

脳虚血におけるバナジウム化合物の神経新生亢進作用

塩田 倫史,^a 森岡 基浩,^b 福永 浩司^{*,a,c}

Vanadium Compounds Enhance Adult Neurogenesis after Brain Ischemia

Norifumi SHIODA,^a Motohiro MORIOKA,^b and Kohji FUKUNAGA^{*,a,c}

^aDepartment of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University,
^cTohoku University 21st Century COE Program “CRESCENDO,” 6-3 Aramaki-Aoba,
Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan, and ^bDepartment of Neurosurgery, School of
Medicine, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Kumamoto City 860-8556, Japan

(Received October 31, 2007)

Generation of neural precursors persists throughout life in the forebrain subventricular zone (SVZ) and dentate gyrus (DG) subgranular zone (SGZ) in rodent and human brains. In addition, newborn granule cells in the hippocampal DG are important for learning and memory formation. Brain injuries such as seizures or trauma could trigger endogenous programs for adult neurogenesis. Although brain ischemia also increases proliferation of neural progenitor cells in SVZ and SGZ, most neural progenitor cells are dead within 2 weeks after brain ischemia. In addition, there is no therapeutic agent to promote neurogenesis in the adult brain following brain injury. Here we found that intraperitoneal administrations of vanadium compounds, a stimulator of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt and extracellular signal regulated kinase (ERK) pathways markedly enhances brain ischemia-induced neurogenesis. Thus, vanadium compounds are potential therapeutic agent to enhance ischemia-induced neurogenesis through PI3K/Akt and ERK activation.

Key words—adult neurogenesis; brain ischemia; vanadium compound; Akt; extracellular signal regulated kinase (ERK)

1. はじめに

脳を構成する細胞，すなわちニューロンやグリアは，もともと神経管の内側の脳室下帯に存在する未分化な神経幹細胞が増殖・分化することにより作られる。これまでヒトやげっ歯類の成体の脳では神経細胞は増えることはないと考えられていたが，近年，海馬歯状回顆粒細胞下層 subgranular zone (SGZ) と脳室下帯 subventricular zone (SVZ) に神経幹細胞が存在しており，絶えず新しいニューロンが生まれることが分かった。^{1,2)} SVZ で産生された新生ニューロンは分裂しながら，rostral migratory stream (RMS) と呼ばれる経路に沿って前方の嗅球へと移動し，最終的に嗅脳の顆粒細胞及び傍糸球

体細胞に分化する。一方，SGZ で産生された新生ニューロンの一部は，海馬歯状回顆粒細胞層へ移動する。新たに産み出されたニューロンは，実際に神経ネットワークに組み込まれて機能する可能性が高い。海馬の神経幹細胞は，学習や豊かな環境下でその増殖頻度が上昇し，逆にストレス負荷，³⁾ 加齢⁴⁾ によって低下することが報告されている。また，海馬歯状回における神経前駆細胞が痙攣発作^{5,6)} や外傷性脳損傷⁷⁾ また，脳虚血⁸⁻¹¹⁾ によって一過性に増加することが明らかとなった。しかし，脳虚血において発生する神経前駆細胞は短命であり，機能的な神経細胞には分化し難いと考えられる。さらに，機能的な神経細胞への分化を促進する薬物もない。

近年，脳虚血後の内在性神経細胞新生を促進するために細胞膜チロシンキナーゼ受容体を活性化する神経栄養因子 epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) を脳室内へ持続的に投与する実験が行われている。^{12,13)} しかし，タンパク質である神経栄養因子の脳室内投与による臨床へ

^a東北大学大学院薬学研究科薬理学分野，^c東北大学 21 世紀 COE プログラム “CRESCENDO” (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)，^b熊本大学医学部附属病院脳神経外科 (〒860-8556 熊本市本荘 1-1-1)

*e-mail: fukunaga@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は，日本薬学会第 127 年会シンポジウム SD6 で発表したものを中心に記述したものである。

の応用は困難である。バナジウムは、インスリン様作用を持っており、糖尿病の治療などにも効果がある元素である。¹⁴⁾ バナジウムは細胞内でリン酸化チロシンホスファターゼを阻害すること¹⁵⁾により、非特異的に細胞膜チロシンキナーゼ受容体を活性化することが可能である。本論文では低分子量バナジウム化合物の末梢投与による神経新生効果について、げっ歯類脳虚血モデルを用いて明らかにした。脳虚血後の神経再生薬としてのバナジウム化合物の有用性について報告する。

2. 脳虚血における5価バナジウム化合物(オルトバナジウム酸)によるSVZでの神経新生促進作用

われわれはリン酸化チロシンホスファターゼ阻害剤であるオルトバナジウム酸 (Na_3VO_4) が細胞の生存シグナルであるプロテインキナーゼ B (Akt) と mitogen-activated protein kinase (MAPK) である extracellular signal regulated kinase (ERK) を活性化することにより細胞保護作用を有することを明らかにした。¹⁶⁾ オルトバナジウム酸は insulin-like growth factor-1 (IGF-1) と同程度の強力な脳保護作用を示した。神経新生においても Akt と ERK の活性化が重要な役割を担っている。例えば、ラットの大脳皮質神経上皮細胞から単離した神経前駆細胞はカルバコール刺激により Akt と ERK 経路を活性化し、DNA 合成を促進する。¹⁷⁾ また、マウスの大脳皮質培養細胞を Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) で刺激すると Akt と ERK 経路を活性化し、神経前駆細胞の増殖を促進する。それらの DNA 合成や増殖はそれぞれの特異的な阻害剤 (Akt 阻害剤; wortmannin, LY294002), (MEK 阻害剤; PD98059, U0126) のどちらの投与によっても抑制される。¹⁸⁾ また、低酸素条件下のマウス由来神経前駆細胞の増殖も、同様にそれぞれの阻害剤によって抑制される。¹⁹⁾

本研究で、われわれは Akt と ERK を活性化するオルトバナジウム酸が脳虚血後の神経新生を亢進するか検討した。実験方法として、成熟雄性ラットに 90 分間の中大脳動脈閉塞を行い、その 1 日後から bromodeoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg, *i.p.*) とオルトバナジウム酸 (2 ml/kg of 12.5 or 25 mM, *i.p.*) を 7 日間投与し、8 日目に灌流固定を行い、SVZ での新生細胞数について免疫染色法を用いて検討した。

オルトバナジウム酸投与によって、Sham 群においては BrdU 陽性細胞数に優位な変化はみられなかった。しかし、脳虚血群においては用量依存的かつ有意な BrdU 陽性細胞数の増加がみられた (Fig. 1)。²⁰⁾ また、オルトバナジウム酸投与によって増加した BrdU 陽性細胞は nestin 陽性細胞であるだけでなく、未成熟な神経細胞のマーカーである doublecortin (DCX) によって染色され、未成熟の神経前駆細胞であることが示された。さらに、それら神経前駆細胞は Akt と ERK のリン酸化抗体で染色されることから、バナジウム化合物が脳虚血において Akt と ERK を活性化して神経前駆細胞数を増加させることが示された。また、脳虚血 8 日目における神経細胞死に対する影響を TUNEL 染色によって検討したところ、脳虚血群とオルトバナジウム酸投与群との間に優位な差はみられなかった。以上の結果により、オルトバナジウム酸による神経前駆細胞の増加は神経保護効果によるものではないことが示唆された。

3. 脳虚血における4価バナジウム化合物VO(OPT)によるSGZでの神経新生促進作用と認知機能改善効果

海馬歯状回における神経新生は学習や記憶の形成に重要であることが示唆されている。例えば、X線照射によって歯状回の神経新生を抑制したラットでは海馬依存性の学習が低下する。²¹⁾ 脳虚血における学習・記憶などの神経機能の障害を改善するには、虚血直後の神経細胞死を抑制するだけでなく、その後の神経新生を促進し、神経機能を回復する必要がある。海馬歯状回に X 線照射した動物に対して脳虚血処置を行うと、照射しなかった動物に比較して水迷路試験の成績が悪いことから、²²⁾ 神経新生が脳虚血によって低下した認知機能に係わっていることが示唆される。脳虚血による神経回路の回復には、障害を受けた脳領域への適切な神経前駆細胞の移動と成熟が不可欠である。これまでの報告で、



塩田倫史

東北大学大学院薬学研究科・薬理学分野・助手。1980年福島県生まれ。2004年岐阜薬科大学卒業。同年、東北大学大学院薬学研究科・薬理学分野教務職員、2005年助手。現在は脳虚血等の神経変性疾患や精神遅滞などの神経疾患の原因と治療に関する研究を行っている。

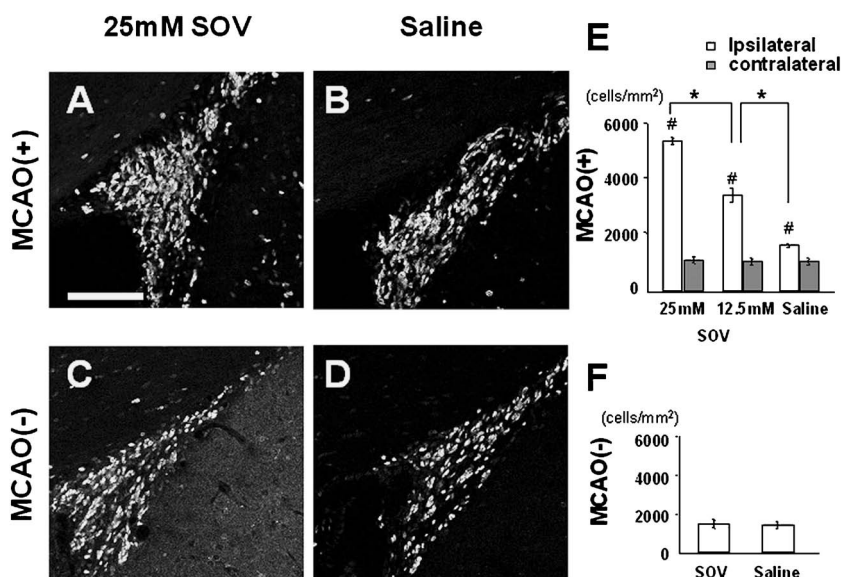


Fig. 1. Evaluation of the Density of BrdU-positive Cells

A to D, laser-scanning confocal microscopic images of immunohistochemical staining for BrdU in the SVZ on the eighth day after middle cerebral artery occlusion (MCAO). A and B, ischemic rats. C and D, nonischemic rats. A and C, sodium orthovanadate (SOV)-treated. B and D, saline-treated. Scale bar, 100 μ m. E, quantitative analysis of the density of BrdU-positive cells in the ipsilateral and contralateral SVZ of ischemic rats treated with 25 or 12.5 mM SOV or with saline. Each group consisted of 15 rats. * $p < 0.05$ versus other groups; # $p < 0.05$ versus contralateral. F, quantitative analysis of the density of BrdU-positive cells in the ipsilateral SVZ of nonischemic rats treated with 25 mM SOV or with saline (modified from Ref. 20).

脳虚血後において、新生した神経の増殖^{10,11)}や移動^{23,24)}が起こることが示されているが、脳虚血により低下した認知機能の神経新生促進による改善効果についての報告はない。オルトバナジウム酸は脳内移行性が悪く、5価のバナジウムを含むことから毒性発現により安全域が狭い。そこで、われわれは5価よりも低毒性である4価のバナジウムを使用して、脳内移行性と毒性を改善した4価バナジウム有機化合物 bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium (IV) [VO (OPT)]¹⁴⁾を合成し、薬効を解析した。VO (OPT) は脳虚血における神経細胞死に対してオルトバナジウム酸よりも低用量で、強力な脳保護効果を示した。²⁵⁾ また、VO (OPT) は Akt の下流の Forkhead 転写因子の活性化を抑制し、細胞死因子である Fas-ligand の転写活性を抑制することで脳虚血による神経細胞死を抑制することを明らかにした。^{26,27)}

本研究でわれわれは、VO (OPT) を用いて脳虚血後の海馬歯状回における神経新生効果の検討を行った。さらに、VO (OPT) による認知機能の回復を評価するために行動解析を行った。方法として、C57BL/6 マウスを用いて30分間の中大脳動脈閉塞モデルを作成した。その後、遅発性神経細胞死がほ

とんど終了する脳虚血1週間後から BrdU (50 mg/kg/day, *i.p.*) と VO (OPT) (0.1, 0.5, 1.0 V mg/kg/day, *i.p.*) の投与を4日間行い、脳虚血2週間後に灌流固定を行い、SGZでの新生細胞について免疫染色法を用いて検討した。

VO (OPT) の投与により脳虚血による神経新生が用量依存的に亢進し、同時に、新生した神経細胞の hilus border から顆粒細胞層への移動も促進された。また、VO (OPT) の投与により亢進した新生細胞は Akt と ERK のリン酸化抗体で染色されるため、VO (OPT) もオルトバナジウム酸と同様、新生細胞で Akt と ERK を活性化することが示された。さらに、それぞれの阻害剤である wortmannin, U0126 を脳室内に投与し検討を行ったところ、VO (OPT) 投与によって増加した新生細胞数と顆粒細胞層への移動がどちらの薬物処置によっても阻害された。Y字迷路試験、新規物質認知試験、及び受動回避試験の行動解析により VO (OPT) の投与が脳虚血後の認知機能低下を改善することを確認した。これらの結果より、脳虚血における VO (OPT) 投与による神経新生には Akt と ERK の両方の活性化が必要であること、VO (OPT) は新生ニューロンを成熟させ、脳虚血により低下した認知機能を改善

することが示唆された。

4. 海馬における神経新生を亢進させる薬物とその作用機序

神経栄養因子以外で海馬の神経新生を亢進する薬物として、バルプロ酸ナトリウムや炭酸リチウムなどの気分安定薬が知られている。バルプロ酸ナトリウムは ERK 経路を活性化して cAMP-response element-binding protein (CREB) を介して抗アポトーシス因子である Bcl-2 の発現を高め、成体ラットの海馬 SGZ で神経新生が促進されるという報告がある。²⁸⁾ 炭酸リチウムも同様に Bcl-2 の誘導が報告されている。²⁹⁾ また、CREB のドミナントネガティブ変異マウスでは、脳虚血による海馬歯状回の神経新生が抑制される³⁰⁾ことから、Bcl-2 のみならず、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 等のほかの CREB 下流遺伝子も神経新生に関与する可能性が考えられる。一方、アルツハイマー治療薬であるドネペジルやメマンチンの投与によっても海馬の神経新生が亢進されることが報告されている。^{31,32)} これらの薬物の神経新生効果は、脳内アセチルコリン神経系が神経新生に関与することを示唆している。ドネペジルは、ニコチン性アセチルコリン $\alpha 7$ 受容体を介して Akt を活性化し神経細胞死を抑制するという報告がなされている。³³⁾ また、Akt の下流分子に glycogen synthesis kinase-3 β (GSK-3 β) や低酸素誘導因子 hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) がある。Akt の活性化は GSK-3 β の活性を抑制する。GSK-3 β の活性抑制はその下流の β -catenin のリン酸化の抑制を引き起こし、核内移行した β -catenin が転写調節因子 lymphoid enhancer-binding factor-1 (Lef-1) を介して neurotrophin-3 等を発現、³⁴⁾ 神経新生を促進すると考えられる。一方、HIF-1 α の下流遺伝子として vascular endothelial growth factor (VEGF)、エリスロポエチンが誘導される。これらは血管新生に関与するサイトカインである。例えば、脳虚血後のラットに VEGF 受容体阻害剤を投与すると、新生細胞の分化や増殖が抑制される。³⁵⁾ また、エリスロポエチン受容体欠損マウスでも脳虚血後、新生細胞の増殖や障害領域への移動が減少するという報告がある。³⁶⁾ 脳虚血により産生された神経前駆細胞に対して血管を介して栄養を供給するために、VEGF やエリスロポエチンによる血管新生は神経新生に不可欠であると考えられ

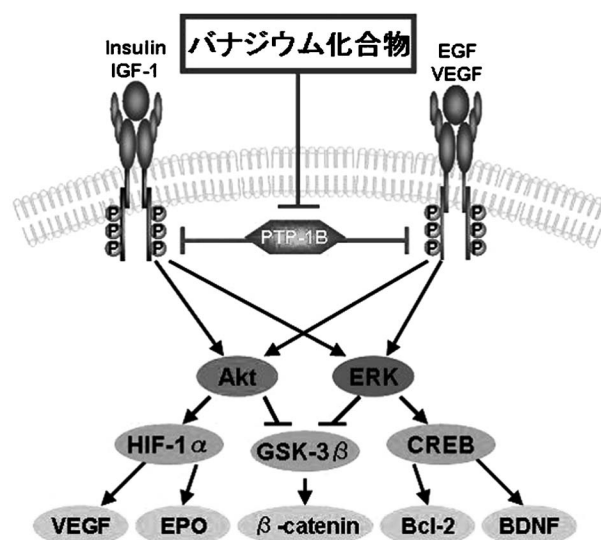


Fig. 2. Schematic Representation of Neurogenesis Enhancement by Vanadium Compounds after Brain Ischemia

Vanadium compounds activate Akt and ERK activities by inhibiting protein tyrosine phosphatases (PTP), and promote activation of downstream targets (HIF-1 α , GSK-3 β and CREB), thereby eliciting neurogenesis enhance factors (VEGF, erythropoietin (EPO), β -catenin, Bcl-2 and BDNF).

る。上述したように、神経新生を促進するためには、Akt と ERK 経路の活性化によるその下流の転写因子が鍵となる (Fig. 2)。

5. 終わりに

本研究では、バナジウム化合物の末梢投与による脳虚血後の神経新生促進効果について明らかにした。バナジウム化合物は Akt と ERK 経路を活性化することによって SVZ, SGZ の両部位で脳虚血後の神経新生を促進した。さらに、海馬歯状回の神経新生効果によって脳虚血により低下した認知機能を改善することから、バナジウム化合物は脳虚血障害に対して、急性期の神経保護作用だけでなく、神経新生効果も期待できる有用な薬剤である。今後は、バナジウム化合物が Akt と ERK 経路の下流のどの因子を活性化しているのか検討する必要がある。このバナジウム化合物をシード化合物として、神経再生治療薬が開発されることを願っている。

REFERENCES

- 1) Altman J., Das G. D., *J. Comp. Neurol.*, **124**, 319-335 (1965).
- 2) Gage F. H., *Science*, **287**, 1433-1438 (2000).
- 3) Gould E., Tanapat P., McEwen B. S., Flugge G., Fuchs E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,

- 95, 3168–3171 (1998).
- 4) Cameron H. A., McKay R. D., *Nat. Neurosci.*, **2**, 894–897 (1999).
 - 5) Bengzon J., Kokaia Z., Elmer E., Nanobashvili A., Kokaia M., Lindvall O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 10432–10437 (1997).
 - 6) Parent J. M., Yu T. W., Leibowitz R. T., Geschwind D. H., Sloviter R. S., Lowenstein D. H., *J. Neurosci.*, **17**, 3727–3738 (1997).
 - 7) Dash P. K., Mach S. A., Moore A. N., *J. Neurosci. Res.*, **63**, 313–319 (2001).
 - 8) Liu J., Solway K., Messing R. O., Sharp F. R., *J. Neurosci.*, **18**, 7768–7778 (1998).
 - 9) Kee N. J., Preston E., Wojtowicz J. M., *Exp. Brain Res.*, **136**, 313–320 (2001).
 - 10) Gu W., Brannstrom T., Wester P., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **20**, 1166–1173 (2000).
 - 11) Jin K., Minami M., Lan J. Q., Mao X. O., Bateur S., Simon R. P., Greenberg D. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 4710–4715 (2001).
 - 12) Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S., Yamamoto S., Hatano O., Kawahara N., Tamura A., Kirino T., Nakafuku M., *Cell*, **110**, 429–441 (2002).
 - 13) Teramoto T., Qiu J., Plumier J. C., Moskowitz M. A., *J. Clin. Invest.*, **111**, 1125–1132 (2003).
 - 14) Sakurai H., Sano H., Takino T., Yasui H., *J. Inorg. Biochem.*, **80**, 99–105 (2000).
 - 15) Lu B., Ennis D., Lai R., Bogdanovic E., Nikolov R., Salamon L., Fantus C., Le-Tien H., Fantus I. G., *J. Biol. Chem.*, **276**, 35589–35598 (2001).
 - 16) Kawano T., Fukunaga K., Takeuchi Y., Morioka M., Yano S., Hamada J., Ushio Y., Miyamoto E., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **21**, 1268–1280 (2001).
 - 17) Li B. S., Ma W., Zhang L., Barker J. L., Stenger D. A., Pant H. C., *J. Neurosci.*, **21**, 1569–1579 (2001).
 - 18) Jin K., Mao X. O., Del Rio Guerra G., Jin L., Greenberg D. A., *J. Neurosci. Res.*, **81**, 497–505 (2005).
 - 19) Sung S. M., Jung D. S., Kwon C.H., Park J. Y., Kang S. K., Kim Y. K., *Neurochem. Res.*, **32**, 1932–1939 (2007).
 - 20) Matsumoto J., Morioka M., Hasegawa Y., Kawano T., Yoshinaga Y., Maeda T., Yano S., Kai Y., Fukunaga K., Kuratsu J. I., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**, 982–991 (2006).
 - 21) Madsen T. M., Kristjansen P. E., Bolwig T. G., Wortwein G., *Neuroscience*, **119**, 635–642 (2003).
 - 22) Raber J., Fan Y., Matsumori Y., Liu Z., Weinstein P. R., Fike J. R., Liu J., *Ann. Neurol.*, **55**, 381–389 (2004).
 - 23) Arvidsson A., Collin T., Kirik D., Kokaia Z., Lindvall O., *Nat. Med.*, **8**, 963–970 (2002).
 - 24) Parent J. M., Vexler Z. S., Gong C., Derugin N., Ferriero D. M., *Ann. Neurol.*, **52**, 802–813 (2002).
 - 25) Shioda N., Ishigami T., Han F., Moriguchi S., Shibuya M., Iwabuchi Y., Fukunaga K., *Neuroscience*, **148**, 221–229 (2007).
 - 26) Shioda N., Moriguchi S., Shirasaki Y., Fukunaga K., *J. Neurochem.*, **98**, 310–320 (2006).
 - 27) Shioda N., Han F., Moriguchi S., Fukunaga K., *J. Neurochem.*, **102**, 1506–1517 (2007).
 - 28) Hao Y., Creson T., Zhang L., Li P., Du F., Yuan P., Gould T. D., Manji H. K., Chen G., *J. Neurosci.*, **24**, 6590–6599 (2004).
 - 29) Chen G., Rajkowska G., Du F., Seraji-Bozorgzad N., Manji H. K., *J. Neurochem.*, **75**, 1729–1734 (2000).
 - 30) Zhu D. Y., Lau L., Liu S. H., Wei J. S., Lu Y. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 9453–9457 (2004).
 - 31) Kotani S., Yamauchi T., Teramoto T., Ogura H., *Neuroscience*, **142**, 505–514 (2006).
 - 32) Jin K., Xie L., Mao X. O., Greenberg D. A., *Brain Res.*, **1085**, 183–188 (2006).
 - 33) Takada-Takatori Y., Kume T., Sugimoto M., Katsuki H., Sugimoto H., Akaike A., *Neuropharmacology*, **51**, 474–486 (2006).
 - 34) Patapoutian A., Reichardt L. F., *Curr. Opin. Neurobiol.*, **10**, 392–399 (2000).
 - 35) Kawai T., Takagi N., Mochizuki N., Besshoh S., Sakanishi K., Nakahara M., Takeo S., *Neuroscience*, **141**, 1209–1216 (2006).
 - 36) Tsai P. T., Ohab J. J., Kertesz N., Groszer M., Matter C., Gao J., Liu X., Wu H., *J. Neurosci.*, **26**, 1269–1274 (2006).