

## 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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590942

研究課題名（和文）脳虚血後の神経細胞死と血管新生における CDK5 活性の役割とその制御機構

研究課題名（英文）The role of CDK5 activation in neuronal death and angiogenesis after ischemic stroke

研究代表者

永田 智香子（仁藤智香子）(NAGATA (NITO) CHIKAKO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30409172

研究成果の概要（和文）：マウス一過性局所脳虚血モデルを用い、虚血再灌流後の神経細胞障害や回復期の血管再生をはじめとする修復過程における Cdk5 の活性化およびそのメカニズムについて検討した。再灌流 6 時間後において、Cdk5 活性および p25/p35 の発現は上昇し、3 日後で低下するも 7 日後に再び上昇した。再灌流 1 日後では、p25/p35 は梗塞部の神経細胞に著明に発現し、3 日から 7 日後においては、梗塞辺縁部の微小血管に最も著明に発現した。Evans Blue leakage 法を用いた血液脳関門障害の評価では、再灌流 3 日後においてピークを認めた。Cdk5 は局所脳虚血後の神経細胞死のみならず、その回復期における angiogenesis に関与している可能性が示唆され、Cdk5 は antiangiogenic therapy のターゲットとなりうる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the role of Cdk 5 activation in neuronal death and angiogenesis in the brain after transient focal cerebral ischemia (tFCI). After reperfusion, both Cdk5 activation and p25/p35 expression were significantly increased at 6 h compared with the control and decreased the expression at 3 days and recovered at 7 days as detected by immunoblotting. p25/p35 was significantly upregulated in neurons in the ischemic area at 1 day and also upregulated in microvessels in the ischemic boundary zone from 3 to 7 days after reperfusion. Changes in BBB leakage indicated that BBB breakdown significantly increased 3 days after reperfusion. These findings suggest that Cdk 5 may be related to not only neuronal death but also angiogenesis after tFCI and can be a target for antiangiogenic therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
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：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：局所脳虚血・Cdk5・神経細胞死・血液脳関門障害・血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

サイクリン依存性キナーゼ (Cyclin-dependent kinases: Cdk5) は細胞周期進行に関わる最も重要な因子であるが、なかでも Cdk5 は分裂を停止した神経細胞でのみ活性化が検出される特異的な Cdk であり、活性化サブユニットである p35 によってその活性は制御されている。Cdk5 の異常活性化はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患における神経細胞死の要因と考えられ注目されており (Cuz JC *et al.*, *Trends Mol Med* 10:452-458, 2004; Smith PD *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13650-13655, 2003)、さらに脳虚血状態においてもアポトーシスや神経細胞死に直接的に関与していることが示されている (Wang J *et al.*, *Nat Neurosci* 6:1039-1047, 2003)。近年、Cdk5 の異常活性化がサブユニット p35 の p25 への限定分解によるものであることが示され、このより安定化された p25 が Cdk5 を death inducer へと変換し、アポトーシスや神経細胞死を誘導することがわかってきた。この為、神経細胞における p35/p25 の発現調節および Cdk5 異常活性化の抑制が、脳虚血の新しい治療戦略において重要なターゲットとなると考えられている (Jochen H *et al.*, *Mol Cell Neurosci* 24:489-502, 2003)。

一方、Cdk5 はオリゴデンドロサイトや血管内皮細胞での発現が知られ、その活性化が虚血後の神経細胞障害に対して保護的に働き、血管新生を促進し、神経再生においても重要な役割をもつ特に脳虚血においては、回復期の血管再生 (angiogenesis) をはじめとする修復過程で Cdk5 の活性化が必要とされているが、そのメカニズムについてはまだ解明され

ていない。

## 2. 研究の目的

我々は、げっ歯類の中大脳動脈を塞栓糸を用いて一定時間閉塞後に血流を再灌流させるモデルを作製し、神経細胞障害から血管新生などの脳機能修復に至るまでの全過程における Cdk5 活性の役割やその制御に関わる細胞シグナル伝達経路について *in vivo* にて検討する。さらに種々の Cdk5 阻害剤や Cdk5 siRNA 等の投与による神経細胞保護効果を確認、虚血再灌流障害に効果的な薬剤の選択と適切な投与時期を決定することで、Cdk5 活性を制御することによる新しい治療法の分子基盤を確立するマウス一過性局所脳虚血モデルを作製し、Cdk5 活性や Cdk5 活性化蛋白 p25/p35、VEGF 等の発現について、虚血直後の細胞障害およびその修復過程における経時変化や脳内における局在を検討した。

## 3. 研究の方法

マウスの中大脳動脈をナイロン糸を用いて一過性に閉塞後、再灌流し、6 時間、1 日、3 日、7 日後に断頭、虚血側大脳皮質を切り出し、Cdk5 活性や Cdk 活性化蛋白 (p35/p25) 発現の経時変化や脳内における局在の変化はウェスタンブロット法、キナーゼアッセイ、免疫組織化学法等で調べる。神経細胞死やアポトーシスの評価は主に TUNEL 法を用いて行い、血管新生については MMP-2 や VEGF などの血管新生因子の発現や変化で評価した。Blood-brain barrier (BBB) の評価には Evans Blue 法を、脳梗塞体積の測定には TTC 染色法を用いる。さらに、種々の Cdk5 阻害剤または Cdk5 siRNA の脳室内投与による、脳内 Cdk5

活性、p35/p25 蛋白発現量の変化や、虚血性神経細胞障害やその修復過程に及ぼす影響を調べ、その投与時期の違いによる神経細胞保護効果について検討した。また、p-tau, p53, GSK-3 $\beta$ , c-jun などの細胞内シグナルの Cdk5 における関与についても検討する。

#### 4. 研究成果

虚血再灌流後 6 時間において、虚血側脳における Cdk5 活性は上昇し、3 日後で低下するも 7 日後では再び上昇した。p25/p35 蛋白の発現も Cdk5 活性と同様に、再灌流後 6 時間でその発現が上昇し、3 日後で低下したが 7 日後では再び上昇を認めた。また、二重免疫染色の結果では、再灌流 1 日後において、p25/p35 蛋白は梗塞部の神経細胞に著明に発現しており、それは TUNEL 染色陽性細胞に局在していた。再灌流 3 日から 7 日後においては、p25/p35 蛋白は梗塞辺縁部の微小血管に最も著明に発現していた。同時に VEGF 蛋白発現も再灌流 3 日から 7 日後において有意に上昇していた。Evans Blue 法では、虚血再灌流 3 日後において、虚血側脳における Evans Blue leakage のピークを認めた。

これらのことより、Cdk5 は局所脳虚血後の神経細胞死のみならず、その回復期における angiogenesis に関与していることが示唆され、Cdk5 は antiangiogenic therapy のターゲットであり、Cdk5 阻害剤は antiangiogenic agent として新しい脳梗塞治療の基盤となりうると考えられた。

#### 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 2 件)

(1) Nito C, Kamada H, Endo H, Narasimhan

P, Lee Y-S, Chan PH. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Expression of the Water Channel Protein Aquaporin-4 after Ischemia in Rat Cortical Astrocytes. *J Neurotrauma* 29, 2404-12 (2012)

(2) Nito C, Ueda M, Inaba T, Katsura K, Katayama Y: FK506 ameliorates oxidative damage and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia. *Neuro Res.* 33, 881-9 (2011)

(3) Nito C, Katayama Y: Neuroprotective Effect of an Antioxidant in Ischemic Stroke: Involvement of Neuronal Death Signaling and Blood-brain Barrier Disruption. *J Nippon Med Sch.* 78, 60-62 (2011)

[学会発表] (計 4 件)

(1) Nito C, Inaba T, Ueda M, Saito T, Katayama Y: Neuroprotective effects of nicergoline against brain damage in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. *42nd Annual Meeting of Society for Neuroscience* (New Orleans, USA), 2012.10

(2) Saito T, Nito C, Ueda M, Inaba T, Kamiya F, Katayama Y: The neuroprotective effects of Post-treatment with atorvastatin reduces inflammatory responses and protects rat brain after transient focal ischemia. *42nd Annual Meeting of Society for Neuroscience* (New Orleans, USA), 2012.10

(3) Nito C, Ueda M, Inaba T, Okubo S, Nomur K, Kamiya F, Ohta S, Katayama Y: Combination therapy with edaravone and mild hypothermia prevents MMP-9

activation and neurovascular injury after focal cerebral ischemia in rats. *The 25th Internal Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function* (Barcelona, Spain), 2001. 5.

(4) Nito C, Ueda M, Inaba T, Nomura K, Katayama Y: A free radical scavenger combined with mild hypothermia attenuates ischemic brain damage by suppressing matrix metalloproteinase 9. *40th Annual Meeting of Society for Neuroscience* (San Diego, USA), 2010. 11.

〔図書〕（計1件）

仁藤智香子、片山泰朗： Therapeutic Window を広げる 時間を止める：t-PAと脳保護薬の併用の可能性. **分子脳血管病** 第10巻第1号 31-36、先端医学社 2010年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永田 智香子（仁藤智香子）

(NAGATA NITO CHIKAKO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30409172