

新規神経保護性 DAMPs: プロサイモシン α の 虚血誘発性非古典遊離の解明

Ischemia-induced non-classical release of prothymosin alpha, a novel neuroprotective DAMPs

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻

Sebok Kumar Halder

[目的]

プロサイモシン α (ProT α) は、小胞体-ゴルジ装置に取り込まれる為のシグナルペプチド配列を有しておらず、メンブレントラフィックを介したエクソサイトーシス系ではない非古典的遊離機構によって細胞外に放出される。また、この遊離は細胞ストレス依存性であることが明らかとなっている。細胞ストレス/障害依存的に細胞外放出される分子群は Damage-associated Molecular pattern molecules (DAMPs) と呼ばれ、そのほとんどが細胞障害性の機能を有しており、神経保護能を持つ ProT α は新規 DAMPs であると言える。本研究は、ProT α の脳における局在と脳虚血誘発性の細胞特異的な遊離を明らかとすることを目的とした。さらに、網膜虚血障害に対する ProT α の保護機構のメカニズムを解明することを目的とした。

[実験方法]

動物: 体重 20–30 g の雄性 C57/BL6 マウスを全ての実験に使用した。

薬剤処置: 抗アレルギー薬 Amlexanox (武田薬品工業株式会社提供) を脳虚血モデル作成 30 分前に脳質内投与 (i.c.v., 10 μ g/5 μ l) した。

中大脳動脈閉塞再灌流 (tMCAO) 脳虚血モデル: 2% イソフルランによる麻酔下で恒温台 (37°C) 上にて手術を行い、体温の維持を行った。中大脳動脈閉塞は、塞栓子固定による手法を用いた。虚血 1 時間後に塞栓子を除去し、再灌流を行った。

一過性高眼圧誘発網膜虚血モデル: ペントバルビタール 75 mg/kg 腹腔内投与による麻酔下で恒温台上にて術式を行い、体温の維持を行った。硝子体を 1% の硫酸アトロピンで散瞳させ、無菌眼内灌流溶液の容器を予め水面がマウスの眼より 135.5 cm (130 mmHg) の高さになるようにつり上げておき、前房に 33G の注射針を刺入し灌流系を解放することにより、前眼房内に圧力を 45 分間負荷することで高眼圧処置を行った (マウス正常眼圧は 15 mmHg 程度)。これらの操作は実体顕微鏡下で行い、眼圧の上昇により網膜虚血が惹起されていることを網膜内血流の遮断を指標に目視にて確認した。虚血負荷終了後に針を抜き、眼圧を低下させ網膜を再灌流させた。

ProT α 投与と、抗体投与による機能吸収: マウスリコンビナント ProT α は、網膜虚血の 4 時間前に硝子体内投与し、抗 Toll-like receptor-4 (TLR-4) 抗体 (東京大学 医科学研究所 三宅健介 教授と共同研究により提供) は、ProT α 投与の 4 時間前に 1 μ g/ μ l の用量で硝子体内投与した。

組織化学的解析: 脳と網膜の組織障害は、それぞれニッスル染色とヘマトキシリン・エオジン染色にて評価した。脳虚血モデルにおける梗塞領域は、TTC 染色にて評価した。細胞同定と ProT α の局在と遊離解析は、免疫組織化学の手法を用いた。

機能解析: 脳虚血に伴う運動障害は、神経学的スコア (1: 右前肢の運動機能障害、2: 一方向性の行動をとる、3: 体勢を保てず傾く、4: 自発運動の消失、5: 死亡) で評価し、生存率による評価も行った。網膜虚血に伴う機能障害は、網膜電位図 (Electroretinogram: ERG) にて評価を行った。

[結果]

ProTαは、成熟マウスの脳において遍在的に発現しており、特に神経新生に関与する領域において強い発現が認められた。ProTαは、核タンパク質として知られており、MAP2 陽性神経細胞では核に強い発現が認められたが、GFAP 陽性アストロサイトでは細胞質に Iba1 陽性ミクログリアでは突起と細胞質に発現が認められた (Fig. 1)。

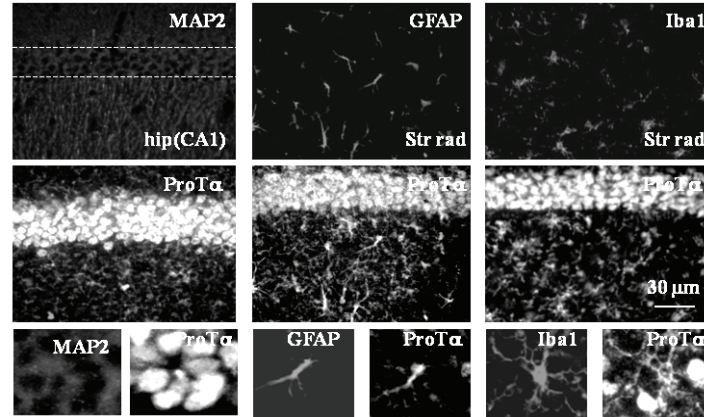


Fig. 1. Cell type-specific cellular and subcellular localization of ProTα in the adult brain.

次に ProTαの遊離について検討したところ、1時間の tMCAO 処置 3 時間後において、海馬 CA1 領域の神経細胞から ProTαの完全な遊離が認められた。しかしながら、アストロサイトとミクログリアでの遊離は観察されなかった。この脳虚血誘発性 ProTα遊離は Amlexanox 処理により阻害され、細胞質内に局在変化した (Fig. 2)。また、本薬剤処理により虚血による脳障害が悪化した。これらの結果より、自己保護能を持つ ProTαの細胞外遊離において、神経細胞が脳独自の源であることが明らかとなった。

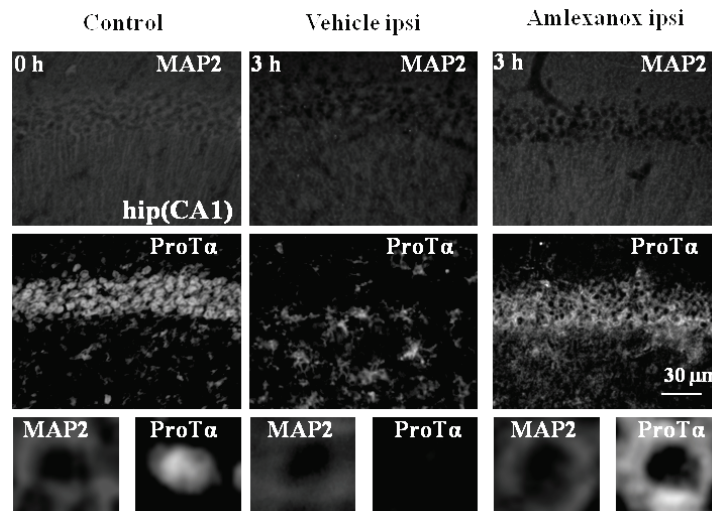


Fig. 2. Amlexanox reversibly blocks cerebral ischemia-induced non-classical release of ProTα from CA1 pyramidal neuronal cell layer in hippocampus in the adult mice brain.

高感度・高定量性を有する網膜虚血モデルにおける ProTα前処置による保護効果について虚血 7 日後で評価を行った。ProTαは、虚血処置 4 時間前投与でも部分的ではあるが、ヘマトキシリン・エオジン染色評価による組織障害も ERG 評価による機能障害も有意に抑制した。興味深いことに、代表的な炎症センサー分子である TLR-4 の機能吸収抗体 2 種類 (Sa + MTS) を ProTα処置の前に投与すると ProTαの保護効果が完

全に阻害された (Fig. 3)。本結果は、ProTαの網膜障害保護効果に TLR-4 を介したシグナルが部分的に関与することを明らかとしたものである。

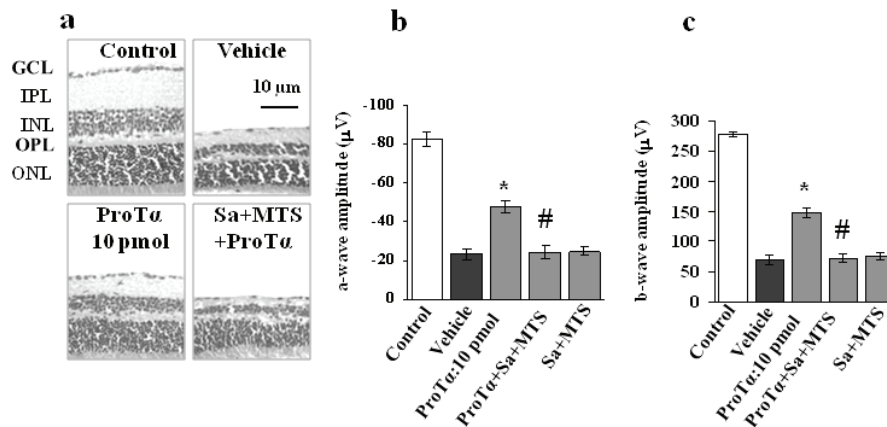


Fig. 3. ProTα preconditioning-induced retinal protection against ischemia through TLR-4.

[考察]

ProTαは神経細胞においてのみ核に局在し、アストロサイトとミクログリアでは細胞質や突起、細胞体に局在が認められた。また、脳虚血による ProTαの遊離は神経細胞でのみ認められた。また、個体レベルにおける ProTαの遊離が細胞レベルと同様に Amlexanox 感受性の非古典的遊離であることが明らかとなった。今後、ProTαの局在、遊離といった細胞特異性の詳細を明らかにする必要がある。一方、網膜虚血障害において、ProTαが候補細胞膜受容体の 1 つである TLR-4 活性化を介して神経保護活性を発揮することが明らかとなった。本結果は、ProTαの神経保護能の全容を明らかとする為に、他の ProTα受容体と TLR-4 受容体シグナルの連関、受容細胞の特異性といった詳細を明らかにする必要があることを意味している。本論文は、ProTα神経保護機構を活用した臨床応用の観点から、重要な研究結果を提示したと考える。

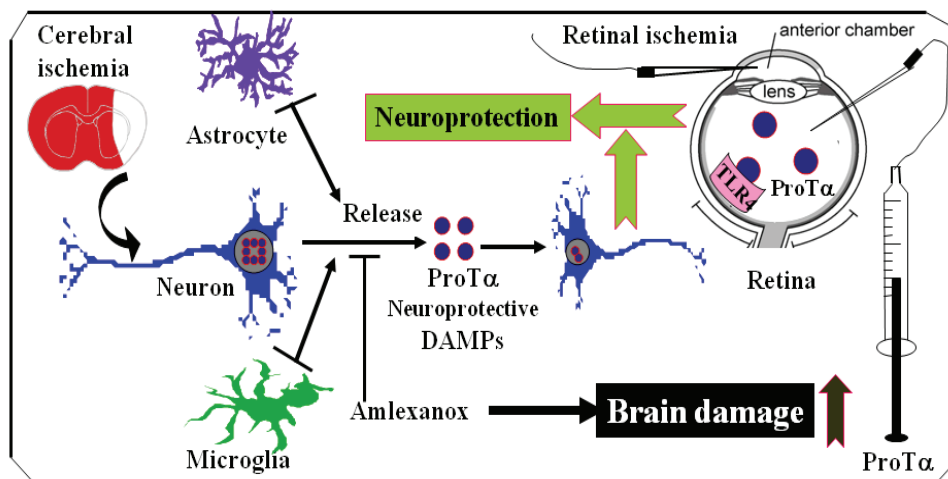


Fig. 4. Cerebral ischemia induces non-classical release of ProTα only from neurons in an amlexanox reversible manner. ProTα protects retina against ischemia through TLR-4.

[基礎となった学術論文]

1. Sebok Kumar Halder and Hiroshi Ueda (2011) Regional distribution and cell type-specific subcellular localization of prothymosin alpha in brain. *Cell and Mol Neurobiol*, DOI: 10.1007/s10571-011-9734-x, in press.