

CGRP 過剰発現マウスにおける運動機能評価

下西 陽大・藤 秀斗・藤野 結衣・米山 佳和・藤原 享志朗

橋川 直也・橋川 成美

岡山理科大学大学院 理学研究科 臨床生命科学専攻

(2021年10月18日受付、2021年12月9日受理)

パーキンソン病は脳黒質においてドパミン神経が障害を受けることによって起こる病気である。ドパミンの減少はうつ様症状と関連があることが報告されている。これまで我々はカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)を脳室内投与することでうつ様症状を改善させることを報告してきた。しかし、パーキンソン病と CGRP の関係性は未だはっきりとしたことが分かっていない。本研究において、CGRP 過剰発現マウスがパーキンソン病様の症状を示すかどうか検討を行なった。12 週齢の野生型マウス、あるいは CGRP トランスジェニック(TG)マウスを用いて、運動機能を評価するために Rotarod test、Catalepsy test の2つの試験を行なった。その後、マウスの脳黒質を採取し、tyrosine hydroxylase (TH)量を Western blotting と免疫組織化学染色を用いて評価した。CGRP TG マウスは rotarod test ではロッド上の滞在時間が減少し、野生型マウスと比べて運動機能障害がみられた。catalepsy test においては、マウスの不動時間が有意に上昇し、錐体外路様症状を示した。しかし、脳黒質における TH 量に変化は見られなかった。以上の結果より CGRP TG マウスはドパミン神経に影響を及ぼさず、運動機能障害を示すことが示唆された。

緒 言

パーキンソン病は、振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害などの運動機能障害をもたらす。

原因として脳黒質および線条体におけるドパミン神経細胞の脱落によっておこることが判明しており、パーキンソン病患者の脳内には α -シヌクレイン(レビー小体)で構成され、ニューロン封入体が蓄積し、神経細胞が減少する¹⁾。発症の割合として中高年に多く発症することが明らかとなっており²⁾、現在パーキンソン病の治療薬には、ドパミンの前駆体であるレボドパ(L-Dopa)が主に用いられている。ドパミンでは血液脳関門を通過することは出来ないが前駆体である L-Dopa であれば通過し、脳内でドパミンに変換されるため症状が改善される³⁾。また補助としてドパミンを分解する MAO-B(モノアミンB)という酵素を阻害する薬が併用されることがある。MAO-B は活性酸素種を生成し黒質線条体の変性に寄与しており⁴⁾、MAO-B を阻害することによりドパミンを脳内に長く止まらせることが可能になる。しかし、レボドパを始めとした現在のパーキンソン病治療薬には、長期服用していると

手足が意に反して動くジスキネジアや、幻覚・妄想といった精神的な副作用などが存在しており適切な量を用いることが重要である。そして、既存薬に変わる新たなパーキンソン病薬の開発が必要とされている。

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide; CGRP)はカルシトニン遺伝子の解析から推定され、同一遺伝子上にコードされている37個のアミノ酸からなる神経ペプチドの一種であり、1982年に発見された。CGRPは、心血管系を含め、中枢末梢に含まれており、cAMPを上昇させ、血管拡張、心拍数増加、心筋収縮力増大、片頭痛を誘発する等の作用がある。これまでにCGRPを脳室内投与することによりうつ様症状を改善させることを報告してきた⁵⁾。パーキンソン病患者はうつ病を合併していることが多く、40%の患者が併発しているという報告があり⁶⁾、CGRPとパーキンソン病には関連があると予想できるものの、未だそのような報告はない。そこで今回我々は、本研究室で作製したCGRP過剰発現(CGRP transgenic; CGRP TG)マウス⁷⁾を用いて、運動機能および、脳黒質におけるチロシンをL-DOPAに変換する酵素である、tyrosine hydroxylase (TH)量を測定すること

によって CGRP TG マウスがパーキンソン病様症状を示すか評価を行った。

1. 実験材料および実験方法

1-1 実験動物

実験動物には、12週齢の CGRP TG マウス及び、対照群として同週齢の C57BL/6J 雄性マウスを野生型マウス(WT)として用いた。動物はケージ内に6匹ずつに分けて飼育を行った。自由給餌法にて飼育し、飲料水は水道水を与えた。

1-2 行動試験による評価

(i) Rotarod test

マウスを回転する棒の上に乗せ落下するまでの時間を測定した。まず、4 rpm の速さで5分間走らせるトレーニングを二日間行い、その後 16.5 rpm の速さでマウスがロッドから落下するまでの時間を測定した。この試験を Day 1 から Day 3 まで行った。ロッドから落下するまでの時間が短ければ短いほど、運動機能障害と考えられる。

(ii) Catalepsy test

卓上に 4cm 上の水平な木製の棒(0.7cm diameter)にマウスの前肢を置き、マウスの前肢が棒から離れるまでの時間を計測した。離れるまでの時間が長ければ長いほど運動機能障害と考えられる。

1-3 Western Blotting 法によるマウス脳黒質タンパク発現量の解析

行動試験終了後、頸椎脱臼を行いマウス脳を摘出した。脳は 1 mm 間隔でスライスし、黒質組織を多く含む切片をくり抜き RNA later に浸けて保存した。

マウス脳黒質からタンパク抽出

採取した黒質サンプルを PBS で洗浄後、SDS sample buffer (200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 400 mM Dithiothreitol (DTT), 8% SDS, 40% glycerol, 0.03 g/10 mL BPB) 100 μ L を加え、プラスチックホモジナイザーで破碎した。15000 rpm で3分間遠心分離を行い、上清を別のチューブに移した。RC・DC法によりタンパク質量を測定し、すべてのサンプルで濃度が同じになるように調整した。

電気泳動とバンドの検出

電気泳動バッファー 300 mL ($\times 10$ Tris-Glycine 30 mL, 10% SDS 3 mL, 蒸留水 267 mL) を調製した。Western Blotting 用 10%アクリルアミドゲルを泳動槽にセ

ットし、ゲル1枚につき 20 mA で泳動を行った。サンプルを各ウェルに、マーカを一番端のウェルにアプライし、108分間電気泳動した後、ゲルを切りだし buffer B (25 mM Tris, 5% メタノール)に浸し5分間浸透させた。buffer A (300 mM Tris, 5%メタノール)、buffer C (25 mM Tris, 5%メタノール, 40 mM 6-アミノカプロンサン) を準備し、濾紙3枚をそれぞれ buffer A, A, B の順に浸し重ねた。そこに buffer B で30分間平衡化させておいたメンブレンを重ね、ゲルを置き、濾紙3枚をそれぞれ buffer C に浸して重ね、Blotting (2 mA/cm², 1時間)を行った。その後 Blocking (1.5% ECL Blocking reagent) を行い、1次抗体(抗 tyrosine hydroxylase 抗体, 1:5000)で一晩 4°C で反応させ、wash したのち、2次抗体(抗グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) ウサギ抗体, 1:20000)にメンブレンを1時間室温で反応させ、wash を行い発光検出器 (LAS 4000 mini) でバンドを検出した。

1-4 免疫組織化学染色

tyrosine hydroxylase (TH)の発現量を観察するため、マウスの黒質の免疫組織化学染色を行った。一次抗体に抗ウサギ tyrosine hydroxylase 抗体 (1:300)を用い、4°Cで一晩反応させた。PBS で洗浄後、fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) -labeled goat anti-rabbit IgG (1:100, ICN Pharmaceuticals, Bridgewater)で温室にて60分間反応させた。PBS で洗浄後、封入し、共焦点レーザー顕微鏡(岡山理科大学機器センターFV3000)で観察を行った。得られた画像は、Image J (National Institutes of Health, Bethesda)にて解析を行った。脳黒質組織面積あたりの TH 免疫陽性反応面積で評価した。

1-5 統計学的解析

得られたデータ値を平均値 \pm 標準誤差(Mean \pm S.E.M)で表した。また t-test を用いて統計的処理を行い、いずれも有意水準 5%以下を有意差ありと判定した。

2. 結果

2-1 rotarod test

実験に用いたマウスの体重に差は見られず、rotarod 試験への影響は及ぼされないと考えた。(Fig. 1A)。WT マウスでは日を追うごとに落下するまでの時間が長くなり、運動学習が行われているのに対し、CGRP TG マウスでは経時的な変化は見られず、落下するまでの時間は短いままであり、WT マウスと比較して運動機能が有意に低下していた。(Fig. 1B)。

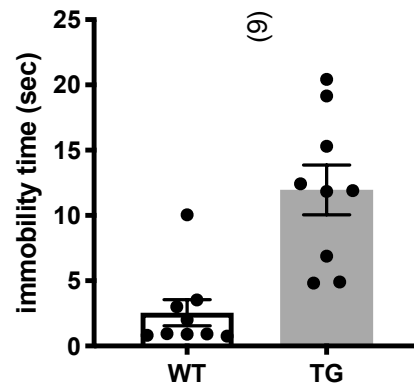
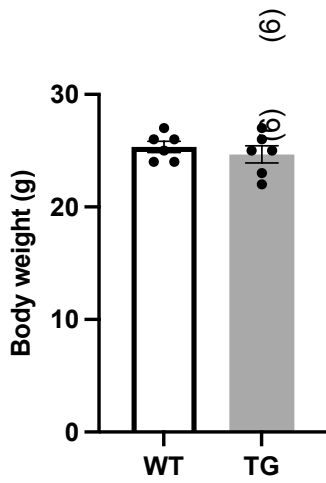


Figure 2. CGRP TG マウスにおける Catalepsy test. WT: wild-type mouse, TG: CGRP transgenic mouse *p<0.05, t-test.

B

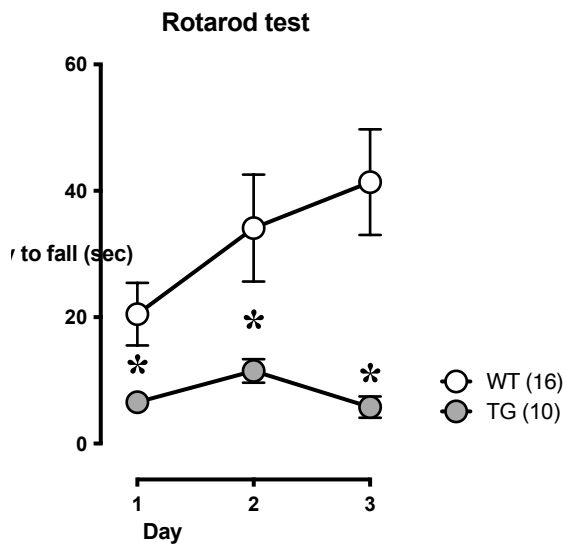


Figure 1. CGRP TG マウスにおける Rotarod 試験 (A) 12 週齢時の体重 (B) Rotarod 試験。WT: wild-type mouse, TG: CGRP transgenic mouse *p<0.05, t-test.

2-2 Catalepsy test

WT マウスと比較して CGRP TG マウスの方が前肢を棒にのせたままの姿勢を保ち続け、有意にカタレプシー状態が長く観察された。(Fig. 2)。

2-3 脳黒質における TH 発現量の変化

Western blotting 法にて脳黒質における TH 発現量の測定を行なった。その結果、WT マウスと CGRP TG マウスで脳黒質における TH 量に有意な変化は見られなかった (Fig. 3)。

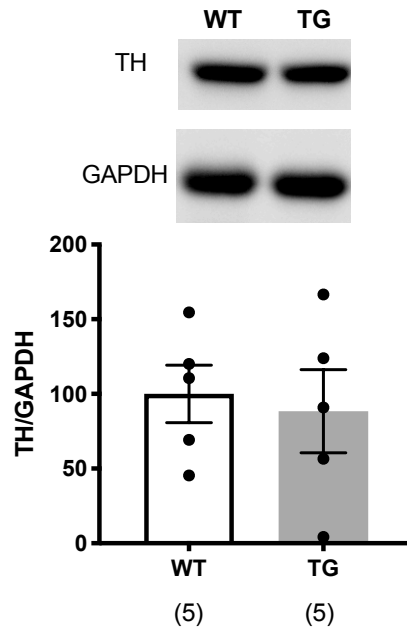


Figure 3. Western blotting によるマウス脳黒質の TH 発現量 上段; TH と GAPDH の代表的なバンド。下段; TH を GAPDH で補正した結果。WT: wild-type mouse, TG: CGRP transgenic mouse *p<0.05, t-test.

2-4 免疫組織化学染色

マウスの脳を矢状に切断し、厚さ 20 μm の薄切切片を作製し、TH 抗体で染色を行った。黒質の部分に神経様の免疫陽性反応が見られたが、WT マウス(Fig. 4A)と比較して CGRP TG マウス(Fig. 4B)で大きな変化は見られなかった。

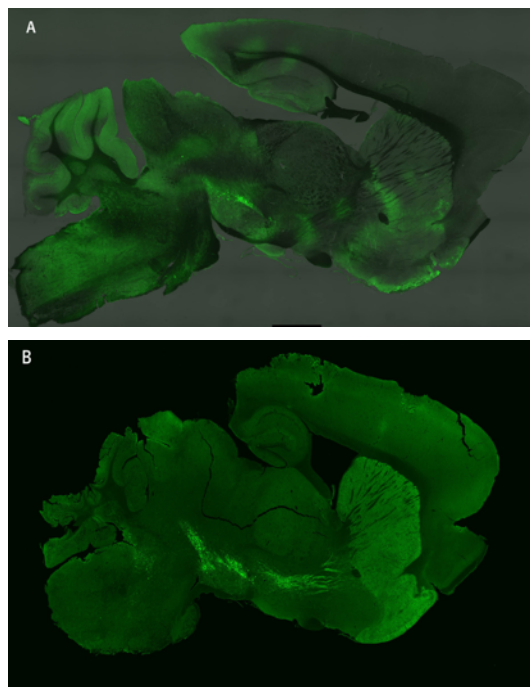


Figure 4. マウスの脳矢状面における TH 免疫陽性反応 (A) WT マウスにおける脳黒質の代表的な画像。(B) CGRP TG マウスにおける TH の分布量。

3. 考察

本実験では、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス及び、同週齢の CGRP TG マウスを用いて CGRP の過剰発現がパーキンソン病様症状に関係しているのかを、運動機能と脳黒質における tyrosine hydroxylase の量で評価した。脳黒質における TH 量に大きな変化は見られなかった。Tyrosine hydroxylase はチロシンから、L-DOPA に変換するドーパミンの律速酵素である。本実験では黒質や線条体におけるドーパミン量の定量的測定は行っていないものの、黒質における TH 量に有意な変化が見られなかったことから、CGRP の過剰発現はドーパミン神経に影響を及ぼさないと示唆される。我々の以前の研究結果より、CGRP をマウスの脳室内に投与すると、L-DOPA からドーパミンに変換する酵素である dopa decarboxylase の mRNA 発現量がマウスの脳海馬において有意に増加していることを報告している(2016 薬理学会年会)。そこで、本実験においても CGRP の過剰発現がドーパミン神経に影響を及ぼす可能性を期待し

ていたが、予想と反して、TH 量の有意な変化はみられなかった。しかし、運動機能評価試験においては WT マウスと比較して CGRP TG マウスの運動機能が有意に低下していた。これまでの研究により CGRP TG マウスでは、CGRP の基本的な生理作用である血管拡張作用により心拍数、収縮期血圧、平均血圧、拡張期血圧が有意に減少することを報告してきた⁷⁾。また CGRP には痛み情報を中枢神経に伝達する作用がある。そこで、痛覚感受性試験を行ったところ、痛み反応の潜時時間が著明に短くなっており痛みに対する感受性が増加されたことも示唆されている⁷⁾。よって、今回の研究により得られた CGRP TG マウスにおける運動機能の減少はドーパミン神経系への影響ではなく、心拍数の低下や痛みを感じていたために起こった可能性が考えられる。

パーキンソン病モデルマウスには他に 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)あるいは 6-hydroxydopamine (6-OHDA)を腹腔内投与することで作製する MPTP マウスや 6-OHDA マウスがある。MPTP はドーパミン神経を脱落させるのに用いられる神経毒であり、マウスに腹腔内投与をすると脳内に移行し、モノアミン酸化酵素 B(MAO-B)により酸化されると MPP⁺となる。これがミトコンドリアにおける電子伝達系の complex I を阻害し、ATP を枯渇させ酸化ストレスを起こす。この結果ドーパミン神経が脱落し運動機能障害を始めとしたパーキンソン病様症状を引き起こされることが明らかにされている^{8,9)}。MPTP の感受性は動物によって異なる。例としてラットでは感受性が低い。これはラットが血液脳関門に MAO-B を豊富に発現しているためであり MPP⁺では血液脳関門を通過できないためである。そこで用いられるのが 6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) である。6-OHDA は血液脳関門を通過し、神経細胞に入り込み細胞内活性酸素種、ROS を誘発し、神経細胞死を引き起こす¹⁰⁾。また遺伝子組み換えによってもモデルマウスが作製されている。パーキンソン病は稀に家族性に発症し、その原因遺伝子として主に、E3 ユビキチンリガーゼであるパーキン (Parkin) や、ユビキチンキナーゼである PINK1 の変異が早期発症に関与すると言われて¹¹⁾。そこでこれらの機能を欠損させたマウス (KO マウス) が作製された。しかし、運動機能障害やドーパミン神経細胞の脱落などはみられなかった^{12,13)}。これらの遺伝子を欠損させたマウスと、ミトコンドリア DNA に変異が蓄積するマウスをかけ合わせてミトコンドリアストレスを誘導したところ、炎症性サイトカインが増加することにより、ドーパミン神経の減少と運動機能障害が認められた¹⁴⁾。この作用は自然免疫・炎症応答を活性化させる stimulator interferon genes (STING) を欠損

させると抑制が見られた¹⁴⁾。つまり、ミトコンドリアの恒常性の破綻が炎症を誘発し、ドパミン神経を脱落させ、運動機能障害を起こしていることを示唆している¹⁴⁾。今回用いた CGRP TG マウスでは炎症性サイトカインの発現については検討しておらず、ミトコンドリアの恒常性についても検討は行っていない。CGRP TG においてドパミン神経の脱落は観察されなかったものの、Parkin や PINK1 欠損マウスと同様にミトコンドリアストレスを負荷することで、ドパミン神経への影響がみられるかもしれない。更なる検討が必要である。

本実験の結果より、CGRP TG マウスでは Rotarod test、Catalepsy test のいずれの試験においても有意な低下が見られた。しかし脳黒質における TH 量は変化が見られなかった。以上の結果より CGRP TG マウスはドパミン神経には影響及ぼさず、運動機能障害を示すことが示唆された。

参考文献

- Dickson DW. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 46: S30-S33, 2018.
- de Lau LM, Giesbergen PC, de Rijk MC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. *Neurology.* 63: 1240-1244, 2004.
- Voet D, Voet J. Amino acid metabolism. *Biochemistry.* 3rd ed Wiley: 1026, 2004.
- Aboukarr A, Giudice M. Interaction between Monoamine Oxidase B Inhibitors and Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *Can J. Hosp Pharm.* 71(3): 196-207, 2018.
- Hashikawa-Hobara N, Ogawa T, Sakamoto Y, Matsuo Y, Zamami Y, Hashikawa N. Calcitonin gene-related peptide pre-administration acts as a novel antidepressant in stressed mice. *Sci Rep.* 5:12559, 2015.
- Reijnders JS, Ehrt U, Weber WE, Aarsland D, Leentjens AF. A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 23: 183-189, 2008.
- Mishima S, Otsuka A, Matsuuchi S, Hashikawa-Hobara N, Inoue K, Hashikawa N. alphaCGRP transgenic mice display typical physiologic features. *Yakugaku Zasshi.* 138: 1119-1126, 2018.
- Jenner P, Marsden CD. The actions of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in animals as a model of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 20: 11-39, 1986.
- Kalaria RN, Mitchell MJ, Harik SI. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 3521-3525, 1987.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 65: 135-172, 2001.
- Hatano T, Kubo S, Sato S, Hattori N. Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 111: 1075-1093, 2009.
- Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, et al. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem.* 278: 43628-43635, 2003.
- Kitada T, Pisani A, Porter DR, et al. Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 11441-11446, 2007.
- Sliter DA, Martinez J, Hao L, et al. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature.* 561: 258-262, 2018.

CGRP-overexpressing TG mice showed ataxia without affects to dopaminergic neurons

Yodai SHITANISHI, Shuto FUJI, Yui FUJINO, Yoshikazu YONEYAMA,

Kyoshiro FUJIWARA, Naoya HASHIKAWA and Narumi HASHIKAWA-HOBARA

Graduate School of science, Okayama University of science

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received October 18, 2021; accepted December 9, 2021)

Background: Parkinson's disease (PD) is caused by a loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. It has been reported that dopamine loss can lead to depression. In our previous study, we found that calcitonin gene-related peptide (CGRP) administration into the brain could ameliorate depressive like behavior in stressed mice. However, it is still unclear how CGRP influences the pathophysiology of PD. Here, we investigated whether CGRP transgenic mice revealed PD-related phenotypes.

Methods: We performed behavioral tests, including rotarod and catalepsy tests to evaluate motor function using male C57BL/6J mice or transgenic (TG) mice overexpressing CGRP (CGRP TG). We performed immunohistochemical analysis and protein analyses on tyrosine-hydroxylase (TH) in the substantia nigra.

Results: CGRP TG mice showed motor deficits when compared with wild-type mice in rotarod and catalepsy tests. However, TH-positive dopaminergic neurons were detected in CGRP TG mice as well as wild-type mice. We also evaluated TH protein levels in CGRP TG mice using western blots. Likewise, the level of TH did not change in CGRP TG mice. Our data indicate that CGRP-overexpressing TG mice have normal dopaminergic neurons yet revealed ataxia.