

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590091

研究課題名（和文） 脳血管タンパク質のチロシンリン酸化に着目した脳血管障害の分子基盤解明と治療戦略

研究課題名（英文） Molecular basis of cerebrovascular disease with protein tyrosine phosphorylation in brain capillaries and therapeutic strategies

研究代表者

高木 教夫 (TAKAGI NORIO)

東京薬科大学・薬学・准教授

研究者番号：50318193

研究成果の概要（和文）：本研究は、脳梗塞後の血液脳関門破綻におけるタンパク質チロシンリン酸化の役割解明を試みた。その結果、血液脳関門を構成する tight junction タンパク質 occludin が、脳梗塞後に顕著にチロシンリン酸化され、この occludin チロシンリン酸化の増大は血液脳関門破綻と梗塞巣増大に関与すること、その上流に PGE<sub>2</sub> 受容体 EP<sub>1</sub> が存在することが明らかとなった。さらに、脳梗塞後のタンパク質チロシンリン酸化は活性酸素種産生源である NADPH oxidase サブユニット量の増加に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：This study sought to determine the role of tyrosine phosphorylation of proteins in the pathophysiological alteration of the blood-brain barrier and subsequent brain injuries after stroke. This study demonstrates that the increase in the tyrosine phosphorylation of tight junctional protein occludin is linked to the disruption of tight junctions and the development of cerebral infarction after stroke and that the prostanoid EP<sub>1</sub> receptor is involved in the tyrosine phosphorylation of occludin. In addition, this study suggests that protein tyrosine phosphorylation may be linked to the increase in the level of NADPH oxidase subunits, which are known as an important source of a reactive oxygen species, after stroke.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物系薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脳虚血、脳血管、チロシンリン酸化、血液脳関門、活性酸素種

## 1. 研究開始当初の背景

成人の脳は全体重の約 2% であるにもかかわらず、心拍出量の約 15% の血液供給を受けている。この事実は、いかに脳組織が膨大な血液供給とそれに伴い運搬されるグルコースや酸素を必要としているかを如実に表し

ている。それ故に、脳組織の恒常性維持や中枢高次機能は血液を運搬している脳血管機能に依存しているとも言え、脳血管の老化あるいはその障害は他の臓器以上に重篤な組織機能障害（脳血管性認知症等）を引き起こすと考えられる。

近年の急速な人口の高齢化に伴い、脳血管

障害の罹患率は増加の一途をたどっており、その治療薬開発は医療的・社会的急務といえる。例えば、代表的な脳血管障害である脳梗塞では、急性期の血栓溶解療法が成果を挙げつつあるが、治療開始時期の限界もあり病態の悪化を防御・改善する優れた薬物は未だに創出されていないのが現状である。

血液脳関門の構造的・機能的本体は脳毛細血管内皮細胞どうしを接合している **tight junction** にある。近年、この **tight junction** を構成する **occludin** のチロシン酸化が細胞膜透過性を亢進することが明らかとなってきた。このことは、**occludin** のチロシン酸化亢進が血液脳関門の機能破綻に深く関与することを推察させる。

脳血管病変発現の重要な要因として酸化ストレスが挙げられる。活性酸素種の役割は広く研究されているが、脳梗塞後の脳血管における活性酸素発生やそのメカニズムは詳細に検討されていない。最近、活性酸素種の発生源として **NADPH oxidase** が注目されてきている。さらに、その活性がチロシン酸化によって亢進する可能性が示唆されてきている。したがって、脳血管内 **NADPH oxidase** は、脳梗塞後の血管病変を解明する上で重要な標的であると考えられる。

これら知見は脳血管でのチロシン酸化が病態推移において重要な因子であることを示している。しかしながら、*in vivo* 虚血性脳血管障害における血管病変の研究、とりわけ単離脳毛細血管を用いた研究は極めて少ない。

## 2. 研究の目的

本研究は虚血性脳血管障害後のチロシンキナーゼ活性化の局在とその標的分子の同定を時間的・空間的に多面的に捉え、チロシンキナーゼ活性化をターゲットにした新たな治療戦略の提示を試みた。すなわち、虚血という事象に最初に遭遇する脳血管に着目した。この考えに基づき脳梗塞後の単離脳血管でチロシン酸化が亢進していること、かつ特に **occludin** のチロシン酸化増大を明らかにし、これが血液脳関門破綻機序の一端である可能性を報告している。

本研究では脳毛細血管のタンパク質、とりわけ血液脳関門の機能に必須な **occludin** と活性酸素種発生源である可能性が高い **NADPH oxidase** に着目し、脳梗塞病態の分子基盤の解明を試みた。具体的には、チロシンキナーゼ阻害薬による虚血性神経細胞死及び梗塞巣形成の抑制効果を実証した後、この効果が標的分子 (**occludin**、**NADPH oxidase**) のチロシン酸化亢進に依存するかを解析する。その結果に基づき、局所チロ

シンキナーゼの活性化機序の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット中大脳動脈閉塞モデルの作製

臨床上観察される脳血管障害あるいは脳卒中病態を鑑み、本研究ではラット中大脳動脈閉塞・再灌流モデルを用いる。すなわち、外科用ナイロン糸を内頸動脈内に挿入し中大脳動脈起始部で留置・抜去する方法を用い、動脈閉塞時間は一般的に行われている 90 分間とする。

### (2) 脳虚血障害の評価

虚血後脳毛細血管におけるチロシンキナーゼの標的とその病態生理学的意義を提示するために、脳虚血障害を評価する。梗塞巣領域は今までと同様に **TTC** 染色で評価するとともに **TUNEL** 染色等によりアポトーシスの検出も行なう。また、**occludin** の結果を反映し、血液脳関門機能を解析する目的で **FITC-albumin** で脳内を還流し、薄切片において血管外への **FITC-albumin** 漏出領域を測定する。血液脳関門機能の解析方法は既報で報告済みである【**Biochem. Bioph. Res. Commun.** 339, 1197-1203, 2006; **J. Neurosci. Res.** 78, 442-453, 2004】。

### (3) 脳毛細血管の単離

チロシンキナーゼの標的として脳毛細血管のタンパク質に着目し、その病態生理学的意義を検討するために、ラット脳から毛細血管を単離する。脳毛細血管は **Ficoll** と **dextran** を用いた遠心分離法で単離する。虚血後脳毛細血管の単離方法は既報で報告済みである【**Biochem. Bioph. Res. Commun.** 339:1197-1203, 2006】。

### (4) 脳虚血後脳毛細血管における **occludin** チロシン酸化に及ぼすチロシンキナーゼ阻害薬 **PP2** 及び **PGE<sub>2</sub>** 受容体 **EP<sub>1</sub>** アンタゴニスト **SC51089** の効果

血液脳関門タンパク質 **occludin** のチロシン酸化に及ぼす **PP2** 及び **SC51089** の効果を検討し、血液脳関門破綻との関連を明らかにする。**Occludin** のチロシン酸化の測定は既報【**Biochem. Bioph. Res. Commun.** 339:1197-1203, 2006】で報告した免疫沈降法によって行なう。**Src** の活性も同時に **western blotting** 法で測定する。

### (5) **NADPH oxidase** サブユニットの膜移行と活性

**NADPH oxidase** サブユニットの細胞膜成分 (**gp91<sup>phox</sup>**, **p22<sup>phox</sup>**) と細胞質成分 (**p47<sup>phox</sup>**, **p67<sup>phox</sup>**, **p40<sup>phox</sup>**, **rac**) の量的変化や膜移行を各細胞画分で **Western blotting** 法によって

解析し、酵素の活性化状態を検討する。

#### (6) 脳梗塞後の酸化ストレス障害の評価

蛍光プローブの dihydroethidium を用い活性酸素種産生を組織学的に評価する。また酸化 DNA 障害を解析するために抗 8-OHdG 抗体を用いて免疫組織化学的に解析する。

#### (7) 血管外 NADPH oxidase の活性化機序

PP2 投与による梗塞巣領域の縮小効果は、神経・グリア細胞のタンパク質チロシンリン酸化が寄与する可能性も考えられる。したがって、脳血管以外の組織においても NADPH oxidase サブユニットのリン酸化や膜移行を解析するとともに PP2 の効果を観察し総合的な病態生理学的意義を提示する。

### 4. 研究成果

(1) 脳梗塞後の脳血管を標的とした研究は少ない。脳毛細血管に存在するタイトジャンクションタンパク質 occludin のチロシンリン酸化は血液脳関門機能の制御に深く関与していると考えられている。本研究ではとりわけ血液脳関門の機能に必須な occludin に着目し、そのチロシンリン酸化と梗塞巣形成との関連をチロシンキナーゼ阻害薬 PP2 を用いて *in vivo* 脳梗塞モデルで検討した。

血液脳関門機能を解析する目的で FITC-albumin で脳内を灌流後、脳組織切片を作製し、血管外への FITC-albumin 漏出領域を測定した。その結果、脳梗塞後に著しく増加した FITC-albumin 漏出領域は PP2 の静脈内投与によって抑制された。さらに、中大脳動脈閉塞・再灌流後 24 時間目の梗塞巣体積は PP2 投与によって縮小した。

次に、ラット脳から毛細血管を既報の方法で単離し、チロシンキナーゼの標的として脳毛細血管の血液脳関門タンパク質 occludin に着目し、そのチロシンリン酸化に及ぼす PP2 の効果を免疫沈降法で解析した。その結果、脳梗塞後に著しく上昇する occludin のチロシンリン酸化は PP2 の投与により抑制された。同時に脳梗塞後の脳毛細血管で増加する活性型チロシンキナーゼ src 量も PP2 投与により抑制された。

以上、脳梗塞後の血液脳関門破綻とその後の梗塞巣拡大の一部に、occludin のチロシンリン酸化上昇が寄与していることが示唆された。これらの結果より、脳梗塞急性期の治療ターゲットの一つの可能性として、脳毛細血管のチロシンリン酸化 occludin を提示した。

(2) 脳梗塞後の脳血管病変発現の重要な要因として酸化ストレスが挙げられる。そこで、活性酸素発生源として NADPH oxidase に着目し、脳梗塞モデルラットから単離した脳毛細血管での NADPH oxidase サブユニットの量的変化を検討した。その結果、脳毛細血管における NADPH oxidase サブユニット p67<sup>phox</sup> 量は中大脳動脈閉塞再灌流後 1 時間目から増加傾向を示し、再灌流 6 時間目からコントロール群と比較し顕著に増加した。チロシンキナーゼ阻害薬 PP2 を脳梗塞後に静脈内投与すると、この再灌流後の NADPH oxidase サブユニット p67<sup>phox</sup> 量の著しい増加は軽減された。

PP2 投与による血液脳関門破綻抑制効果や梗塞巣拡大抑制効果等、ここまでの結果を考え合わせると、脳虚血再灌流後の脳毛細血管におけるチロシンキナーゼを介した NADPH oxidase の活性化とそれに基づく活性酸素発生は脳梗塞病態形成課程での一つの重要な要因であることが示唆された。

(3) 脳組織の恒常性維持や中枢高次機能の発揮は血液を運搬している脳血管機能に依存しているともいえる。次に PGE<sub>2</sub> 受容体の EP<sub>1</sub> に着目し、脳梗塞後の occludin のチロシンリン酸化機序解明を試みた。脳梗塞後に減少する脳組織生存領域は EP<sub>1</sub> 受容体アンタゴニスト SC51089 (10 µg/kg, i. p.) の投与で有意に抑制された。FITC-albumin の脳内還流により血液脳関門機能を検討した結果、脳梗塞後に増加した脳血管外への FITC-albumin 漏出は SC51089 の投与により抑制された。

さらに、Ficoll と dextran を用いた遠心分離法で単離した脳毛細血管を用い、src の活性化及び occludin のチロシンリン酸化を検討した結果、脳梗塞後に上昇した src の活性化と occludin チロシンリン酸化は SC51089 の投与によって有意に抑制された。これらの結果から、脳梗塞後に惹起される血液脳関門の破綻はチロシンキナーゼ src の活性化とそれに伴う occludin チロシンリン酸化が関与し、これらの上流シグナルの一部に EP<sub>1</sub> 受容体が存在すると示唆された。

(4) これまで脳梗塞後の脳血管における活性酸素種の発生源として NADPH oxidase の役割を示唆してきた。さらに本研究は、脳血管外、特にシナプス部位における NADPH oxidase subunit の集積を明らかにし、それに伴う脳梗塞後の局所的酸化ストレスの増大が示唆された。

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4件)

- ① Murotomi K, Takagi N,\* Takeo S, Tanonaka K (2011) NADPH oxidase-mediated oxidative damage to proteins in the postsynaptic density after transient cerebral ischemia and reperfusion. Mol. Cell. Neurosci., 46(3):681-688. 査読 \* corresponding author
- ② Murotomi K, Takagi N,\* Mizutani R, Honda T, Ono M, Takeo S, Tanonaka K (2010) mGluR1 antagonist decreased NADPH oxidase activity and superoxide production after transient focal cerebral ischemia. J. Neurochem. 114 : 1711-1719. 査読有 \* corresponding author
- ③ Fukumoto K, Takagi N,\* Yamamoto R, Moriyama Y, Takeo S, Tanonaka K (2010) Prostanoid EP1 receptor antagonist reduces blood-brain barrier leakage after cerebral ischemia. Eur. J. Pharmacol. 640(1-3):82-86. 査読有 \* corresponding author
- ④ Takenaga Y, Takagi N,\* Murotomi K, Tanonaka K, Takeo S (2009) Inhibition of src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab. 29(6):1099-1108. 査読有 \* corresponding author

[学会発表] (計5件)

- ① 室富和俊、高木教夫、田野中浩一、NADPH oxidase は一過性局所脳虚血後のシナプス後肥厚部関連タンパク質の酸化障害に寄与する, 第84回日本薬理学会年会, 2011年3月22日, 横浜
- ② 室富和俊、高木教夫、大野恵美、水谷玲子、竹尾聰、田野中浩一、一過性局所脳虚血後のNADPH oxidase を介したスーパーオキシド産生における mGluR1 の関与, 第83回日本薬理学会年会, 2010年3月16日, 大阪
- ③ 室富和俊、高木教夫、竹永悠司、竹尾聰、田野中浩一、一過性局所脳虚血後のoccludin チロシンリン酸化と血液脳関門破綻へのSrcの関与, 第82回日本薬理学会年会, 2009年3月16日, 横浜

④ 高木教夫, 虚血性脳障害の病態解析と治療戦略, 第52回日本薬学会関東支部大会, 2008年10月4日, 千葉

⑤ K. Murotomi, N. Takagi, Y. Takenaga, S. Takeo, and K. Tanonaka, Inhibition of protein tyrosine kinase prevents disruption of blood brain barrier and attenuates infarct size after transient focal cerebral ischemia, 第51回日本神経化学大会, 2008年9月11日, 富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 教夫 (TAKAGI NORIO)  
東京薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 50318193

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし