

## II. 富山県産和漢薬から開発する脊髄損傷改善薬に関する研究

富山大学・和漢医薬学総合研究所

神経機能学分野 東田千尋

和漢薬製剤開発分野 紺野勝弘

神経機能学分野 久保山友晴

脊髄損傷では、外傷性に脊椎が損壊し、挫滅あるいは離断した脊髄内で神経細胞やミエリン細胞が破壊され脳と末梢を繋ぐ信号が断裂される。損傷脊髄部位およびその下位脊髄が支配する体幹・上下肢の運動と感覚が機能不全に陥る。現在、全世界で約250万人の脊髄損傷者がおり、さらに年間13万人があらたに脊髄損傷を負っている。脊髄損傷の治療に関して、多方面からの研究が進められているが、慢性期に至った脊髄損傷の機能回復は極めて困難である。

本研究では、脊髄損傷を効果的に回復させ得る新しい治療薬の創出を目指している。そのために、①初代培養神経細胞を用いたスクリーニング、および動物モデルでの検討による、軸索伸展作用を有する和漢薬成分の同定、②軸索再生不全に陥った軸索を再伸展させる分子メカニズムの解析、③脊髄損傷慢性期で運動機能の改善を阻む因子の同定、を進めている。また②および③の結果を逐次①のスクリーニング系に反映させ、軸索再生を達成するいくつかの機序ごとに、和漢薬から活性化化合物を探索することで、軸索伸展を導く複数のメカニズムにもとづき、創薬シーズとなる活性成分の多面的な同定を進める。

### 【各班の概要】

#### 脊髄損傷モデルマウスにおける和漢薬の有効性の検討

東田 千尋

脊髄損傷後、慢性期に移行するにしたがって損傷中心を囲うように形成されるグリア性瘢痕は、軸索が再伸展したり分枝することを物理的障壁となり阻害するだけでなく、軸索伸展を阻害する細胞外基質を分泌する。主たる軸索阻害因子はコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) である。よって、CSPG 存在下でも軸索伸展が可能になることは、慢性期脊髄損傷の運動機能を改善する上で鍵となる重要な活性である。昨年度は、CSPG コーティング上でも軸索を伸展させる活性の検出を目的として、110種類の生薬水エキスを検討し活性を有する生薬として苦参と連翹を特定した。今年度はそれらに関し、脊髄損傷モデルマウスでの活性評価により *in vivo* での有効性を検討し、さらに活性成分の同定にも進んだ。

和漢生薬を脊髄損傷改善に有効な薬物素材と考え、各種和漢生薬エキスを対象にして脊髄損傷改善作用の薬理活性を検討し、活性成分の同定と作用機序の分子的解明を目指した。昨年度までの検討により有効性を示した苦参、連翹に関して、本年度は、その活性成分の特定を目指した。生薬エキスの分離・精製を進め、活性成分の定量も実施した。

グリア性瘢痕内では活性化アストロサイトから阻害因子のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) が分泌され、これが濃度勾配を形成して沈着し、軸索再生を阻害する主たる原因の一つとなっている。CSPG による軸索再生阻害の機序は未だ解明されておらず、これを紐解くことは、軸索再生の機序を知ることに繋がる。昨年度までに久保山は、p21-activated kinase (PAK) が paxillin をリン酸化して CSPG 濃度勾配上の軸索再生を促進することを明らかにした。PAK はプロテインキナーゼ A (PKA) によってリン酸化されることによって不活性化されることが報告されていることから、CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball では PKA が活性化し、それによって PAK が不活性化し、paxillin のリン酸化が抑制されているのではないかと考えた。そこで本年度は、dystrophic endball における PKA の活性を検討した。

## Ⅱ－１ 脊髄損傷モデルマウスにおける和漢薬の有効性の検討

富山大学・和漢医薬学総合研究所 神経機能学分野

准教授 東 田 千 尋

### 【研究目的と背景】

脊髄損傷に対する臨床的対処の現状としては、受傷直後の大量ステロイド剤投与による障害の減弱化が試みられているものの、その効果は疑問視されており (Kronvall et al., 2005)、動物実験での改善効果も明確でない (Pereira et al., 2009)。こういった現状の中、胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を応用した再生医療が次世代の脊髄損傷の治療戦略として有望視され、近年、精力的に基礎研究が進められている (Kumagai et al., 2009 ; Tsuji et al., 2010)。しかしこれらの戦略で、モデル動物での脊髄損傷改善作用が認められるのは、対照群でもある程度の自然回復が認められる損傷条件下で、急性期 (1-2日以内) から亜急性期 (10日程度以内) に細胞を移植した場合が主であり、慢性期での有効性は不明である。つまり慢性期に至った脊髄損傷の機能回復は依然として極めて困難であると考えられている。

グリア瘢痕は、慢性期脊髄損傷で CSPG などの軸索抑制因子を放出するため、その負の側面がクローズアップされてきた。しかしグリア瘢痕を形成する astrocyte には、積極的に軸索伸展を促す神経成長因子 (BDNF, NGF, NT 3 等) の分泌 (Rolls et al., 2009)、シナプス間隙のグルタミン酸クリアランスによる神経細胞死の保護 (Rothstein et al., 1996) といった正の作用も備わっていることが、次々と示されている。つまり、慢性期脊髄損傷を治療する鍵は、①神経軸索の伸展と、②グリア細胞の正の作用を高めるような制御の両方に働きかけることである (Tohda and Kuboyama, 2011; Teshigawara, Kuboyama et al., 2013)。

そこで本研究では、和漢薬を対象にして、脊髄損傷改善作用の薬理活性を、細胞モデルと脊髄損傷動物モデルにおいて多面的に検討し、活性成分の同定と、作用機序の分子的解明を目指す。In vivo モデルでの解析 (東田)、in vitro モデルでのアッセイとメカニズム解析 (東田、久保山)、化学的分析研究 (紺野) と役割分担し、相互に連携しながら実施する。

本年度は、昨年度までの研究で軸索伸展活性が認められた苦参、連翹に着目し、in vivo での運動機能改善作用についての評価を行い活性化合物の同定も目指した。

## 【実験方法】

### 1) 脊髄損傷マウスの運動機能障害に対する生薬エキスおよび生薬成分の改善作用

ddY マウス（雌性，8 週齢）の第10胸椎を切除し，露出させた脊髄に6.5 g の錘を 2 cm の高さから 1 回落下させ圧挫損傷モデルを作製した。損傷 1 時間後に初回，その翌日から 1 日 1 回，苦参水エキス，連翹水エキス（500 mg/kg，経口）またはマトリン（10,100  $\mu\text{mol/kg}$ ，経口），オキシマトリン（10,100  $\mu\text{mol/kg}$ ，経口）の投与を31日間行った。マウスの後肢運動機能の評価は10段階の BMS スコアと，5 段階の BSS スコア，加えて我々が考案した TMS スコア（投稿中）により行った。その後，マウスを麻酔下に還流固定し脊髄を摘出した。連続矢状断切片を作製し，免疫組織染色を行った。縫線脊髄路の可視化には，セロトニン（5-HT）抗体を用い，同時に astrocyte マーカーの GFAP 抗体，コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）マーカーの CS56抗体を用いた三重染色を行った。

### 2) CSPG 基質上における軸索伸展阻害に対する生薬エキスの改善作用

マウス胎児（胎生14日齢）の脳より大脳皮質神経細胞を初代培養した。培養には，poly-D-lysine コーティングののち，CSPG として aggrecan を 2  $\mu\text{g/ml}$  にてさらにコーティングした 8-well カルチャースライドを用いた。細胞は  $5 \times 10^4$  cells/well の密度で播種した。培養 2 日目に，溶媒のみあるいは生薬エキスを 1,10  $\mu\text{g/ml}$  になるように培地中に加え，その 6 日後に細胞を固定し免疫蛍光染色を行った。軸索マーカーとしてリン酸化型ニューロフィラメント H（pNF-H）と，神経細胞マーカーとして MAP2 を 2 重染色した。蛍光顕微鏡（BX61/DP70システム，オリンパス）にて画像を取得し，軸索の長さを Neurocyte 画像解析ソフトで測定するとともに，Image J 画像解析ソフト上で神経細胞の数を測定し，神経細胞あたりの軸索の長さを算出した。

## 【実験結果】

苦参，連翹の各エキスを，脊髄損傷マウスに経口投与し，31日間の後肢運動機能の評価した。溶媒投与群と比較して，苦参エキス投与によって BMS スコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (17,544) = 9.069,  $P < 0.0001$ ），BSS スコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (17,544) = 9.232,  $P < 0.0001$ ），TMS スコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (17,544) = 10.49,  $P < 0.0001$ ）が有意に改善した。また，連翹エキス投与によっても，BMS スコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (17,510) = 3.317,  $P < 0.0001$ ），BSS スコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (17,510) = 4.449,  $P < 0.0001$ ），TMS スコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (17,510) = 3.295,  $P < 0.0001$ ）が有意に改善した。苦参エキス投与群の脊髄損傷部位では，5-HT 陽性軸索の密度が有意に増加していた。

苦参，連翹の各水エキスを分画し（共同研究者・紺野の項），CSPG 基質上の軸索形成に対する作

用を検討した。苦参エキスの酢酸エチル画分は無効であり、アルカロイド画分、水画分には軸索伸展活性が認められた。同濃度での活性はアルカロイド画分の方が強い傾向があった。苦参の主要成分としてマトリンとオキシマトリンが知られており、特にアルカロイド画分にはこの2成分がともに多く含有されていることが示された（共同研究者・紺野の項）。

苦参の主成分であるマトリン、オキシマトリンを、脊髄損傷マウスに経口投与し、31日間の後肢運動機能を評価した。溶媒投与群と比較して、マトリン（100  $\mu\text{mol/kg}$ ）投与によってBMSスコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (15,330) = 6.427,  $P < 0.0001$ ）、BSSスコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (15,330) = 4.071,  $P < 0.0001$ ）、TMSスコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (15,330) = 6.132,  $P < 0.0001$ ）が有意に改善した。マトリンの低用量（10  $\mu\text{mol/kg}$ ）、およびオキシマトリンは無効だった。

連翹の画分に関しては、酢酸エチル画分、アルカロイド画分、水画分のいずれにも軸索伸展活性が検出された。活性の強さによる画分の絞り込みができなかった。そこで疎水性の差により再分画を実施し、再度、軸索伸展活性を検討している。

## 【考察】

昨年度の研究においては、110種類の生薬を対象に、細胞でのスクリーニングを行い、CSPG上での軸索伸展阻害を乗り越える活性を、苦参、牛膝、連翹に見出した。さらに昨年は、脊髄損傷マウスに、300 mg/kgの用量で30日間投与する実験により、苦参エキスと連翹エキスによる後肢運動機能改善作用を示した。今年度はその再現性を検討した結果、確かに苦参エキス（500 mg/kg）及び連翹エキス（500 mg/kg）に後肢運動機能改善作用があることを明らかにし、少なくとも苦参エキス投与群では、損傷部位での縫線脊髄路の伸展が認められる結果も得た。苦参エキス500 mg/kg中には、45  $\mu\text{mol/kg}$ のマトリン、10  $\mu\text{mol/kg}$ のオキシマトリンが含有されていることが分かったため（共同研究者・紺野の項）、10  $\mu\text{mol/kg}$ 、100  $\mu\text{mol/kg}$ の用量で、マトリンおよびオキシマトリンの経口投与を実施したところ、マトリンにのみ効果が認められた。

経口投与後のオキシマトリンの大部分はマトリンへ代謝される（Fan et al., 2013）と報告されていることも鑑みると、苦参エキス中の脊髄損傷改善に関わる活性成分はマトリンであることが示唆される。現在、マトリン投与群の損傷脊髄内での組織変化を検討中であるとともに、マトリンの分子作用機序について検討している。

これらの検討により、脊髄損傷の治療につながるターゲットシグナルが明らかにできるものと考えている。同時に、苦参と連翹を構成生薬とした新たな漢方方剤を作製し、脊髄損傷マウスに投与する実験を実施し、単独の生薬エキスでの作用と比較して、相加・相乗作用が期待できないかも検討する予定である。また一連の研究結果より、CSPG上での軸索形成の活性が、脊髄損傷後の運動機能改善

活性をある程度予測できることも示された。よってこの実験系は、今後、薬物や活性化合物のスクリーニングへの利用や、薬物の作用機序の解明に積極的に利用できると考えている。

## 【参考文献】

- 1) Kronvall E, Sayer FT, Nilsson OG. Methylprednisolone in the treatment of acute spinal cord injury has become more and more questioned. *Lakartidningen*. 2005; 102 (24-25) : 1887-1888,
- 2) Pereira JE, Costa LM, Cabrita AM, Couto PA, Filipe VM, Magalhães LG, Fornaro M, Di Scipio F, Geuna S, Mauricio AC, Varejão AS. Methylprednisolone fails to improve functional and histological outcome following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*. 2009; 220 (1) : 71-81.
- 3) Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Nagoshi N, Kitamura K, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Katoh H, Okada S, Shibata S, Matsuzaki Y, Toh S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One*. 2009; 4 (11) : e7706.
- 4) Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107 (28) : 12704-12709.
- 5) Rolls A, Shechter R, Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10 (3) : 235-241.
- 6) Tohda C, Kuboyama T. Current and future therapeutic strategies for functional repair of spinal cord injury. *Pharmacol Ther*. 2011; 132 (1) : 57-71.
- 7) Teshigawara K, Kuboyama T, Shigyo M, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C. A novel compound, denosomin ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *Br J Pharmacol*. 2013; 168 (4), 903-919.
- 8) Fan R, Liu R, Ma R, Bi K, Li Q. Determination of oxymatrine and its active metabolite matrine in human plasma after administration of oxymatrine oral solution by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Fitoterapia*. 2013; 89 : 271-277.

## Ⅱ－２ 脊髄損傷に有効な和漢薬の活性成分の同定

富山大学・和漢医薬学総合研究所 和漢薬製剤開発分野

客員教授 紺野勝弘

### 【研究の目的とその背景】

脊髄損傷に対する薬物療法について、多くの研究が行われているが、未だ有効な治療法は確立されていない<sup>1)</sup>。たとえば、臨床的対処としてステロイド剤の大量投与が試みられているが、その有効性は疑問視されている。また、胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を応用した再生医療が有望視され、基礎研究が進められているが、実用化には更なる研究の進展を待たなければならない。このような現状の中、本研究代表者の東田らは、伝統薬物成分が脊髄損傷改善の有効な薬剤になり得る可能性を示している。東田らは、和漢生薬をはじめとした伝統薬物の神経変性疾患改善作用に関する基礎研究を積み重ねてきているが<sup>2)</sup>、その一環として、アユルベーダ薬物である Ashwagandha (インド人参, *Withania somnifera* の根) に含まれるステロイドサポニン Withanoside IV が、記憶障害改善作用と共に脊髄損傷マウスの運動機能を回復させる効果があることも明らかにした<sup>3)</sup>。さらに、代謝研究によって、Withanoside IV は投与後代謝され、糖部分がはずれたアグリコン (サポゲニン) sominone となって活性を発揮することも証明した<sup>4,5)</sup>。そこで、sominone およびその誘導体を化学合成し、より活性が強く合成も比較的容易な denosomin を創成するに至った<sup>6,7)</sup>。この一連の研究は、伝統薬物成分、特にステロイドサポニンあるいはそのアグリコン (サポゲニン) が、抗認知症薬・脊髄損傷改善薬開発のためのリード化合物になり得ることを示したものと言える。

これらの結果から、和漢生薬は脊髄損傷改善に有効な薬物素材と考えられるが、これまでその観点からの研究は行われていない。そこで、本研究では、各種和漢生薬エキスを対象にして脊髄損傷改善作用の薬理活性を検討し、活性成分の同定と作用機序の分子的解明を目指す。

昨年度までに、110種の和漢生薬エキスについてスクリーニングを行ない、3種 (苦参, 牛膝, 連翹) に強い軸索伸展活性を認め<sup>8)</sup>。さらに、うち2種 (苦参, 連翹) は、脊髄損傷マウスの後肢運動機能を有意に回復させた。そこで、活性物質の特定を目指して、これら2種の生薬エキスの分離・精製を進めた。

### 【結果】

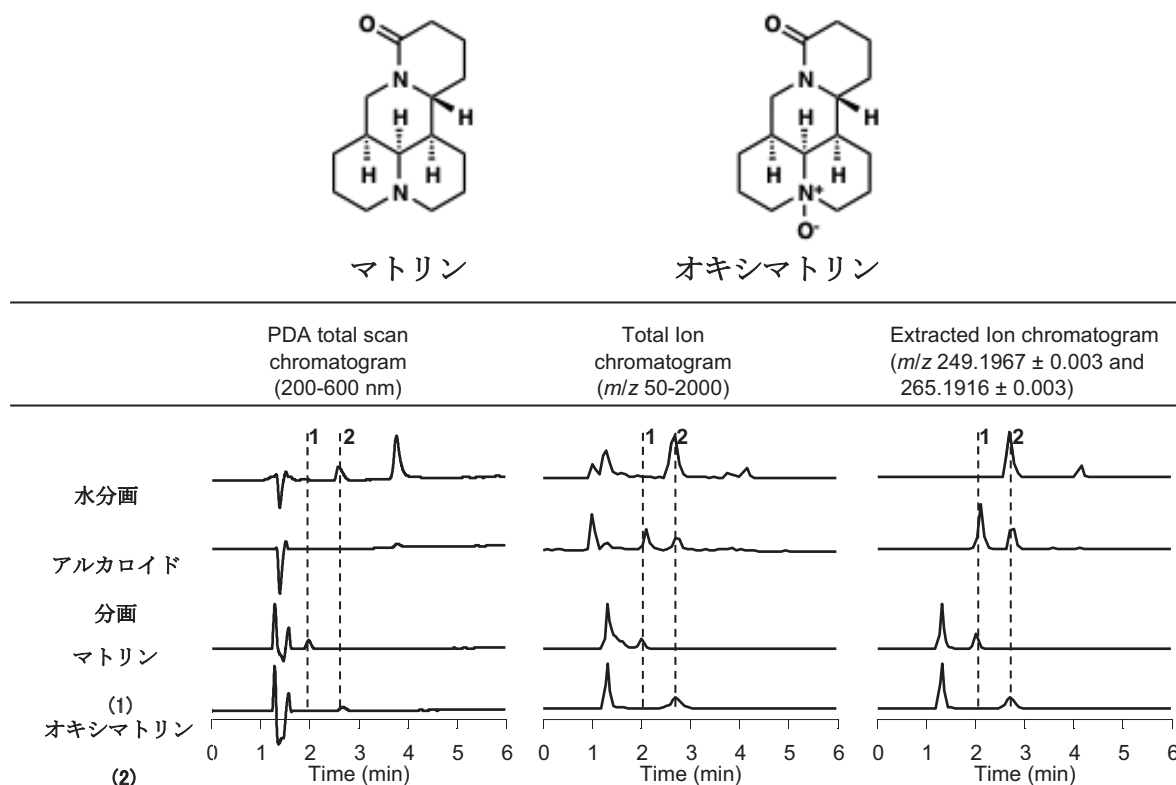
#### 1. 苦参エキス中の活性成分

まず、定法に従って溶媒分画を行った。苦参エキスを酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル分画を得た。

水層は、アンモニア水を加えて塩基性とした後、クロロホルムで抽出してアルカロイド分画とした。残った水層を凍結乾燥し、水分画を得た。

こうして得られた三つの分画の軸索伸展活性を調べたところ、アルカロイド分画と水分画が活性を示したが、酢酸エチル分画には活性が認められなかった。この結果から、活性成分はアルカロイド関連物質と考えられた。そこで次に、活性を示した二つの分画に、これらアルカロイドが含まれているかどうかを、LC-MSを用いて検討した。

結果を図1に示す。標品のマトリン、オキシマトリンは、それぞれRT 2 min および2.7 min に溶出される。これと比較しながら分析すると、水分画にはオキシマトリンのみが、アルカロイド分画には、マトリンとオキシマトリンの両方が検出された。精密質量分析においても、それぞれの分子式に一致する値を与えた。



HPLC conditions: CAPCELL PAK C<sub>18</sub> UG-120, 1.5 x 120 mm (Shiseido), 5-95% MeCN/H<sub>2</sub>O/0.1% HCO<sub>2</sub>H for 25 min, 0.2 mL/min at 25 °C, detected by ESI-(+)-Orbitrap MS (ThermoScientific).

図1. マトリン、オキシマトリンのLC-MS分析

さらに、各分画での含有量を知るために、両化合物の定量を試みた。標品を用い、上記LC-MS法にて検量線を作成し、これに基づいて定量した結果を表1に示す。アルカロイド分画には、エキスに比べてマトリンは約5倍、オキシマトリンは約2倍の濃度で含まれていて、溶媒分画によって効率良く濃縮されていることがわかる。しかし、水分画のオキシマトリン含量は低く、活性のなかった

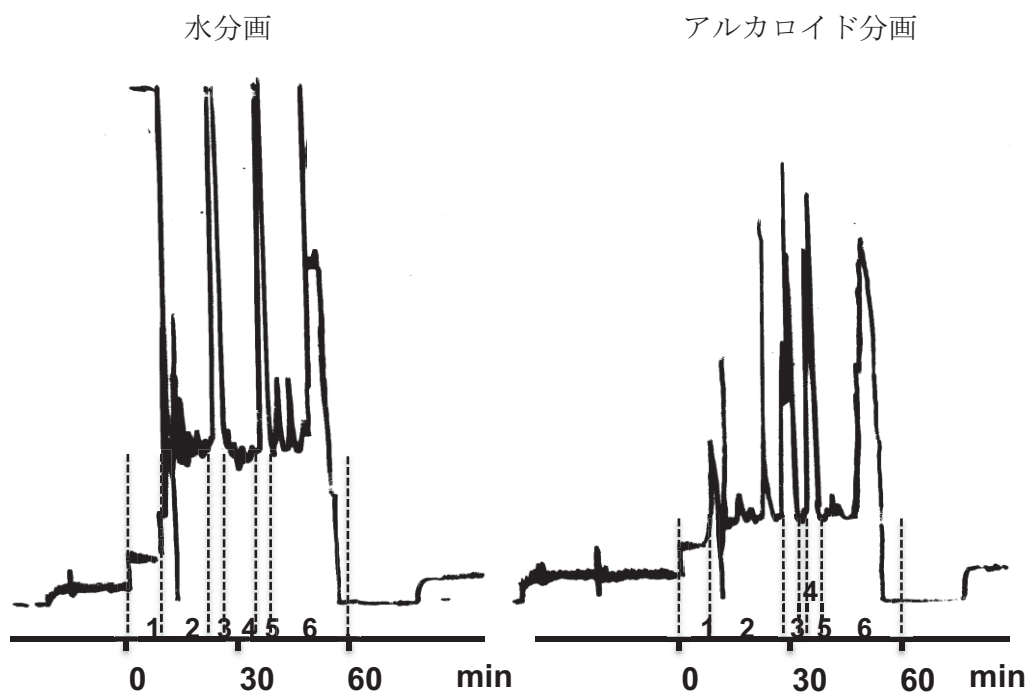


表1. マトリン, オキシマトリンの定量

	マトリン ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	オキシマトリン ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
苦参エキス	22.4	5.3
水分画	0.1	0.4
アルカロイド分画	140.3	9.5
酢酸エチル分画	0.7	0.2

酢酸エチル分画と同程度であった。このことは、水分画には、オキシマトリン以外の活性成分が存在することを示唆する。

そこで次に、各活性分画を再分画することにより、オキシマトリン以外の活性成分を検索した。逆相 HPLC を用いて再分画した結果を図 2 に示す。水およびアルカロイド分画から、それぞれからさらに 1~6 の分画を得た。LC-MS 分析により、水分画からは画分 5 にオキシマトリンが、アルカロイド分画からは画分 3 にマトリン、画分 5 にオキシマトリンが溶出されていることがわかった。現在、これら再分画成分の軸索伸展活性を検討している。



HPLC conditions: Xtera Prep MS C<sub>18</sub> ODB, 19 x 250 mm (Waters), 5-15% (40 min)-95% (60 min) MeCN/H<sub>2</sub>O/0.05 M TFA, 5 mL/min at UV 210 nm.

図 2. HPLC による再分画

## 2. 連翹エキスの分離・精製

連翹エキスについても、苦参エキスと同様な方法で溶媒分画したが、軸索伸展活性はどの分画にも有意に見られ、苦参エキスのように特定の分画に集中することはなかった。すなわち、連翹エキスの場合、溶媒分画は活性成分の分離・精製には適切な方法ではないことがわかったので、別の方法で分

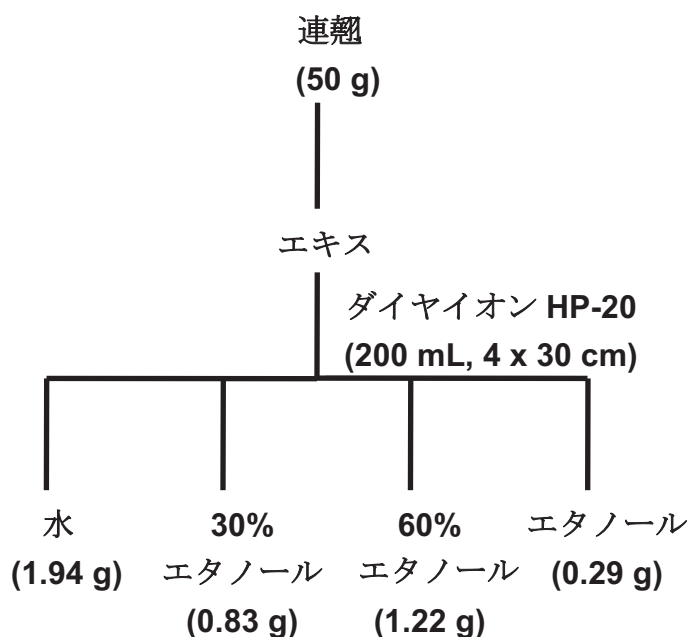


図3. 連翹エキスのだイヤイオン HP-20 による分画

### 【考察】

110種の和漢生薬エキスの軸索伸展活性スクリーニングから、2種（苦参，連翹）の活性の強いエキスを選び、活性成分の検索を行った。苦参エキスからは、溶媒分画によって活性成分が効率良くアルカロイド分画に分配・濃縮され、活性物質としてマトリンを同定した。マトリンは、苦参の主アルカロイド成分としてよく知られ、これまでに神経保護作用，抗がん作用，抗炎症作用が報告されているが、軸索伸展活性は、本研究によって初めて見出された。水分画も、アルカロイド分画と同様の活性を示したが、オキシマトリンの含量は非常に低く、他の活性成分の存在が示唆された。そこで、逆相HPLCで再分画し、他の活性成分の分離・精製を検討している。連翹エキスは、苦参エキスとは異なり、同様の溶媒分画では効率良く活性成分を濃縮できないことがわかった。すなわち、苦参とは活性物質の化学的性質が異なることが窺える。そこで現在、ダイヤイオン HP-20を用いた疎水性吸着クロマトグラフィーによる分画を検討している。

ここで得られた結果は、和漢生薬が脊髄損傷改善に有効な薬物素材であることを、現実に示したものであると言える。これらの情報をもとに、今後さらに活性成分の分離・精製，活性物質の同定ができれば、新しい和漢薬の展開，あるいは創薬への発展が期待できる。

### 【参考文献】

- 1) Tohda C. and Kuboyama T. Current and future therapeutic strategies for functional repair of spinal cord injury. *Pharmacol. Ther.* (2011) **132**, 57-71.

画することにした。ダイヤイオンHP-20は、疎水性相互作用に基づいた吸着クロマトグラフィーで、生薬エキスのような多成分混合物を疎水性，親水性の成分に分離するため繁用される方法である。連翹エキスにこの方法を試みることにした。分離スキームを図3に示す。全体の約半量は吸着されずに素通りし，残り半分がエタノール濃度の段階溶出によって，少しずつ溶出されてきていることがわかる。現在，これら分画の軸索伸展活性を検討中である。

- 2) 東田千尋: 伝統薬物による神経変性疾患の克服－治療薬開発と病態機序の解明に向けて－, 薬学雑誌 (2008) **128**, 1159-1167.
- 3) Nakayama N. and Tohda C. Withanoside IV improves hindlimb function by facilitating axonal regrowth and increase in peripheral nervous system myelin level after spinal cord injury. *Neurosci. Res.* (2007) **58**, 176-182.
- 4) Kuboyama T., Tohda C., Komatsu K. Withanoside IV and its active metabolite, sominone, attenuate A (25-35)-induced neurodegeneration, *Eur. J. Neurosci.*, (2006) **23**, 1417-1426.
- 5) Tohda C., Joyashiki E. Sominone enhances neurite outgrowth and spatial memory mediated by the neurotrophic factor receptor. *Br. J. Pharmacol.* (2009) **157**, 1427-1440.
- 6) Matsuya Y., Yamakawa Y., Tohda C., Teshigawara K., Yamada M. and Nemoto H. Synthesis of sominone and its derivatives based on RCM strategy: discovery of a novel anti-Alzheimer's disease medicine candidate "denosomin". *Org. Lett.* (2009) **11**, 3970-3973.
- 7) Teshigawara K., Kuboyama T., Shigyo M., Nagata A., Sugimoto K., Matsuya Y. and Tohda C. A novel compound, denosomin, ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *Br. J. Pharmacol.* (2013) **168**, 903-919.
- 8) Kuboyama T., Luo X., Park K., Blackmore M. G., Tojima T., Tohda C., Bixby J. L., Lemmon V. P., Kamiguchi H. Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. *Exp. Neurol.* (2013) **248**, 157-169.

## Ⅱ－３ 細胞接着斑形成制御を機序とする脊髄損傷治療薬の開発

富山大学・和漢医薬学総合研究所 神経機能学分野

助教 久保山 友 晴

### 【研究目的と背景】

脊髄損傷などで中枢神経組織が損傷を受けると、損傷部位周辺で活性化アストロサイトが凝集し、グリア性癍痕が形成される。断裂した神経軸索はグリア性癍痕を越えて再生することができない。そのため、脊髄損傷では下肢麻痺などの機能障害が永続する。1928年 Cajal は、脊髄損傷部位（グリア性癍痕形成部）近傍で軸索終末部が膨腫した球状体を呈して伸長が停止することを発見し、これを dystrophic endball と名づけた。Dystrophic endball の形成が軸索再生不全の原因だと考えられているが、未だにその分子的基盤は明らかになっていない。一方、グリア性癍痕内では活性化アストロサイトから阻害因子のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) が分泌され、これが濃度勾配を形成して沈着し、軸索再生を阻害する主たる原因の一つとなっている (Davies et al, 1999)。Case Western Reserve 大学 Silver 博士らは、CSPG 濃度勾配を形成した培養皿上で後根神経節神経細胞を培養することにより、dystrophic endball を再現した (Tom et al, 2004)。これにより、CSPG による軸索再生不全を dystrophic endball 形成の視点から解析する妥当性が示唆された。本培養系を用いることにより、dystrophic endball の分子的基盤の解析が容易になり、これまで未解決であった“CSPG による軸索再生阻害の機序”の解明を大きく進めることができる。

私はこれまでに、前述した dystrophic endball の形成を再現する培養系を用いて大規模な薬物スクリーニングを行なった結果、プロテインキナーゼA (PKA) 阻害剤を処置することにより、dystrophic endball が前方への移動を再開することを初めて明らかにした。次に、細胞運動能に重要な役割を果たす細胞接着斑（細胞-基質間の結合形成部）の構成分子である paxillin が PKA 阻害によってリン酸化され、これにより細胞接着斑のダイナミクスが亢進し、結果として dystrophic endball が CSPG 濃度勾配上で前方移動を再開することを明らかにした。

そこで私は、脊髄損傷下で再生不全に陥った軸索終末部の細胞接着斑の形成を制御することができれば、軸索再生が誘発され、脊髄損傷を治療することができるのではないかと考えた。そこで、細胞接着斑の形成制御作用を有する生薬及びその成分を同定し、その薬理作用を解析することにより、新たな脊髄損傷治療薬を開発することを目指している。本目標を達成するためには、CSPG 濃度勾配を検知し、細胞接着斑の形成を制御するに至るまでの機序を解明して鍵となる分子を同定することが重要となる。昨年度までに久保山は、p21-activated kinase (PAK) が paxillin をリン酸化して CSPG 濃度

勾配上の軸索再生を促進することを明らかにした。PAK は PKA によってリン酸化されることによって不活性化されることが報告されている (Howe and Juliano, 2000)。また, dystrophic endball では PKA が活性化していることを明らかにしている。以上のことから, CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball では PKA が活性化しているため PAK が不活性化し, paxillin のリン酸化が抑制されていると考えられた。そこで本年度は, dystrophic endball における PKA の活性化制御機構について検討した。

## 【実験方法】

### 1. 細胞培養

Tom らの方法 (Tom et al, 2004) に準じて, 培養皿上に CSPG の濃度勾配を作製した。次に成体ラットより後根神経節神経細胞を単離し, CSPG 濃度勾配を形成させた培養皿あるいは 10  $\mu$ g/ml laminin をコートした培養皿上に播種し, 2 % B-27 (Invitrogen) を含む Neurobasal A 培地 (Invitrogen) を用いて 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 2. 免疫染色

実験 1 では培養 4 時間後に薬物を処置し, その 2 日後, 戸島らの方法 (Tojima et al, 2007) に準じて細胞を固定し, 神経マーカーのウサギ抗  $\beta$ -tubulin III ポリクローナル抗体 (Sigma) 及びマウス抗 CSPG モノクローナル抗体 (CS-56, Sigma) を用いて免疫染色を行った。倒立蛍光顕微鏡 (BZ-8000, KEYENCE) を用いて蛍光画像を取得した。CSPG 濃度勾配の外側の端から内側へ 120  $\mu$ m の距離の間に伸長した軸索の長さを定量した。

実験 2 では, 培養 2 日後, 薬物を 5 分間処置した後に上述した手法で細胞を固定した。続いて PKA regulatory domain II (PKA RII) を認識するマウスモノクローナル抗体 (1:400, BD Biosciences) 及び PKA RII の 96 番目のセリン残基のリン酸化 (pS<sup>96</sup> PKA RII) を特異的に認識するウサギモノクローナル抗体 (1:200, Epitomics) を 1 次抗体として用い, Alexa Fluor 488 結合型抗マウス IgG 抗体 (1:400, Invitrogen) 及び Alexa Fluor 594 結合型抗ウサギ IgG 抗体 (1:400, Invitrogen) を 2 次抗体として用い, 免疫染色を行った。倒立蛍光顕微鏡 (Axio Observer Z1, Carl Zeiss) を用いて蛍光画像を取得した。軸索終末部における蛍光強度は Axio Vision software (Carl Zeiss) を用いて定量した。

## 【実験結果】

### 1. cAMP 阻害による軸索再生作用

PKA 阻害剤によって CSPG 濃度勾配を横切る軸索再生が促進されることは既に明らかにしている。PKA は cAMP 増加によって活性化される。そこで cAMP 阻害剤処置による CSPG 濃度勾配上の軸索

再生に対する作用を検討した。CSPG 濃度勾配下で培養した神経細胞に対して、cAMP のアンタゴニスト Rp-cAMPS (20, 10, 200  $\mu$ M), 膜貫通型アデニル酸シクラーゼ阻害薬 2',5'-dideoxyadenosine (0.1, 1, 10, 50  $\mu$ M), 細胞質型アデニル酸シクラーゼ阻害薬 2-hydroxyestradiol (1, 5, 10  $\mu$ M) を処置したが、いずれも濃度勾配を横切る軸索の長さは増加しなかった。

## 2. Dystrophic endball における cAMP 阻害時の PKA の活性

PKA は 2 つの catalytic subunit と 2 つの regulatory subunit (RI・RII) から構成される。RI と RII は catalytic subunit のキナーゼ活性を阻害する (Taylor et al, 1990)。cAMP が RI・RII に結合すると、RI・RII が catalytic subunit と解離し、catalytic subunit のキナーゼ活性が賦活化する。RII の 96 番目のセリン残基は自己リン酸化すると、cAMP 依存性の catalytic subunit と RII の解離が促進され、catalytic subunit のキナーゼ活性が賦活化する (Granot et al, 1980; Erlichman et al, 1983)。そのため、RII の 96 番目のセリン残基のリン酸化 (pS<sup>96</sup> PKARII) を認識する抗体を用いて PKA の活性化を検出する手法が既に報告されている (Mizuno et al, 2002)。そこで私は、pS<sup>96</sup> PKARII および PKARII に対する抗体を用い、神経軸索終末部における pS<sup>96</sup> PKARII と PKARII の蛍光強度の比をとり、PKA の活性を評価する実験を行った。PKA の catalytic domain に作用して直接 PKA の活性を阻害する KT5720 (1  $\mu$ M) および mPKI (1  $\mu$ M) を dystrophic endball に処置した時、pS<sup>96</sup> PKARII に対する PKARII の比 (PKA の活性) は減少した。一方、Rp-cAMPS (200  $\mu$ M), 2',5'-dideoxyadenosine (50  $\mu$ M), 2-hydroxyestradiol (10  $\mu$ M) を処置しても PKA の活性は減少しなかった。

### 【考察】

以上の研究結果から、CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball では PKA の活性が増加しているが、これは dystrophic endball で cAMP の濃度が増加しているためではなく、何らかの機構で PKA が直接活性化されていることが推測された。Proline-directed protein kinase や RSK1 など、PKA の regulatory domain と catalytic domain の間の相互作用を調整して PKA を活性化させるプロテインキナーゼがいくつか報告されており (Braun et al., 1991; Chaturvedi et al., 2006; Houslay et al., 2006), CSPG 濃度勾配はこのようなキナーゼの活性を制御するなどして PKA を直接活性化しているかもしれない。これまでの研究成果より、CSPG 濃度勾配下で再生不全に陥った軸索を再生させる機序として、PKA 阻害による PAK, paxillin を介した再生機序を明らかにした。本成果は、脊髄損傷治療薬の新たな分子ターゲットを提唱するものである。以上の久保山の研究成果の一部は、Experimental Neurology に発表した (Kuboyama et al., 2013)。

## 【参考文献】

- Braun RK, Vulliet PR, Carbonaro-Hall DA, Hall FL. Phosphorylation of RII subunit and attenuation of cAMP-dependent protein kinase activity by proline-directed protein kinase. *Arch Biochem Biophys*, 289:187-191, 1991.
- Chaturvedi D, Poppleton HM, Stringfield T, Barbier A, Patel TB. Subcellular localization and biological actions of activated RSK1 are determined by its interactions with subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol*, 26:4586-4600, 2006.
- Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 19:5810-5822, 1999.
- Erlichman J, Rangel-Aldao R, Rosen OM. Reversible autophosphorylation of type II cAMP-dependent protein kinase: distinction between intramolecular and intermolecular reactions. *Methods Enzymol*, 99:176-186, 1983.
- Granot J, Mildvan AS, Kaiser ET. Studies of the mechanism of action and regulation of cAMP-dependent protein kinase. *Arch Biochem Biophys*, 205:1-17, 1980.
- Houslay MD. A RSK(y) relationship with promiscuous PKA. *Sci STKE*, 2006:pe32, 2006.
- Howe AK, Juliano RL. Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol*, 2:593-600, 2000.
- Kuboyama T, Luo X, Park K, Blackmore MG, Tojima T, Tohda C, Bixby JL, Lemmon VP, Kamiguchi H. Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. *Exp Neurol*, 248:157-169, 2013.
- Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, Saito K, Seishima M, Nabeshima T. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. *Behav Brain Res*, 133:135-41, 2002.
- Tojima T, Akiyama H, Itofusa R, Li Y, Katayama H, Miyawaki A, Kamiguchi H. Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat Neurosci*, 10:58-66, 2007.
- Tom VJ, Steinmetz MP, Miller JH, Doller CM, Silver J. Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury. *J Neurosci*, 24:6531-6539, 2004.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*, 59:971-1005, 1990.