

機関番号：32665

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700414

研究課題名 (和文) 低分子化合物を用いた糖尿病によるスパインの形態変性におけるカルパインの役割の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the role of calpain on the degeneration of spines caused by diabetes using a low molecular weight compound

研究代表者

小菅 康弘 (KOSUGE YASUHIRO)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：70383726

研究成果の概要 (和文)：糖尿病による慢性的な高血糖は、海馬の長期増強現象の減少や認知機能の低下を引き起こすことが知られている。本研究では、高血糖が誘発する認知機能障害のメカニズムを明らかにするため、streptozotocin 誘発 1 型糖尿病モデルマウスの海馬および高グルコース条件で培養したヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用い、スパインの構成タンパク質の 1 つである post-synaptic density 95 (PSD-95) の発現変化についての検討を行った。その結果、extracellular-regulated kinase (ERK) のリン酸化レベルの低下が、*in vivo* および *in vitro* レベルでの高血糖状態の持続化による有害作用において重要な役割を演じていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Chronic hyperglycemia, such as diabetes mellitus, has been shown to induce cognitive impairment and defects of long-term potentiation in the hippocampus. In order to assess the mechanism of cognitive impairment by hyperglycemia, the expression of post-synaptic density 95 (PSD-95), a key components of spine, was investigated in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y, after exposure to high-glucose and in the hippocampus in streptozotocin-induced diabetic mice. These results suggest that decrease in phosphorylated ERK plays a significant role in the adverse effect of chronic hyperglycemia *in vivo* and *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 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：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：糖尿病・海馬・スパイン・カルパイン・シナプス可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

食生活や生活習慣の急激な変化により、糖尿病の患者数は世界的に増大し、21 世紀最大の疾患のひとつと考えられている。糖尿病は、細胞内への糖の取り込みに重要なインスリ

ンの分泌不足のために糖代謝、タンパク質代謝、脂質代謝に異常が生じ、慢性的な高血糖の結果、特有の糖尿病合併症をもたらす病気である。近年、糖尿病が中枢神経系に及ぼす影響についても解析が進み、糖尿病モデルマ

ウスではシナプス伝達や記憶・学習に深く関連すると考えられている海馬の長期増強現象 (LTP) を抑制することやシナプス可塑性において重要な役割を演じているシナプス後部の構成タンパク質の発現が変化することが報告されている。このように、糖尿病による慢性的な高血糖は、海馬の神経突起の萎縮やシナプスの減少を誘発・増悪するリスクファクターになる可能性が示唆されているものの、そのメカニズムについては不明な点が多い。スパインは一つの興奮性シナプスの情報を処理する最小単位構造であり、記憶学習の基盤となるシナプス可塑性はこの構造単位で発生する。そのため、スパインの形態異常は学習機能障害を誘発すると考えられている。近年、アルツハイマー病 (AD) の脳内において、神経細胞死に先立ち、記憶障害の引き金となる神経突起の変性やスパイン減少が生じることが見いだされ、これらの変性に  $Ca^{2+}$  依存性酵素の 1 つである calpain の異常活性化によるシナプス構成タンパク質の分解が関与することが報告されている。また、糖尿病モデル動物の脳内では amyloid  $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ) の蓄積や  $A\beta$  による神経毒性が生じやすいとの報告や、2 型糖尿病が AD の危険因子になるばかりでなく、AD の前駆症状として知られる軽度認知障害 (MCI) を起こすリスクを高めるという疫学調査の結果もあり、糖尿病は AD の発症や進行に密接に関与することが示唆されている。そのため、糖尿病による海馬のスパインの減少に calpain の異常活性化が関与する可能性があるものの、そのような視点で検討を行っている例はなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、糖尿病による慢性的な高血糖が誘発する海馬機能低下のメカニズムを、海馬神経細胞のスパインまたはシナプスの構造変化に着目して明らかにすることを目的とする。特に、申請者がこれまでに、calpain の活性抑制作用を有する作用を持つことを見いだしている低分子化合物である S-allyl-L-cysteine (SAC) をツールとして用い、スパインまたはシナプスの形態異常における calpain の役割について、組織化学的および生化学的な手法を用いて検証を行う。また、SAC を基本骨格として合成した誘導体を、*in vitro* および *in vivo* モデルを用いて評価することで、calpain を標的とした治療薬開発の可能性についても検証する。

## 3. 研究の方法

### 3-1 I 型糖尿病モデルマウスの作成

8 週齢のマウスに 18 時間絶食させた後 streptozotocin (STZ) を 100 mg/kg で腹腔内投与した。投与後一定期間ごとに血糖値を自

己検査用グルコースキット (バイエル薬品株式会社) を用いて測定し、血糖値が 400 mg/dL 以上のマウスを糖尿病モデルマウスとした。なお、対照群には、生理食塩液を腹腔内投与した。

### 3-2 海馬長期増強現象 (LTP) の *in vivo* 測定

マウスにウレタン (1.0 g/kg) 麻酔液を腹腔内投与した。マウスの食道に経口投与用チューブ挿入した後、脳定位固定装置に固定し、頭部を切開、頭蓋骨を露出、Bregma および Lamda の位置を確認し、水平にした。刺激電極 (双極、tungsten 製) を嗅内皮質貫通線維側 (Lamda から側方 3.0 mm、深さ 1.5 mm) に、記録電極 (単極、tungsten 製) を歯状回顆粒細胞層 (Bregma から後方 2.0 mm、側方 1.6 mm、深さ 1.5 mm) の位置に刺入した。刺激電極より刺激し、歯状回顆粒細胞の活動電位の総和である集合電位の振幅 (population spike amplitude ; PS amplitude) を測定し、最大の集合電位の振幅が測定できる位置に微調整した。テスト刺激は、最大応答の半分の応答が得られる強度に設定し、30 秒毎に与えた。テタヌス刺激はテスト刺激と同じ強さの電流で、100 Hz、100 発の刺激を与えた。その後、集合電位の振幅を 60 分間以上測定し、テタヌス刺激後 30~60 分の振幅の平均値を LTP magnitude として算出した。解析は、LTP 測定解析装置 (フルサワラボ・アプライアンス) を用いて解析した。

### 3-3 *in vitro* モデルの作成

10% ウシ胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 中で培養したヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y を使用した。高 glucose (HG) 処置として、DMEM 中に 100 mM glucose を曝露した。なお、対照群には、同濃度の mannitol を処置した。

### 3-4 タンパク質の発現解析

#### ① Western Blot 法

各処置後の脳部位および培養細胞は、RIPA buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2.5% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% Triton-X, complete™ mini 1 Tab] を用いて、細胞抽出液を作成した。Sample buffer [80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 3% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercapto ethanol, 0.2% bromophenol blue] を用いて SDS 化した後、5%~12.5% polyacrylamide gel を用いて電気泳動した。泳動終了後に Immobilon™-P Transfer Membrane (Millipore) に転写し、室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、TTBS で洗浄し、各種の一次抗体と 4°C で一晩反応させ、HRP で標識された二次抗体を室温で 1 時間反応させた。終了後、TTBS で洗浄し、

ECLにより発色させた。得られた各バンドは、scion image soft ware を用いて解析を行った。

#### ②免疫組織化学染色法（蛍光抗体法）

0.1 M Phosphate buffer、4.5 % sucrose を含む 4 % PFA で 30 分固定し、PBS で洗浄した後、0.4 % Triton-X-100 を含む PBS を用い 4 °C で一晩反応させた。その後 2 % 正常ヤギ血清を含む PBST (PBS + 0.1 % Triton X-100) を用い室温で 1 時間ブロッキングし、各種の一次抗体を 4 °C で一晩反応させた。一次抗体処置終了後、PBST で洗浄し、蛍光標識された二次抗体を 4 °C で一晩反応させた。その後、PBST で洗浄した後、カバーガラスに移し、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, LSM-510) を用いて観察を行った。

#### 4. 研究成果

はじめに、streptozotocin (STZ) 誘発 1 型糖尿病モデルマウス (糖尿病モデルマウス) を用いて、記憶形成の基礎過程と考えられているシナプス可塑性の一つである長期増強現象 (LTP) を測定したところ、これまでの報告と一致して、高血糖状態が 8 週間続いた糖尿病マウスの海馬では、著しい LTP の低下が認められた。そこで、スパインの構成タンパク質の変化について解析したところ、シナプス後部のマーカータンパク質の一つである post-synaptic density 95 (PSD-95) の発現が、時間依存的に低下する傾向が認められ、STZ 投与 8 週間後では、Control 群と比較して約 25% の発現低下が認められた (Fig. 1)。しかし、STZ 投与 8 週間後においても、顕著な海馬神経細胞の脱落や形態異常は認められなかった。同様に、小脳においても PSD-95 の発現は認められたが、海馬と異なり PSD-95 の発現レベルに差は認められなかった (Fig. 1)。

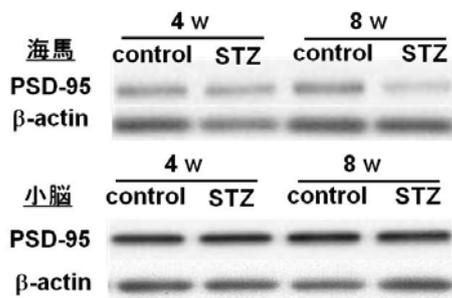


Fig.1 糖尿病マウス海馬および小脳の PSD-95 の発現変化

糖尿病モデルマウスの海馬で認められた PSD-95 の発現減少が、グルコース濃度の上昇によって生じるか否かを明らかにするため、SH-SY5Y を用いて検討を行った。高グルコース条件で培養した SH-SY5Y 細胞に

おいても、PSD-95 の発現は、時間依存的に低下した。これまでに、PSD-95 の発現は、calpain の異常活性化により減少することが報告されている。そこで、糖尿病モデルマウス海馬及び高グルコース条件で培養した SH-SY5Y 細胞における calpain の活性化の変化を、spectrin 等の calpain 基質の発現変化を Western blot 法により検討したが、calpain の活性化レベルに顕著な変化は認められなかった。また、高グルコース条件で培養した SH-SY5Y 細胞において認められた PSD-95 の発現低下は、SAC (1 mM) や市販の calpain 阻害薬である calpeptin (100 μM) の存在下でも抑制されなかった。以上の結果から、慢性的な高血糖が誘発する PSD-95 の発現低下には、calpain 異常活性化の関与は少ないことが示唆された。また、本研究では、これまでに、我々の研究グループが calpain の活性抑制作用を持つことが報告している S-allyl-L-cysteine (SAC) を基本骨格として、新たに 20 種類の誘導体を合成し、初代培養海馬神経細胞を用いて、これらの誘導体の持つ神経細胞保護効果について検討を行った。その結果、修飾基を組み合わせることで、SAC よりも強力な神経細胞死抑制作用を持つ誘導体の合成が可能であることも明らかとなった。

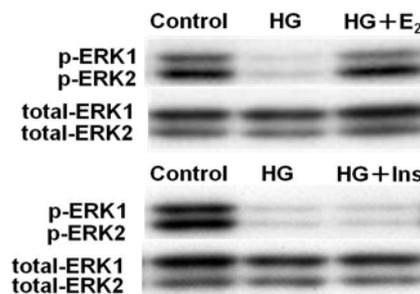


Fig.2 E2およびInsがリン酸化ERKの発現低下に及ぼす影響 (SH-SY5Y細胞)

さらに、本研究では、SH-SY5Y 細胞を用いて PSD-95 の発現調節に関与する分子の変化について解析を行った。その結果、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の一つである extracellular-regulated kinase (ERK) のリン酸化レベルが時間依存的に低下することが確認された。しかし c-Jun N-terminal kinase (JNK) および p38 のリン酸化レベルに顕著な変化は認められなかった。同様に、高グルコース条件で培養した糖尿病モデルマウスにおいても、ERK のリン酸化レベルの低下が認められ、その発現レベルは control 群に比べ約 30% 低下した。これに対して、小脳では、海馬と異なり、リン酸化 ERK の発現レベルに変化は

認められなかった。

最後に、STZ 誘発糖尿病モデルマウス及び SH-SY5Y を用いた実験から、高血糖（グルコース）状態の持続化により誘発される細胞内の ERK の活性化の抑制が、PSD-95 の発現低下に関与するか否かについて検討を行った。ERK の活性化作用を持つことが報告されている 17 $\beta$ -estradiol (E2) を、高グルコース処置した SH-SY5Y 細胞に処置したところ、高グルコース処置によるリン酸化 ERK や PSD-95 の発現減少は顕著に抑制された (Fig. 2)。一方、インスリン (Ins) やアルツハイマー型痴呆症の治療薬である Donepezil には、ERK の活性化作用や PSD-95 の発現低下抑制作用は認められなかった (Fig. 3)。また、E2 が PSD-95 の発現に及ぼす影響について、免疫組織化学的手法を用いた検討を行ったが、ここでも、E2 は高グルコース処置が誘発する PSD-95 の発現低下を顕著に抑制した。

以上の結果より、糖尿病で認められる中枢神経機能障害には、高グルコース（高血糖）状態の持続化による ERK の活性化レベルの低下が誘発するスパインの変性に重要な役割を演じていることが示唆された。

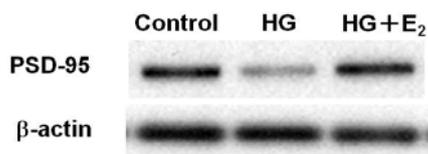


Fig.3 E2がPSD-95の発現低下に及ぼす影響 (SH-SY5Y細胞)

## 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)

Yasuhiro Kosuge, Kayo Sekikawa-Nishida, Hiroko Negi, Kumiko Ishige, Yoshihisa Ito  
Characterization of chronic glutamate-mediated motor neuron toxicity in organotypic spinal cord culture prepared from ALS model mice  
Neuroscience Letters, 2009, 454(2):165-169

〔学会発表〕 (計 1 件)

小菅康弘, 川島由樹, 山岡由佳, 山岸由佳, 宮岸寛子, 石毛久美子, 伊藤芳久  
ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウス海馬における細胞内シグナル伝達系の変化  
第 122 回日本薬理学会関東部会  
2010 年 6 月 5 日、静岡

〔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〕

<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/page.jsp?id=1384>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

小菅 康弘 (KOSUGE YASUHIRO)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：70383726

