

脳神経血管機構におけるプリオン蛋白質の役割

安高 勇気

福岡大学薬学部 実務薬剤学教室 〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈8-19-1

A role of the cellular prion proteins in the neurovascular unit

Yuki Yasutaka

Department of Pharmaceutical and Health Care Management, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

The present study aimed to investigate a role of the cellular prion protein (PrP^C) in the neurovascular unit (NVU) including neurons and microvascular endothelial cells.

First, atorvastatin, a strong 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, induced neurite outgrowth and increased PrP^C levels in Neuro2a cells in a time- and dose-dependent manner. PrP^C mRNA expression was also increased by atorvastatin. Farnesol, a non-sterol mevalonate derivative, attenuated the atorvastatin-induced neurite outgrowth and PrP^C expression. Neuro2a cells overexpressing PrP^C showed a remarkable enhancement of the atorvastatin-induced neurite outgrowth compared with mock cells transfected with empty pCI-neo vector. These results suggest that PrP^C contributes, at least in part, to atorvastatin-induced neurite outgrowth.

Second, we examined the effect of tumor necrosis factor- α (TNF α) on the function and expression of the beta-amyloid (A β) transport-related proteins including PrP^C in the mouse brain microvascular endothelial cell line MBEC4. TNF α decreased PrP^C levels and intracellular accumulation of the radiolabeled A β exposed to MBEC4. Similarly, anti-prion protein antibody also decreased this accumulation of the radiolabeled A β . These results suggest that TNF α lowers PrP^C levels, which in turn, reduces A β in the brain endothelium.

In conclusion, PrP^C in the NVU may be involved in the regulation of neurite outgrowth and endothelial A β accumulation and consequently may lead to decreased risk for the TNF α -related neurodegeneration including Alzheimer's disease.

keywords : cellular prion protein, HMG-CoA reductase inhibitors, neurite outgrowth, beta-amyloid, tumor necrosis factor- α

【緒言】

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 prion protein) と病原性のある異常型プリオン蛋白質 PrP^{Sc} (Scrape prion protein) の2種類が存在し、PrP^{Sc}はPrP^Cの高次構造変化によって形成される^{1,2)}。PrP^{Sc}は牛で認められる狂牛病やヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病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。一方、PrP^Cの生理機能については不明な点が多い。PrP^Cはあらゆる臓器に発現しており、特に神経細胞に多く発現が認められている。

神経細胞では銅の細胞内取り込みや細胞接着などに関与することが報告されている^{3,4)}。また、本研究に先立ち、当研究室ではPrP^Cが脳血管内皮細胞に発現し、その細胞の遊走能維持に関与することを明らかにした⁵⁾。これらのことから、PrP^Cは神経細胞、脳血管内皮細胞において生理作用を示し、その発現変化はこれら細胞の機能に大きく影響することが示唆された。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発現が変化した際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。

そこで、本研究では神経細胞と脳血管内皮細胞におけるPrP^Cの役割を明らかにすることを企てた。第1章では神経細胞におけるatorvastatinによる神経突起伸長とPrP^C発現について検討を行った。第2章では脳血管内皮細胞における腫瘍壊死因子 α (Tumor Necrosis Factor α : TNF α) の β -amyloid (A β) 輸送能とPrP^C発現に対する作用について検討を行った。

第1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

【背景・目的】

HMG-CoA還元酵素阻害剤（スタチン）は末梢でのコレステロール合成阻害作用を有し、脂質異常症患者へ幅広く使用されている。一方、スタチンはAlzheimer's disease (AD) の進行リスク低下に関与することが近年報告されている⁶⁻⁸⁾ことから、スタチンは中枢神経系疾患にも有用であることが示唆された。神経細胞を用いた研究では、スタチンは上皮成長因子受容体の活性化やRhoAシグナルの抑制を介して神経突起伸長を促進することが報告されている⁹⁻¹⁰⁾が、まだその詳細な機序は明らかではない。神経突起伸長を促す神経成長因子はPrP^C発現増加を誘導することが報告されている¹¹⁾ため、スタチンがPrP^C発現に作用し、その神経突起伸長に関与することが想起される。そこで、本章では臨床で広く使用されているスタチン系薬剤atorvastatinのPrP^C発現に対する作用とPrP^Cのatorvastatin誘導神経突起伸長に対する影響を検討した。

【結果・考察】

Neuro2a (N2a) 細胞（マウス神経芽細胞腫）にatorvastatinを処置した結果、時間・濃度依存的に神経突起伸長細胞の数を増加させた。また、atorvastatinは濃度依存的にPrP^C発現量を増加させ、10 μ Mから有意な増加が認められた (Fig. 1)。

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。atorvastatinはメバロン酸経路を遮断することから、メバロン酸経路中間代謝物の類似物であるfarnesolを補充し、メバロン酸経路の再生を行った結果、atorvastatin誘導神経突起伸長は抑制され、PrP^C発現量も減少した。そこで、atorvastatin誘導神経突起伸長にPrP^C発現が関与するか検討するため、PrP^Cを過剰発現させたN2a細胞 (NP01, NP03) にatorvastatinの処置を行った。mock細胞 (PrP^C遺伝子を導入していないN2a細胞) と比較し神経突起伸長細胞数は有意に増加した (Fig. 2A, B)。

より詳細な機序を明らかにするために、細胞骨格制御のシグナルに関わるRho family G蛋白の発現について検討を行った。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処置にて

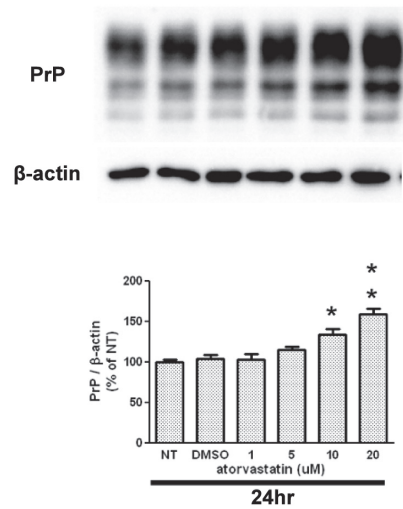


Fig. 1 Dose-dependent increases in PrP^C induced by atorvastatin in Neuro2a cells. Neuro2a cells were treated with atorvastatin at concentrations ranging from 1 to 20 μM for 24 h (n = 8 each). Representative western blots (top) and densitometric analysis (bottom) of the PrP^C levels. Band intensities 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). Values are means ± S.E. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01, significantly different from vehicle (DMSO).

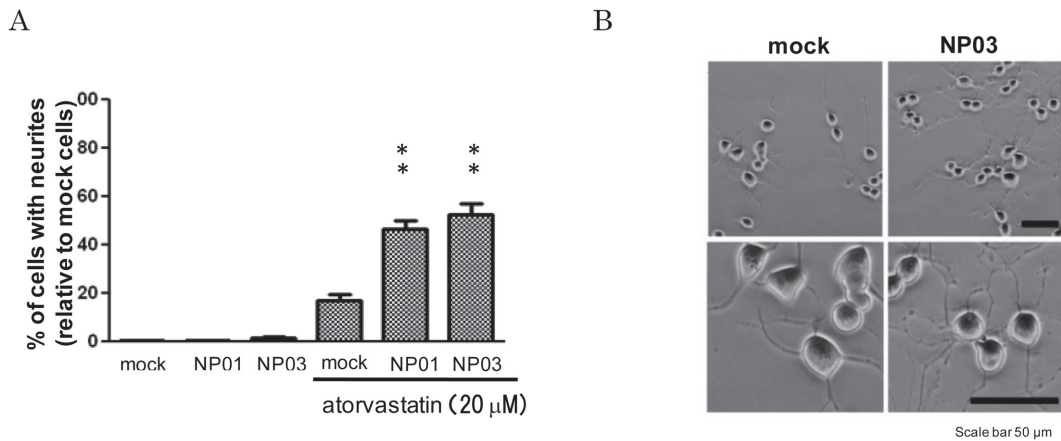


Fig. 2 Enhancement of atorvastatin-induced neurite outgrowth in PrP^C-overexpressing cells (NP01 and NP03 cells). (A) Neurite outgrowth of NP01 and NP03 cells after treatment with 20 μM atorvastatin for 24 h (n = 12 each). Neurite outgrowth of cells is expressed as a ratio to control values (mock cells). Each bar indicates the mean ± S.E. ***P* < 0.01, significantly different from mock cells. (B) Representative photographs showing at low and high magnification neurite outgrowth of mock and NP03 cells after treatment with 20 μM atorvastatin for 24 h. Scale bar = 50 μm.

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。atorvastatinは突起伸長促進作用を示すCdc42の発現量を増加させ、farnesolの共処置はCdc42発現量を減少させた (Fig.3A)。さらに、atorvastatinを処置したNP01とNP03は、同処置のmock細胞と比較してCdc42発現量の増加が認められた (Fig.3B)。

以上より、atorvastatinはPrP^C発現量を増加させること、また、PrP^C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となった。また、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。PrP^CによるCdc42発現量増加機序は不明であるため、PrP^CとCdc42を繋ぐシグナル解明が今後の検討課題である。スタチンによるAD進行リスク低下機序について、本研究結果からPrP^Cを介した神経突起伸長がAD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提案できる。

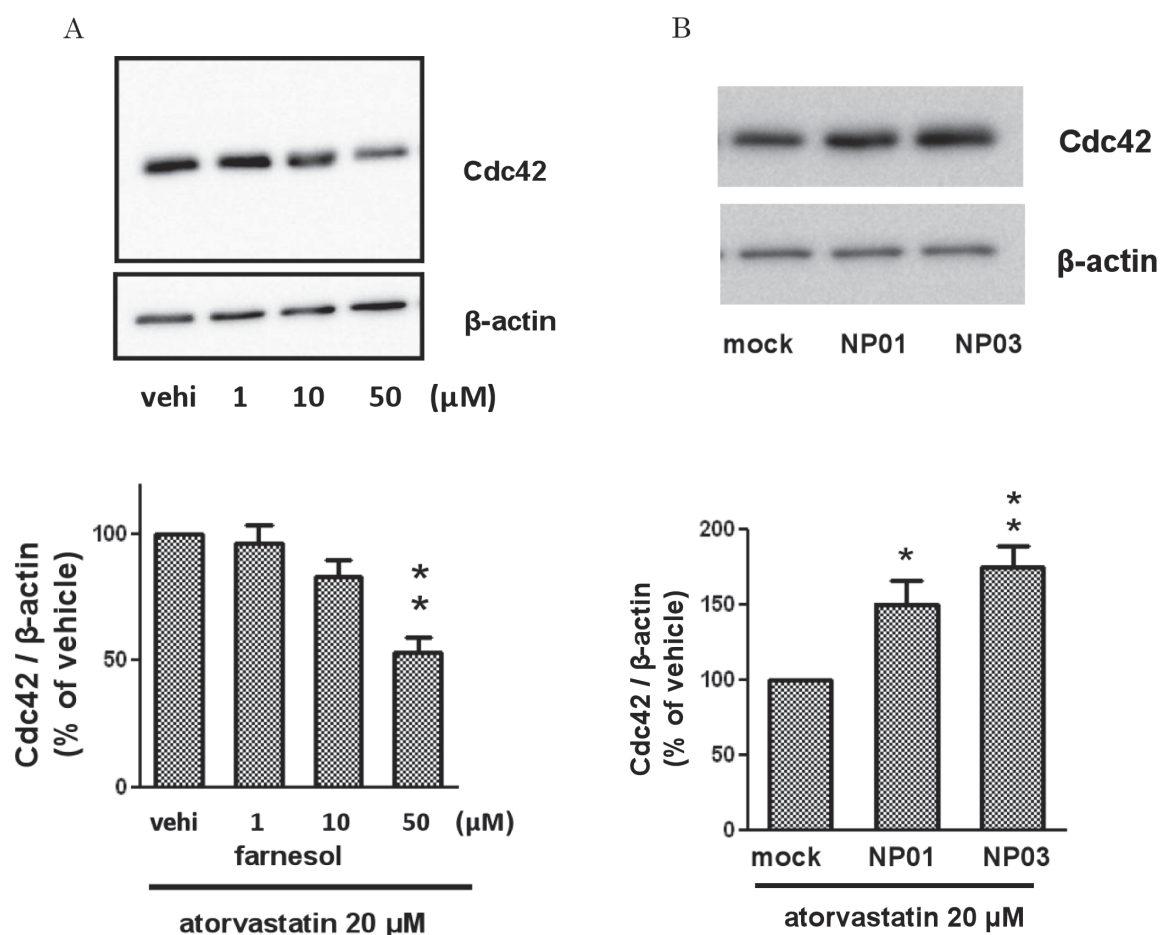


Fig.3 (A) Farnesol-induced inhibition of atorvastatin-facilitated Cdc42 expression. Each bar indicates the mean \pm S.E. ** $P < 0.01$, significantly different from vehicle (vehi). Representative immunoblots (top) and densitometric analysis (bottom) of Cdc42 and β -actin levels. (B) Representative western blots of Cdc42 levels in mock, NP01 and NP03 cells. Each bar indicates the mean \pm 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2章 脳血管内皮細胞のA β 輸送におけるPrP^Cの寄与とPrP^C発現に対するTNF α の作用

【背景・目的】

AD患者の血清ではTNF α を含むサイトカイン量の増加が認められている¹²⁾。抗TNF α 抗体の投与はAD治療臨床研究において認知機能改善を示し、ADモデルマウスでは老人斑を減少させた^{13, 14)}。これらの報告から、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される。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。

脳内A β の蓄積には、脳内でのA β 産生増加と脳外へのA β 排泄低下によることが提案されている。脳血管内皮細胞は複数のA β 輸送分子を発現しており、脳内からA β を細胞内に取り込んだのち、細胞外へA β を排出することでA β を脳内から脳外へと排泄している。また、血管を構築する脳血管内皮細胞は血清中に増加したTNF α の主な標的細胞であることが考えられる。このことから、TNF α の脳血管内皮細胞に対する作用がA β 輸送を阻害し、脳外へのA β 排泄低下を招くことが想起される。

A β 輸送分子には細胞外排出に寄与するP-glycoprotein (P-gp) や細胞内取り込みに寄与するlow density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) の存在が認められている¹⁵⁻¹⁹⁾。また、神経細胞においてPrP^CがA β と結合することが知られている^{20, 21)}が、脳血管内皮細胞のA β 輸送におけるPrP^Cの役割は解明されていない。そこで、本章では脳血管内皮細胞のA β 輸送に着目し、TNF α のPrP^C発現に対する作用とPrP^CのA β 輸送への影響を検討した。

【結果・考察】

脳血管内皮細胞におけるTNF α の効果を確認するために、マウス脳毛細血管内皮細胞株(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.4A)。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PrP^Cの発現量が有意に減少した(Fig.4B)。A β 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。一方、TNF α 処置によってLRP1の発現量に影響は認められなかった。

TNF α がA β 輸送に与える影響を評価するために、TNF α を処置し24時間後に125ヨードでラベルしたA β 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A β を γ カウンターで測定を行った。その結果、A β の細胞内蓄積量はNT群と比べ、TNF α 1 ng/mLより有意な減少が認められた。また、A β の細胞内蓄積量減少がTNF α 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、TNF α 処置24時間後にWST assayを行った。NT群と比較し、TNF α 処置群で有意な細胞生存率低下は認められなかった。

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、verapamil処置によってこの減少は阻害された(Fig.5A)。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

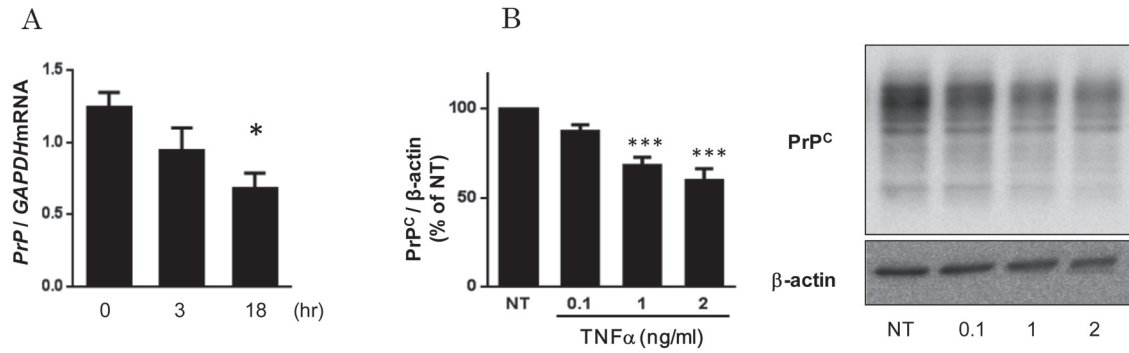


Fig. 4 (A) TNF α -induced a time-dependent decrease in PrP^C mRNA levels in MBEC4 cells. mRNA expression was measured by real-time RT-PCR 3 and 18 h after treatment with TNF α (2 ng/ml) ($n = 6$). PrP^C mRNA levels were normalized to GAPDH. Values are means \pm SE, * $P < 0.05$, significantly different from 0 h (just before treatment). (B) TNF α -induced changes in PrP^C 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, *** $P < 0.001$, significantly different from NT. Representative immunoblots (right) and densitometric analysis (left) of PrP^C and β -actin levels.

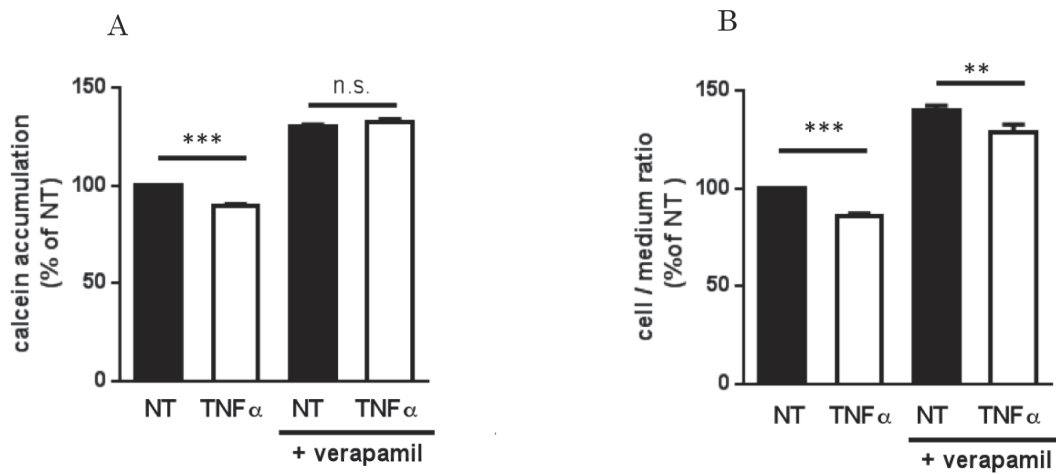


Fig. 5 (A) TNF α -induced changes in the intracellular calcein levels in MBEC4 cells treated without or with verapamil. Cells were treated with TNF α (2 ng/ml) for 24 h and then incubated with calcein-AM in the absence or presence of verapamil (100 μ M) for 30 min ($n = 4$). The data are expressed as 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.

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 蓄積量の減少は阻害されなかった (Fig.5B)。

この細胞内A β 蓄積量減少にはP-gp発現増加によるA β 細胞外排出とPrP^C発現量減少によるA β 細胞内取り込みが寄与していることが示唆された。そこで、P-gpの阻害剤であるverapamilを処置し、細胞内A β 蓄積量を測定した。P-gp基質であるcalceinを用いた検討から、P-gpが阻害されるverapamil濃度を使用した。verapamilは細胞内A β 蓄積量を増加させたが、TNF α によるA β 蓄積量減少は維持されたままであった。この減少はPrP^C発現量減少に起因することが示唆されたため、MBEC4細胞においてPrP^CがA β 細胞内取り込みに関与するか抗PrP抗体 (SAF32) を用いて検討を行った。SAF32によるPrP^Cのマスキングは細胞内A β 蓄積量を減少させた (Fig.6)。

以上のことから、TNF α によるMBEC4細胞内A β 蓄積量減少の一部は、PrP^C発現量減少によるA β の細胞内取り込みの低下に起因することが示唆された。脳血管内皮細胞のA β 細胞内取り込みはA β 脳外排泄の起点となるため、TNF α によるPrP^C発現量減少を介したA β 細胞内取り込みの低下は、A β の脳内蓄積に大きく寄与すると考えられる。本研究結果はADにおける抗TNF α 抗体治療の新たな作用機序を提案するものである。

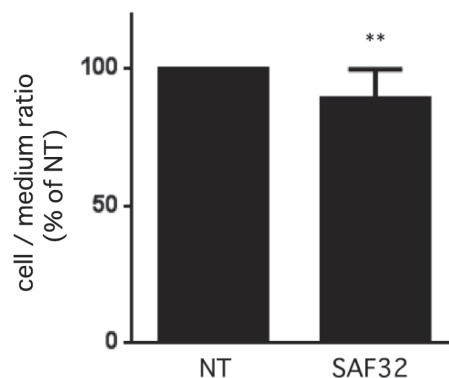


Fig.6 Anti-prion protein antibody-induced reduction of intracellular ¹²⁵I-A β accumulation in MBEC4 cells. Cells were treated with anti-prion protein antibody (SAF32, 1 μ g/ml) for 30 min and then incubated with ¹²⁵I-A β for 60 min (n = 9). The data are expressed as percentages of control values (NT). Each bar indicates the mean \pm SE, ***P* < 0.01, significantly different from NT.

【総括】

本研究では、脳神経血管機構構成細胞（神経細胞・脳血管内皮細胞）におけるPrP^Cの役割を明らかにすることを試みた。第1章では、ADの進行リスクを低下させるスタチンがPrP^C発現量を増加させ、スタチン誘発神経突起伸長に対してPrP^C発現増加が促進的に作用することを明らかにした。第2章では、脳血管内皮細胞におけるAβ細胞内取り込みがPrP^Cを介して行われることを明らかとし、TNFαによるPrP^C発現量減少がAβ細胞内取り込みを低下させることを提案した。以上のことから、ADにて有効性が認められる薬剤やAD病態下で変動が認められる生体分子がPrP^C発現変化を介して、AD病態の改善や増悪に影響することが示唆された。本研究結果は、脳神経血管機構構成細胞におけるPrP^Cの役割の一つとして、AD病態に対して保護的に働く可能性を提案するものである。

【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あげます。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。

【引用文献】

- 1) Prusiner SB, *Science*. **216**, 136-144 (1982).
- 2) J. Collinge, *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 519-550 (2001).
- 3) Mangé A, et al., *FEBS Lett.*, **514**, 159-162 (2002).
- 4) Choi CJ, et al., *Toxicol Sci.*, **98**, 495-509 (2007).
- 5) T.Watanabe, et al., *Neurosci. Lett.* **496**, 121-124 (2011).
- 6) A.M. Pooler, et al., *J. Neurochem.*, **97**, 716-723 (2006).
- 7) B. Wolozin, et al., *Arch. Neurol.*, **57**, 1439-1443 (2000).
- 8) Y. Young-Xu, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **42**, 690-697 (2003).
- 9) M.E. Evangelopoulos, et al., *J. Neurosci. Res.*, **87**, 2138-2144 (2009).
- 10) M.E. Evangelopoulos, et al., *Neurosci. Lett.*, **468**, 28-33 (2010).
- 11) Zawlik I, et al., *Neurosci Lett.*, **400**, 58-62 (2006).
- 12) D. Gezen-Ak, et al., *J Alzheimers Dis*, **37**, 185-195 (2013).
- 13) E. Tobinick, et al., *MedGenMed*, **8**, 25 (2006).
- 14) J. Q. Shi, et al., *Brain Res*, **1368**, 239-247 (2011).
- 15) AM. Hartz, et al., *Mol Pharmacol.*, **77**, 715-723 (2010).
- 16) J. R. Cirrito, et al., *J Clin Invest*, **115**, 3285-3290 (2005).
- 17) T. Pflanzner, et al., *Neurobiol Aging*, **32**, 2323.e1-2323.e11 (2011).
- 18) K. Yamada, et al., *J Biol Chem*, **283**, 34554-34562 (2008).
- 19) T. Pflanzner, et al., *J Cereb Blood Flow Metab* **32**, 628-632 (2012).
- 20) J. Laurén, et al., *Nature*, **457**, 1128-1132 (2009).
- 21) HW. Kessels, et al., *Nature*, **466**, e3-4 (2010).