

2014年度 学位論文

脳神経血管機構におけるプリオン蛋白質の役割

A role of the cellular prion proteins in the neurovascular unit

福岡大学大学院 薬学研究科 薬学専攻

安高 勇気

目次

緒言	4
本論	6
第一章 血管修復・再生機能におけるプリオン蛋白質の役割	6
第一節 序論.....	6
第二節 結果.....	8
1-2-1. 脳血管内皮細胞における siPrP の効果	8
1-2-2. PrP knockdown 細胞における Na-F 透過性	9
1-2-3. PrP knockdown 細胞における tight junction 蛋白質の免疫染色	10
1-2-4. PrP knockdown 細胞における P-gp 機能.....	11
1-2-5. PrP knockdown 細胞における細胞遊走能	12
第三節 考察.....	14
第四節 実験材料ならびに実験方法	16
第二章 atorvastatin による神経突起伸長に対するプリオン蛋白質の役割.....	28
第一節 序論.....	28
第二節 結果.....	30
2-2-1. atorvastatin の神経突起伸長作用.....	30
2-2-2. atorvastatin の PrP ^C 発現に対する作用	32
2-2-3. farnesol 共処置による神経突起伸長および PrP ^C 発現に対する作用	33
2-2-4. PrP ^C 過剰発現株における atorvastatin の作用.....	35
2-2-5. atorvastatin の Rho family G 蛋白質発現に対する作用	37
第三節 考察.....	39
第四節 実験材料ならびに実験方法	41
第三章 脳血管内皮細胞の Aβ 排出機構におけるプリオン蛋白質の役割.....	43
第一節 序論.....	43
第二節 結果.....	46
3-2-1. PrP mRNA および PrP ^C への TNF α の影響.....	46

3-2-2. P-gp および LRP1 発現に及ぼす TNF- α の影響	47
3-2-3. A β 輸送に対する TNF α の影響	48
3-2-4. A β 輸送に及ぼす P-gp の影響	49
3-2-5. A β 輸送に対する抗 PrP 抗体 (SAF32) の影響.....	51
第三節 考察.....	52
第四節 実験材料ならびに実験方法	54
総括	59
引用文献.....	61
謝辞	72

緒言

ヒトプリオン病、特に Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) は痴呆症状を中心とした神経症状が急速に進行し死に至る難病である。現在までに画期的な治療法は確立されておらず、対症療法のみであるため、治療法の開発は急務を要する。臨床的に効果が期待されたキナクリンやペントサン硫酸 (pentosan polysulfate : PPS) 投与は十分な治療効果を得られず、また肝障害といった副作用の面からも治療法の確立には至らなかった (1, 2, 3)。

プリオン蛋白質には、病原性のない正常型プリオン蛋白質 PrP^C (Cellular) と病原性のある異常型プリオン蛋白質 PrP^{Sc} (Scrape) の 2 種類がある。PrP^{Sc} は、牛の狂牛病やヒトの CJD、羊のスクレイピーなどの感染性海綿状脳症 (Transmissible spongiform encephalopathy : TSE) などのプリオン病の原因物質の一つであることが報告されており、その細胞毒性や高次構造変化機序については精力的に研究が進められ、その病態生理機能は明らかにされつつある。PrP^{Sc} は PrP^C が構造的に転換し不溶性のアイソフォームとなったものであり、プロテアーゼに抵抗性を示すという特徴を持つ。そして、PrP^{Sc} 同士で凝集体を作り、脳内に蓄積していくと神経脱落が引き起こされ、プリオン病が発症するという仮説が立てられている (4, 5)。一方、PrP^C はあらゆる動物のあらゆる臓器に含まれている糖蛋白質であり、GPI アンカーを有し細胞膜に局在している。特に脳神経細胞に多く発現しており、神経細胞では神経細胞保護、銅代謝、細胞接着、細胞内シグナル伝達、神経突起伸長などに関与することが報告されている (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13)。しかし、上述したように、PrP^C はあらゆる臓器細胞に発現しているにも関わらず、発現が多い神経細胞を

用いた生理機能解明研究が多く、他の細胞における生理機能は未だ不明な点が多い。

神経細胞と脳血管内皮細胞は中枢神経系維持に重要である脳神経血管機構 (neurovascular unit : NVU) の構成細胞であり、これらの細胞における PrP^C の発現を調節する因子ならびに PrP^C 発現が変化した場合の細胞機能変化を捉えることは、中枢神経系疾患発症機序やその薬物治療機序の解明に繋がると考えられる。

PrP^C 発現を調節する因子には様々な報告がなされており、神経細胞において Adenosine triphosphate (ATP) や Nerve growth factor (NGF) 、 Epidermal growth factor (EGF) は増強的に機能する (14) 。また、線維芽細胞において SP1 や Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) は増強的に機能することが報告されている (15) 。

そこで、本研究では神経細胞と脳血管内皮細胞における新たな PrP^C の生理機能解明とその発現調節因子の同定を目的とした。第一章では PrP^C の mRNA をターゲットにした siRNA を処置することにより PrP^C の発現を減少させた脳血管内皮細胞株を用いて、血液脳関門制御機構および血管の修復・再生機能に着目し、脳血管内皮細胞における PrP^C の機能について検討した。第二章では神経細胞における atorvastatin による神経突起伸長に対する PrP^C の役割について検討を行った。第三章では脳血管内皮細胞の Beta-amyloid (A β) 排出機構における PrP^C の役割について検討を行った。

本論

第一章 血管修復・再生機能におけるプリオン蛋白質の役割

第一節 序論

PrP^Cは脳血管内皮細胞に発現しているが、PrP^Cの脳血管内皮細胞での生理機能は明らかではない(16, 17, 18)。脳血管内皮細胞の特徴はそれを取り囲む脳ペリサイト(脳血管周皮細胞)およびアストロサイトなどと血液脳関門(Blood-Brain Barrier: BBB)を構成し、脳血管内皮細胞同士が密着に結合して構成されるtight junctionや細胞に発現するトランスポーターによって脳への物質移行を制御し、脳神経機能維持に関与している(19)。tight junctionは、OccludinやClaudine-5およびZO-1などの蛋白質からなる複合体であり、細胞間隙輸送を制御している(20, 21, 22, 23)。トランスポーターの1つであるP-糖蛋白質(P-gp)は脳内に移行してきた異物を血管側へ排出する機能を有している。ガン細胞や神経細胞においてPrP^CとP-gpが機能的相関を示すとの報告もあることから、脳血管内皮細胞でも同様の相関が考えられる(24)。また、PrP^Cは脳血管内皮細胞間で接着に関わることから、tight junction機能に関与することが考えられる(16)。さらに、脳血管内皮細胞は神経細胞や非神経細胞などと脳神経血管機構(neurovascular unit: NVU)を構成しており、中枢神経系の機能維持に関与し、シナプス伝達や神経新生・血管新生などの様々な機能に関係していると考えられる。血管新生は微小血管の出芽、微小血

管内皮細胞の増殖や遊走、微小管の形成など複雑な過程を含むが、成熟血管の融合性単層から基底膜への内皮細胞の遊走によって行われ、脳虚血などの血管損傷後に起きる。脳虚血後の血管内皮細胞には PrP^C の発現が増加することが報告されており (25, 26) 、血管新生に PrP^C が関与することが考えられる。本章では、PrP^C の mRNA をターゲットにした siRNA を処置することにより PrP^C の発現を減少させた脳血管内皮細胞株を用いて、BBB 制御機構および血管の修復、再生機能に着目し、脳血管内皮細胞における PrP^C の機能を検討した。

第二節 結果

1-2-1. 脳血管内皮細胞における siPrP の効果

脳血管内皮細胞における siPrP (PrP に対する siRNA) の効果を確認するため、リアルタイム RT-PCR 法を用いて、siPrP による bEND.3 細胞 (マウス脳血管内皮細胞株) における PrP mRNA の発現量を解析した。bEND.3 細胞における siPrP 処置による PrP mRNA の発現量は、Control siRNA 処置と比較し有意に減少した (Fig.1-1A)。次に、脳血管内皮細胞における PrP^C の発現量に siPrP の与える影響を解析するため、Western blot 法を行った。PrP^C の発現量は siPrP 処置により Control siRNA 処置に比べ有意に減少した (Fig.1-1B)。

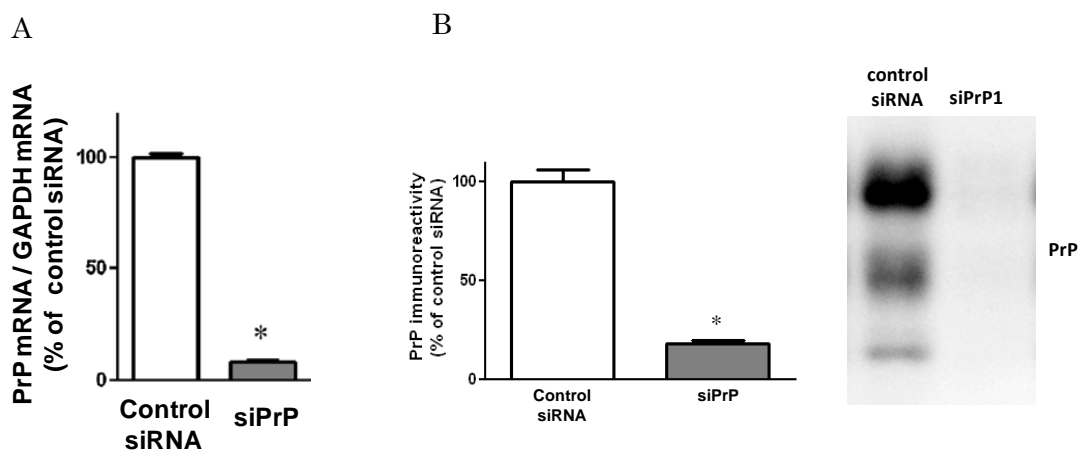


Fig.1-1 siRNA inhibition of PrP mRNA expression (A) and PrP^C protein levels (B) in the bEND.3 cells. The cells were transfected with siPrP targeting PrP mRNA, or control siRNA (n = 3 each). PrP mRNA expression was measured by real-time RT-PCR 24 h after transfection. PrP^C levels were measured 48 h after transfection by western blotting. The representative image shows the expression levels of PrP^C protein determined by SDS-PAGE followed by western blotting. The data are expressed as the percentage of control levels (control siRNA-transfected bEND.3 cells). The values are mean \pm S.E. (n = 3 wells). * $p < 0.05$, significantly different from control siRNA.

1-2-2. PrP knockdown 細胞における Na-F 透過性

脳血管内皮細胞に発現している PrP の tight junction 機能への影響を検討するため、bEND.3 細胞における Na-F (Sodium fluorescein) の透過性を解析した。siPrP 処置の Na-F 透過性は、non-treatment (NT) および Lipofectamine RNAi Max (Lip) 、 Control siRNA 処置と比べ有意な差は認められなかった (Fig.1-2)。

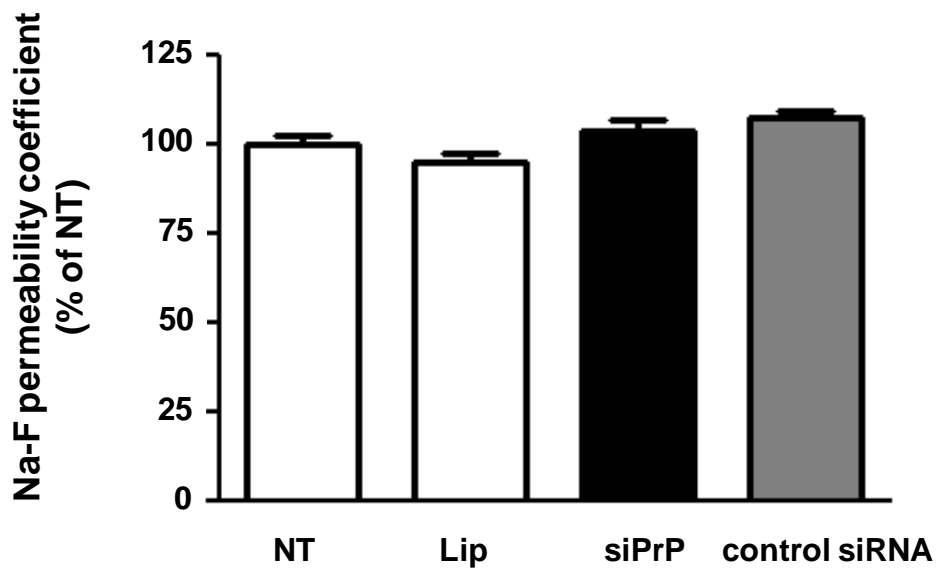


Fig. 1-2 Na-F permeability in PrP-lowered cell by siPrP. Na-F permeability was measured 96 h after transfection ($n = 3$). The data are expressed as the percentage of non-treatment (NT). The values are mean \pm S.E. ($n = 3$ wells).

1-2-3. PrP knockdown 細胞における tight junction タンパクの免疫染色

さらに、PrP の tight junction 機能への影響を確認するため、siPrP 処置により ZO-1 発現に影響を及ぼすかを検討した。siPrP 処置による ZO-1 発現の形状は、non-treatment (NT) および Lipofectamine RNAi Max (Lip) 、Control siRNA 処置と比べ有意な差は認められなかった (Fig.1-3)。

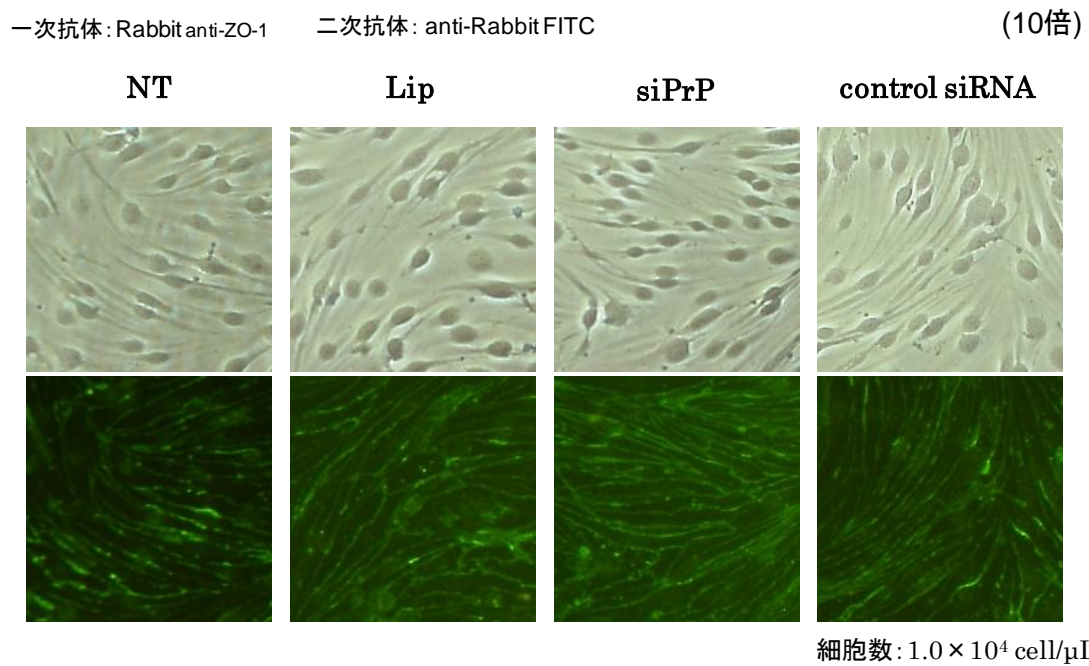


Fig.1-3 Localization of zo-1 in siPrP-treated cells Photographs are light field image (upper panel) and zo-1 immunostaining (lower panal).

1-2-4. PrP knockdown 細胞における P-gp 機能

PrP knockdown 細胞における P 糖蛋白質 (P-glycoprotein:P-gp) 機能を検討するため、P-gp の基質である Calcein-AM の細胞内蓄積について解析した。siPrP 処置による Calcein AM の取り込みは、10 nM および 20 nM の濃度において Control siRNA 処置と比べ有意な差は認められなかった (Fig.1-4)。

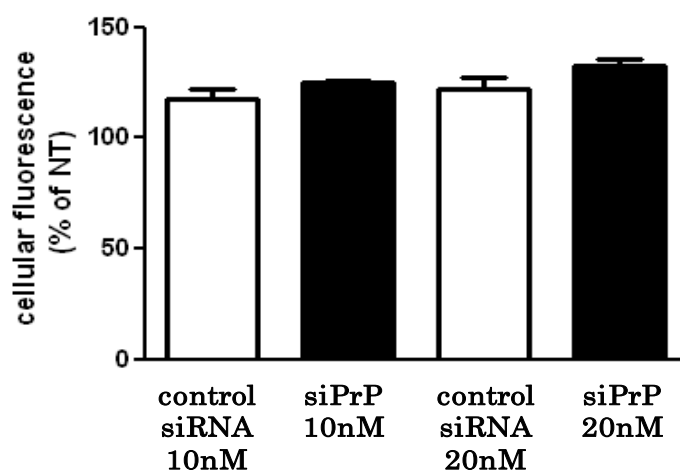
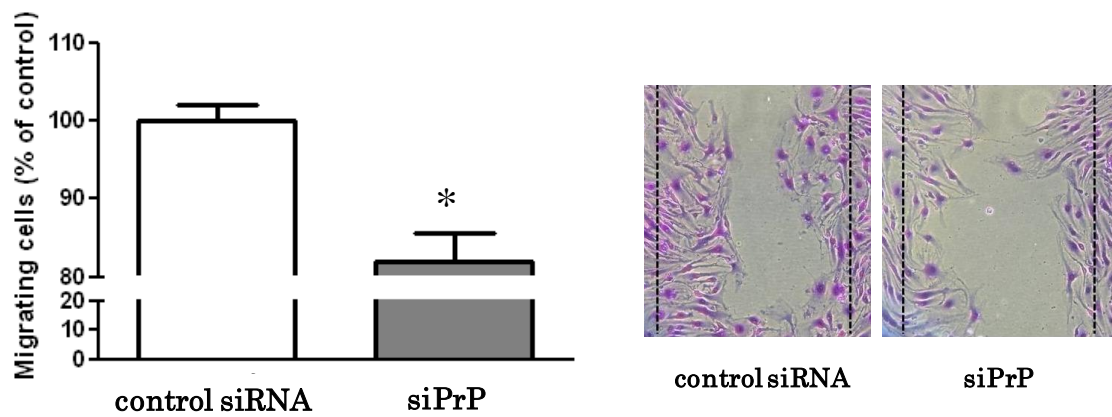


Fig. 1-4 Function of P-gp in siPrP-treated cells. Accumulation of calcein were measured 48 h after transfection (n = 3). The data are expressed as the percentage of non-treatment (NT). The values are mean \pm S.E. (n = 3 wells).

1-2-5. PrP knockdown における細胞遊走能

PrP の蛋白量減少が確認できた siPrP 処置 48 時間後、細胞層にピペットチップで十字に傷をいれ、その傷あとに遊走してきた細胞の総面積を解析した。siPrP によって PrP 発現量が減少した細胞では、Control siRNA 処置と比較し遊走細胞数が減少した (Fig.1-5A)。また、siPrP 処置群は、Control siRNA 群と比較し細胞遊走面積が減少した (Fig.1-5 B)。

A



B

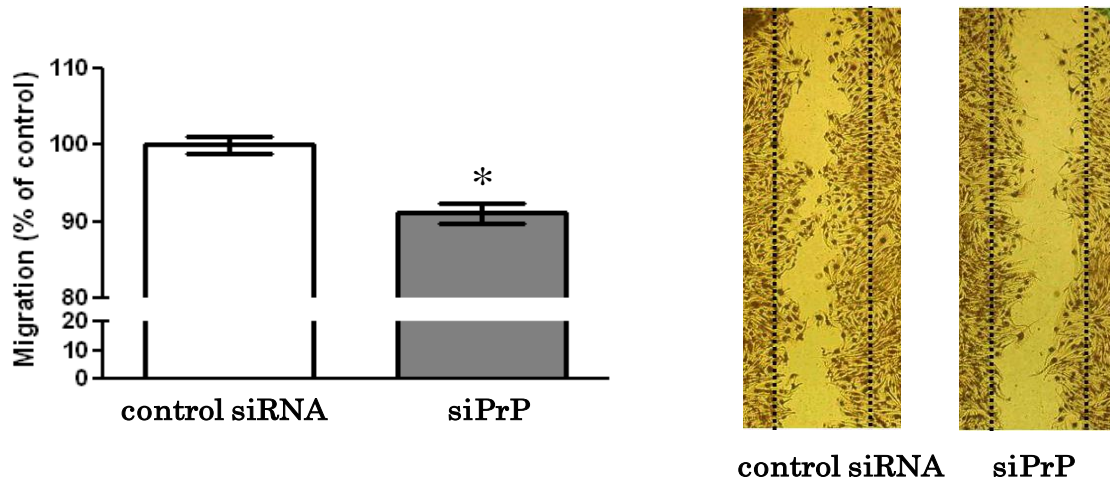


Fig. 1-5 The number of bEND.3 cells (A) and the area covered by bEND.3 cells (B) migrating into the wound area. Cells were transfected with siPrP1 (n = 21) or control siRNA (n = 21). The representative images show migration of bEND.3 cells transfected with control siRNA and siPrP. The data are expressed as the percentage of control values (control siRNA-transfected bEND.3 cells). The values are means \pm S.E. (n = 7 separate experiments with three dishes each). * $p < 0.05$; significantly different from control siRNA.

第三節 考察

本章では、まず PrP^C の mRNA をターゲットにした siRNA を処置することにより PrP^C の発現を減少させた bEND.3 cell を用いて、BBB 制御機構における PrP^C の機能について検討した。

BBB における tight junction 機能を評価するために、Na-F 透過性および tight junction の免疫染色を行った。その結果、NT 群や Control siRNA 処置群と比較して siPrP 処置群の Na-F 透過性は変化を認めず、ZO-1 の免疫染色像も同様に NT 群や Control siRNA 処置群と siPrP 処置群との間に有意な差はなかった。また、BBB における P-gp の機能を評価するために、Calcein-AM の取り込みを検討したが、Control siRNA 処置群と siPrP 処置群との間に有意な差はなかった。これらの結果より、PrP^C は tight junction や P-gp の機能には影響しないことが考えられた。

次いで、PrP^C の血管修復・再生機能に着目し、脳血管内皮細胞における傷の修復能を評価するために cell scratch migration assay を行った。その結果、Control siRNA 処置群と比較し、siPrP 処置群では scratch area への遊走細胞数および遊走細胞面積の減少が認められた。この結果より、脳微小血管内皮細胞が脳内で損傷された領域に遊走する際に PrP^C が関与することが示唆された。

PrP^C はあらゆる動物のあらゆる臓器に含まれており、脳血管内皮細胞にも発現している (16)。また、脳梗塞患者の脳内の神経や微小血管では PrP^C の発現は増加している (25)。さらに、PrP^C を過剰発現させた動物への脳虚血処置はその虚血損傷が低減され (26)、PrP^C

欠損マウスでは脳梗塞部位が増大しているとの報告がある (27)。これらの報告は、PrPC が脳梗塞時における虚血損傷を軽減、修復させる働きがあることを提案しており、PrPC の脳血管内皮細胞遊走調節による血管損傷修復に関する本研究の結果を支持するものである。

以上より、PrPC は脳血管内皮細胞の遊走を制御することにより虚血性障害のような損傷から脳血管内皮細胞を含む NVU の再生に関与することが示唆された。

第四節 実験材料ならびに実験方法

使用試薬

細胞培養関連試薬

D-MEM は Wako pure chemical (Osaka, Japan) (以下, Wako)から購入した。Penicillin-Streptomycin (以下, P/S)、PBS (pH 7.2, Store at 15 to 30°C)、0.25% Trypsin-EDTA、Opti-MEM (Store at 2 to 8°C) は Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA) より購入した。FETAL BOVINE SERUM (以下: FBS) は Biowest (Nuaille, France) より購入した。D-MEM 10 培地および D-MEM 培地は、下記の方法で調整した。D-MEM に P/S および FBS を加える際は FAST PES Filter Unit (NALGENE) で濾過を行った (Store at 2 to 10°C)。

●D-MEM10 培地

D-MEM (High Glucose)	445 mL
P/S	5 mL
FBS	50 mL
<hr/>	
final volume	500 mL

●D-MEM 培地

D-MEM	195 mL
P/S	5 mL
FBS	50 mL
<hr/>	
final volume	250 mL

細胞導入関連試薬

Lipofectamine RNAiMAX (Store at 4°C)、Stealth RNAi、Stealth RNAi Negative Universal Control Medium (Store at -20°C) は Invitrogen (Grand Island, NY, USA) から購入した。

Western blot 関連試薬

Lysis buffer、2× SDS sample buffer、10% APS、30% acryl amide、1.5 M Tris-HCl、0.5 M Tris-HCl、Water saturated isobutanol、10× Running buffer、Transfer buffer、10× Tris Buffered Saline (以下、TBS)、TBS-T、5% Blocking buffer、Physiological buffer は、下記の方法で調整した。BCA Protein Assay Kit (BCA™ Protein Assay Reagent A, BCA™ Protein Assay Reagent B, Albumin Standard) は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA) より購入した。99.8%メタノール (高速液体クロマトグラフ用) は nacal tesque (Kyoto, Japan) より購入した。無水エタノールは Wako から購入した。Ultra Pure™ Temed (Store at 2 to 8°C in the dark) は Invitrogen から購入した。N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (以下、TEMED) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。skim milk は雪印乳業 (Sapporo, Japan) から購入した。ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit (Lumigen™ TMA-6 Solution A, Lumigen™ TMA-6 Solution B) (Store at 2 to 8°C in the dark) は Amersham Biosciences から購入した。

●Lysis buffer

500 M Tris-HCl (pH6.8) (NIPPON GENE., LTD.)	80 µL
5 M NaCl (Wako)	80 µL
0.5 M EDTA (pH 8.0) (NIPPON GENE., LTD.)	8 µL
100% Glycerol	400 µL
100% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)	40 µL
10% SDS	40 µL
200 mM Na ₃ VO ₄	40 µL
500 mM NaF	8 µL
100 mM Sodium pyrorhosphate decahydrate	800 µL
5% Sodium deoxycholate	400 µL
20 mM PMSF	20 µL
20% Protase Inhibitor cocktail	40 µL
Sterilized water	2044 µL
<hr/>	
final volume	4 mL

●2× SDS sample buffer

0.5M Tris-HCl (pH6.8 at 25°C)	12.5 mL (f.c.125 mM)
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Sigma-Aldlich)	2 g (f.c. 4% w/v)
Glycerol, 99.5+%, A.C.S. (Sigma-Aldlich)	10 mL (f.c. 20%)
Dithiothreitol (DTT) (クレールランド試薬) (nacalai tesque)	5 mL (f.c.100 mM)
Bromophenol Blue (BPB) (Wako)	20 mg (f.c. 0.02%)
Distilled water	22.5 mL

final volume 50 mL

●10% APS (用事調整)

Ammonium persulfate 98% (Sigma-Aldlich)	0.1 g
Distilled water	1 mL

●30% acryl amide (Store at 4°C in the dark)

acryl amide minimum 99% (Sigma-Aldlich)	29.2 g
N' N'-bis-methylene-acrylamide (Sigma-Aldlich)	0.8 g

Make to 100 mL with deionized water

●1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) (Store at 4°C)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	27.23 g
Distilled water	~80 mL

1 mol / L 塩酸 (Wako) で pH 8.8 に調整し、精製水で 150 mL までメスアップする。

●0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) (Store at 4°C)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	6 g
Distilled water	~60 mL

1 mol / L 塩酸 (Wako) で pH 6.8 に調整し、精製水で 100 mL までメスアップする。

●Water saturated isobutanol (Store at RT)

Isobutyl Alcohol (nacalai tesque)	60 mL
Distilled water	30 mL

瓶を振って混和し 2 層に分かれたら、isobutanol 層 (上層) を使用する。

●10× Running buffer

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (nacalai tesque)	30.3 g	(f.c. 0.25 M)
Glycine (nacalai tesque)	143.1 g	(f.c. 1.92 M)
SDS	10 g	(f.c. 1 % w/v)

蒸留水に溶解し、final volume 1 L となるように調整する。

電気泳動時は 10 倍希釈して使用する。

●Transfer buffer

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (nacalai tesque)	3.0 g	(f.c. 25 mM)
Glycine (nacalai tesque)	14.4 g	(f.c. 192 mM)
methanol	200 mL	(f.c. 20% w/v)
Distilled water	~750 mL	

final volume 1 L にメスアップ

●10× Tris Buffered Saline (TBS)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (nacalai tesque)	24.2 g
NaCl (Wako)	80 g

1 mol / L 塩酸 (Wako) で pH 7.6 に調整し、精製水で 1L までメスアップする。

●TBS-T

10× TBS	50 mL
water	450 mL
Tween 20 (SIGMA)	500 μL

●5% Blocking buffer

skim milk	2.0 g
TBS-T	40 mL

●Physiological buffer

NaCl	141 mM	82.4 g/L	} (10× conc.) 50 mL
KCl	4 mM	2.98 g/L	
CaCl ₂	2.8 mM	3.11 g/L	
MgSO ₄	1 mM	1.2 g/L	
NaH ₂ PO ₄	1 mM	1.38 g/L	
d-Glucose	10 mM	0.9 g	
HEPES	10 mM	1 M	
dH ₂ O			aq

Total 500 mL. pH 7.4

BSA 1 g/100 mL (1%)

- 1) 10×Physiological buffer と 1 M HEPES を調製し、4℃で保存しておく。
- 2) 10×Physiological buffer 50 mL と 1 M HEPES 5 mL を 445 mL の dH₂O に溶かし glucose を 0.9 g 加える。その後、5 M NaOH で pH7.4 に合わせる。4℃で保存。
- 3) 100 mL の physiological buffer に 1 g の bovine serum albumin を溶かし、Physiological buffer containing 1% BSA とする。

その他の試薬

Blocking-One, Crystal Violet (Store at 15 to 30℃) は nacalai tesque から購入した。
Calcein-AM は Mo Bi Tec (Goettingen, Germany) から購入した。10% Formalin Solution

(pH 7.2, Store at 15 to 30°C) は Wako から購入した。Krebs-Ringer buffer は、下記の方法で調整した。

●Krebs-Ringer buffer

NaCl	141 mM	8.30 g/L
KCl	3 mM	0.224 g/L
CaCl ₂	1.4 mM	0.155 g/L
MgSO ₄	1.2 mM	0.244 g/L
NaH ₂ PO ₄	1.5 mM	0.261 g/L
d-Glucose	4 mM	0.721 g/L
HEPES	10 mM	2.383 g/L
dH ₂ O		aq
Total		1000 mL

使用細胞株

bEND.3 cell (マウス脳血管内皮細胞株 : ATCC, Manassas, VA) を用いた。細胞は、75 cm² Cell Culture Flask (BD Falcon) に細胞密度 2.0×10^5 cell/2 mL/well の濃度で播種し、D-MEM 培地、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

Transfection (Western blot)

細胞を Fibronectin (0.1%, SIGMA) でコーティングした MULTIWELL 6 well に細胞密度 2.0×10^5 cell/2 mL/well の濃度で播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。24 時間後に PBS で 2 回 well を洗い、無血清培地 (Opti-MEM) に任意の濃度に調整した siRNA と細胞導入剤 (Lipofectamine RNAi Max) を混和し、下記のように処置した。その 4 時間後に D-MEM 10 培地 (2 mL) に入れ替えた。

A

	Blank	Lip only	siPrP (10 nM)	siPrP (20 nM)	siPrP (50 nM)	NC (50 nM)
siRNA	—	—	1.2 μL	2.4 μL	6 μL	6 μL
Opti-MEM	250 μL	125 μL	123.8 μL	122.6 μL	119 μL	119 μL

(si112 : 12.5 μM、NC siRNA : 12.5 μM)

B

Lipofectamine	2.5 μ L
Opti-MEM	122.5 μ L

well を PBS で 2 回洗浄後、1 well あたり Opti-MEM を 1250 μ L 加えた。A と B を混和し、室温で 15 分間静置した後、調整した A+B 液を 250 μ L / well 添加した。

PrP^c の検出

siRNA 処置 48 時間後に PBS (4°C) (2 mL/well) で 2 回洗浄後、Lysis buffer (150 μ L/well) にて細胞を融解し、CELL SCRAPER (SUMILON) を用いて回収した。遠心分離 (13,000 rpm, 20 分, 4°C) 後、上清を回収し、BCA Protein Assay Kit を用いて蛋白濃度を測定した。上清に TBS を加えサンプルの蛋白量を合わせた後、Sample buffer を加えた。サンプルは -20°C で保存した。Western blot 解析には Fluor Chem Imager (Alpha Innotech) を使用した。

ゲル作製

・ Separation Gel : 下

精製水	3.4 mL
30% acrylamide	8 mL
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	2.5 g
10% SDS	0.1 mL

・ Stacking Gel : 上

精製水	6.1 mL
30% acrylamide	1.3 mL
0.5M Tris-HCl (pH6.8)	2.5 mL
10% SDS	0.1 mL

上記の試薬を各々の瓶の中で混和し、デシケーターで 15 分間脱気した。その間にゲル板を無水エタノールで拭きセットし脱気後、Separation Gel の瓶へ Temed 5 μ L と 10% APS (用事調整) 50 μ L 加え、ゲル板へ流し込んだ (※ゲル板 [小] の上から 2 cm まで)。続いて、ゲル板へ isobutanol を 1 mL 流し込み、ゲルが固まるまで 1 時間静置した。Separation Gel が固まった後、Stacking Gel の瓶へ Temed 10 μ L と 10% APS 50 μ L 加え、ゲル板の上まで流し込み、ゲル板へコームを差し込みゲルが固まるまで 1 時間静置した。

Western blot 解析

ゲルを Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA) にセットし、1× Running

buffer を入れ、マーカーを 5 μ L およびサンプルを 10 μ L ずつ 45 分間電気泳動した (constant 200 V)。泳動中に PVDF 膜 (Immobilon-P Transfer Membrane : MILLIPORE) をメタノールに 1 分間浸した後、フィルター (BIO-RAD) とともに Transfer buffer に浸した。泳動終了後、ゲル板からゲルを剥がし Transfer buffer に浸した。転写装置 Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) に陽極側から blot paper、PVDF 膜、ゲル、blot paper の順で密着させ (面積 $\text{cm}^2 \times 2$) mA、90 分間セミドライ方式で転写した。転写終了後、PVDF 膜を Blocking buffer 中で振とうし、室温で 2 時間ブロッキングを行った。

PVDF 膜を TBS-T で 1 回濯いだ後、一次抗体 (Anti-Prion Protein, Mouse-Mono (SAF 32) (SPI bio) 1% skim milk で終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈して使用した) を反応させた (4°C, overnight, 振とう)。PVDF 膜を TBS-T で 3 回濯いだ後、TBS-T で洗浄した (3 回, 10-10-10 min)。二次抗体 (Anti-mouse IgG HRP Conjugate, 1% skim milk に 10000 倍希釈して使用) を反応させ (室温, 1 時間, 振とう)、PVDF 膜を TBS-T で 3 回濯いだ後、TBS-T で洗浄した (3 回, 10-10-10 分)。

検出は ECL Advance Western Blotting Detection Kit に含まれる ECL Advance Solution A (300 μL) および B (300 μL) を 1:1 で調整したものを PVDF 膜に滴下し、CCD fluor chem™ (Alpha Inotech) にてバンドを検出した。画像処理及び解析は fluor chem™ 付属ソフトを用いた。

Transfection (Na-F 透過性, 免疫染色)

細胞を Fibronectin (0.1%, SIGMA) でコーティングした Transwell Permeable (CORNING) の上層に細胞密度 1.0×10^4 cell/well で 100 μL 播種、下層に D-MEM を 600 μL 入れて、37°C、5% CO_2 条件下で培養した。24 時間後に上層を PBS で 2 回 well を洗い、Opti-MEM に任意の濃度に調整した siRNA と細胞導入剤 (Lipofectamine RNAi Max) を混和し、下記のように処置した。4 時間後に D-MEM 20 培地を 50 μL 添加した。

siRNA + Lipofectamine

A

	Blank	Lip only	siPrP (10 nM)	NC (10 nM)
siRNA	—	—	0.8 μL	0.8 μL
Opti-MEM	8.3 μL	4.16 μL	3.36 μL	3.36 μL

(siPrP : 0.625 μM , NC siRNA : 0.625 μM)

B

Lipofectamine	0.083 μ L
Opti-MEM	4.076 μ L

PBS で 2 回 well を洗った後、Opti-MEM を 41.6 μ L/well 入れておく。A と B を混和し、静置する（室温、15 分）。その後、調整した A+B 液を 8.3 μ L / well 添加する。

Na-F 透過性

siRNA 処置 48 時間後に physiological buffer (37°C) (100 μ L/well) で 2 回洗浄後、下層も physiological buffer (600 μ L) と入れ替える。上層を physiological buffer (600 μ L) を入れた新しい well に移す。上層の液を取り除き、Na-F (100 μ g/mL physiological buffer) を 100 μ L 入れ、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。30、60、90、120 分後、下層をピペッティングして sample として 100 μ L ずつ取っておき、その都度 physiological buffer (100 μ L) を下層に加えた。sample は physiological buffer で 5 倍希釈したのち、蛍光強度を蛍光プレートリーダー (CytoFluor Series 4000, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) を用いて測定した（励起波長 485 nm, 蛍光波長 530 nm）。検量線より Na-F の濃度を算出した。

免疫染色

3.5 cm dish にエタノールで滅菌したスライドガラスを入れ、Fibronectin (0.1%, SIGMA) でコーティングした。dish に細胞密度 2.0×10^5 cell/2 mL/well で播種して 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。24 時間後に transfection を行った。transfection 96 時間後に免疫染色を行った。PBS で 3 回洗浄を行い、4% Paraformaldehyde/Phosphate Buffer を用いて 15 分間室温で細胞を固定した。PBS で 3 回洗浄後、0.1%Tryton X-100 を 5 分間処理した。Blocking-One を室温で 30 分間処理した。その後、PBS にて希釈した 1 次抗体 (PrP (SAF32)、goat polyclonal IgG (# sc-7694 : Santa Cruz Biotechnology, Inc, PBS に 100 倍希釈して使用) を 37°C で 1 時間処理した。PBS で 3 回洗浄した後、2 次抗体 (Cy3 anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch 115-165-146)、PBS に 100 倍希釈して使用) を室温で遮光し 1 時間処理した。さらに PBS で 5 回洗浄後、標本は VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (VECTOR LABORATORIES, INC.) にて封入し、蛍光顕微

鏡 (BZ-8000, KEYENCE) にて観察した。

Transfection (Calcein-AM の取り込み)

細胞を Fibronectin (0.1%, SIGMA) でコーティングした MULTIWELL 6 well に細胞密度 2.0×10^5 cell/2 mL/well の濃度で播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。24 時間後に PBS で 2 回 well を洗い、Opti-MEM に任意の濃度に調整した siRNA と細胞導入剤 (Lipofectamine RNAi Max) を混和した。その 4 時間後に、D-MEM 10 培地 (2 mL) に入れ替えた。

siRNA+Lipofectamine

A

	NC (10 nM)	siPrP (10 nM)	NC (20 nM)	siPrP (20 nM)
siRNA	1.2 μ L	1.2 μ L	2.4 μ L	2.4 μ L
Opti-MEM	123.8 μ L	123.8 μ L	122.6 μ L	122.6 μ L

(siPrP : 12.5 μ M、NC siRNA : 12.5 μ M)

B

Lipofectamine	2.5 μ L
Opti-MEM	122.5 μ L

Calcein-AM の取り込み

siRNA 処置 48 時間後に Krebs-Ringer buffer (37°C) (2 mL/well) で 3 回洗浄後、1 μ M Calcein-AM 入り Krebs-Ringer buffer を 1mL/well 入れ、37°C で 30 分インキュベートした。Krebs-Ringer buffer (4°C) で 3 回 wash 後、1%Tryton X-100 で溶解させ、蛍光を測定した。

Transfection (Scratch assay)

細胞を器官培養 dish に細胞密度 1.0×10^5 cell/well で 500 μ L 播種して 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。24 時間後に PBS で 2 回 well を洗い、無血清培養液 (0 %D-MEM) に任意の濃度に調整した siRNA と細胞導入剤 (Lipofectamine : Lip) を混和し、total 375 μ L

添加した。その 4 時間後に D-MEM 10 培地 500 μL に入れ替えた。

siRNA+Lipofectamine

A

	Blank	Lip only	siPrP (10 nM)	siPrP (50 nM)	NC (10 nM)	NC (50 nM)
siRNA	—	—	3 μL	15 μL	6 μL	6 μL
0% D-MEM	31.25 μL	31.25 μL	28.25 μL	16.25 μL	28.25 μL	16.25 μL

(siPrP : 12.5 μM , NC siRNA : 12.5 μM)

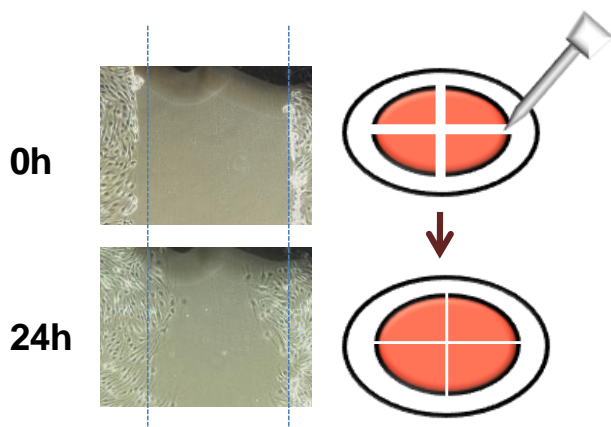
B

Lipofectamine	0.625 μL
0% D-MEM	30.625 μL

PBS で 2 回 well を洗浄後、0% D-MEM を 312.5 $\mu\text{L}/\text{well}$ 入れておく。A と B を混和し、静置する (室温, 15 分)。その後、調整した A+B 液を 62.5 $\mu\text{L} / \text{well}$ 添加する。4 時間後、Medium を抜き、D-MEM 10 培地 500 μL と入れ替える。

Scratch assay

Transfection 44 時間後、白チップ (1-10 μl) で dish の底を十字に scratch し、細胞層に傷をつける。0% D-MEM で 3 回 wash した後、顕微鏡にて scratch 部位を撮影した。



scratch から 24～30 時間後 PBS 500 μ L/well で 2 回 wash し、4% Paraformaldehyde (500 μ L/well) で 20 分固定した。次いで、PBS 500 μ L/well で 2 回 wash し、0.1% クリスタルバイオレット/PBS (500 μ L/well) で 1 時間染色した。染色液を抜き、PBS 500 μ L/well を入れ、顕微鏡にて scratch 部位を撮影した。スクラッチした直後の傷の幅に線を引いておき、24 時間後、線の内側に侵入した細胞の面積と細胞数を評価した。

第二章 atorvastatin による神経突起伸長に対するプリオン蛋白質の役割

第一節 序論

神経細胞において 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬 (スタチン系薬剤) が神経突起を伸ばすということがこれまでに報告されており、神経突起伸長と Alzheimer's disease (AD) などのリスク低下が関与することが提案されている (28)。スタチン系薬剤は、atorvastatin や simvastatin などの脂溶性スタチンと、pravastatin などの水溶性スタチンに分類されており、両者とも脂質異常症の治療薬として世界的に使用されている。近年、疫学的研究においてうつ病や不安障害、AD などの中枢神経疾患の発症リスク低下にスタチンの使用が関係していることが報告されている (29, 30)。また、pitavastatin や atorvastatin による A β の産生低下は、コレステロール低下作用とは異なる機序を介し、APP、特にリン酸化型 APP のレベルの低下により引き起こされることが報告されている (31)。この報告は、スタチン系薬剤が末梢への効果だけではなく、中枢へも効果を示すことを提案している。しかし、その中枢神経への作用メカニズムの詳細は明らかではない。

これまでに、スタチン系薬剤による上皮成長因子受容体の活性化や RhoA シグナルの抑制などが神経突起伸長を促進することが報告されているが (32, 33)、スタチン系薬剤による神経突起伸長メカニズムは不明な点が多い。PrP^C は神経突起伸長に影響することが報告されているが (9, 34, 35)、PrP^C がスタチン系薬剤による神経突起伸長に関与しているかは明らかではない。細胞遊走には、細胞の極性化、突出、接着、後部収縮などの様々な段階

がある。PrPCは基底膜にある Laminin (LN) と結合することが知られており、細胞遊走における接着に PrPC-LN の結合が関与することが考えられる。さらに PrPC-LN の結合は神経突起伸長を促進することや (36)、PrPC は神経細胞接着因子 (neural cell adhesion molecule: N-CAM) とも結合し、神経突起伸長を促進することが報告されている (37, 38)。このように PrPC は神経突起伸長に関係しており、脳血管内皮細胞の遊走時における突出にも関与することが考えられる。神経突起を伸長させる作用を有する Nerve growth factor (NGF) は PrPC 発現を増加させることが報告されており (39)、大動脈の血管内皮細胞においては細胞遊走を誘導することが報告されている (40)。すなわち、NGF による細胞遊走誘導には PrPC 発現増加を介した突出が関与している可能性が考えられる。神経細胞株において、PrPC は Src-family キナーゼや ERK 経路の活性と機能的に共役しているという報告があり、PrPC の刺激により細胞内のシグナル伝達物質が活性化することから、PrPC は神経突起生成や細胞分化の際の反応の仲介をしているのではないかと示唆されている (41, 42)。

そこで、本章では神経細胞におけるスタチンによる神経突起伸長メカニズムに PrPC が関与しているかを解明するため、Neuro2a 細胞 (マウス神経芽細胞腫 : N2a) を用いて、臨床で広く利用されている atorvastatin による神経突起伸長と PrPC の関係について検討した。

第一節 結果

2-2-1 atorvastatin の神経様突起伸長作用

N2a 細胞に atorvastatin 1、5、10、20 μM および DMSO を処置し、3、6、12、24 時間後の細胞を撮影し神経突起伸長細胞数の計測を行い、その割合を解析した。細胞体の長軸の 2 倍以上の長さに神経突起を伸ばした細胞を神経突起伸長細胞として判別した。3 時間処置では神経突起伸長はほとんどみられなかったが、atorvastatin 処置は 6 時間、12 時間、24 時間と時間依存的に神経突起を伸長させた。20 μM atorvastatin の 24 時間処置では約 60% の細胞が神経突起を伸ばした。また、この反応は濃度依存的にみられた (Fig.2-1, 2-2)。

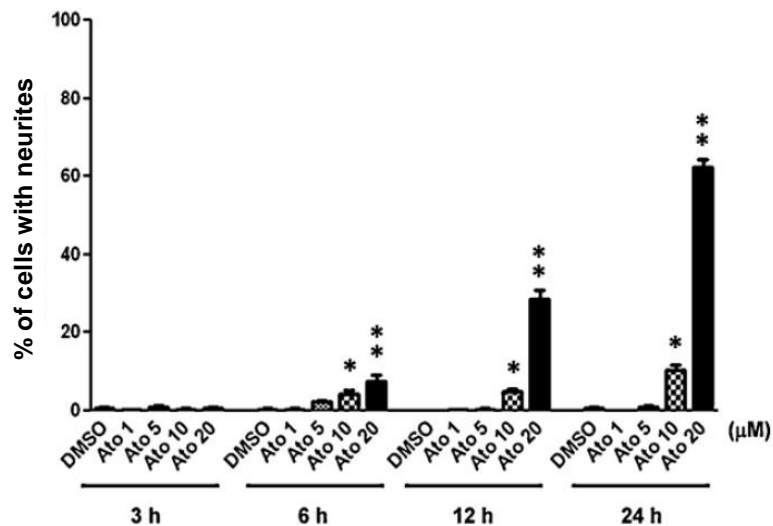


Fig.2-1 Neurite outgrowth induced by atorvastatin in Neuro2a cells. Time- and dose-dependent atorvastatin-induced neurite outgrowth. Neuro2a cells were treated with atorvastatin (Ato) (1–20 μM) for 3–24 h ($n = 8$ –12 each). Each bar indicates the mean \pm S.E. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, significantly different from vehicle (DMSO).

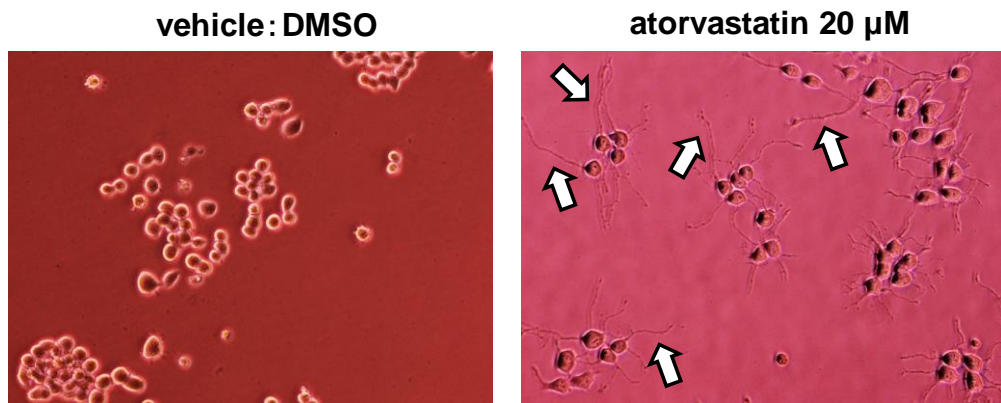


Fig.2-2 Neurite outgrowth of Neuro2a cells in response to DMSO and atorvastatin (20 μ M), respectively, for 24 h.

2-2-2. atorvastatin の PrP^C 発現に対する作用

N2a 細胞に atorvastatin を処置し、3、6、12、24 時間後に western blot を行い、蛋白レベルでの PrP^C 発現量を検討した。atorvastatin の 24 時間処置では、10 μ M より PrP^C の発現量は有意に増加した (Fig.2-3A)。また、atorvastatin 20 μ M 処置における PrP^C の発現量は処置時間に依存して増加した (Fig.2-3B)。

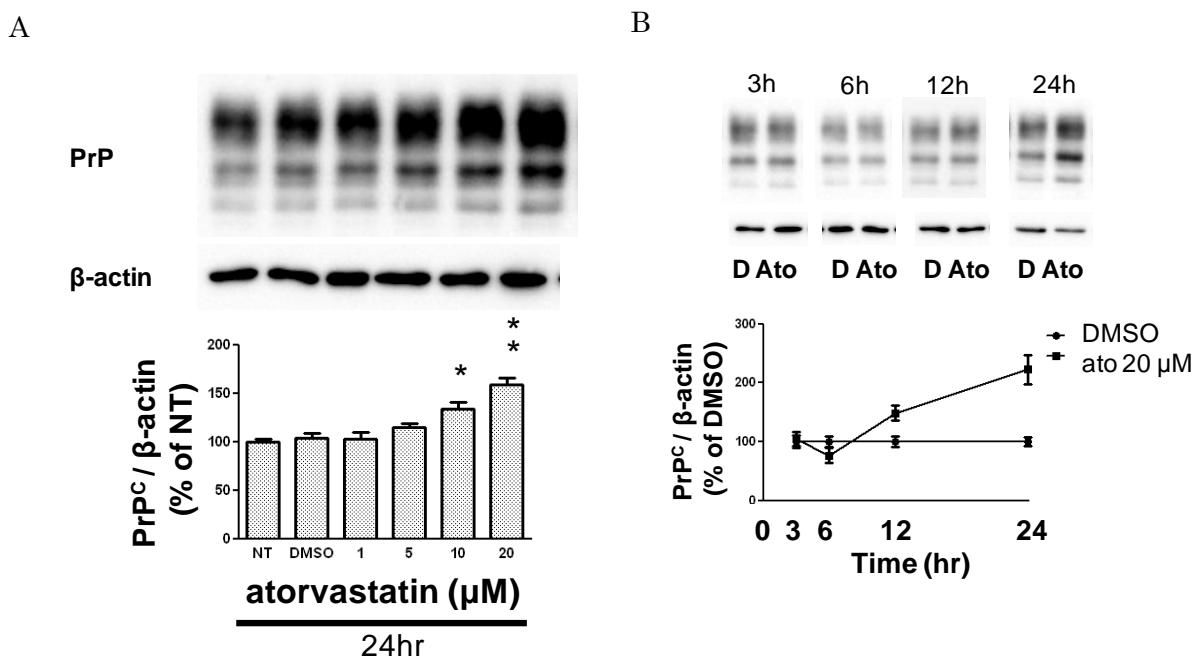


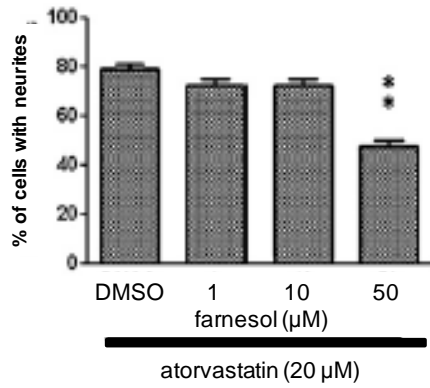
Fig. 2-3 Time- and dose-dependent increases in PrP^C induced by atorvastatin in Neuro2a cells. (A) Neuro2a cells were treated with atorvastatin at concentrations ranging from 1 to 20 μ M for 24 h (n = 8 each). Representative western blots (top) and densitometric analysis (bottom) of the PrP^C levels (A and B). Band intensities were quantified by scanning densitometry (using β -actin as a loading control) and the data are expressed as percentages of control values (vehicle (DMSO)-treated cells). (B) PrP^C expression was examined during the period 3–24 h after treatment of cells with vehicle (DMSO:D) and atorvastatin 20 μ M (Ato) (n = 8 each). Values are means \pm S.E. * P < 0.05 and ** P < 0.01, significantly different from vehicle (DMSO).

2-2-3. atorvastatin+farnesol 処置による神経突起伸長および PrP^C 発現に対する作用

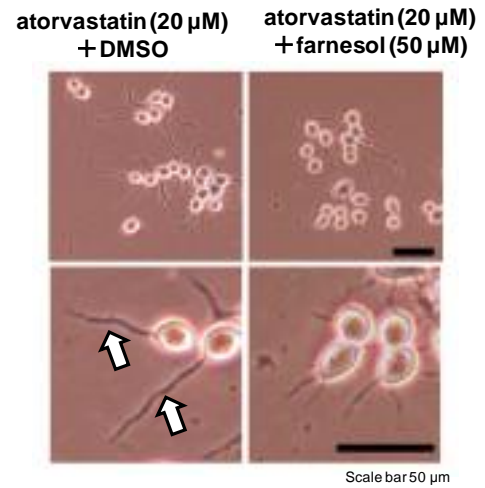
メバロン酸経路の中間代謝物であるファルネシル 2 リン酸 (Farnesyl pyrophosphate : FPP) の付加はスタチン系薬剤による神経突起伸長を抑制することが報告されており、FPP の減少が神経突起伸長に重要であることが示唆されている。そこで、PrP^C の発現がメバロン酸経路に関与するか明らかにするため、FPP からの代謝物である farnesol を補充した時の PrP^C 発現量と神経突起伸長を検討した。atorvastatin 20 μ M および farnesol 1、10、50 μ M を処置し、24 時間後の細胞を撮影した。コントロールである DMSO 付加群に比べ、farnesol 50 μ M の付加群では神経突起伸長の抑制が認められ、神経突起伸長細胞数が有意に減少した (Fig.2-4A, B)。

atorvastatin 20 μ M および farnesol 1、10、50 μ M を処置し、24 時間後に western blot 法を行い、PrP^C 発現量を解析した。その結果、farnesol 50 μ M 付加により PrP^C の発現量は有意に減少した (Fig.2-4C)。

A



B



C

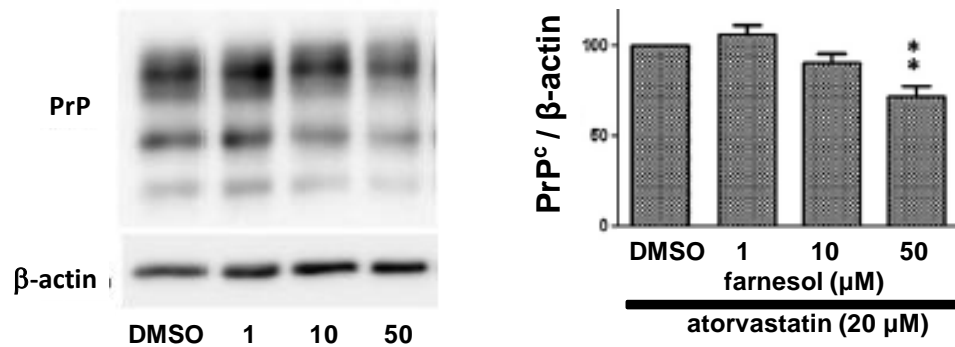
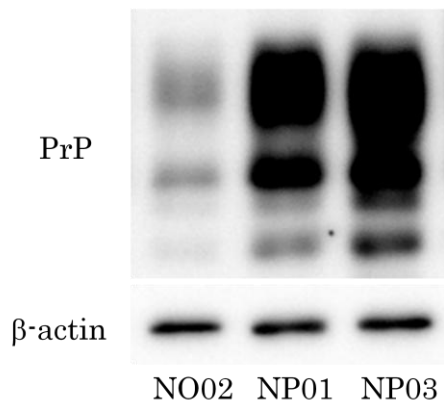


Fig. 2-4 Farnesol-induced inhibition of atorvastatin-facilitated neurite outgrowth and PrP^c expression. (A) Neurite outgrowth of Neuro2a cells after treatment with 20 μM atorvastatin in combination with farnesol (1–50 μM) for 24 h (n = 8 each). (B) Representative photographs showing at low and high magnification neurite outgrowth of Neuro2a cells in response to 20 μM atorvastatin without (atorvastatin + DMSO) or with 50 μM farnesol (atorvastatin + farnesol). Scale bar = 50 μm. (C) PrP^c expression was examined after treatment with 20 μM atorvastatin in combination with farnesol (1–50 μM) for 24 h (n = 5). Representative western blots (left) and densitometric analysis (right) of the PrP^c levels. Band intensities were quantified by scanning densitometry (using β-actin as a loading control) and the data are expressed as percentages of control values (vehicle (DMSO)-treated cells). ***P* < 0.01, significantly different from vehicle (DMSO).

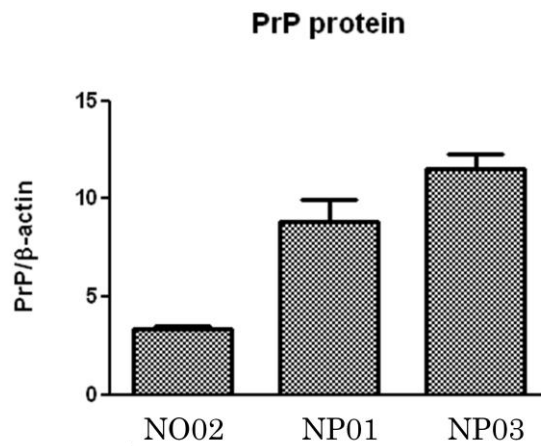
2-2-4. PrP^C 過剰発現株における atorvastatin の作用

PrP^C をコードしていないプラスミドを導入した NO02、PrP^C をコードしたプラスミドを導入した NP01、NP03 を作製し、PrP^C 安定過剰発現 N2a 細胞を確立した。NP01 と NP03 は NO02 と比較して、2 倍以上の PrP^C を発現した (Fig.2-5A, B)。これらの細胞に atorvastatin 20 μ M を処置し、24 時間後に神経突起伸長細胞数を解析した。atorvastatin を処置した際、NO02 と比較して、atorvastatin 処置していない細胞間では差は認められなかった。PrP^C 過剰発現株 (NP01, NP03) では神経突起伸長細胞数が増加した (Fig.2-5C, D)。

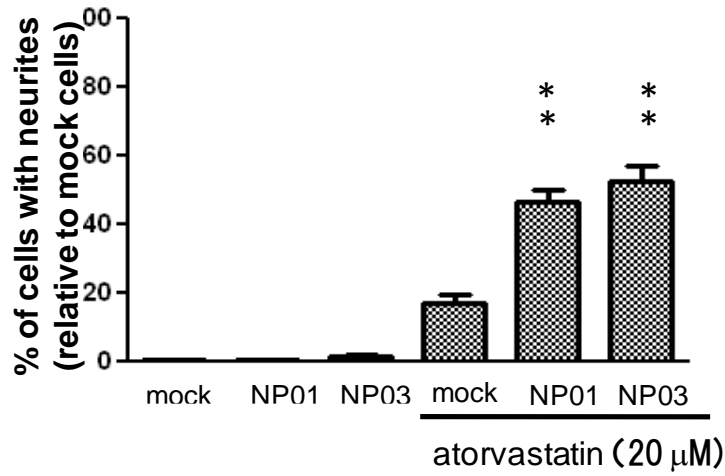
A



B



C



D

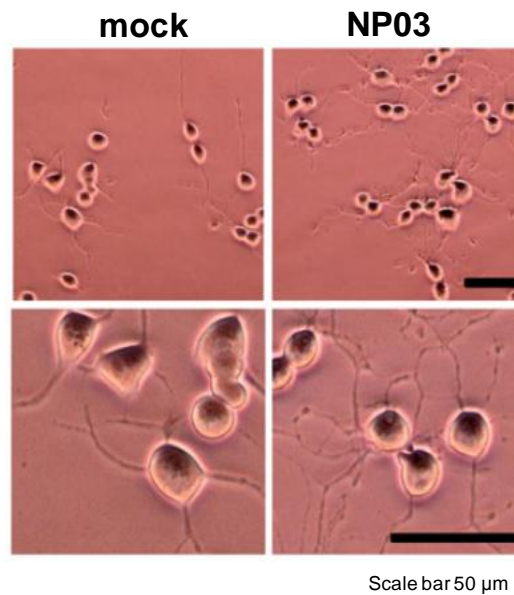


Fig.2-5 Enhancement of atorvastatin-induced neurite outgrowth in PrPC-overexpressing cells (NP01 and NP03 cells). Representative western blots (A) and densitometric analysis (B) of PrPC levels in mock, NP01 and NP03 cells. Band intensities were quantified by scanning densitometry (using β -actin as a loading control) and the data are expressed as a ratio to control values (mock cells). (C) Neurite outgrowth of NP01 and NP03 cells after treatment with 20 μ M atorvastatin for 24 h (n = 12 each). Neurite outgrowth of cells is expressed as a ratio to control values (mock cells). Each bar indicates the mean \pm S.E. $**P < 0.01$, significantly different from mock cells. (D) Representative photographs showing at low and high magnification neurite outgrowth of mock and NP03 cells after treatment with 20 μ M atorvastatin for 24 h. Scale bar = 50 μ m.

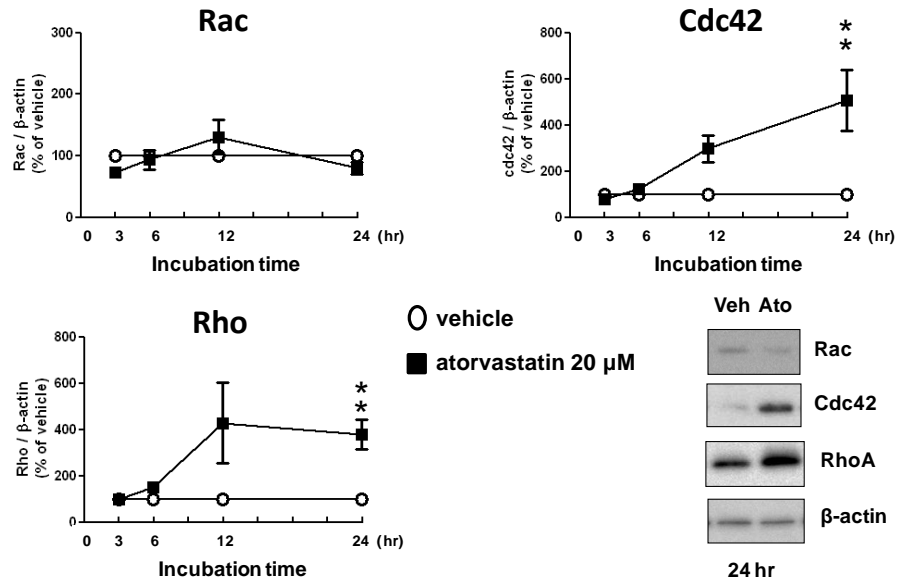
2-2-5. atorvastatin の Rho family G 蛋白発現に対する作用

次に PrPC が神経突起伸長を促進させる、より詳細な機序について検討を行った。その機序として、細胞骨格の調節に関わる Rho family G 蛋白に着目した。その中の Rho はストレスファイバーを形成し、神経突起抑制に作用する。Rac はラメリポディアを形成、Cdc42 はフィロポディアを形成し、神経突起伸長に作用することが知られている。そこで、N2a 細胞における atorvastatin 処置によるこれら G 蛋白の発現量を解析した。

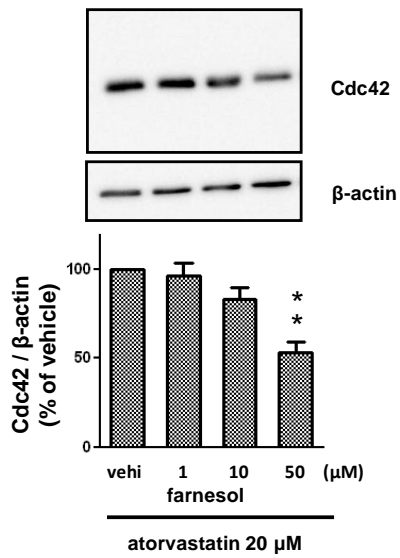
atorvastatin を処置し、3、6、12、24 時間後の Rho family G 蛋白の発現量を解析した。atorvastatin 処置にて Rac の発現量変化は認められなかった。Rho に関しては発現量の増加が認められたが、12 時間以降にさらなる増加は認められなかった。一方、Cdc42 発現量は時間依存的に増加が認められた (Fig.2-6 A)。

次に、atorvastatin による神経突起伸長を抑制した farnesol を共処置し、24 時間後に western blot 法を行い、Rho family G 蛋白の発現量を解析した。farnesol 50 μ M 処置は atorvastatin によって増加した Cdc42 発現量を有意に減少させた (Fig.2-6 B)。そこで、PrPC が Cdc42 発現に影響するか検討を行うため、PrPC 過剰発現細胞に atorvastatin を処置し、Cdc42 発現量を解析した。PrPC 過剰発現 N2a 細胞の NP01、NP03 は mock 細胞と比較し、Cdc42 発現量の増加が認められた (Fig.2-6 C)。

A



B



C

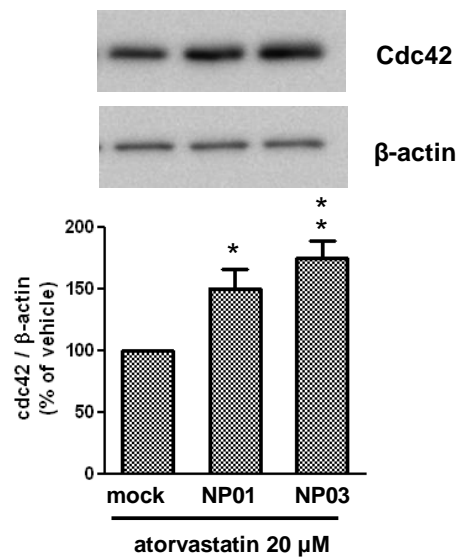


Fig.2-6 (A) Representative western blots of Rho family G protein levels induced by atorvastatin (20 μM) in Neuro2a cells. Time-dependent increases in Cdc42 levels induced by atorvastatin in Neuro2a cells. (B) Farnesol-induced inhibition of atorvastatin-facilitated Cdc42 expression. Each bar indicates the mean ± S.E. ** $P < 0.01$, significantly different from vehicle (vehi). Representative immunoblots (top) and densitometric analysis (bottom) of Cdc42 and β-actin levels. (C) Representative western blots of Cdc42 levels in mock, NP01 and NP03 cells. Each bar indicates the mean ± S.E. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from mock cells. Representative immunoblots (top) and densitometric analysis (bottom) of Cdc42 and β-actin levels.

第三節 考察

本章では、N2a 細胞への atorvastatin 処置は時間および濃度依存的に神経突起を伸長させることを示した。また、PrPC 発現量は atorvastatin の濃度および処置時間に依存して増加することを示した。さらに、PrPC 過剰発現 N2a 細胞における atorvastatin 処置は、Mock N2a 細胞と比較し、神経突起伸長細胞数を増加させることを示した。これらの結果から、PrPC 発現量の増加は atorvastatin による神経突起伸長を増強することが明らかになった。

これまでに、神経細胞にスタチン系薬剤を処置すると NGF 受容体である Trk を一過性に活性化することで神経成長因子である NGF の発現量が増加するという報告 (43) や、神経細胞に NGF とインスリンを処置するとプリオン遺伝子の mRNA と蛋白質の発現量が増加するという報告がある (44)。これらの報告から、神経細胞への atorvastatin 処置は NGF の増加を誘導し、それによって PrPC の発現量を増加させることが考えられる。また、スタチン系薬剤を処置した細胞で NO が神経突起伸長を促進させているという報告 (45) と、NO を放出することで PrPC の発現量が増加するという報告がある (46)。これらの報告から、スタチン系薬剤が NO を増加させ、NO が PrPC の発現を増加させるということが考えられる。また、PrPC はラミニン I と結合し、神経突起伸長のためのシグナルを誘導するという報告 (9, 47) や、 $\beta 1$ インテグリンのクラスタリングを阻害することで、 $\beta 1$ インテグリンによる神経突起伸長阻害を防ぐことが報告されている (48)。これらの報告から、PrPC の発現量増加は細胞内でのシグナル活性に関与していると考えられ、PrPC 仲介シグナル誘導が神経突起伸長に関与することが示唆される。上述したように、スタチンによる神経突起伸

長には NGF や ERK など、複数の因子が関与していると考えられる。その一つにスタチンによる RhoA シグナルの抑制が神経突起伸長に関与することが報告されており (35)、本研究ではこの経路に焦点をあてた。

細胞骨格の調節に関わる Rho family G 蛋白に着目し、atorvastatin 処置により Cdc42 発現量が増加することを示した。さらに、PrP^C 過剰発現細胞においても同様に atorvastatin を処置により Cdc42 発現量が増加することを示した。従って、PrP^C 発現が Cdc42 発現量増加を導き、神経突起伸長を促進することが示唆された。本研究では、Cdc42 が神経突起伸長を促進させることまで明らかにしたが、メバロン酸経路の中間代謝物であるゲラニルゲラニル 2 リン酸により RhoA のゲラニルゲラニル化などのさらに詳細な機序については確認していない。また、メバロン酸経路の FPP は細胞生存に関わる Ras 蛋白質の活性に関与しており、Ras 蛋白の下流には ERK などが存在するため、ERK 経路が動いている可能性も考えられる。スタチン系薬剤による神経突起伸長のより詳細な機序については今後も検討すべき課題が残されている。

本章における結果により、PrP^C を介した神経突起伸長が AD などの神経変性疾患で認められる神経細胞障害に対して改善的に関与することが考えられる。

第四節 実験材料ならびに実験方法

使用試薬

細胞培養関連試薬および Western blot 関連試薬

第一章参照

その他の試薬

atorvastatin は LKT laboratories, Ins (St.Paul, MN) から購入した。atorvastatin は Dimethyl sulfoxide (以下, DMSO) (wako) に溶解し、20 mM の濃度で -20°C の環境で保存した。

使用細胞株

Neuro2a cell (マウス神経芽細胞腫 : N2a) を用いた。細胞は、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。培養液として 10% FBS/D-MEM を用いた。

PrP 過剰発現細胞株の作製

PrP 過剰発現細胞株を作製するために、マウス PrP cDNA を Open Biosystems (Huntsville, AL) から得た。この cDNA を mammalian expression vector pCI-neo (Promega, Madison, WI) に組み込み、Lipofectamine 2000 (invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて N2a 細胞に導入した。導入した細胞に G-418 (1 mg/mL) (Roche, Basel, Switzerland) を処置し、安定過剰発現株を選別した。コントロール細胞株として、PrP cDNA を組み込んでいない pCI-neo を導入した細胞も作製した。安定過剰発現株は G418 (0.5 mg/mL) の存在下で培養した。

突起伸長作用の計測

atorvastatin 処置後、任意の時間で細胞を撮影した。1つの写真の中で細胞数が最低 30 個になるように撮影し、細胞体の大きさの 2 倍の長さの神経突起を有する細胞を神経突起伸長細胞として判別した。全細胞の中で神経突起伸長細胞の割合を数値として表した。

Western blot 解析

atorvastatin 処置後に cold-PBS で 2 回洗浄後、Lysis buffer にて細胞を融解し、CELL SCRAPER (SUMILON) を用いて回収した。遠心分離 (13,000 rpm, 20 min, 4°C) 後、上清を回収し、BCA Protein Assay Kit を用いて蛋白濃度を測定した。上清に TBS を加えサンプルの蛋白量を合わせた後、等量の 2×Sample buffer を加えた。サンプルは−20°Cで保存した。SDS-PAGE の方法に関しては第一章参照。以下に使用した抗体を記す。

一次抗体 : Anti PrP Antibody (SAF32) (Cayman chemical; Cat.No. 189720)

二次抗体 : Anti-mouse IgG,HRP-linked Antibody(GE Healthcare;Cat.No.NA931)

Anti-rabbit IgG,HRP-linked Antibody(GE Healthcare;Cat.No.NA934)

第三章 脳血管内皮細胞の A β 排出機構におけるプリオン蛋白質の役割

第一節 序論

アルツハイマー型認知症 (AD) は、認知機能低下を呈する神経変性疾患である。AD 患者の脳では、神経細胞から分泌された Beta-amyloid (A β) が繊維状に凝集し、脳組織へ沈着した老人斑が認められる。

血液脳関門 (Blood-brain barrier : BBB) は脳の内環境を維持する鍵となる役割をする。脳内 A β は BBB を介して脳外へ排出される。BBB 上には様々な輸送系が発現し、循環血液と脳の間での物質交換を制限しており、中枢の環境を維持する中枢クリアランスシステムとして機能している。つまり、BBB 輸送システムの変動による中枢クリアランスシステムの低下は、脳内の A β の蓄積を導く可能性がある。BBB の機能不全や脳の血流減少、脳アミロイド血管症を含む脳血管の機能不全は AD の病因であるとの報告がある (49)。

A β の排出機構には、BBB を構成する脳血管内皮細胞に発現する P-糖蛋白質 (P-gp) や low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) 等による A β 輸送分子が関与しており、排出機構の異常によって A β が脳内に蓄積することが示唆されている (50, 51, 52, 53, 54)。LRP1 は A β とは *in vitro* において直接結合しないことが報告されているが (53)、LRP1 とともに細胞内へ取り込まれる PrP は A β と結合することから (55, 56)、A β と LRP1 間に PrP 等の介在物が存在し、A β 輸送に関与している可能性がある。P-gp は、BBB において内皮細胞の血管側膜に局在し、排出輸送を担っている (57)。しかし、これらの分子の AD 病態下における発現・機能調節機構は解明されていない。

AD 患者の脳では、同年齢の健常人と比較し血清中の tumor necrosis factor (TNF) α などのサイトカインの発現が亢進している (58)。また、髄液中からも炎症性サイトカインの産生が多く検出されていることから (59)、AD における炎症反応の関与が強く示唆されている。TNF α や interferon- γ によって BBB の P-gp 排出機能が抑制されるという報告 (60) や IL-6、IL-10、IL-13 等の血清中濃度は A β 流出の変化を示したという報告 (61) から、炎症時に誘導される炎症性サイトカインは BBB の機能に何らかの影響を与えることが考えられる。また、非ステロイド系抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs : NSAIDs) 常用者の AD 発現率は非常用者と比較し低いことが知られている (62, 63)。つまり、炎症は AD の病因や病態進行に関与することが考えられる。

関節リウマチの治療薬であるエタネルセプトを用いた抗 TNF α 療法は、ヒトにおいて AD の認知機能を改善したとの報告がある (64)。また、抗 TNF α 療法は遺伝子組み換え型 AD マウスにおいて TNF α やアミロイド斑を減少させる (65)。これらの報告は、TNF α は老人斑の構成分子である A β の脳内蓄積を導き、認知機能を低下させることが示唆している。しかし、TNF α が A β の蓄積にどのように寄与しているかは明らかではない。A β の脳内蓄積機序には、神経細胞からの A β 産生増加と脳血管内皮細胞を介した A β の脳外排出低下が考えられている。しかし、脳血管内皮細胞を介した A β 脳外排出に対する TNF α の影響は明らかではない。AD では血清中の TNF α が増加していることから、血液に面している脳血管内皮細胞が TNF α の標的細胞であることが考えられる。また、TNF α は P-gp の発現を増加させる。しかし、血管内皮細胞内で TNF α を介した P-gp の増加が A β 輸送を制御するかどうかは検討されていない。さらに、LRP1 や PrP^c などの他の A β 輸送分子の影響は解明され

ていない。

そこで、脳から血液への A β の排出除去機構は PrP^C によって制御されるかを解明するため、MBEC4 細胞（マウス脳毛細血管内皮細胞株）を用いて A β 輸送分子として知られる P-gp や LRP1、PrP^C による A β 排出機構への影響について検討した。

第二節 結果

3-2-1. PrP mRNA および PrP^c への TNF α の影響

脳血管内皮細胞における TNF α の効果を確認するために、MBEC4 細胞に TNF α を処置し、3 時間、18 時間後にリアルタイム RT-PCR 法を用いて、TNF α による PrP mRNA の発現量を解析した。PrP mRNA の発現量は、3 時間後に減少傾向を示し、18 時間後には有意な減少が認められた (Fig.2-1A)。次に、24 時間後に蛋白を回収し Western blot 法を行った。蛋白量に関しては、TNF α 1 ng/mL よりプリオン蛋白質の発現量が有意に減少した (Fig.2-1B)。

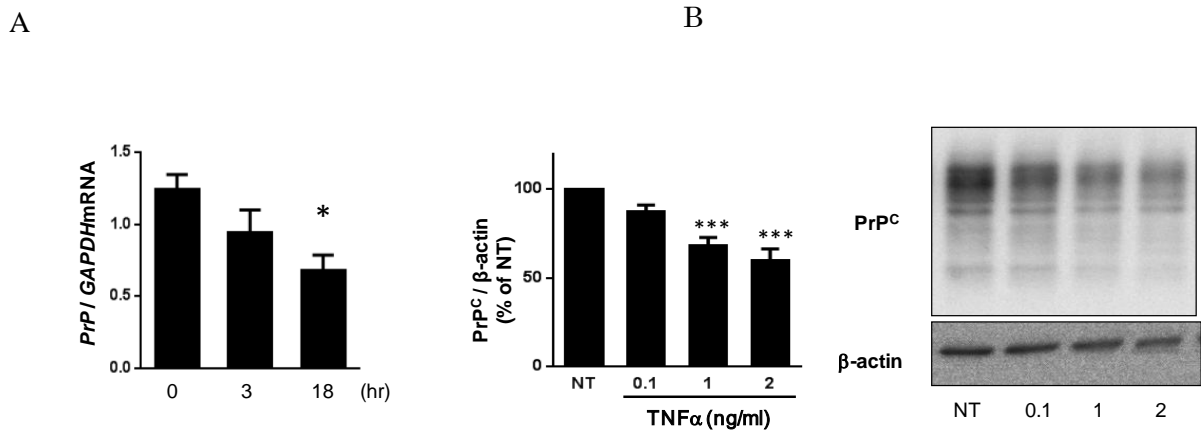


Fig.2-1 (A) TNF α -induced a time-dependent decrease in PrP^c mRNA levels in MBEC4 cells. mRNA expression was measured by real-time RT-PCR 3 and 18 h after treatment with TNF α (2 ng/ml) (n = 6). PrP^c mRNA levels were normalized to GAPDH. Values are means \pm SE, * P < 0.05, significantly different from 0 h (just before treatment). (B) TNF α -induced dose-dependent increase in P-gp levels in MBEC4 cells. P-gp expression was examined 24 h after TNF α treatment (0.1–2.0 ng/ml, n = 12 each). The data are expressed as percentages of control values (NT). Each bar indicates the mean \pm SE, * P < 0.05, ** P < 0.01, significantly different from NT. Representative immunoblots (right) and densitometric analysis (left) of P-gp and b-actin levels.

3-2-2. TNF α の LRP1 発現および P-gp 発現に対する作用

A8 輸送分子に関与すると考えられる P-gp および LRP1 の発現量に TNF α の与える影響を解析するために、24 時間後に蛋白を回収し Western blot 法を行った。

P-gp の発現量は、non-treatment (NT) と比べ TNF α 1 ng/mL より有意に増加した (Fig.2-2A)。一方、TNF α 0.1, 1, 2 ng/mL 処置によって LRP1 の発現量に影響は認められなかった (Fig.2-2B)。

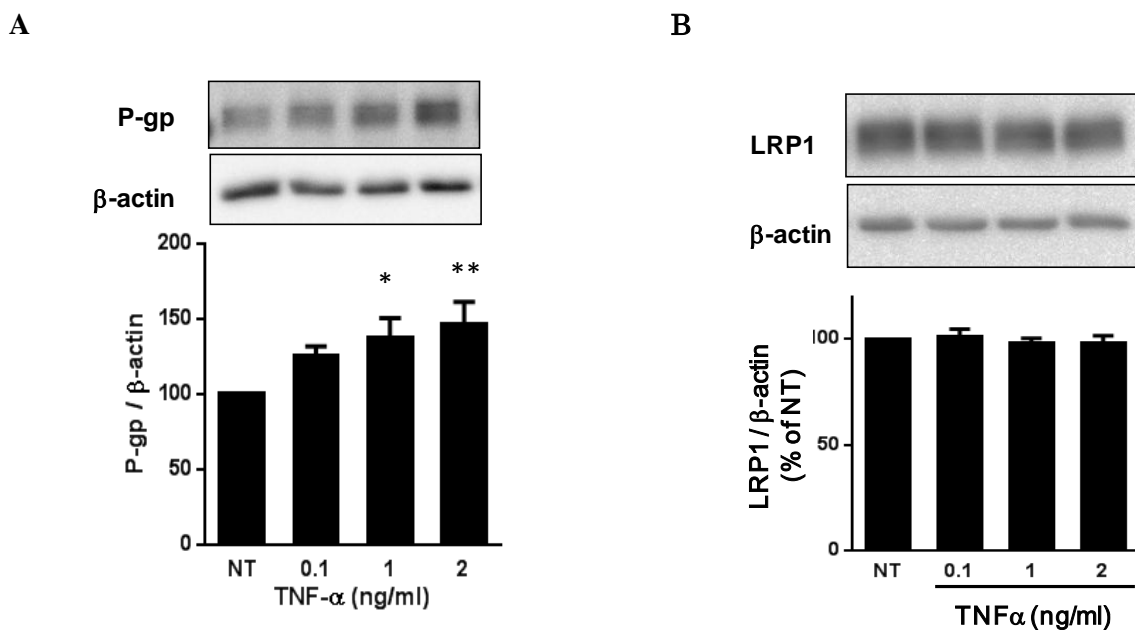


Fig.2-2 (A) TNF α -induced dose-dependent increase in P-gp levels in MBEC4 cells. P-gp expression was examined 24 h after TNF α treatment (0.1–2.0 ng/ml, n = 12 each). (B) TNF α -induced changes in LRP1 expression in MBEC4 cells. Protein expression was examined 24 h after TNF α treatment (0.1–2.0 ng/ml, n = 12 each). The data are expressed as percentages of control values (NT). Each bar indicates the mean \pm SE, * P < 0.05, ** P < 0.01, significantly different from NT. Representative immunoblots (top) and densitometric analysis (bottom) of P-gp and β -actin levels.

3-2-3. Aβ 輸送に対する TNFα の影響

TNFα が Aβ 輸送に与える影響を評価するために、TNFα を処置し 24 時間後に 125 ヨードでラベルした Aβ を処置し、その 60 分後に細胞を回収し、細胞内に蓄積したラベル化 Aβ を γ カウンターで測定を行った。その結果、Aβ の細胞内蓄積量は non-treatment (NT) と比べ、TNFα 1 ng/mL より有意な減少が認められた (Fig.2-3 A)。

また、Aβ の細胞内蓄積量減少が TNFα による細胞死によって引き起こされたものではないことを確認するため、TNFα 処置 24 時間後に WST assay を行った。NT 群と比較し、TNFα 処置群で有意な細胞生存率低下は認められなかった (Fig.2-3 B)。

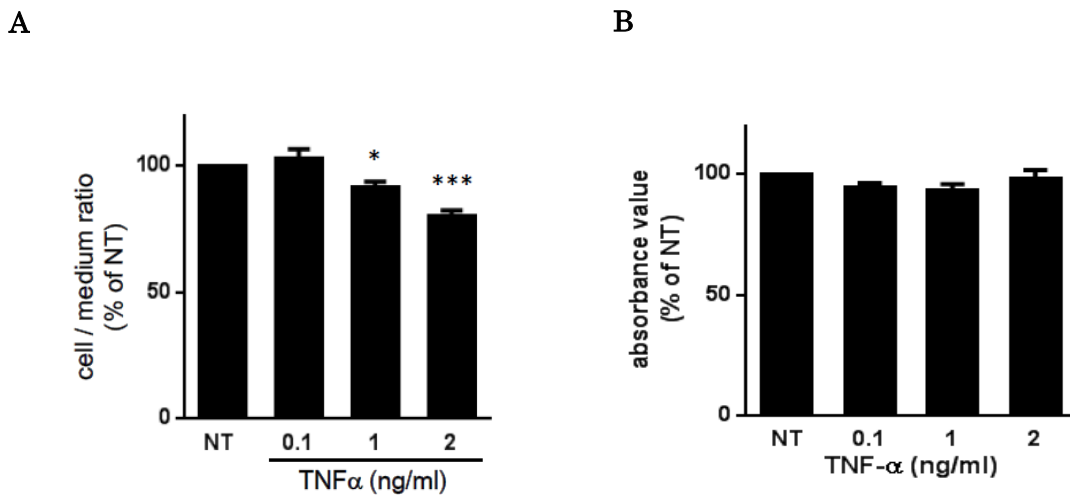


Fig.2-3 (A) TNFα-induced reduction in intracellular ^{125}I -Aβ levels in MBEC4 cells. Cells were treated with TNFα (0.1–2.0 ng/ml) for 24 h and incubated with ^{125}I -Aβ for 60 min ($n = 14$ –21). (B) Cell proliferation and survival rates in TNFα-treated MBEC4 cells. MBEC4 cells were treated with TNFα (0.1–2.0 ng/ml) for 24 h and incubated with WST8 for 60 min ($n = 6$). The data are expressed as percentages of control values (NT: non-treatment). Each bar indicates the mean \pm SE, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significantly different from NT.

3-2-4. A β 輸送に及ぼす P-gp の影響

TNF α 処置による A β の細胞内蓄積量減少は、P-gp 発現量増加による細胞外排泄増加によるものなのか、PrP 発現量減少による細胞内取り込み減少によるものなのかが考えられた。まず、P-gp による排出増加の寄与を検討するため、P-gp 阻害剤である verapamil を処置し P-gp 機能を阻害した際の細胞内 A β 蓄積量を検討した。

TNF α 処置 24 時間後に P-gp の基質である calcein とともに verapamil を処置し 30 分後に細胞を回収し蛍光測定を行った。その結果、TNF α 処置によって P-gp の発現量が増加するため、calcein の蓄積量が減少が認められたが、ベラパミル処置によってこの減少は阻害された (Fig.2-4A)。続いて、TNF α の処置し 24 時間後に A β と verapamil を処置し、その 60 分後に細胞を回収し γ カウンターにて測定を行った。TNF α 処置によって P-gp の発現量が増加するため、A β の細胞内蓄積量は減少が認められた。さらに、verapamil 処置が細胞内 A β 蓄積量を増加することから、P-gp が A β 排出に作用していることが認められた。しかし、verapamil 処置を行い P-gp の機能を阻害しても、TNF α による細胞 A β 蓄積量の減少を阻害されなかった (Fig.2-4B)。

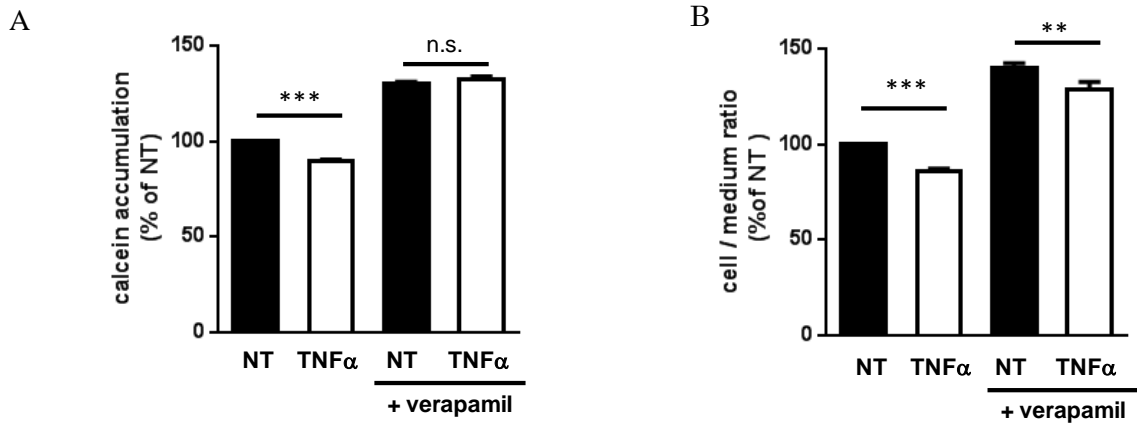


Fig. 2-4 (A) TNF α -induced changes in the intracellular calcein levels in MBEC4 cells treated without or with verapamil. Cells were treated with TNF α (2 ng/ml) for 24 h and then incubated with calcein-AM in the absence or presence of verapamil (100 μ M) for 30 min (n = 4). The data are expressed as percentages of control values (NT without verapamil). Each bar indicates the mean \pm SE, *** P < 0.001, significantly different. n.s.: no significance (B) TNF α -induced changes in the intracellular 125 I-A β accumulation in MBEC4 cells treated without or with verapamil. Cells were treated with TNF α (2 ng/ml) for 24 h and then incubated with 125 I-A β in the absence or presence of verapamil (100 μ M) for 60 min (n = 18). The data are expressed as percentages of control values (NT without verapamil). Each bar indicates the mean \pm SE, ** P < 0.01, *** P < 0.001, significantly different.

3-2-5. A β 輸送に対する抗 PrP 抗体 (SAF32) の影響

上述した結果から、A β 輸送には P-gp 以外に別の経路が存在することが示唆された。そこで、プリオン蛋白質に着目した。神経細胞においてプリオン蛋白質が A β と結合することから、プリオン蛋白質が脳血管内皮細胞において A β と結合し、細胞内に取り込むことが考えられる。A β の細胞内取り込みにプリオン蛋白質が関与するか検討するため、抗 PrP 抗体 (SAF32) により PrP をマスキングすることで、A β とプリオン蛋白質の結合を阻害した状態での A β の細胞内蓄積量を検討した。

ラベル化 A β を処置する 30 分前に抗 PrP 抗体である SAF32 を処置した。SAF32 の前処置により、non-treatment (NT) と比べ細胞内の A β 蓄積量に有意な減少が認められた。

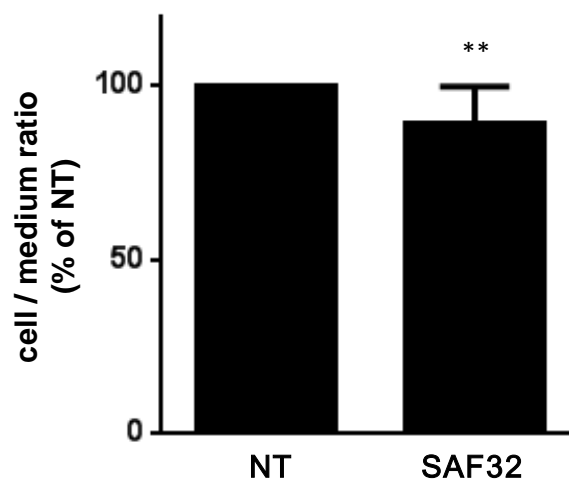


Fig.2-5 Anti-prion protein antibody-induced reduction of intracellular ^{125}I -A β accumulation in MBEC4 cells. Cells were treated with anti-prion protein antibody (SAF32, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min and then incubated with ^{125}I -A β for 60 min ($n = 9$). The data are expressed as percentages of control values (NT). Each bar indicates the mean \pm SE, ** $P < 0.01$, significantly different from NT.

第三節 考察

本章では、A β の脳外への排泄過程において P-gp の排出機序が存在すると同時に、他の排出経路の存在を明らかにした。

脳血管内皮細胞内において TNF α 処置により細胞内の A β 蓄積量は細胞増殖や生存率に変化を与えずに用量依存的な減少が認められた。また、TNF α 処置により P-gp 発現量は増加し、細胞内の calcein 蓄積量は減少するが、この減少は P-gp 阻害剤である verapamil によって阻害されることを示した。これらの結果から、TNF α は P-gp の発現量を増加させることで、A β 排出機能を増強するすることが示唆された。一方、verapamil によって P-gp 機能を阻害しても TNF α による細胞内 A β 蓄積量減少を阻害できないことを示した。

A β の排出機構には、脳血管内皮細胞に発現する LRP1 の関与が示唆されているが (52, 53)、本研究において TNF α は LRP1 の発現量に影響を与えなかったが、PrP^C の発現量を減少させることが明らかとなった。さらに、抗 PrP 抗体である SAF32 を前処置し、細胞内の A β 蓄積量を解析した結果、A β と PrP^C の結合を阻害した状態での A β の細胞内蓄積量は有意な減少が認められた。この結果から、脳血管内皮細胞内で PrP^C は A β 排出機構において促進的な役割を果たすことが明らかとなった。

従って、A β の脳外への排出過程には、まず、PrP^C を介した血管内皮細胞への取り込みがあり、次に、その取り込まれた A β の P-gp を介した血管方面への排泄があることが示唆された。TNF α は P-gp の発現増加により A β の細胞外への排出を増加させるが、P-gp 機能が増加したとしても、細胞内に A β が少ないと排出を促進できないと考えられる。

血清中の TNF α を抑制すること（抗 TNF α 療法）は、A β 排出機構の起点となる PrPC の機能を維持させるためにも重要であると考えられる。本章の結果より、PrPC を介した細胞内 A β の取り込み機序を AD における抗 TNF α 抗体治療の新たな作用機序として提案する。

第四節 実験材料ならびに実験方法

使用試薬

細胞培養関連試薬および Western blot 関連試薬

第一章参照

その他の試薬

ECF buffer、Acid Wash buffer は、下記のように調整した。A β 42 peptide (Amyloid β -Protein 42 Human) は、PEPTIDE INSTITUTE, INC. (Osaka, Japan) から購入した。1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (以下, HFIP)、sephadex G-10 は Sigma-Aldrich から購入した。¹²⁵I radionuclide は PerkinElmer (Waltham, MA, USA) から購入した。¹²⁵I using IODO-BEADS Iodination Reagent は PIERCE (Rockford, IL) から購入した。Recombinant mouse TNF α は R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。SYBR Green Real-time PCR Master Mix Plus は Toyobo (Osaka, Japan) から購入した。Calcein-AM は Mo Bi Tec (Goettingen, Germany) から購入した。

● ECF buffer

NaCl	138mM	8.065g
KCl	5mM	0.373g
CaCl ₂ · H ₂ O	1.3mM	0.191g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.8mM	0.163g
KH ₂ PO ₄	0.3mM	0.041g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.3mM	0.107g
d-glucose	5.6mM	1.009g
HEPES	10mM	2.383g
<hr/>		
final volume		1000 mL
pH 7.4 に調整		

●Acid Wash buffer

CH ₃ COONa	28mM	2.296g
NaCl	120mM	7.012g
Sodium barbital	20mM	4.123g
<hr/>		
final volume		1000 mL
pH 3.0 に調整		

抗体

anti-LRP1 antibody、anti-b-actin antibody は Abcam (Cambridge, UK) から購入した。anti-P-gp antibody は Calbiochem (San Diego, CA) から購入した。Anti-prion protein (SAF32) antibody は Bertin Pharma (Montigny-le-Bretonneux, France) から購入した。HRPconjugated anti-mouse and anti-rabbit IgG secondary antibodies は GE Healthcare (Waukesha, WI) から購入した。

使用細胞株

MBEC4 細胞 (マウス脳血管内皮細胞) を用いた。細胞は、10% FBS を含む D-MEM を培養液とし、75 cm² Cell Culture Flask (BD Falcon) に播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

Uptake assay of ¹²⁵I-Aβ

TNFα を 24 時間処置した後、Aβ42 peptide 約 5 μg と ¹²⁵I-Na を IODO-BEADS Iodination Reagent と共に反応させ、各ペプチドを ¹²⁵I でラベル化した。ラベル化した ¹²⁵I- Aβ42 は sephadex G-10 を満たしたカラムで精製して実験に用いた。細胞を 1% BSA/ECF buffer (138 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 0.3 mM KH₂PO₄, 0.3 mM Na₂HPO₄, 5.6 mM D-glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4) で 3 回洗浄し (800 μL/well)、¹²⁵I ラベル化ペプチドを含む 1% BSA/ECF buffer を加え (800 μL/well) 培養した (60 min, 37°C)。Cold ECF buffer で 5 回洗浄 (800 μL/well) した後、Acid Wash buffer (28mM CH₃COONa, 120 mM NaCl, 20 mM sodium barbital, pH3.0) で 3 回洗浄した (800

μL/well)。1%Triton-X で溶解した細胞 (600 μL/well) と incubation buffer は trichloroacetic acid (final concentration, 10%) とウシ血清アルブミン (final concentration, 0.33%) に混和し、遠心分離した (2380g, 10 min)。沈殿物を γ counter によって定量化した。BCA Protein Assay Reagent kit を用いて蛋白濃度を測定した。細胞内の ¹²⁵I- Aβ42 量は cell/medium 比で現した。

The cell/medium ratio (μl/mg of protein) = ¹²⁵I counts in the cells (cpm/mg protein)/¹²⁵I counts in the incubation buffer (cpm/μl)

Aβ42 の stock solution (stock 1) は、HFIP の中に Aβ42 peptide を溶解し (4°C, 1 時間、振とう)、チューブに分割した。最終濃度を 1 mg/ml とした。分割した Aβ42 溶液は HFIP で再溶解し、Aβ42 stock 2 溶液は乾燥し -20°C で保存した。SAF32 (Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France) は ¹²⁵I-Aβ42 処置の 30 分前に処置した。

WST-8 assay

MBEC4 細胞生存率は生化学的な指標として WST-8 assay (Cell Counting Kit-8, DOJINDO, Kumamoto, Japan) を用いた。MBEC4 細胞 を 96 well-マイクロプレートの各 well に 100 μL ずつ播種した。TNFα 処置後、serum-free DMEM で 3 回洗浄した。Serum-free medium で 10 倍希釈した WST-8 溶液を 10 μL ずつ添加し、インキュベータ内で 1 時間呈色反応を行った後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 (測定波長 450 nm, 参照波長 630 nm) を測定した。

LRP1 および P-gp の mRNA の検出 (定量 PCR)

MBEC4 細胞に TNFα を 3 時間あるいは 18 時間処置後、cold-PBS で 2 回洗浄後、Buffer RLT (QIAGEN, Venlo, Netherlands) にて細胞を融解し、CELL SCRAPE を用いて QIA shredder (QIAGEN) へ回収した。続いて、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて mRNA を精製した。SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を用いて回収した mRNA を逆転写させ、cDNA を作製した。その後、SYBR Green Real-time PCR Master Mix Plus とプライマーを用いて、下記のプロトコールに従い、Mx 3000P™ Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene, La Jolla, CA) 中で反応させた。

熱変性 : 95°C、15s、アニーリング : 60°C for PrP, Mdr1a, Mdr1b, 54°C for GAPDH、

30s、伸長反応：72°C、45s を 1 サイクルとして反応させた。

プライマー対の塩基配列は以下の通りである（センス/アンチセンス：5' to 3'）；

5'-CTGCTGGCCCTCTTTGTGAC-3'

and 5'-CTTTTTGCAGAGGCCGACAT-3' for *PrP*

5'-CATGACAGATAGCTTTGCAAGTGTAG-3'

and 5'-GGCAAACATGGCTCTTTTATCG-3' for *Mdr1a*,

5'-AAGCCAGTATTCTGCCAAGCAT-3'

and 5'-CTCCAGACTGCTGTTGCTGATG-3' for *Mdr1b*

5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'

and 5'-GGATGCAGGGATGTTCT-3' for *GAPDH*.

LRP1 および P-gp 発現量の検出

第一章同様に Western blot 解析を行った。

P-gp

Separation Gel : 8%

一次抗体 : Anti P-gp Antibody (C219) (Calbiochem, San Diego, CA ; Cat.No. 517310)

二次抗体 : Anti mouse IgG, HRP-linked Antibody (GE Healthcare ; Cat.No. NA931)

LRP1

Separation Gel : 10%

一次抗体 : Anti LRP1 Antibody (EPR3724) (abcam, Cambridge, UK ; Cat.No. ab92544)

二次抗体 : Anti rabbit IgG, HRP-linked Antibody (GE Healthcare ; Cat.No. NA934)

β -actin

Separation Gel : 8%, 10%, 12%

一次抗体 : Anti β -actin Antibody (abcam, Cambridge, UK)

二次抗体 : Anti rabbit IgG, HRP-linked Antibody (GE Healthcare ; Cat.No. NA934)

Calcein-AM efflux assay

TNF α 処置 48 時間後に Krebs-Ringer buffer (37°C, KRB; 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 1.0 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM d-glucose, pH 7.4) (1 mL/well) で 3 回洗浄後、Krebs-Ringer buffer で 100 倍に希釈した 1 μ M Calcein-AM を細胞に入れ (500 μ L/well) 、37°C で 30 分インキュベートした。Verapamil (P-gp 阻害剤) も同時に処置した。Krebs-Ringer buffer (4°C) で 3 回洗浄後、1%Tryton X-100 で溶解した (400 μ L/well) 。波長 (Excitation : 485/20, Emission 530/25) にて、細胞内に蓄積した Calcein の蛍光を測定した。細胞数の補正は総蛋白量を用いた。蛋白量は BCA assay にて解析した。

総括

PrP^C は神経細胞保護、銅代謝、細胞接着、細胞内シグナル伝達などに関与することが示唆されているが、その生理機能は依然として不明瞭である。そこで本研究では、NVU 構成細胞における PrP^C の生理機能解明と PrP^C の発現調節因子同定を試みた。

第一章では、PrP^C が BBB の tight junction や P-gp の機能に影響を及ぼさずに BBB を含む脳神経血管機構の修復、再生に関与することを明らかにした。これらの結果から PrP^C は脳血管内皮細胞の遊走を制御することにより、虚血性障害のような損傷から脳血管内皮細胞を含む NVU の再生に関与することが示唆された。

第二章では、AD の進行リスクを低下させることが報告されているスタチン系薬剤の 1 つである atorvastatin が PrP^C 発現量を増加させること、PrP^C 発現量の増加は神経突起伸長を促進することを明らかにした。また、本章の結果から PrP^C 発現が Cdc42 発現量増加を導き、神経突起伸長を促進することが示唆された。atorvastatin は神経細胞において PrP^C 発現量を増加させ、神経突起伸長を促進させることから、AD などの神経細胞傷害に対して有効であることが考えられる。atorvastatin の神経細胞への処置では PrP^C が増加するため、結合する A β が増えることが考えられる。A β oligomer が神経細胞の PrP^C に結合し、シナプス伝達が減弱されることが報告されている (66)。よって、atorvastatin は毒性の方向に働くと考えられる。しかし、PrP^C の生理機能には抗酸化作用 (7) などの神経を保護する報告があるため、atorvastatin が神経保護的に働くことも考えられる。また、神経細胞が A β monomer を取り込み、細胞内で蛋白分解することで A β の脳内蓄積を防ぐことも考えられ

る。従って、スタチン系薬剤は認知機能の改善と増悪のどちらにも働くことが考えられるが、スタチン系薬剤の使用が認知機能の悪化に効果的であったとの報告 (67) も存在することから、今後のスタチン系薬剤による AD 治療への進展が期待される。

第三章では、A β の脳外への排出過程において P-gp 機能による排出機序が存在すると同時に、A β 細胞内取り込みが PrP^C を介して行われることを明らかにし、TNF α による PrP^C 発現量減少が A β 細胞内取り込みを低下させることを提案した。これらの結果より、AD 脳において TNF α を抑制することは、A β 排出機構の起点となる PrP^C の機能を維持するためにも重要であると考えられる。

本研究結果は、NVU 構成細胞における PrP^C の生理機能として、損傷時の再生や神経突起伸長促進、A β 脳外排出促進といった生体保護作用があることを提案するものである。

引用文献

- 1) Caughey B, Brown K, Raymond GJ, Katzenstein GE, Thresher W. Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red [corrected] *J Virol.*, **68**(4) , 2135-2141, 1994
- 2) Bernhard Ehlers, Heino Diringer. Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen. *J Gen Virol.*, **65**(8) , 1325-1330, 1984
- 3) Pocchiari M, Casaccia P, Ladogana A. Amphotericin B: a novel class of antiscrapie drugs. *J Infect Dis.*, **160**(5), 795-802, 1989
- 4) Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* **216**, 136-144, 1982
- 5) J. Collinge, Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis, *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 519–550, 2001
- 6) Mangé A, Milhavet O, Umlauf D, Harris D, Lehmann S, PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells., *FEBS Lett.*, **514**(2-3), 159-162, 2002
- 7) Choi CJ, Anantharam V, Saetveit NJ, Houk RS, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. Normal cellular prion protein protects against manganese-induced oxidative stress and apoptotic cell death. *Toxicol Sci.*, **98**(2), 495-509, 2007
- 8) A. Aguzzi, C. Sigurdson, M. Heikenwaelder, Molecular mechanisms of prion

pathogenesis, *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 11-40, 2008

9) E. Graner, A.F. Mercadante, S.M. Zanata, O.V. Forlenza, A.L. Cabral, S.S. Veiga, M.A. Juliano, R. Roesler, R. Walz, A. Minetti, I. Izquierdo, V.R. Martins, R.R. Brentani, Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis, *Brain Res. Mol.*

Brain Res. **76**(1), 85-92, 2000

10) R. Linden, V.R. Martins, M.A. Prado, M. Cammarota, I. Izquierdo, R.R. Brentani, Physiology of the prion protein, *Physiol. Rev.* **88**(2), 673-728, 2008

11) B. Schneider, V. Mutel, M. Pietri, M. Ermonval, S. Mouillet-Richard, O. Kellermann, NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**(23), 13326-13331, 2003

12) M. Turu, M. Slevin, P. Ethirajan, A. Luque, A. Elasbali, A. Font, J. Gaffney, M. Cairols, P. Kumar, S. Kumar, J. Krupinski, The normal cellular prion protein and its possible role in angiogenesis, *Front. Biosci.*, **13**, 6491-6500, 2008

13) S.M. Zanata, M.H. Lopes, A.F. Mercadante, G.N. Hajj, L.B. Chiarini, R. Nomizo, A.R. Freitas, A.L. Cabral, K.S. Lee, M.A. Juliano, E. de Oliveira, S.G. Jachieri, A. Burlingame, L. Huang, R. Linden, R.R. Brentani, V.R. Martins, Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection, *EMBO J.*, **21**, 3307-3316, 2002

14) Sauer H, Wefer K, Vetrugno V, Pocchiari M, Gissel C, Sachinidis A, Hescheler J, Wartenberg M, Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF-alpha:

- the role of intracellular reactive oxygen species, *Free Radic Biol Med.*, **35**, 586-594, 2003
- 15) Bellingham SA, Coleman LA, Masters CL, Camakaris J, Hill AF, Regulation of prion gene expression by transcription factors SP1 and metal transcription factor-1, *J Biol Chem.*, **284**, 1291-1301, 2009
- 16) P. Viegas, N. Chaverot, H. Enslin, N. Perriere, P.O. Couraud, S. Cazaubon, Junctional expression of the prion protein PrP^C by brain endothelial cells: a role in trans-endothelial migration of human monocytes, *J. Cell Sci.*, **119**, 4634-4643, 2006
- 17) Simak, J, Holada, K, D'Agnillo, F, Janota, J, Vostal, JG: Cellular prion protein is expressed on endothelial cells and is released during apoptosis on membrane microparticles found in human plasma. *Transfusion*, **42**, 334-342, 2002.
- 18) Starke, R, Drummond, O, MacGregor, I, Biggerstaff, J, Gale, R, Camilleri, R, Mackie, I, Machin, S, Harrison, P: The expression of prion protein by endothelial cells: a source of the plasma form of prion protein?, *Brit J Haematol.*, **119**, 863-873, 2002.
- 19) Miller G, Breaking Down Barriers. *Science*, **297**(5584), 1116-1118, 2002
- 20) Furuse M, Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita Sh., Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin, *J Cell Biol.*, **141**(7), 1539-50, 1998
- 21) Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S, Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.*, **123**(6), 1777-1788, 1993
- 22) Stevenson BR, Silicino JD, Mooseker MS, Goodenough DA, Identification of ZO-1: a

- high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia., *J Cell Biol.*, **103**(3), 755-766, 1986
- 23) Huber JD, Egleton RD, Davis TP, Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Neurosci.*, **24**(12), 719-725, 2001
- 24) S. Vogelgesang, Cerebrovascular P-glycoprotein expression is decreased in Creutzfeldt–Jakob disease, *Acta neuropathol.* , **111**(5), 436-444, 2006
- 25) N. Mitsios, M. Saka, J. Krupinski, R. Pennucci, C. Sanfeliu, M. Miguel Turu, J. Gaffney, P. Kumar, S. Kumar, M. Sullivan, M. Slevin, Cellular prion protein is increased in the plasma and peri-infarcted brain tissue after acute stroke, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 602-611, 2007
- 26) W.C. Shyu, S.Z. Lin, M.F. Chiang, D.C. Ding, K.W. Li, S.F. Chen, H.I. Yang, H. Li, Overexpression of PrP^C by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model, *J. Neurosci.*, **25**, 8967-8977, 2005
- 27) G. Mitteregger, M. Vosko, B. Krebs, W. Xiang, V. Kohlmannsperger, S. Nölting, GF. Hamann, HA. Kretzschmar, The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein., *Brain Pathol.*, **17**(2), 174-183, 2007
- 28) A.M. Pooler, S.C. Xi, R.J. Wurtman, The 3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A reductase inhibitor pravastatin enhances neurite outgrowth in hippocampal neurons, *J. Neurochem.*, **97**, 716-723, 2006
- 29) B. Wolozin, W. Kellman, P. Ruosseau, G.G. Celesia, G. Siegel, Decreased prevalence

of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, *Arch. Neurol.*, **57**, 1439-1443, 2000

30) Y. Young-Xu, K.A. Chan, J.K. Liao, S. Ravid, C.M. Blatt, Long-term statin use and psychological well-being. Long-term statin use and psychological well-being, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **42**, 690-69, 2003

31) Hosaka A, Araki W, Oda A, Tomidokoro Y, Tamaoka A., Statins reduce amyloid β -peptide production by modulating amyloid precursor protein maturation and phosphorylation through a cholesterol-independent mechanism in cultured neurons., *Neurochem Res.*, **38**(3), 589-600, 2013

32) M.E. Evangelopoulos, J. Weis, A. Krüttgen, Mevastatin-induced neurite outgrowth of neuroblastoma cells via activation of EGFR, *J. Neurosci. Res.*, **87**, 2138-2144, 2009

33) M.E. Evangelopoulos, S. Wüller, J. Weis, A. Krüttgen, A role of nitric oxide in neurite outgrowth of neuroblastoma cells triggered by mevastatin or serum reduction, *Neurosci. Lett.*, **468**, 28-33, 2010

34) F.H. Beraldo, C.P. Arantes, T.G. Santos, C.F. Machado, M. Roffe, G.N. Hajj, K.S. Lee, A.C. Magalhães, F.A. Caetano, G.L. Mancini, M.H. Lopes, T.A. Américo, M.H. Magdesian, S.S. Ferguson, R. Linden, M.A. Prado, V.R. Martins VR, Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin γ 1 chain, *FASEB J.*, **25**, 265-279, 2011

35) D. Loubet, C. Dakowski, M. Pietri, E. Pradines, S. Bernard, J. Callebert, H.

Ardila-Osorio, S. Mouillet-Richard, J.M. Launay, O. Kellermann, B. Schneider, Neuritogenesis: the prion protein controls $\beta 1$ integrin signaling activity, *FASEB J.*, **26**, 678-690, 2012

36) E. Graner, A.F. Mercadante, S.M. Zanata, O.V. Forlenza, A.L. Cabral, S.S. Veiga, M.A. Juliano, R. Roesler, R. Walz, A. Minetti, I. Izquierdo, V.R. Martins, R.R. Brentani, Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **76**, 85-92, 2000

37) Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB., Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein., *J Mol Biol.*, **314**(5), 1209-1225, 2001

38) Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Schachner M., Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth., *J Cell Biol.*, **169**(2), 341-354, 2005

39) Zawlik I, Witusik M, Hulas-Bigoszewska K, Piaskowski S, Szybka M, Golanska E, Liberski PP, Rieske P. Regulation of PrPC expression: nerve growth factor (NGF) activates the prion gene promoter through the MEK1 pathway in PC12 cells. *Neurosci Lett.*, **400**(1-2), 58-62, 2006

40) Rahbek UL, Dissing S, Thomassen C, Hansen AJ, Tritsarlis K., Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration.,

Pflugers Arch., **450**(5), 355-361, 2005

41) Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O., Signal transduction through prion protein., *Science.* , **289**(5486), 1925-1928, 2000

42) Schneider B, Mutel V, Pietri M, Ermonval M, Mouillet-Richard S, Kellermann O., NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **100**(23), 13326-13331, 2003

43) T.Kumano, T.Mutoh, H.Nakagawa, M.Kuriyama., HMG-CoA reductase inhibitor induces a transient activation of high affinity nerve growth factor receptor,Trk,and morphological differentiation with fatal outcome in PC12 cells., *Brain Research*, **859**, 169-172, 2000

44) C.Kuwahara, .A.Kubosaki, T.Nishimura, Y.Nasu, Y.Nakamura, K.saeki, Y.matsumoto, and T.Onodera., Enhanced Expression of Cellular Prion Protein Gene by Insulin or Nerve Growth Factor in Immortalized Mouse Neuronal Precursor Cell Lines., *BBRC* , **268**, 763-766, 2000

45) M.E.Evangelopoulos, Stefan Wuller Joachim Weis Alexander Kruttgen., A role of nitric oxide in neurite outgrowth of neuroblastoma cells triggered by mevastatin or serum reduction., *Neurosci Lett.*, **468**, 28-33, 2010

46) Vinchi Wang, Tzu-chao Chuang, Yaw-Don Hsu,Wei-Yuan Chou, Ming-Ching Kao.,

Nitric oxide induces prion protein via MEK and p38 MAPK signaling., *BBRC*, **333**, 95-100, 2005

47) F.H. Beraldo, C.P. Arantes, T.G. Santos, C.F. Machado, M. Roffe, G.N. Hajj, K.S. Lee, A.C. Magalhães, F.A. Caetano, G.L. Mancini, M.H. Lopes, T.A. Américo, M.H. Magdesian, S.S. Ferguson, R. Linden, M.A. Prado, V.R. Martins VR, Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin γ 1 chain, *FASEB J.*, **25**, 265-279, 2011

48) D. Loubet, C. Dakowski, M. Pietri, E. Pradines, S. Bernard, J. Callebert, H. Ardila-Osorio, S. Mouillet-Richard, J.M. Launay, O. Kellermann, B. Schneider, Neuritogenesis: the prion protein controls β 1 integrin signaling activity, *FASEB J.*, **26**, 678-690, 2012

49) M. Sochocka, ES. Koutsouraki, K. Gasiorowski, J. Leszek, Vascular oxidative stress and mitochondrial failure in the pathobiology of Alzheimer's disease: a new approach to therapy., *CNS Neurol Disord Drug Targets.*, **12(6)**, 870-881, 2013

50) AM. Hartz, DS. Miller, B. Bauer, Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease., *Mol Pharmacol.*, **77(5)**, 715-723, 2010

51) J. R. Cirrito, R. Deane, A. M. Fagan, M. L. Spinner, M. Parsadanian, M. B. Finn, H. Jiang, J. L. Prior, A. Sagare, K. R. Bales, S. M. Paul, B. V. Zlokovic, D. Piwnicka-Worms and D. M. Holtzman, P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases

amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* **115**, 3285-3290, 2005

52) T. Pflanzner, M. C. Janko, B. Andre-Dohmen, S. Reuss, S. Weggen, A. J. Roebroek, C. R. Kuhlmann and C. U. Pietrzik, LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid-beta across the blood-brain barrier., *Neurobiol Aging*, **32**(12), 2323 e2321-2311, 2011

53) K. Yamada, T. Hashimoto, C. Yabuki, Y. Nagae, M. Tachikawa, D. K. Strickland, Q. Liu, G. Bu, J. M. Basak, D. M. Holtzman, S. Ohtsuki, T. Terasaki and T. Iwatsubo, The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid beta peptides in an in vitro model of the blood-brain barrier cells., *J Biol Chem*, **283**(50), 34554-34562, 2008

54) T. Pflanzner, B. Petsch, B. Andre-Dohmen, A. Muller-Schiffmann, S. Tschickardt, S. Weggen, L. Stitz, C. Korth and C. U. Pietrzik, Cellular prion protein participates in amyloid-beta transcytosis across the blood-brain barrier., *J Cereb Blood Flow Metab* **32**(4), 628-632, 2012

55) J. Laurén, DA. Gimbel, HB. Nygaard, JW. Gilbert, SM. Strittmatter, Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers., *Nature*, **457**(7233), 1128-1132, 2009

56) HW. Kessels, LN. Nguyen, S. Nabavi, R. Malinow, The prion protein as a receptor for amyloid-beta., *Nature*, **12**, 466(7308), 2010

- 57) A. Tsuji, T. Terasaki, Y. Takabatake, Y. Tenda, I. Tamai, T. Yamashima, S. Moritani, T. Tsuruo, J. Yamashita, P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells., *Life Sci.*, **51**(18), 1427-1437, 1992
- 58) D. Gezen-Ak, E. Dursun, H. Hanagasi, B. Bilgic, E. Lohman, O. S. Araz, I. L. Atasoy, M. Alaylioglu, B. Onal, H. Gurvit and S. Yilmazer, BDNF, TNFalpha, HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment., *J Alzheimers Dis*, **37**(1): 185-195, 2013
- 59) D. Blum-Degen, T. Müller, W. Kuhn, M. Gerlach, H. Przuntek, P. Riederer, Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients., *Neurosci Lett.*, **202**, 17-20, 1995
- 60) NY. Lee, YS. Kang, The decrease of paclitaxel efflux by pretreatment of interferon- γ and tumor necrosis factor- α after intracerebral microinjection., *Brain Res.* , **1499**, 158-162, 2013
- 61) LB. Jaeger, S. Dohgu, R. Sultana, JL. Lynch, JB. Owen, MA. Erickson, GN. Shah, TO. Price, MA. Fleegal-Demotta, DA. Butterfield, WA. Banks, Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease., *Brain Behav Immun.*, **23**(4), 507-517, 2009
- 62) PL. McGeer, EG. McGeer, Anti-inflammatory drugs in the fight against Alzheimer's disease., *Ann N Y Acad Sci.*, **777**, 213-220, 1996

- 63) JJ. Hoozemans, JM. Rozemuller, ES. van Haastert, R. Veerhuis, P. Eikelenboom, Cyclooxygenase-1 and -2 in the different stages of Alzheimer's disease pathology., *Curr Pharm Des.*, **14**, 1419-1427, 2008
- 64) E. Tobinick, H. Gross, A. Weinberger and H. Cohen, TNF-alpha modulation for treatment of Alzheimer's disease: a 6-month pilot study., *MedGenMed*, **8(2)**, 25,2006
- 65) J. Q. Shi, W. Shen, J. Chen, B. R. Wang, L. L. Zhong, Y. W. Zhu, H. Q. Zhu, Q. Q. Zhang, Y. D. Zhang and J. Xu, Anti-TNF-alpha reduces amyloid plaques and tau phosphorylation and induces CD11c-positive dendritic-like cell in the APP/PS1 transgenic mouse brains., *Brain Res*, **1368**: 239-247, 2011
- 66) F. Checler, Alzheimer's and prion diseases: PDK1 at the crossroads, *Nat Med.* , **19**, 1088-1090, 2013
- 67) C. Cramer, MN. Haan, S. Galea, KM. Langa, JD. Kalbfleisch, Use of statins and incidence of dementia and cognitive impairment without dementia in a cohort study, *Neurology*, **71**, 344-350, 2008

謝辞

本稿を終わるにあたり、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部実務薬剤学教室 教授 二神幸次郎 先生、ならびに本研究の遂行にあたり数々の有益なる御助言と御指導を賜りました福岡大学薬学部 薬学疾患管理学教室 教授 片岡泰文 先生に深く感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なご助言を賜りました福岡大学薬学部 臨床疾患薬理学教室 教授 岩崎克典 先生に厚くお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり多大な御助言と御指導を賜りました福岡大学薬学部 薬学疾患管理学教室 准教授 山内淳史 先生、同助教 渡辺拓也 先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、多大な御助言と御協力を頂いた福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室の皆様へ感謝致します。