しドパミン神経を保護する. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日. (地震)
- ④ 高橋剛士, 吾郷由希夫, 田熊一徹, 松田敏夫: レボドパ誘発ジスキネジア形成過程における一酸化窒素の役割. 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 枚方, 2010 年 10 月 30 日.
- ⑤ 虎谷祐伊, 梨子田哲明, 叢雅娜, 吾郷由希夫, 田熊一徹, 松田敏夫: 慢性拘束ストレス負荷マウスの情動行動変化における一酸化窒素の役割. 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 枚方, 2010 年 10 月 30 日.
- ⑥ 梨子田哲明, 太田友樹, 川崎俊之, 吾郷由希夫, 田熊一徹, 松田敏夫: 一酸化窒素誘発ドパミン神経細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇への Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 交換系逆モードの関与. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2010, 京都, 2010 年 9 月 11 日.

- ⑦ 梨子田哲明, 北尾達哉, 井上由里子, 川崎俊之, 吾郷由希夫, 田熊一敬, 松田敏夫:  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系-1 はアストロサイトにおける一酸化窒素誘発細胞死に関与する. Neuro 2010 第33回日本神経科学大会, 第53回日本神経化学学会大会, 第20回日本神経回路学会大会, 神戸, 2010年9月2-4日.
- ⑧ Tetsuaki Nashida, Toshiyuki Kawasaki, Yana Cong, Sayoko Fukuda, Yukio Ago, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda: The  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange inhibitor SEA0400 protects against dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. The XXVII congress of the CIMP (CIMP2010), Hong Kong, China, June 6-10, 2010.
- ⑨ 梨子田哲明, 川崎俊之, 北尾達哉, 叢雅娜, 吾郷由希夫, 田熊一敬, 松田敏夫: MPTP 誘発ドパミン神経障害に対する  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系阻害薬 SEA0400 の保護作用. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2009, 東京, 2009年8月24日.
- ⑩ 井上由里子, 北尾達哉, 梨子田哲明, 川崎俊之, 吾郷由希夫, 田熊一敬, 松田敏夫: アストロサイトの一酸化窒素誘発細胞死における  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系を介する  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の役割 第115回日本薬理学会近畿部会, 金沢, 2009年6月26日.
- ⑪ 梨子田哲明, 川崎俊之, 大槻健弥, 北尾達哉, 吾郷由希夫, 田熊一敬, 松田敏夫: パーキンソン病モデル MPTP 誘発ドパミン神経障害における  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の関与. シンポジウム「精神・神経・筋疾患のトランスレーショナルリサーチ」第52回日本神経化学学会大会, 伊香保温泉, 2009年6月21~24日.
- ⑫ 梨子田哲明, 大槻健弥, 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 MPTP 誘発ドパミン神経障害保護作用. 第82回日本薬理学会年会, 横浜, 2009年3月16-18日.
- ⑬ Tatsuya Kitao, Toshiyuki Kawasaki, Tetsuaki Nashida, Yukio Ago, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda: Nitric oxide-induced astrocyte apoptosis and its protection by the radical scavenger edaravone. Neuroscience 2008, Washington D.C., USA, November 15-19, 2008.
- ⑭ 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  $\text{Ca}^{2+}$ 流入 第114回日本薬理学会近畿部会, 神戸, 2008年11月14日.
- ⑮ 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.
- ⑯ Tetsuaki Nashida, Toshiyuki Kawasaki, Tatsuya Kitao, Sayoko Fukuda, Yukio Ago, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda: Involvement of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in nitric-oxide-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. 第51回日本神経化学学会大会, The 2nd Asia Pacific Congress of Biological Psychiatry, 第30回日本生物学的精神医学会, 富山, 2008年9月11-13日.
- ⑰ 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.
- ⑱ 梨子田哲明, 川崎俊之, 北尾達哉, 福田小夜子, 吾郷由希夫, 松田敏夫: SH-SY5Y 細胞における一酸化窒素誘発細胞死への  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の関与. 第31回日本神経科学大会 (Neuroscience 2008), 東京, 2008年7月9-11日.
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b013/>
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
松田 敏夫 (MATSUDA TOSHIO)  
大阪大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号: 00107103
- (2)研究分担者  
吾郷 由希夫 (AGO YUKIO)  
大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：50403027