

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592081

研究課題名(和文) グリアの神経成長因子発現制御に基づいた脳血管障害の新規治療法開発にむけた基礎検討

研究課題名(英文) A new approach for the treatment of cerebrovascular diseases based on the regulation of nerve growth factor in glial cells

研究代表者

吉田 秀見 (Yoshida, Hidemi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40201008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：エダラボン(脳卒中急性期の脳保護薬)とカルノシン酸(ローズマリー精油等に含まれるジテルペノイド)は、培養ヒトアストロサイトの神経成長因子NGFの発現を協調的に亢進させることを明らかにした。この協調効果は低酸素及び再酸素曝露下においても有効であった。

カルノシン酸は、培養SH-SY5Yヒト神経芽腫細胞及びヒトアストロサイトにおいて、認知症の原因分子の一つであるアミロイド(A $\beta$ )ペプチドの産生を抑制することを発見した。このA $\beta$ 産生の抑制は低酸素及び再酸素曝露下のアストロサイトでも認められた。

以上の成果は、脳血管障害の予後改善とアルツハイマー型認知症の予防の二面に同時につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that edaravone (a brain-penetrant free radical scavenger used for the patients with the acute phase of stroke) and carnosic acid (CA), a phenolic diterpene compound found in the labiate herbs rosemary and sage, synergistically enhances the expression of nerve growth factor (NGF) in cultured human astrocytes under not only normoxia but also hypoxia or reoxygenation.

Also, we found that CA suppresses the production of amyloid-beta peptides (Abeta, a group of dementia-causing molecules) 1-42 (and also Abeta 1-43 in astrocytes) in cultured SH-SY5Y human neuroblastoma cells and human U373MG astrocytoma cells. The inhibitory effect of CA was effective in astrocytes even under hypoxia/reoxygenation.

These results may be simultaneously connected with development of the both methods for the amelioration of postischemic neuronal dysfunction in cerebrovascular diseases and the prevention of Abeta-mediated diseases, particularly Alzheimer's disease.

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：脳血管障害 アストロサイト NGF エダラボン カルノシン酸 ニューロン アミロイド セクレターゼ

1. 研究開始当初の背景

- (1) 根治法のない難治性脳疾患への対策は、高齢化が進む日本社会にとって極めて重要な課題である。脳血管障害（脳卒中）は脳疾患のなかでも発症頻度が高く、後遺症のもたらす運動・高次機能障害等の影響が介護者をも巻き込む点で深刻さを増しつつある。
- (2) 脳梗塞急性期における血栓溶解薬 tPA の治療ウィンドウが現在の発症後 3 時間以内から 4.5 時間以内に拡大される状況になれば、より多くの患者が治療対象になり、脳虚血・再灌流後の適切な対処がますます重要になると考えられる。
- (3) 日本で脳梗塞急性期の脳保護薬として承認されている薬剤は、2001 年 6 月からのフリーラジカル消去剤エダラボン（図 1 左）だけであり、臨床病型を問わない基礎治療薬として広く使用されている。

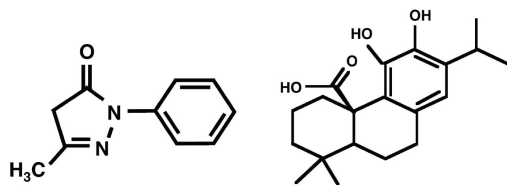


図1. エダラボン(左)とカルノシン酸(右)の構造式

- (4) 虚血・低酸素で誘導された血管内皮増殖因子 VEGF の過剰発現は脳浮腫の拡大をもたらす。研究代表者らは、中枢神経系グリアの最多細胞であるアストロサイトの培養系において、エダラボンが VEGF の発現を中等度に抑制することを明らかにした (Ishikawa と Yoshida ら, Neurosci Res 2007)。また、低酸素・再酸素化培養アストロサイトにおいて、エダラボンが神経成長因子 NGF の発現を誘導することを明らかにした (Yoshida ら, Neurosci Res 2010)。
- (5) ローズマリーやサージ精油由来のジテルペノイドであるカルノシン酸(図 1 右)は、アストロサイトの NGF 合成を促進させることがすでに知られている (Kosaka ら, Biol Pharm Bull 2003)。
- (6) 活性酸素種や過酸化脂質をストレス源とする神経細胞機能の傷害を軽減するためにも、ストレス源の除去とともに神経栄養因子の供給が欠かせない。
- (7) グリアの神経栄養因子群の内因性発現を効果的に高めることは脳血管障害発症後における神経機能傷害の回避・軽減につながり、ひいては、神経変性疾患などの難治性脳疾患のより広く新しい治療戦略にもつながる可能性がある。さらにそれは、将来的に胚性幹細胞 (ES 細胞) や新型万能細胞 (iPS 細胞) による脳疾患治療が行われる際にもその一助になるものと考えられる。

2. 研究の目的

- (1) グリア細胞における神経栄養因子の内因性発現に対して、合成脳保護薬とともに協

調的亢進作用をもつ天然有機化合物について、その効能の評価と機序の解明を目的とする。

- (2) 当該化合物が、アルツハイマー病などの神経変性疾患の治療戦略に関わるセクレターゼなどの遺伝子制御候補になる可能性を探る。

3. 研究の方法

- (1) 培養ヒト中枢神経系細胞として、正常アストロサイト、T98G グリオblastoma 細胞株、U373MG アストロサイトマ細胞株、SY-SY5Y ニューロblastoma 細胞株を用いた。(雑誌論文欄 及び 、 、 )
- (2) 培養細胞における神経栄養因子発現誘導因子の検索・解析、並びに、セクレターゼなどの神経変性疾患関連遺伝子の解析のために、定量 PCR 法やウェスタンブロット法を用いた。(雑誌論文欄 及び 、 、 )
- (3) タンパク質リン酸化経路 (MAPK など) や Nrf2 経路など、ストレス誘導遺伝子発現機構に関連する諸経路の関与を検討するために、特異的阻害剤や RNA 干渉法を用いた。(雑誌論文欄 及び 、 、 )

4. 研究成果

- (1) エダラボンとカルノシン酸は培養ヒトアストロサイトの神経成長因子 NGF 発現誘導を協調的に亢進させることを明らかにした。その協調効果は低酸素及び再酸素曝露下においても認められた。その際、酸化還元感受性転写因子 Nrf2 の核内蓄積が必要であると同時に、Nrf2 蓄積に一部分が関与していたリン酸化酵素 JNK のリン酸化や、Nrf2 蓄積とは独立のリン酸化酵素 MEK のリン酸化が部分的に関与する機構を明らかにした。(図 2 : 雑誌論文欄 及び )

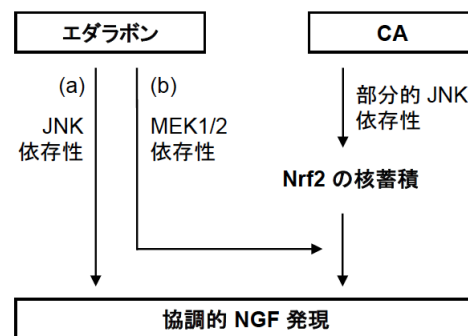


図2. エダラボンとカルノシン酸(CA)による協調的 NGF 発現機構(仮説)

- (a) JNK 依存的活性化、並びに、NGF mRNA 安定化などによる転写後活性化、(b) Nrf2 核蓄積後の MEK1/2 依存的活性化

- (2) カルノシン酸の未知の抗神経変性機能を検討したところ、認知症の原因分子として最有力とされるアミロイド (A $\beta$ ) ペプチドの産生(分泌)を、培養 SH-SY5Y ヒト神経

芽腫細胞において抑制することを発見した。検討した A の分子種は A 1-40 及び A 1-42 である。この抑制には Nrf2 は介在せず、カルノシン酸により誘導された セクレターゼが、アミロイド前駆体タンパク質の切断を促進していた。特に、セクレターゼのなかでも TACE (別名 ADAM17) が重要な役割を担っていることを明らかにした。(図 3 : 雑誌論文欄 )

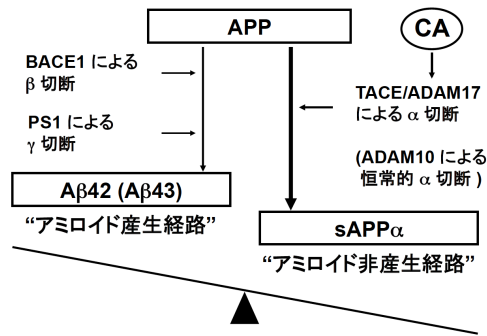


図3. アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 切断経路におけるカルノシン酸 (CA) の役割

(3) カルノシン酸による A 産生抑制機構がグリアの最多細胞であるアストロサイトににおいても機能していることを明らかにした。しかも、この効果は低酸素及び再酸素曝露下においても認められた。近年、高毒性が判明した A 1-43 に対しても有効であることがわかった。(図 4 : 雑誌論文欄 )

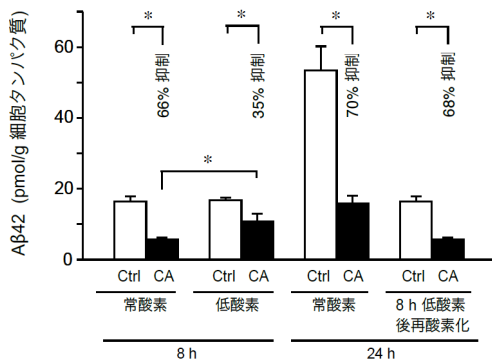


図4. 低酸素・再酸素化培養アストロサイトにおけるカルノシン酸 (CA) による Aβ 産生の抑制

(4) 以上の細胞レベルの検討結果から、カルノシン酸及びその類似構造化合物と既存の脳保護剤エダラボンを併用的に応用することにより、脳内でより効果的な神経保護・維持機能を引き出すことができる可能性に加え、認知症を予防する内在機能を促進することができる可能性も示唆された。つまり、脳血管障害の予後改善とアルツハイマー型認知症の予防の二面に同時につながる基礎知見が得られた。

## 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 23 件)

Yoshida H, Meng P, Matsumiya T, Tanji K, Hayakari R, Xing F, Wang L, Tsuruga K, Tanaka H, Mimura J, Kosaka K, Itoh K, Takahashi I, Imaizumi T, Carnosic acid suppresses the production of amyloid-1-42 and 1-43 by inducing an -secretase TACE/ADAM17 in U373MG human astrocytoma cells, *Neurosci Res*, 査読有, 2014; 79: 83-93, DOI: 10.1016/j.neures.2013.11.004.

Imaizumi T, Numata A, Yano C, Yoshida H, Meng P, Hayakari R, Xing F, Wang L, Matsumiya T, Tanji K, Tatsuta T, Murakami M, Tanaka H, ISG54 and ISG56 are induced by TLR3 signaling in U373MG human astrocytoma cells: possible involvement in CXCL10 expression, *Neurosci Res*, 2014; pii: S0168-0102(14)00037-6, DOI: 10.1016/j.neures.2014.03.001.

Imaizumi T, Aizawa T, Hayakari R, Xing F, Meng P, Tsuruga K, Matsumiya T, Yoshida H, Wang L, Tatsuta T, Tanaka H, Tumor necrosis factor-synergistically enhances polyinosinic-polycytidylic acid-induced toll-like receptor 3 signaling in cultured normal human mesangial cells: possible involvement in the pathogenesis of lupus nephritis, *Clin Exp Nephrol*. 査読有, 2014 Mar 14 [Epub ahead of print], PMID: 24627031, <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10157-014-0956-3>.

Matsumiya T, Hayakari R, Narita N, Ito R, Kon T, Kubota K, Sakaki H, Yoshida H, Imaizumi T, Kobayashi W, Kimura H, Role of type I- and type II-interferon in expression of melanoma differentiation-associated gene-5 in HSC-3 oral squamous carcinoma cells, *Biomed Res*, 査読有, 2014; 35(1): 9-16, PMID: 24573197,

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/35/1/35\\_9/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/35/1/35_9/_article).

Aizawa T, Imaizumi T, Tsuruga K, Watanabe S, Chiba Y, Matsumiya T, Yoshida H, Tanaka H, Mizoribine selectively attenuates monocyte chemoattractant protein-1 production in cultured human glomerular mesangial cell: a possible benefit of its use in the treatment of lupus nephritis, *Nephrology (Carlton)*, 査読有, 2014; 19(1): 47-52, DOI: 10.1111/nep.12171. Watanabe S, Imaizumi T, Tsuruga K, Aizawa T, Ito T, Matsumiya T, Yoshida H, Joh K, Ito E, Tanaka H, Glomerular expression of myxovirus resistance

protein 1 in human mesangial cells: possible activation of innate immunity in the pathogenesis of lupus nephritis, *Nephrology (Carlton)*, 査読有, 2013; 18(12): 833-837, DOI: 10.1111/nep.12155.

Aizawa T, Imaizumi T, Tsuruga K, Watanabe S, Yoshida H, Kumagai N, Ito E, Tanaka H, Urinary fractalkine and monocyte chemoattractant protein-1 as possible predictors of disease activity of childhood

glomerulonephritis, *Tohoku J Exp Med*, 査読有, 2013; 231(4): 265-270, PMID: 24284376,

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/231/4/231\\_265/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/231/4/231_265/_article).

Matsumiya T, Xing F, Ebina M, Hayakari R, Imaizumi T, Yoshida H, Kikuchi H, Topham MK, Satoh K, Stafforini DM, Novel role for molecular transporter importin 9 in posttranscriptional regulation of IFN- expression, *J Immunol*, 査読有, 2013; 191(4): 1907-1915, DOI: 10.4049/jimmunol.1201925.

Imaizumi T, Murakami K, Ohta K, Seki H, Matsumiya T, Meng P, Hayakari R, Xing F, Aizawa-Yashiro T, Tatsuta T, Yoshida H, Kijima H, MDA5 and ISG56 mediate CXCL10 expression induced by toll-like receptor 4 activation in U373MG human astrocytoma cells, *Neurosci Res*, 査読有, 2013; 76(4): 195-206, DOI: 10.1016/j.neures.2013.05.002.

Imaizumi T, Aizawa-Yashiro T, Watanabe S, Matsumiya T, Yoshida H, Tatsuta T, Xing F, Meng P, Hayakari R, Tsuruga K, Tanaka H, TLR4 signaling induces retinoic acid-inducible gene-1 and melanoma differentiation-associated gene 5 in mesangial cells, *J Nephrol*, 査読有, 2013; 26(5): 886-893, DOI: 10.5301/jn.5000254.

Imaizumi T, Aizawa-Yashiro T, Matsumiya T, Yoshida H, Watanabe S, Tsuruga K, Tatsuta T, Xing F, Hayakari R, Meng P, Tanaka H, Interaction between interferon-stimulated gene 56 and melanoma

differentiation-associated gene 5 in Toll-like receptor 3 signaling in normal human mesangial cells, *Am J Nephrol*, 査読有, 2013; 37(2): 118-125, DOI: 10.1159/000346415.

Meng P, Yoshida H, Matsumiya T, Imaizumi T, Tanji K, Xing F, Hayakari R, Dempoya J, Tatsuta T, Aizawa-Yashiro T, Mimura J, Kosaka K, Itoh K, Satoh K, Carnosic acid suppresses the

production of amyloid- 1-42 by inducing the metalloprotease gene TACE/ADAM17 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, *Neurosci Res*, 査読有, 2013; 75(2): 94-102, DOI: 10.1016/j.neures.2012.11.007.

Aizawa-Yashiro T, Imaizumi T, Tsuruga K, Watanabe S, Matsumiya T, Hayakari R, Yoshida H, Satoh K, Ito E, Tanaka H, Glomerular expression of fractalkine is induced by

polyinosinic-polycytidylic acid in human mesangial cells: possible involvement of fractalkine after viral infection, *Pediatr Res*, 査読有, 2013; 73(2): 180-186, DOI: 10.1038/pr.2012.165.

Xing F, Matsumiya T, Onomoto K, Hayakari R, Imaizumi T, Yoshida H, Yoneyama M, Fujita T, Satoh K, Foreign RNA induces the degradation of mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS): the role of intracellular antiviral factors. *PLoS One*, 査読有, 2012; 7(9): e45136, DOI: 10.1371/journal.pone.0045136.

Hayakari R, Matsumiya T, Xing F, Tayone JC, Dempoya J, Tatsuta T, Aizawa-Yashiro T, Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K, Effects of Brazilian green propolis on double-stranded RNA-mediated induction of interferon-inducible gene and inhibition of recruitment of polymorphonuclear cells, *J Sci Food Agric*, 査読有, 2013; 93(3): 646-651, DOI: 10.1002/jsfa.5892.

Dempoya J, Matsumiya T, Imaizumi T, Hayakari R, Xing F, Yoshida H, Okumura K, Satoh K, Double-stranded RNA induces biphasic STAT1 phosphorylation by both type I interferon (IFN)-dependent and type I IFN-independent pathways, *J Virol*, 査読有, 2012; 86(23): 12760-12769. DOI: 10.1128/JVI.01881-12.

Imaizumi T, Aizawa-Yashiro T, Tsuruga K, Tanaka H, Matsumiya T, Yoshida H, Tatsuta T, Xing F, Hayakari R, Satoh K, Melanoma differentiation-associated gene 5 regulates the expression of a chemokine CXCL10 in human mesangial cells: implications for chronic inflammatory renal diseases, *Tohoku J Exp Med*, 査読有, 2012; 228(1):17-26, PMID: 22892369,

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/228/1/228\\_17/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/228/1/228_17/_article).

Tatsuta T, Imaizumi T, Shimoyama T, Sawaya M, Kunikazu T, Matsumiya T,

Yoshida H, Satoh K, Fukuda S, Expression of melanoma differentiation associated gene 5 is increased in human gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*, *J Clin Pathol*, 査読有, 2012; 65(9): 839-843. DOI: 10.1136/jclinpath-2011-200590.

Yoshida H, Mimura J, Imaizumi T, Matsumiya T, Ishikawa A, Metoki N, Tanji K, Ota K, Hayakari R, Kosaka K, Itoh K, Satoh K, Edaravone and carnosic acid synergistically enhance the expression of nerve growth factor in human astrocytes under hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Res*, 査読有, 2011; 69(4): 291-298. DOI: 10.1016/j.neures.2010.12.016.

Mimura J, Kosaka K, Maruyama A, Satoh T, Harada N, Yoshida H, Satoh K, Yamamoto M, Itoh K, Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes, *J Biochem*, 査読有, 2011; 150(2): 209-217, DOI: 10.1093/jb/mvr065.

⑳ Tsuruga K, Watanabe S, Oki E, Aizawa-Yashiro T, Yoshida H, Imaizumi T, Ito E, Tanaka H, Imbalance towards Th1 pathway predominance in purpura nephritis with proteinuria, *Pediatr Nephrol*, 査読有, 2011; 26(12): 2253-2258. DOI: 10.1007/s00467-011-1996-5.

㉑ Imaizumi T, Tanaka H, Mechti N, Matsumiya T, Yoshida H, Sato F, Aizawa-Yashiro T, Tsuruga K, Hayakari R, Satoh K, Polyinosinic-polycytidylic acid induces the expression of interferon-stimulated gene 20 in mesangial cells, *Nephron Exp Nephrol*, 査読有, 2011; 119(2): e40-e48. DOI: 10.1159/000328923.

㉒ Imaizumi T, Sato F, Tanaka H, Matsumiya T, Yoshida H, Yashiro-Aizawa T, Tsuruga K, Hayakari R, Kijima H, Satoh K, Basic-helix-loop-helix transcription factor DEC2 constitutes negative feedback loop in IFN- $\gamma$ -mediated inflammatory responses in human mesangial cells, *Immunol Lett*, 査読有, 2011; 136(1): 37-43, DOI: 10.1016/j.imlet.2010.11.009.

〔学会発表〕(計2件)

孟鵬飛、吉田秀見、丹治邦和、松宮朋穂、邢飛、早狩亮、三村純正、伊東健、今泉忠淳、カルノシン酸はアミロイドによる神経系細胞のアポトーシス経路活性化を抑制する、第151回弘前医学会例会、2014年1月31日、弘前大学医学部コミュニケ

ーションセンター(青森県弘前市)  
孟鵬飛、吉田秀見、松宮朋穂、今泉忠淳、丹治邦和、邢飛、早狩亮、三村純正、伊東健、カルノシン酸は培養ヒト神経芽腫細胞のアミロイド(1-42)分泌を抑制する、第150回弘前医学会例会、2013年1月25日、弘前大学医学部コミュニケーションセンター(青森県弘前市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://vascularbiology.web.fc2.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 秀見 (YOSHIDA, Hidemi)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40201008