

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591853

研究課題名（和文） 脳プレコンディショニングにおける CAVOLIN-1 の研究と応用

研究課題名（英文） The study of Caveolin-1 and its application in cerebral preconditioning

研究代表者

横山 高玲 (YOKOYAMA TAKAAKIRA)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00347329

研究成果の概要（和文）：Caveolin-1 欠損マウスでは、脳虚血プレコンディショニングが働かず、海馬脳血管床の減少が見られ、その代償機構のためか、脳底動脈輪の側副血行形成が見られた。また、加齢に関連して見られる、海馬神経細胞のシナプスシグナリングコンポーネントの減少や、アルツハイマー病を示唆する神経変性が、若年でも見られた。更に、Caveolin-1 の再発現により、アミロイドβ蛋白の発現量の減少を認めたことから、Caveolin-1 の損失が神経変性と加齢を加速させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The cerebral ischemic preconditioning didn't work in Caveolin-1 knockout mice and their cerebrovascular volume in the hippocampi was reduced. Their collateral formation of Willis ring was higher than WT mice, which might be a compensating mechanism. And in the hippocampi of young Caveolin-1 knockout mice, the synapse signaling components were reduced and neurodegenerative changes indicative Alzheimer's disease were seen, which are generally related to aging. Additionally, neuron-targeted Caveolin-1 re-expression in caveolin-1 knockout neurons in vitro decreased amyloid beta protein expression. These data suggests loss of cavolin-1 accelerates neurodegeneration and aging.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：Caveolin-1

## 1. 研究開始当初の背景

プレコンディショニングとは、臓器に対して細胞死を起こさない程度のストレスを与えることにより、その後起こりうる致命的なストレスから臓器を守るといふ、一般的な現象である。この現象を薬物等で臨床応用する

ことが可能になれば、脳卒中・頭部外傷・びまん性脳障害など、重篤な脳後遺症を来す致命的ストレスから、内因性神経保護機序を利用して、脳を保護できる可能性がある。プレコンディショニングをもたらす方法は多数報告されているが、最も確実な方法は、細

胞・組織・臓器が致死的な虚血を起こす「以前」に、それらに短時間虚血を与えることである。しかし、細胞障害が起こる「以前」に、非致死性ストレスを与えることは、临床上は非実用的である。よってこの現象の解明が急がれるが、関与するシグナル分子と伝達機構など未だ不明な点が多い。これまでの報告では、神経細胞が保護されるためには新たな遺伝子翻訳と蛋白合成が必要であることが示唆されている。

一方、我々の共同研究者は、「心筋細胞」において、細胞膜上に存在する脂質に富んだ窪み構造（カベオラ）の構成タンパク質 Caveolin-1 が、麻酔薬によるプレコンディショニングの保護機序に関与していることを明らかにした。麻酔薬による心筋細胞のプレコンディショニングによって、電子顕微鏡写真上でカベオラの増加を発見した。更に、Caveolin-1 ノックアウトマウスでは、野生型マウスでみられる Src tyrosine kinase のリン酸化が見られなかったことより、カベオラという形態構造による区分化が Caveolin-1 と Src のリン酸化を誘導し、それが心筋の保護作用に関与していると結論した。

さらに、彼らは「神経細胞」においても、そのシナプスに存在する NMDA 受容体と Caveolin-1 が相互作用して、虚血に対する神経保護作用を呈していることを報告した。神経細胞膜上には Caveolin-1 は存在するものの、カベオラは存在しないと報告されている。その培養神経細胞において、プレコンディショニングによって、Caveolin-1、Src、Erk1/2 等のタンパク質のリン酸化が増加していることが明らかとなった。更に、プレコンディショニングによって、Caveolin-1 と 2 型 NMDA 受容体及び膜脂質ラフトの、同一部位への局在化が促進され、その下流の NMDAR/SFK/ERK といった細胞生存経路が活性化されることにより、虚血性障害及び細胞死から神経細胞を保護している、と結論した。

シナプスに接する神経細胞膜上の受容体の一つである、NMDA 受容体の活性化によって、脳のプレコンディショニングが引き起こされることは、これまでも示唆されてきた。しかし、*in vivo* で、caveolin-1 と、虚血に対する神経保護機序との関連を報告したものは多くない。また、*in vitro* を含めて、血管新生などの間接的作用ではなく、直接的な神経保護作用との関連を報告したものは無い。

## 2. 研究の目的

(1) Caveolin-1 が虚血耐性の獲得にどのように影響を及ぼすか、*in vivo* 即ち Caveolin-1 ノックアウトマウスで確認する。

(2) Caveolin-1 ノックアウトに、Caveolin-1 を再発現させた場合の虚血耐性の獲得に及

ぼす影響を調べる。

## 3. 研究の方法

(1) 野生型マウス、Caveolin-1 ノックアウトマウスにおける、脳虚血プレコンディショニングによる、海馬神経細胞死の評価

マウス両側頸動脈閉塞全脳虚血モデル (Smith らの方法) を用いて、野生型マウス (C57BL/6J オス) と Caveolin-1 ノックアウトマウス (オス) に以下の処置を行う。

①手術;各マウスを 4 群に分け、以下の処置を行う。

(i) sham 手術 (sham) (両側総頸動脈に糸をかけるのみ)

(ii) 虚血プレコンディショニング手術のみ (IPC) (3 分間閉塞)

(iii) 致死性虚血手術のみ (LI) (両側総頸動脈をクリップで閉塞。12 分間閉塞)

(iv) 虚血プレコンディショニング+24 時間後の致死性虚血手術 (IPC+LI)

手術は、全身麻酔、気管挿管、人工呼吸管理、レーザードップラー脳血流モニター下 (Lethal の際) で行う。

尚、両側頸動脈閉塞時の両側脳血流量が、閉塞 1 分前の脳血流量の 10% 以下に低下したもののみ、「Lethal」とし、それ以外を除外する。

②虚血判定時期;最後の手術から 3 日後に、sacrify し、heparinized PBS で脱血及び 10% buffered formalin で還流固定する。

③側副血行路形成;2 後、2ml の Indian Ink+0.2% gelatine/PBS を心室経路で投与。Plasticity grading score を用いて、ウイリス脳底部動脈輪の側副血行路形成の程度を判定する (Murakami K et. Brain Research. 1998)。

④生存神経細胞数比;Formalin 固定後、Butanol または Ethanol 脱水、パラフィン包埋し、切片作成後、CresylViolet (ニッスル) 染色し、両側海馬 CA1 の錐体細胞数を計測し、生存率を計算する。

(2) Caveolin-1 アデノウイルスを用いた Caveolin-1 再発現によるプレコンディショニングの効果の評価

Caveolin-1 ノックアウトマウスに Caveolin-1 アデノウイルスを感染させ、Caveolin-1 を再発現させた状況下でプレコンディショニングの神経保護効果が再現できるかどうかを確認する。まず試験的に、アデノウイルスを尾静脈経路で投与し、72 時間後に判定する。caveolin-1 の発現がどれほど再現できているかを、免疫組織、免疫プロテオミクスで確認する。安定した再発現マウスの作成が完了した状況で、アデノウイルス投与 72 時間後に、前述の手術を行い、評価時に、Caveolin-1 の発現状況も確認する。

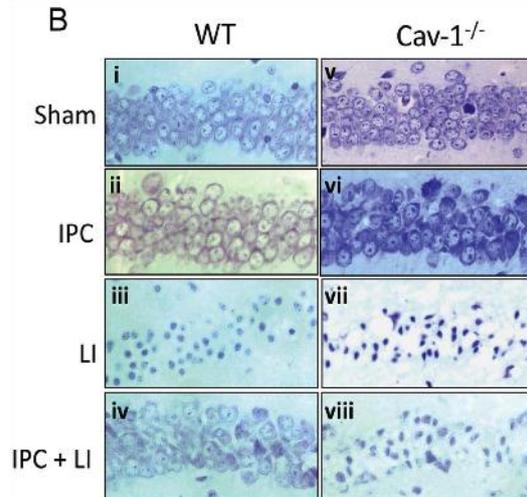
#### 4. 研究成果

(1) Caveolin-1 ノックアウトマウスの表現型  
 ①【Caveolin-1 ノックアウトマウスでは、脳虚血プレコンディショニングが働かない】

Sham 手術、虚血プレコンディショニング手術、致死的虚血手術においては、野生型マウスと Caveolin-1 ノックアウトマウスとの間に、海馬 CA1 領域の神経細胞死数に有意差はなかった。しかし、致死的虚血前に虚血プレコンディショニングを行った場合、野生型マウスは、Caveolin-1 ノックアウトマウスと比較して、海馬 CA1 神経細胞を有意に虚血侵襲から保護していた。

即ち Caveolin-1 ノックアウトマウスでは、虚血プレコンディショニングは働かないことが示唆された。

[各虚血処置後の海馬 CA1 領域のニッスル染色]



WT: 野生型マウス。

Cav-1<sup>-/-</sup>: Caveolin-1 ノックアウト (ホモ) マウス。

Sham: 総頸動脈露出のみ。

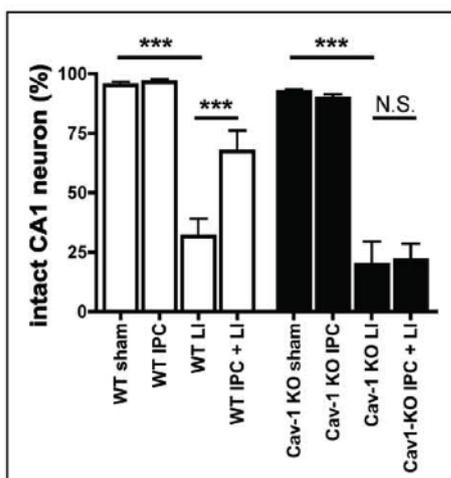
IPC: 虚血プレコンディショニング処置; 両側総頸動脈3分間閉塞。

LI: 虚血処置; 両側総頸動脈12分間閉塞。

IPC+LI: 虚血プレコンディショニング (3分間閉塞) + 24時間後の致死的虚血処置 (12分間閉塞)

細胞核が凝集あるいは、細胞質が濃染している細胞が死細胞。

[定量化グラフ]



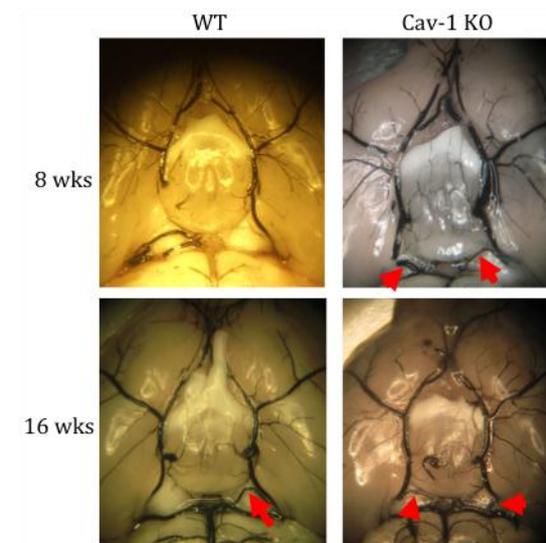
②【Caveolin-1 ノックアウトマウスは、脳底部動脈の側副血行路が多い】

前述の虚血処置の際、両側脳血流が閉塞前の10%以下に低下したマウスのみを対象とし、脳底部ウィルス動脈輪の側副血行路を確認した。

Caveolin-1 ノックアウトマウスは、同週齢の野生型マウスと比較して有意に多かった。

即ち、Cavolin-1 ノックアウトマウスでは、側副血行路が多いにも関わらず、虚血耐性が働きにくく、加齢により側副路の形成が多い傾向があった。

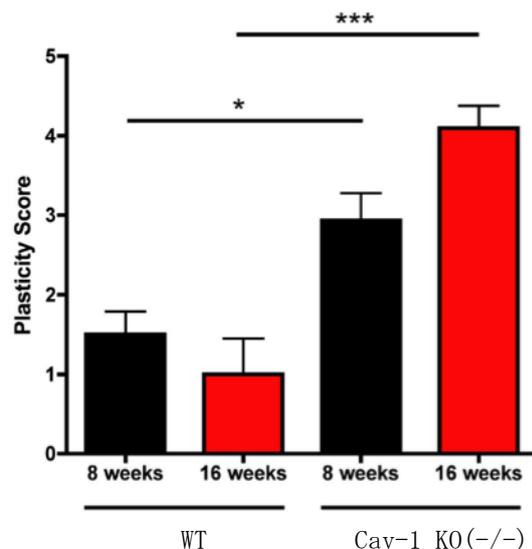
[ウィルス動脈輪側副血行路形成]



8 wks : 8 週齢。16 wks: 16 週齢。

矢印は後交通動脈。

[Plasticity Score 定量化グラフ]



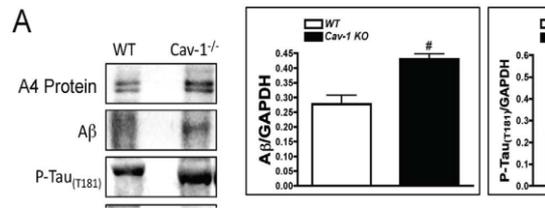
\*\*\*P<0.001, \*P<0.05, n=7-17.

③【Caveolin-1 ノックアウトマウスでは、海馬の血管床が低下している】

ウイルス動脈輪の側副血行路は、ヒトにおいては胎生期～出生時が最も多く、加齢と共に少なくなる傾向がある。一方、Caveolin-1 ノックアウトマウスにおける側副血行路の多さ、特に加齢とともに増加する傾向は、その逆であり、虚血耐性の低下を代償したのかもしれない。

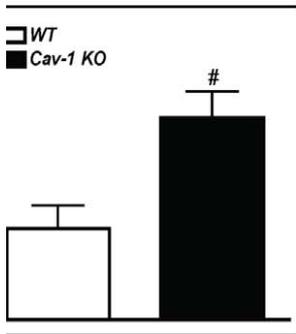
そこで、海馬における脳血管容積を lectin GSA 染色によって計測したところ、Caveolin-1 ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、20-25%の低下が認められた。

【海馬における脈管 lectin GSA 染色】



WT: 野生型、Cav-1KO: caveolin-1 ノックアウトマウスの海馬

【脈管容積の定量化グラフ】



④【海馬抽出物内のシナプス関連シグナルタンパク質は、年齢依存性に減少する】

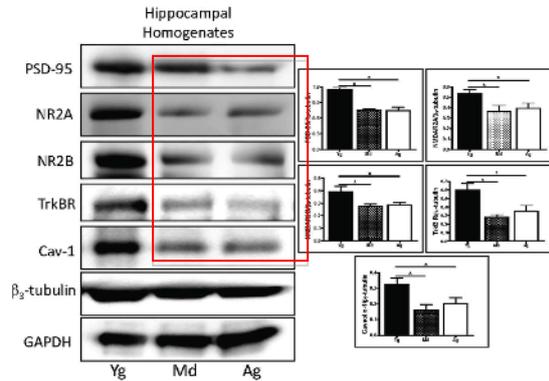
Caveolin-1 ノックアウトマウスが、同週齢の野生型マウスと比較して、側副血行路が多く、微小脈管の減少を代償している可能性があることから、Caveolin-1 は加齢による神経変性にも関与していることが示唆された。

ここで、研究の方向を、Caveolin-1 と加齢との関連に大きくシフトすることになった。

まず、月齢別に野生型マウスの海馬のタンパク質を抽出し、神経のシナプス関連シグナルの発現量を見たところ、young (3-6 ヶ月齢: Yg) に比較して、middle aged (12 ヶ月齢: Md)、aged (24 ヶ月齢: Ag) では PSD-95、NR2A、NR2B、TrkB、Cav-1 の発現量が低下していた。

即ち、海馬のシナプスシグナルコンポーネントと Caveolin-1 は、月齢依存的に減少する。

【海馬抽出物内のシナプス関連シグナルタンパク質の月齢別免疫プロット】



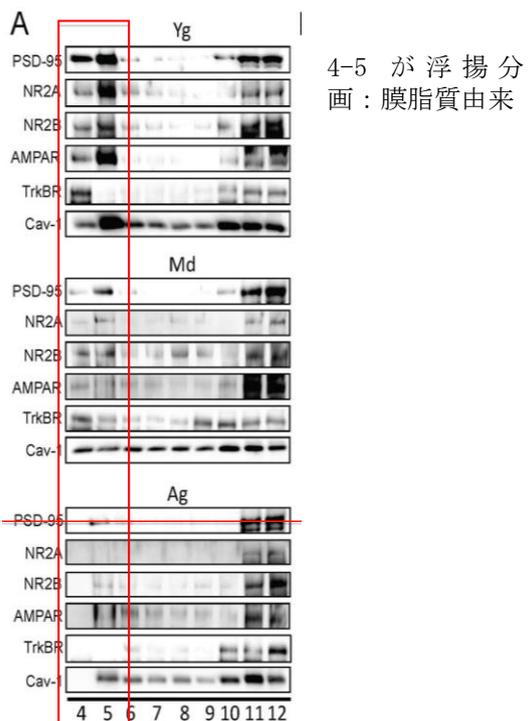
⑤【膜脂質ラフト (筏) 内のシナプスシグナルコンポーネントは、加齢と共に減少する】

膜脂質ラフトは、哺乳類脳のシナプスを安定化させると言われている。そこで、野生型と Caveolin-1 ノックアウトマウスの、全脳抽出物をスクロースで濃度分画し、膜脂質ラフトを精製し、免疫プロットした。

young 脳からの浮揚性分画(第 4-5 分画)、即ち膜脂質ラフト由来のタンパク質中には、多くのシナプスシグナルコンポーネント、PSD-95、NR2A、NR2B、AMPA、TrkA、Cav-1 が含まれていたが、middle aged と aged ではそれらは有意に低下していた。

即ち、膜脂質ラフト由来の Caveolin-1 やシナプスシグナルコンポーネントは、月齢依存性に減少している。

【Young、middle aged、aged の野生型マウス海馬抽出物のスクロース濃度分画を免疫プロット】

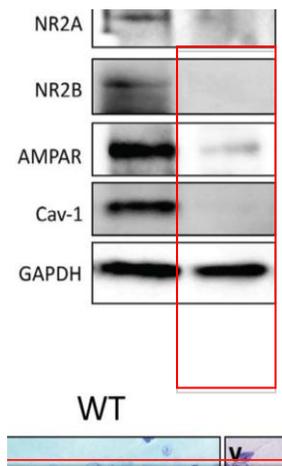


⑥【若い Caveolin-1 ノックアウトマウスでは、シナプスシグナルタンパク質が減少している】

野生型高齢マウスで、海馬と膜脂質ラフトにおける Caveolin-1 の発現が低下していたので、若い Caveolin-1 ノックアウトマウスでもシナプスタンパク質発現が低下しているかを評価した。

若い Caveolin-1 ノックアウトマウス海馬 synaptosome 内のシナプスタンパク質の発現パターンは、高齢野生型マウスと類似して減少していた。

**【Young Caveolin-1 ノックアウトマウス海馬の synaptosome の免疫プロット】**



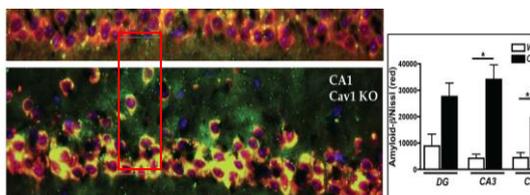
⑦【若い Caveolin-1 ノックアウトマウスは、アルツハイマー病様表現型を早期に呈している】

以前の報告で、Caveolin-1 と膜脂質ラフトは、アミロイド前駆蛋白のアミロイド産生過程を調節しているとされており、若い Caveolin-1 ノックアウトマウスが、アルツハイマー病を示唆する病理学的特徴を呈しているかどうかを評価した。

若い Caveolin-1 ノックアウトマウスの海馬抽出物中のアミロイドβとタウ蛋白の発現は、野生型に比較して、有意に上昇していた。

**【海馬抽出物中のアミロイドβとタウ蛋白の発現】**

(左：免疫プロット、右：定量グラフ)



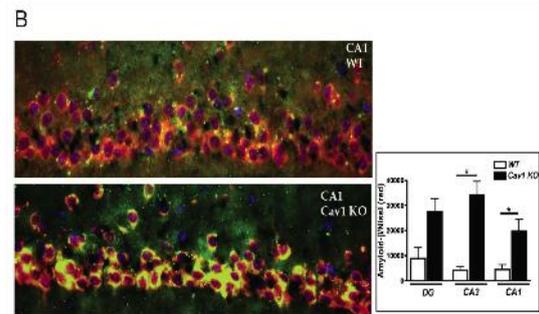
⑧【若い Caveolin-1 ノックアウトマウスの海馬神経細胞内に、アミロイドβ蛋白が強く発現している】

若い Caveolin-1 ノックアウトマウスの海馬切片上の錐体神経細胞にアミロイドβ蛋白が、野生型マウスと比較して、有意に強い発現を認めた。

白が、野生型マウスと比較して、有意に強い発現を認めた。

Caveolin-1 ノックアウトマウスでは、若いにもかかわらず、加齢性神経変化が見られる。

**【海馬 CA1 の二重免疫染色】**



左上段：野生型。左下段：若い caveolin-1 ノックアウトマウス。

Nissl：赤、アミロイドβ：緑、オーバーラップで黄色に。

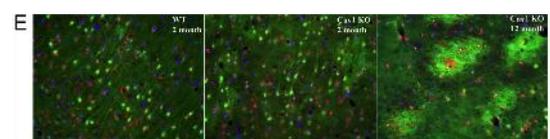
右：Nissl 陽性細胞中のアミロイドβ陽性細胞の定量グラフ。白：野生型、黒：Caveolin-1 ノックアウトマウス。

⑨【Caveolin-1 ノックアウトマウスは、著明な星細胞によるグリオシスと、神経変性を呈する】

Fluoro-Jade B 染色を行うと、若い (2 ヶ月齢) 野生型マウスの海馬 CA1 では、神経細胞の変性はほとんどなく、astrocyte が整然と配置している。一方、Caveolin-1 ノックアウトマウスの 12 ヶ月齢の CA1 領域には、大きな明るい絡まった緑色蛍光部分と赤色の Nissl 神経細胞、そしてかなり無秩序な配列の astrocyte がみられる。

即ち、加齢とともに神経変性が進行していることを示している。

**【海馬 CA1 領域の三重染色】**



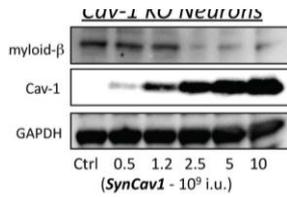
左：野生型 2 ヶ月齢、中央：Caveolin-1 ノックアウト 2 ヶ月齢、右：Caveolin-1 ノックアウト 12 ヶ月齢  
緑色：Fluoro-Jade B、赤色：Nissl、青色：DAPI。

**(2) Caveolin-1 再発現の影響**

【培養 Caveolin-1 ノックアウト神経細胞に、神経細胞に特異的に Caveolin-1 を再発現させると、アミロイドβ蛋白の発現が減少した】

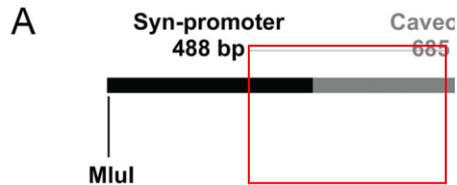
Caveolin-1 を発現するベクターの開発に時間がかかり、最終的に動物モデルの応用はできなかった。

しかし、神経細胞に特異的に Caveolin-1 蛋白を発現するベクターを作成 (SynCav1: 神経特異的シナプシンプロモーターを含むレンチウイルス) した。



Caveolin-1 ノックアウトマウスから得られた、6つの別々の神経細胞培養に、SynGFP (コントロールベクター) あるいは SynCav1 (Caveolin-1 強制発現ベクター) を感染させると、72 時間後では、SynCav1 で有意に amyloid beta の発現が減少した。

[Caveolin-1 ノックアウトマウスの培養海馬神経細胞に Caveolin-1 を強制発現させた後の免疫プロット]

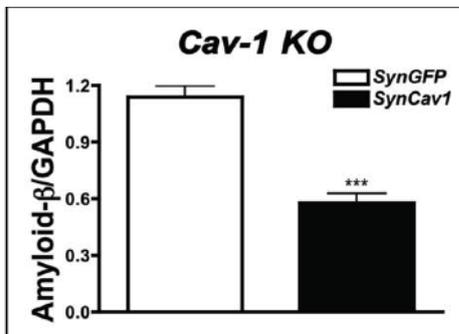


Syn-promoter-Cav1-PolyA can be cut

SynGFP: コントロールベクター

SynCav1: Caveolin-1 発現ベクター

[免疫プロット上のアミロイドβ蛋白の発現量の定量化グラフ]



左: コントロールベクター

右: Caveolin-1 発現ベクター

## 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 Brian P. Head, Takaakira Yokoyama, Hemal H. Patel. Loss of Caveolin-1 Accelerates Neurodegeneration and Aging. PlosOne. 査読有、vol. 5, 2010, e15697

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横山 高玲 (YOKOYAMA TAKAAKIRA)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 00347329

### (2) 研究分担者

川原 信隆 (KAWAHARA NOBUTAKA)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号: 60214673

菅野 洋 (KANNO HIROSHI)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号: 40244496