

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860058

研究課題名(和文) ドパミン神経系と神経免疫系を制御するERMタンパク質からの創薬基盤の創出

研究課題名(英文) Study on drug discovery in the central nervous system targeting ERM protein

研究代表者

位田 雅俊 (Inden, Masatoshi)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70512424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ERMタンパク質を標的とした新しい創薬基盤の創出を目的としている。Moesin (Msn)が、ミクログリアにおいて炎症性サイトカイン tumor necrosis factor の放出機構およびERM binding protein 50 (EBP50)を介して誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)と相互作用することを見出した。また、MsnノックダウンしたBV2細胞では、ファゴサイトーシス能が低下することを明らかにした。さらに、Msnノックアウトマウスにおいて、LPS投与によるミクログリアの活性化が減弱した。以上の結果より、Msnを標的とした創薬研究の基盤になる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Moesin (Msn), a member of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) proteins links between membrane proteins and actin cytoskeleton, and contributes to maintenance of cellular function and morphology. In this study, we examined the function of Msn in microglia. We found that Msn was involved in the release mechanism of tumor necrosis factor in BV2 cells. In addition, Msn interacted with inducible nitric oxide synthase (iNOS) via ERM binding protein 50 (EBP 50). It was also revealed that the phagocytosis ability of BV2 cells knocked down by Msn was decreased due to the abnormal actin skeleton. Furthermore, activation of microglia by administration of LPS was attenuated in Msn knockout mice. These results suggest that it may be the foundation of drug discovery research for microglia targeting Msn.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ERMタンパク質 ミクログリア 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) の主要変性部位は黒質-線条体ドパミン神経系である。黒質に分布しているドパミン神経細胞が変性・脱落することで、投射先である線条体でドパミン枯渇に伴う受容体刺激の顕著な低下のために、四大臨床症候を特徴とする運動障害が引き起こる。PD 治療薬には、ゴールドスタンダードと位置づけられる L-DOPA をはじめ、複数使用されているが、そのすべてが対症療法薬である。しかも、慢性的に L-DOPA を 4 年間以上服用すると約 40% の患者に重度な副作用が生じる。この副作用の発現の一因として、ドパミン受容体伝達の異常や、過度なドパミン神経細胞死、ミクログリアの慢性的な炎症などが想定されている。しかし、未だ発症機序は不明のままであり、著しく患者の Quality of life を低下させる。一方で、運動障害だけに留まらず、うつや認知機能の低下などを含む非運動症状も深刻な課題である。

スキャホールドタンパク質は、細胞内情報伝達系において、複数の情報伝達や細胞骨格関連タンパク質と結合して、シグナル伝達複合体を形成する足場となり、発現する細胞の活性を制御することで脳内環境の変化に対応している。申請者は、PD 病態において主要変性部位だけではなく、海馬においてもスキャホールドタンパク質であるエズリン (Ezr)、ラディキシン (Rdx)、モエシン (Msn) を含む ERM タンパク質のうち、空間認知機能の低下に伴い Ezr のみが上昇していることを明らかにした (Matsumoto *et al*, *Biol Pharm Bull*. 2011; 34: 1753-1758)。また、平成 24-25 年度科学研究費補助金 (若手 B) により、PD モデルの海馬において、ドパミン神経変性により PD 原因遺伝子 *LRRK2* 活性化による過剰なリン酸化 Ezr が、結果的に空間認知機能の低下に繋がる可能性を明らかにした (投稿準備中)。即ち、ドパミンシグナルの制御に ERM タンパク質が関与することを示しているが、PD 病態の黒質-線条体系ドパミン神経系における ERM タンパク質の役割は不明である。さらに、神経毒 MPTP で作成した PD モデルマウスの黒質では、活性化ミクログリアにおいてリン酸化 ERM が増加していた。過剰なミクログリアの活性化はドパミン神経細胞死に密接に関与する。このことから、ERM タンパク質は脳部位、細胞、脳内環境において特異的に機能していることが予想できる。近年の報告で、P2Y7 受容体を介して ERM タンパク質の活性制御に関する論文が報告された。活性化したミクログリアや PD 患者脳の変性部位において P2Y7 受容体の発現増加も知られる。以上より、PD 病態脳においてそれぞれの ERM タンパク質は、特異的に細胞ごとに機能し、ドパミン神経系そのものの制御だけではなく、脳環境を規定するミクログリアの活性化をも制御するという仮説を推測させた。以上の背景のもと、本研究を実施した。

2. 研究の目的

PD 病態における黒質-線条体ドパミン神経系とミクログリアにおける ERM タンパク質の役割を明らかにし、副作用のない治療薬、ミクログリアを標的としたドパミン神経保護薬の創薬研究の基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) PD モデルマウスの作製

C57BL/6 マウスに、20 mg/kg body weight の用量で 2 時間おきに 4 回腹腔内投与する。免疫組織学的検討のため、最終投与 3 日目に灌流固定を行った。また、生化学的解析のため、最終投与 3 日目にマウスを頸椎脱臼により致死させ速やかに脳を摘出した。摘出した脳から各部位を分離し、湿重量を測定した。湿重量の 10 倍量の 1 mM EGTA、1 mM EDTA、320 mM Sucrose、1×プロテアーゼ阻害剤 (nacalai tesque)、1×ホスファターゼ阻害剤 (nacalai tesque) を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジナイズした。懸濁液を 800×g、4 °C で 10 分間遠心し、上清と沈殿した核画分とに分離した。そして再び上清を 18,000×g、4 °C で 20 分間遠心し、上清の細胞質画分と沈殿の膜画分とに分離した。本実験では細胞質画分を使用した。

(2) 免疫組織学的検討

蛍光二重免疫染色には、ウサギ抗 Iba1 抗体、マウス抗 ERM 抗体を用いた。その後二次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体および Alexa Fluor 546 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。標識した蛍光を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss) を用いて観察した。

(3) 生化学的検討

タンパク質を 7.5 % ポリアクリルアミドゲルにて 40 mA で 60 分間 SDS-PAGE 後、転写緩衝液 (25 mM Tris、192 mM glycine、20 % methanol、0.02 % SDS) 中で、PVDF 膜 (MILLIPORE) に 4 °C、100 V で 90 分間転写した。その後、PVDF 膜は 5 % スキムミルクおよび 0.05 % Tween20 を含む トリス塩酸緩衝化生理食塩水 (10 mM Tris、150mM NaCl、pH 8.0) で 1 時間反応させ、非特異結合を防止した。そして一次抗体として、抗 TH 抗体、抗 p-ERM 抗体、抗 ERM 抗体、抗 Ezrin 抗体、抗 Radixin 抗体、および抗 Moesin 抗体を用いて室温で 1 時間反応させた。二次抗体にはそれぞれヤギ抗マウス抗体、ヤギ抗ウサギ抗体を用いて 30 分間反応させた。タンパク質の検出には ECL (Enhanced chemiluminescent) キット (GE healthcare) を用いた。定量解析は ImageJ 画像処理ソフトウェアを用いて行った。

培養液中の TNF α および NO は、ELISA 法および Griess 法により測定した。

(4) 細胞培養

BV2 細胞は常法により培養した。ERM 遺伝子および EBP50 のノックダウンには、siGENOME SMARTpool siRNA を用いて常法に従って行った。

(5) 免疫細胞染色

4% PFA/PBS 溶液を用いて 30 分間固定した後、PBS-Glycine 溶液で洗浄した。次に 0.1% TritonX-100 溶液および 10% BSA 溶液をそれぞれ 15 分間インキュベートし、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。一次抗体は抗アクチン抗体、抗 p-ERM 抗体、抗 ERM 抗体、抗 Ezrin 抗体、抗 Radixin 抗体、および抗 Moesin 抗体、抗 Iba1 抗体を用いて、二次抗体は Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体および Alexa Fluor 546 標識抗ウサギ IgG 抗体で検出した。

ファゴサイトーシス能は、Phagocytosis Assay Kit (Cayman Chemical) によって評価した。

(6) 統計学的解析

実験結果は平均値 ± 標準誤差 (standard error of mean, SEM) で表示した。比較群と対照群の有意差検定には、分散分析法 (analysis of variance, ANOVA) を用い、後検定には Bonferroni/Dunn 検定法を行った。危険率は、統計学的に 5 %未満を有意差があると判定した。

4. 研究成果

ドパミン神経毒である 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジンを C57BL/6 マウスに投与したものを、PD モデルマウスとして使用した。MPTP は、脳内のアストロサイトに取り込まれ、モノアミン酸化酵素 MAO-B により酸化されて MPP⁺ となる。MPP⁺ はドパミントランスポーターを介してドパミン神経細胞に選択的に取り込まれミトコンドリアの電子伝達系の複合体 I を阻害し、ATP 合成を障害することによりドパミン神経細胞死を引き起こす。また、投与方法に、急性投与方法と慢性投与方法があり、急性投与方法では、ミクログリアの活性化を黒質や線条体で観察することが出来る。MPTP を急性投与した PD モデルマウスにおいて、障害された黒質ドパミン神経細胞の近傍に現れる活性化ミクログリアが強くリン酸化 ERM タンパク質を共発現していたことを免疫染色法で確認した。また、ウェスタンブロット法により、PD モデルマウスの黒質において、リン酸化 ERM タンパク質の増加を確認した。より詳細に検討するために、マウスミクログリア細胞株 BV2 細胞を用いて解析した。まず、BV2 細胞における Ezr、Rdx、Msn の構成比を検討したところ、Ezr : Rdx : Msn はおおそよ 1 : 1 : 5 であった。リポポリサッカライド (LPS) による活性化した BV2 細胞において、LPS 濃度依存的に ERM タンパク質のリン酸化 ERM タンパク

質の増加が認められた。また、LPS により活性化した BV2 細胞は炎症性サイトカインを放出することがよく知られている。ERM タンパク質は、アクチンフィラメントや細胞膜と相互作用する細胞骨格関連タンパク質である。そこで、炎症性サイトカインの 1 つである TNF α に着目した。対照群と比較して LPS 刺激 4 時間後の Msn をノックダウンさせた BV2 細胞 (Msn-KD) のみ、培養液中の TNF α が有意に減少していた。Ezn-KD および Rdx-KD BV2 細胞ではそのような減少は観察されなかった。一方で、Msn-KD BV2 細胞において、TNF α の遺伝子発現量は変化しなかった。従って、Msn は LPS 刺激の早期における TNF α の放出機構に関与することを明らかにした。さらに、TNF α の放出に関係するとの報告があるリサイクルエンドソームのマーカー・Rab11 に着目した。Duolink In Situ PLA システムにより、Msn と Rab11 の相互作用が LPS により活性化した BV2 細胞において確認できた。以上は、Msn と Rab11 の相互作用が TNF α の放出に関係する可能性を示唆する。

また、Msn-KD BV2 細胞において、LPS を 24 時間処置したところ、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現が有意に減少し、培養液に含まれる一酸化窒素 (NO) 量が有意に減少することを見出した。免疫沈降法などにより、直接的に Msn は iNOS に結合しないことを見出した。そこで、ERM binding protein 50 (EBP50) に着目した。EBP50 を一過性にノックダウンした BV2 細胞において LPS を 24 時間処置したところ、iNOS の発現が有意に減少した。また、免疫沈降法などにより、Msn は EBP50 を介して iNOS と相互作用することを見出した。これらにより、Msn を介した iNOS の制御機構の一端を解明することができた。さらに、Msn-KD BV2 細胞では、アクチン骨格の異常により、ファゴサイトーシス能が低下することを明らかにした。また、Msn ノックアウトマウスにおいて、野生型マウスと比較して、LPS 腹腔内投与によるミクログリアの活性化が減弱した。以上の結果は、Msn を標的とした創薬研究の基盤になる可能性がある。

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 Masatoshi Inden, Kazuyuki Takata, Daijiro Yanagisawa, Eishi Ashihara, Ikuo Tooyama, Shun Shimohama, Yoshihisa Kitamura. α 4 Nicotinic acetylcholine receptor modulated by galantamine on nigrostriatal terminals regulates dopamine receptor-mediated rotational behavior. *Neurochem. Int.* 94: 74-81 (2016). doi: 10.1016/j.neuint.2016.02.008. 査読有

② Yosuke Matsumoto, Masatoshi Inden,

Atsushi Tamura, Ryo Hatano, Sachiko Tsukita, Shinji Asano. Ezrin mediates neuritogenesis via down-regulation of RhoA activity in cultured cortical neurons. *PLoS One* 9: e105435 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0105435. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

①Nanami Nikaidou, Haruka Abe, Masatoshi Inden, Hisaka Kurita, Isao Hozumi Role of the ERM family in the microglial iNOS expression. 第7回 名古屋・南京・瀋陽 薬学学術シンポジウム (2016年9月24日 名古屋 名城大学)

②阿部春果、位田雅俊、二階堂七海、栗田尚佳、保住 功 ミクログリアの iNOS 発現における ERM ファミリーの役割 日本薬学会第136年会 (2016年3月26日~29日 横浜)

③内田泰弘、位田雅俊、名嘉優熙、栗田尚佳、平山 祐、永澤秀子、保住 功 VPS35 ノックダウン細胞における2価鉄イオンの局在変化 第89回薬理学会年会 (2016年3月9日~11日 横浜)

④位田雅俊、北村佳久、下濱 俊 パーキンソン病モデルラットにおけるガラントミンのニコチン受容体を介した薬物巡回運動 第127回日本薬理学会近畿部会 (2015年6月26日 岐阜)

⑤全並美穂、位田雅俊、打越 舞、保住 功 ミクログリアの炎症性サイトカイン放出における ERM ファミリーの役割 第135回日本薬学会年会 (2015年3月25日~28日 神戸 兵庫医療大学 他)

⑥位田雅俊 原因遺伝子を軸にした神経変性疾患の創薬研究 2014年度 創薬科学フロンティアシンポジウム (2014年11月23日 京都 京都薬科大学)

⑦ Yosuke Matsumoto, Masatoshi Inden, Atsushi Tamura, Ryo Hatano, Sachiko Tsukita, Shinji Asano Ezrin regulates neuritogenesis through down-regulation of RhoA/ROCK/MLC2 pathway *Neuroscience* 2014 (2014/11/15-19 Washington DC)

⑧打越 舞、位田雅俊、全並美穂、金子雅幸、保住 功 活性化ミクログリアにおける ERM タンパク質の機能解析 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2014 (2014年8月30日 大阪 近畿大学)

〔図書〕(計 0 件)

なし。

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし。

○取得状況 (計 0 件)

なし。

〔その他〕

ホームページ等

http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/yakuchi/Med_Mol_Therp/Home.html

(岐阜薬科大学・薬物治療研究室)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

位田 雅俊 (INDEN, Masatoshi)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70512424

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。

(4) 研究協力者

なし。