

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790403

研究課題名 (和文) 神経障害部位特異的な薬物送達方法の開発

研究課題名 (英文) Developmental challenges for drug delivery system targeting to neurodegenerative area

研究代表者

高田 和幸 (TAKATA KAZUYUKI)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10434664

研究成果の概要 (和文) : アルツハイマー病における神経障害部位では発症誘導因子のアミロイドβ依存的にアクチン重合関連因子の蓄積が引き起こされていることを見だし、シナプス破綻との関連性ならびに新規治療ターゲットを提唱した。さらに脳梗塞などの神経障害部位では、アストロサイトが神経保護作用を有する DJ-1 を分泌することを見だし、アストロサイトを用いた DJ-1 の脳内送達による神経保護戦略の可能性を示唆した。

研究成果の概要 (英文) : In neurodegenerative regions of Alzheimer's disease (AD), I found amyloid-β (Aβ)-dependent accumulation of actin assembly-related factor, and suggested correlations between Aβ and synaptic loss. This result may indicate a new therapeutic target against AD. I also found that astrocytes released DJ-1, a neuroprotective factor, in neurodegenerative regions of brain ischemia. This result suggests a possible usefulness of astrocytes as a delivery carrier for the DJ-1 to brains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：神経障害部位, 神経保護, アルツハイマー病, 脳梗塞, アミロイドβ, シナプス破綻, アクチン重合, アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

近年、神経保護作用、神経分化や機能制御作用を有する様々な因子が神経変性疾患治療に向けたシードドラッグとして見つかった。しかしながら、その多くにおいて *in vivo* 脳への応用に際して末梢と脳を隔てる

血液-脳関門の通過が問題となり脳実質への送達が困難である。血液-脳関門の透過性はその物質の分子量や親水性といった物性に大きく依存しており、特にシードドラッグがペプチドや蛋白質の場合は末梢での分解が問題となっている。

一方、グリア細胞は脳内環境を監視し、神経障害などの異変を認識してその遊走機能により集積・活性化する。この積極的なグリア細胞の関わりは、異物貪食機能、サイトカインや神経栄養因子の産生・分泌機能を介して神経保護的に働くことが予想されている。

2. 研究の目的

神経障害部位への効率的・特異的な薬物送達方法が見つかれば、神経変性疾患の治療薬開発における時間的、経済的節約、さらにはより多方面からの治療アプローチが可能となり飛躍的な進歩が期待される。そこでその前段階として本研究課題の目的は、(1) 神経障害部位特異的な脳内環境の変化を解析し、(2) グリア細胞の貪食、遊走、分泌機能を利用した脳および神経障害部位特異的な薬物送達戦略の可能性について評価することである。

3. 研究の方法

(1) アルツハイマー病 (AD) の神経障害部位特異的な脳病理学的変化の解析

① ヒト剖検脳組織：インフォームドコンセントならびに倫理委員会の審査・許可を得たヒト AD 患者 (67 歳) 剖検脳および対照者 (77 歳) の剖検脳の脳組織を使用した。

② ヒト剖検脳サルコシル不溶性分画の調製：AD 患者剖検脳 (側頭皮質) および対照者剖検脳のそれぞれ 4 例について HEPES 溶液を用いてホモジネートした。12,000 x g での遠心後、得られた上清を細胞質分画として回収し、沈澱物には 1% のサルコシル溶液を用いて再度ホモジネートした。ホモジネートをさらに 100,000 x g で遠心し、得られた沈殿にライムリ溶液を加えてサルコシル不溶性分画とした。

③ AD モデルマウス：ヒト変異型の amyloid precursor protein (APP) 遺伝子を導入した Tg2576 マウス、ヒト変異型 Tau 遺伝子を導入した JNPL3 マウスおよびヒト変異型 APP、ヒト変異型 Tau およびヒト変異型 presenilin 1 (PS1) 遺伝子の 3 遺伝子を導入した 3xTg-AD マウスの脳組織を使用した。

④ 組織学的解析：ヒト剖検脳組織およびマウス脳組織を抗 A β 抗体、抗リン酸化 Tau 抗体、リン酸化 collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) 抗体および抗 Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein (WAVE) 抗体を用いて免疫組織学的解析、さらには共焦点

レーザー顕微鏡による解析を行った。

⑤ 生化学的解析：ヒト剖検脳から調製したサルコシル不溶性分画におけるリン酸化 Tau、CRMP2 および WAVE の発現について Western blotting 法により解析した。AD 剖検脳から調製した細胞質分画を用い、リン酸化 Tau、CRMP2、WAVE の結合性について免疫沈降法により解析した。

(2) アストロサイトにおける DJ-1 発現と分泌に関する解析

① 大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルラット：MCAO モデルラットは Wistar 系雄性ラットを使用し、ナイロン栓子の挿入により左中大脳動脈を閉塞する方法で作製した。中大脳動脈閉塞 120 分後、栓子を抜き去ることにより、血流を再灌流した。対照群 (sham) は栓子の挿入をせずに上記と同様の手順で作製した。

② 磁気共鳴 (MR) 画像法：MCAO-再灌流から 24 時間後、7 テスラ MR 装置による解析を行った。T2 強調画像は繰り返し時間 (repetition time, TR) 2000 ms、エコー時間 (echo time, TE) 40 ms、計測範囲 35 x 35 mm²、スライス厚 1 mm、マトリックス 256 x 128 で撮影し、画像を得た。撮像中、ラットは 50% 酸素、50% 空気下に 1.5% イソフルランにて麻酔した。

③ 組織化学的解析：MCAO モデルラット脳組織を抗 microtubule-associated protein-2 (MAP2) 抗体、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体、抗 DJ-1 抗体を用いて免疫組織学的解析および共焦点レーザー顕微鏡による解析を行った。一方、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色は MCAO-再灌流から 24 時間後ラットを断頭致死させ脳を摘出し、摘出した脳を 2 mm の厚さでスライスし、2% TTC を含む生理食塩水に浸した。その後、4% パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液中で固定した。

④ ラット初代培養アストロサイト：ラット初代培養アストロサイトは 37°C、5% CO₂、95% 空気の環境に設定された CO₂ インキュベーター内で培養・維持した後、H₂O₂ で処置した。細胞ならびにメディアムをサンプルとして回収し、ライムリ溶液で溶解した。その後、DJ-1 および β -actin の発現を Western blotting 法により解析した。

⑤ ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y の培養：ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y は、アストロサイトと同様の環境下で培養した。DJ-1 のノックダウンは、5'-GGA TCC CGT CAA GGC TGG CAT CAG GAC AAT

TGA TAT CCG TTG TCC TGA TGC CAG CCT TGA TTT
TTT CCA AAA GCT T-3'の配列のオリゴヌクレ
オチドを用い、常法に従い行った。

⑥ 3-(4, 5 -dimethyl-2-tiazolyl)-2, 5-
diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 法
による細胞生存率の測定：細胞生存率の測定
は MTT 法を用いて解析した。細胞を 96 穴ブ
レートに播種し 24 時間培養後、H₂O₂、GST お
よび GST-DJ-1 を 24 時間処理した。その後、
MTT を加え、37°C で 4 時間反応させた。生細
胞に取り込まれ、MTT から生成したホルマザ
ンを等量の塩酸/イソプロパノールを加えて
溶解した後、570 nm の吸光度を測定した。

⑦ 電子スピン共鳴 (ESR) 法：ESR は中心磁
場；340.2±5 mT、出力；4 mW、マイクロウ
ェーブの周波数；9.4 GHz、変調磁場；0.1 mT、
応答時間；0.03 秒および掃引時間；2 分間の
測定条件とした。スピントラップ剤として
5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)
を用いた。H₂O₂からの・OH 測定には H₂O₂と Fe²⁺
の反応として知られる Fenton 反応系におい
て GST-DJ-1、GST、pentaacetic acid、FeSO₄、
H₂O₂、DMPO、PB を混合した。混合後 1 分で ESR
の測定を開始した。これらの条件で得られた
・OH のスペクトルと内部標準 Mn²⁺のシグナル
との比で・OH の発生量を評価した。

4. 研究成果

(1) AD の神経障害部位特異的な脳病理学的
変化の解析

①AD 患者剖検脳組織における免疫組織染色

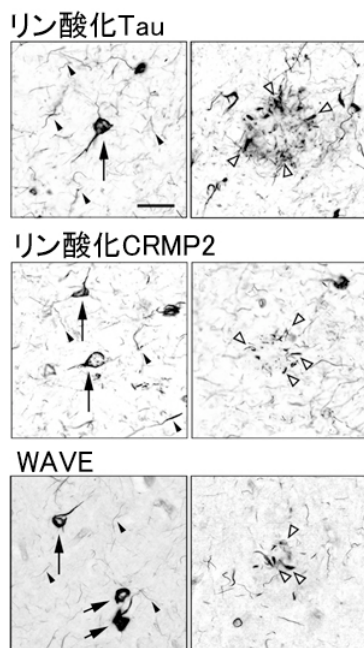


図 1 AD 剖検脳組織の解析

対照者の剖検脳では局所的な免疫反応性は
認められなかったが、AD 患者剖検脳では神経
原線維変化 (黒矢印)、Aβ プラーク周辺の変
性神経突起 (白矢頭) およびニューロピルス
レッド (黒矢頭) においてリン酸化 Tau、
リン酸化 CRMP2 および WAVE の蓄積が観察さ
れた (図 1)。

②Western Blotting によるサルコシル不溶性
分画の解析

対照者のサルコシル不溶性分画では認めら
れなかったが、AD 患者剖検脳から調製したサ
ルコシル不溶性分画ではリン酸化 Tau、
CRMP2 および WAVE の免疫反応性が検出され
た (図 2)。

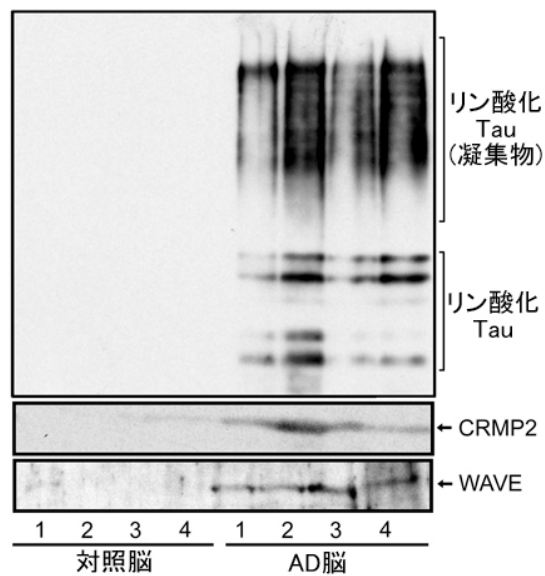


図 2 サルコシル不溶性分画の解析

③AD 剖検脳の細胞質分画における蛋白質の
結合性の解析

AD 剖検脳から調製した細胞質分画において
CRMP2 が、Aβ とは結合しないが、リン酸化 Tau
や WAVE と結合性を有することがわかった
(図 3)。

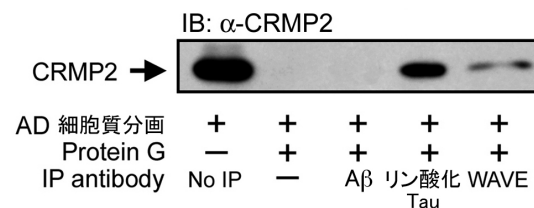


図 3 免疫沈降実験
IB: Immuno blotting,
IP: Immunoprecipitation.

④AD モデルマウスを用いた解析

JNPL3 マウスではリン酸化 Tau とリン酸化 CRMP2 が神経細胞内で蓄積していた。Tg2576 マウスでは A β プラークのみが形成されていた。3xTg-AD マウスでは A β プラークの形成、リン酸化 Tau とリン酸化 CRMP2 の神経細胞内で蓄積に加え、WAVE が神経細胞内で蓄積していた (図 4)。

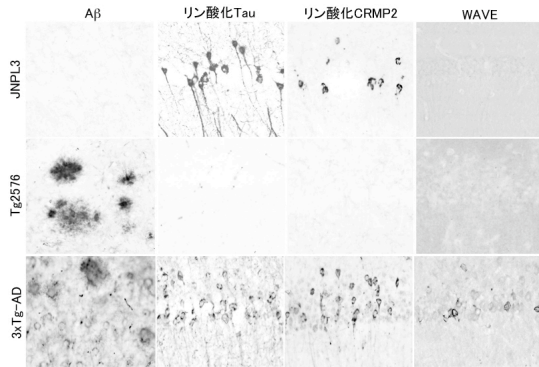


図 4 AD モデルマウス海馬組織の解析

以上の結果から、アクチン重合の調節因子である WAVE の神経細胞内での蓄積には A β という要素が必要であること、さらにその蓄積には CRMP2 のリン酸化 Tau ならびに WAVE との結合性が関与することが示唆された。この結果は、これまで不明であったアクチン細胞骨格の破綻が AD 脳で誘導されていることを示唆する発見であり、さらには AD で認められる個々の病理所見の関連性、つまり、A β が神経原線維変化やシナプス破綻の成熟化因子または発症因子として作用する可能性を示す重要な知見である。また、アクチン重合を調節する化合物の脳内送達が新規 AD 治療薬の開発ターゲットに成りうる可能性が期待される。

(2) アストロサイトにおける DJ-1 発現と分泌に関する解析

① MCAO モデルラット脳の解析

MCAO-再灌流から 24 時間後、MCAO モデルラットの神経障害部位を MRI、TTC 染色および抗 MAP2 抗体を用いて検出した。抗 GFAP 抗体を用いた解析より梗塞巣周辺のペヌンブラ領域にはアストロサイトが活性化して集積していることがわかった。また、抗 DJ-1 抗体を用いた解析により、ペヌンブラ領域には DJ-1 の免疫反応性が増大していることがわかった。共焦点レーザー顕微鏡を使用した解析により、増大する DJ-1 はペヌンブラ領域で活性化して集積するアストロサイト由来であることが示唆された (図 5)。

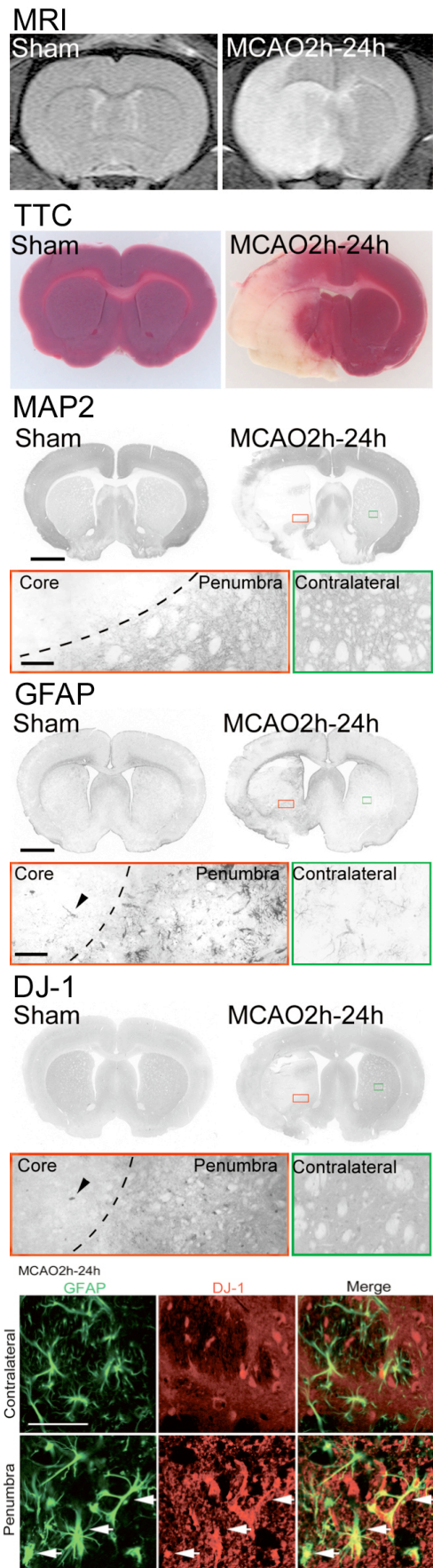


図 5 MCAO モデルラット脳の解析

② ラット初代培養アストロサイトにおける DJ-1 の発現と分泌

ラット初代培養アストロサイトに H_2O_2 を処置したところ、培養液中への DJ-1 の分泌は濃度依存的に増加した。一方、細胞内での DJ-1 の発現量は $150 \mu M$ までの H_2O_2 濃度では、濃度依存的に発現量が増加した (図 6)。

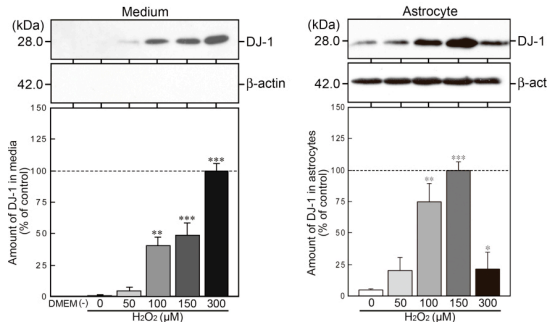


図 6 培養アストロサイトにおける DJ-1 の発現・分泌

③ ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y による DJ-1 の神経保護作用の解析

ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y に H_2O_2 を処置し、その生存率に対する DJ-1 の作用を MTT 法により解析した。その結果、 H_2O_2 の濃度依存的に SH-SY5Y の生存率は低下した。さらに DJ-1 をノックダウンした SH-SY5Y での H_2O_2 に対する脆弱性は増加した。どちらの細胞においても外因性のリコンビナント DJ-1 蛋白質を処置すると H_2O_2 による生存率の低下が抑制されることがわかった (図 7)。

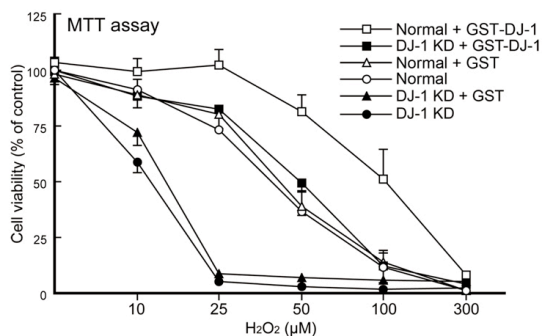


図 7 SH-SY5Y 細胞の生存率
Normal: 野生型 SH-SY5Y 細胞,
DJ-1 KD: DJ-1 ノックアウト SH-SY5Y 細胞

④ ESR を用いたヒドロキシラジカルに対する DJ-1 の作用解析

ヒドロキシラジカルは鉄イオンと H_2O_2 の反応 (Fenton 反応) により発生させ、ESR により検出した。リコンビナント DJ-1 は発生したヒドロキシラジカルを消去する作用がある

ことがわかった。

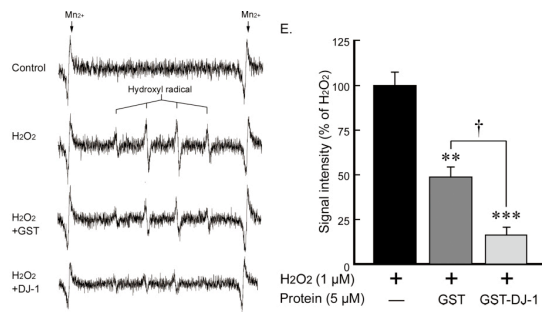


図 8 ヒドロキシラジカルに対する DJ-1 の作用

以上の結果より、DJ-1 はヒドロキシラジカルなどの活性酸素種を除去する作用により神経保護作用を有することが示唆された。さらにアストロサイトは酸化ストレスを感知すると DJ-1 の発現量を増加させ、さらに分泌することがわかった。このことからアストロサイトを用いた DJ-1 の脳内への送達や分泌が神経変性疾患の新たなターゲットになることが示唆された。

おわりに

本研究を遂行するにあたり、下記 (6. 研究組織 (4) 研究協力者) のように多くの研究者および大学院生のご協力を頂きました。ここにお名前を列記するとともに心より感謝の意を表します。

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) Takashi Yanagida, Jun Tsushima, Yoshihisa Kitamura, Daijiro Yanagisawa, Kazuyuki Takata, Tomonori Shibaiki, Atsuko Yamamoto, Takashi Taniguchi, Hiroyuki Yasui, Takahiro Taira, Shigehiro Morikawa, Toshiro Inubushi, Ikuo Tooyama and Hiroyoshi Ariga: Oxidative stress induction of DJ-1 protein in reactive astrocytes scavenges free radicals and reduces cell injury. *Oxi. Med. Cell. Long.* 査読有 2, 36-42 (2009).

(2) Kazuyuki Takata, Yoshihisa Kitamura, Yukinori Nakata, Yasuji Matsuoka, Hidekazu Tomimoto, Takashi Taniguchi and Shun Shimohama: Involvement of WAVE

Accumulation in A β /APP Pathology-Dependent Tangle Modification in Alzheimer's Disease. *Am. J. Pathol.* 査読有 175, 17-24 (2009).

〔学会発表〕(計7件)

(1) 高田 和幸 他: アミロイド β 蛋白質依存性アルツハイマー病病変の研究. 日本薬学会第130年会, 2010年3月29日, 就実大学(岡山)

(2) 北村佳久 他: アルツハイマー病の神経原線維変化における CRMP2 の蓄積. 日本薬学会第130年会, 2010年3月29日, 岡山桃太郎アリーナ(岡山)

(3) 高田 和幸 他: アルツハイマー病におけるアミロイド β 依存性の神経原線維変化成熟化に関する解析. 第83回日本薬理学会年会, 2010年3月17日, 大阪国際会議場(大阪)

(4) 北村 佳久 他: アルツハイマー病の変性神経形成におけるリン酸化 CRMP2 蓄積に対するアミロイド β 蛋白質およびリン酸化タウ蛋白質の関与. 第83回日本薬理学会年会, 2010年3月17日, 大阪国際会議場(大阪)

(5) 伊藤 奈津子 他: 酸化ストレスによるアストロサイト DJ-1 の遊離および神経保護作用の解析. 第83回日本薬理学会年会, 2010年3月17日, 大阪国際会議場(大阪)

(6) 高田 和幸 他: アルツハイマー病ワクチン療法戦略における抗 A β 抗体のミクログリアに対する作用. 日本薬学会第129年会, 2009年3月27日, 京都国際会議場(京都)

(7) 高田 和幸 他: 抗アミロイド β 抗体によるミクログリアのアミロイド β 貪食機能制御. 第82回日本薬理学会年会, 2009年3月16日, パシフィコ横浜(神奈川)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 和幸 (TAKATA KAZUYUKI)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 10434664

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

谷口 隆之 (京都薬科大学・教授)
下濱 俊 (札幌医科大学・教授)
遠山 育夫 (滋賀医科大学・教授)
富本 秀和 (三重大学・教授)
有賀 寛芳 (北海道大学・教授)
平 敬宏 (山梨大学・教授)
犬伏 俊郎 (滋賀医科大学・教授)
森川 茂廣 (滋賀医科大学・教授)
安井 裕之 (京都薬科大学・教授)
北村 佳久 (京都薬科大学・准教授)
松岡 康治 (ジョージタウン大学・助教)
柳沢 大治郎 (京都薬科大学・大学院生)
柳田 孝志 (京都薬科大学・大学院生)
中田 行紀 (京都薬科大学・大学院生)
芝池 知徳 (京都薬科大学・大学院生)
津島 純 (京都薬科大学・大学院生)
山本 温子 (京都薬科大学・大学院生)