

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10520

研究課題名(和文) 脳虚血耐性成立のための分子基盤の解明 アルドラーゼAとアコニターゼ2に着目してー

研究課題名(英文) In vitro study of the functional significance of ischemic tolerance-induced changes in the expression level of aconitase2 and aldolase A

研究代表者

中島 崇行 (Nakajima, Takayuki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：30333644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海馬の虚血耐性獲得時に発現量が変化するアルドラーゼAとアコニターゼ2に注目し、ラット胎仔から採取した海馬神経細胞への遺伝子導入実験により、「アルドラーゼAとアコニターゼ2は虚血から神経を保護するキータンパク質か？」について調べることを目的とした。培地からグルコースと酸素を除去して神経細胞を培養することで虚血模擬処置とした。アコニターゼ2ノックダウン細胞をノックダウンを行っていないコントロールの細胞とともに虚血模擬処置を行ったところ、アコニターゼ2発現をノックダウンさせたとしても、虚血模擬によって誘導される細胞死滅率はコントロールの細胞と同程度であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine whether aconitase 2, an enzyme of tricarboxylic acid cycle, and aldolase A, an enzyme of glycolytic system, are key proteins for protecting neurons from ischemic injury using a cultured fetal hippocampal neurons. In this study, in vitro model of ischemia were mimicked by oxygen-glucose deprivation (OGD). OGD-induced cell death was assessed by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH) that leaked into the culture medium. OGD for 180 min induced significantly neuronal cell death. The decrease in expression level of aconitase 2 mRNA and protein after transfection of aconitase 2 siRNA were confirmed by RT-PCR and western blot, respectively. There was not significant difference in OGD-induced neuronal cell death between aconitase 2 siRNA transfected neurons and control siRNA transfected neurons.

研究分野：中枢神経

キーワード：脳神経疾患 脳虚血 海馬 虚血耐性

1. 研究開始当初の背景

ヒトが呼吸や心拍の一時停止に陥ると、一命は取り留めたととしても、脳に障害が残ることがある。脳の中でも特に海馬、大脳皮質、小脳が酸素不足(虚血)の影響を受け易く、認知や感情、運動機能に障害が及ぶ。ヒトでは虚血が4~5分続くと脳の神経細胞が損傷する。ところが、神経細胞に傷害を及ぼさないくらいに非常に弱い虚血を前もって負荷すると、その後の強い虚血に対して抵抗性を示す。これを虚血耐性という。

虚血耐性はラットなどの実験動物の脳はもちろん、初代培養神経細胞でも認められる。ヒト臨床では、脳梗塞発症前に一過性脳虚血発作を経験した患者は、その後起きた脳梗塞による予後が良い傾向があり、虚血耐性はヒトでも起こりえるとされている(Nat. Rev. Neurosci. 2006; 7:437-448.)。過去、虚血耐性の分子メカニズム解明は脳虚血の画期的な治療方法の開発につながるとの期待感から、研究が盛んに行われてきたが、現在にいたるまで、その詳細については不明である。

脳に血液を供給する総頸動脈と椎骨動脈を一時的に閉じる全脳虚血処置は、海馬神経細胞の顕著な脱落を招く。これは一時的な心停止後に見られる脳の病態に類似している。本申請者は全脳虚血モデルラットを用いて海馬での虚血耐性現象について検討してきた。その結果、ラットに5分虚血を負荷すると、海馬の神経細胞が脱落するが、前もって3分虚血(3分虚血は神経細胞を脱落させない弱い虚血)を負荷すると、その後の5分虚血負荷による神経細胞の脱落の程度が減る。すなわち、3分虚血は虚血耐性を誘導する(Neurol. Sci., 32:229-239. 2011.)。本申請者は、「海馬が虚血耐性を獲得するための分子基盤の解明」を目的として、3分虚血負荷後の海馬で発現量が変化するタンパク質、すなわち、虚血に対して抵抗性を持たせる可能性のあるタンパク質の網羅的検索をプロテオーム解析によって行ってきた。その結果、解糖系酵素であるアルドラーゼAの発現量増加とミトコンドリアTCA酸回路酵素であるアコニターゼ2の発現量減少を確認し、そのデータの一部はすでに論文で発表している(J. Neurol. Sci., 358:158-171. 2015.)。この結果は、アルドラーゼA発現量の増加およびアコニターゼ2発現量の減少が神経細胞にとって虚血に対して抵抗性を獲得するための重要な因子である可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、3分虚血の後に負荷後のアルドラーゼAとアコニターゼ2の発現量変化に注目し、in vitroでの遺伝子導入実験により、「アルドラーゼAとアコニターゼ2は虚血から神経を保護するキータンパク質か?」を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラット胎仔由来海馬神経細胞培養

胎齢18日目のラット胎仔海馬を取り出し、0.01% DNaseI存在下で0.25% trypsinで37で20分間処理した。ピペティングによって組織中の細胞を分散させ、遠心後、2% G21 supplement, 2 mM グルタミン、0.3% glucose, 37.5 mM 塩化ナトリウム、1% ペニシリンーストレプトマイシ、5% ウシ胎児血清を含む Neurobasal Medium (PM 培地) に細胞を懸濁した。その後、70 μ m 孔のフィルターで細胞懸濁液をろ過し、ろ液を遠心して細胞を沈殿させた。その後、沈殿した細胞塊を再び PM 培地で懸濁した。細胞を 7.2×10^5 個/ml の密度で poly-D-lysine でコートされた細胞培養プレートに播種した。播種の翌日に、2% G21 supplement, 2 mM グルタミン、0.3% glucose, 37.5 mM 塩化ナトリウム、1% ペニシリンーストレプトマイシを含む Neurobasal Medium (SM 培地) に培地を交換した。

(2) 蛍光二重免疫染色

培養神経細胞を4% paraformaldehyde-0.1M phosphate buffer (PB) で固定した後、一次抗体であるウサギ抗 microtubule associated protein 2 (MAP2) 抗体およびマウス抗 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を反応させ、その後、二次抗体である DyeLight488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体および DyeLight594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を反応させた。

(3) 虚血模擬処置

虚血模擬処置は、培養液中のグルコースおよび酸素除去下で細胞を培養することとした。培養プレートを PBS で洗浄後、虚血用培地(グルコース無添加 EBSS) に置き換え、酸素除去剤であるアネロパッケンキ(三菱ガス化学)を用いて細胞を2時間あるいは3時間培養した。

(4) Lactate dehydrogenase (LDH) アッセイ

細胞死は LDH 細胞毒性テストキット(和光純薬)を用いて細胞内から培養液中に漏出した LDH 活性を測定することで評価した。虚血模擬処置を行った細胞培養液の一部をキット付属の反応溶液と混合して室温で40分インキュベーションした。インキュベーション後に生じたフォルマザンは吸光分光光度計を用いて560nmの波長で検出した。

(5) アコニターゼ2 ノックダウン

海馬神経細胞の培養4日目にアコニターゼ2 mRNA に対する siRNA を細胞に導入した。

(6) RT-PCR

siRNA 導入によるアコニターゼ2 mRNA のノックダウン効果を調べるために RT-PCR を行った。TRIsure(日本ジェネティクス)を用いて培養神経細胞からトータル RNA を抽出した。抽出した RNA から M-MLV reverse transcriptase (プロメガ) を用いて cDNA を作製した。PCR は得られた cDNA を鋳型にしてアコニターゼ2

mRNA に対する特異的なプライマーを用いて行った。

(7) ウェスタンブロット

siRNA 導入によるアコニターゼ 2 タンパク質のノックダウン効果を調べるためにウェスタンブロットを行った。細胞溶解液によって細胞内のタンパク質を抽出してサンプルとした。サンプルを電気泳動した後、抗アコニターゼ 2 抗体を用いてサンプル中のアコニターゼ 2 を検出した。

4. 研究成果

胎仔海馬由来培養神経細胞を培養してから 7 日後に神経細胞のマーカータンパク質である MAP2 に対する抗体とアストロサイトのマーカータンパク質である GFAP で蛍光二重免疫染色を行うと、培養細胞中のおよそ 80-90% の割合で、MAP2 陽性反応が認められた。すなわち、今回の培養条件では効率的に神経細胞の培養を行うことができていることを表している。

胎仔海馬由来培養神経細胞を培養してから 7 日後に 2 時間または 3 時間の虚血模擬処置を行った。3 時間の虚血模擬処置を行うと、コントロールの細胞と比較して培養液中に遊離する LDH 活性値が 30-40% 程度上昇した。このことは 3 時間の虚血模擬処置を行うと著しい細胞死を誘導することを表している。一方、2 時間の虚血模擬処置を行ったところ、培養液中に遊離する LDH 活性値は虚血模擬処置を行っていないコントロールの細胞で見られる LDH 活性値とほぼ同じであった。そこで、これ以降の実験は 3 時間の虚血模擬処置を行うこととした。

siRNA のアコニターゼ 2 に対するノックダウン効果を確認した。海馬由来培養神経細胞を培養してから 4 日目にアコニターゼ 2 に対する siRNA を導入し、その 3 日後にアコニターゼ 2 mRNA の発現レベルを半定量的 RT-PCR で調べた。アコニターゼ 2 に対する siRNA を導入した細胞におけるアコニターゼ 2 mRNA の発現レベルは、siRNA を導入していない細胞あるいはコントロールの siRNA を導入した細胞のアコニターゼ 2 mRNA の発現レベルと比べると、およそ 50-60% 程度減少していることが確認できた。さらに、siRNA 導入による神経細胞でのアコニターゼ 2 タンパク質の発現レベルへの影響をウェスタンブロットで確認すると、アコニターゼ 2 に対する siRNA を導入した細胞におけるアコニターゼ 2 タンパク質の発現レベルは、siRNA を導入していない細胞あるいはコントロールの siRNA を導入した細胞のアコニターゼ 2 タンパク質発現レベルと比べると、およそ 15-20% 程度減少していることが確認できた。

アコニターゼ 2 siRNA の導入による神経細胞の虚血に対する抵抗性の変化を調べるために、アコニターゼ 2 siRNA を導入した神経細胞、siRNA を導入していない細胞、コントロールの siRNA を導入した細胞に虚血模

擬処置を行った。その結果、アコニターゼ 2 siRNA を導入した神経細胞における虚血模擬処置後の培養液中の LDH 活性の値と siRNA を導入していない細胞およびコントロールの siRNA を導入した細胞における虚血模擬処置後の培養液中の LDH 活性の値との間に有意な変化は認められなかった。すなわち、アコニターゼ 2 siRNA を導入した神経細胞において、虚血に対する抵抗性が増加することを示す結果は得られなかった。今回の結果は、以前に本申請者が論文で発表した虚血耐性を獲得した海馬で見られるアコニターゼ 2 タンパク質発現レベルの減少は、虚血に対する抵抗性の増加とは無関係であることを示しているのかもしれない。

アコニターゼ 2 はクエン酸回路においてクエン酸をシスアコニターゼを介してイソクエン酸に変換する酵素である。クエン酸回路は NADH_2^+ および FADH_2 を産生し、これらの還元化補酵素を酸化リン酸化のために電子伝達系に輸送し、結果的に ATP の産生をもたらす。ゆえに、アコニターゼ 2 は 3 分虚血後の海馬 CA 1 領域でその発現レベルが減少することは神経細胞が生存するには矛盾しているように思える。一方で、アコニターゼ 2 は毒性の強い活性酸素種の細胞内産生部位の一つであると考えられている。ウシの心臓から精製したアコニターゼ 2 はヒドロキシラジカルの産生部位の一つであることが示されている。アコニターゼ 2 は、その活性中心において補欠分子族である $[4\text{Fe-4S}]$ を保有しており、これが活性酸素とりわけスーパーオキシドラジカルに感受性が高い。スーパーオキシドによる $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ の酸化は鉄イオンおよび過酸化水素を放出し、さらにフェントン反応と呼ばれる鉄イオンと過酸化水素間の反応を介して細胞毒性の強いヒドロキシラジカルを産生する。すなわち、アコニターゼ 2 は細胞が生存するのに必要不可欠な酵素である一方で、細胞が酸化ストレスに陥った際には細胞に害をもたらす酵素となりうる。虚血を受けた神経細胞はスーパーオキシドの影響を強く受けることが多くの研究によって示されていることから、本申請者は、虚血耐性を獲得した海馬では、神経細胞内でのクエン酸回路機能を適度に維持できるレベルでアコニターゼ 2 の発現を減少させることによって、虚血後の酸化ストレスを軽減させ、ひいては虚血後の神経細胞死を軽減させているのかもしれないと推測していた。今後は、3 分の虚血を受け、虚血耐性を獲得した海馬がその後強い虚血ストレスを受けた際に、虚血耐性を獲得して内海馬と比べて実際に酸化ストレスが軽減されているのかどうかを確認する必要があるかもしれない。

アルドラーゼ A の解析については、現在、アルドラーゼ A 遺伝子を神経細胞に導入する準備を整えている段階でとどまっております。アルドラーゼ A の遺伝子導入がもたらす虚

血への影響の検証については実験を継続しているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakajima T, Hata R, Kondo T, Takenaka S. Proteomic analysis of the hippocampus in naïve and ischemic-preconditioned rat. J Neurol Sci. 2015. 358:158-171. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

中島崇行、竹中重雄. 虚血性プレコンディショニング後のラット海馬 CA1 領域におけるタンパク質発現の変化 (日本病態生理学会・国立精神・神経医療研究センター・2017年8月20日)

中島崇行、竹中重雄. 虚血性プレコンディショニング後のラット海馬 CA1 領域におけるタンパク質発現の変化 (日本獣医学会・北里大学・2015年9月9日)

中島崇行、竹中重雄. ラット海馬 CA1 領域と CA3/DG 領域間で発現レベルが異なるタンパク質のプロテオーム解析による探索 (日本病態生理学会・愛媛大学・2015年8月2日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 崇行 (NAKAJIMA Takayuki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号 : 30333644

(2)研究分担者

竹中 重雄 (TAKENAKA Shigeo)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学
研究科・教授

研究者番号 : 10280067

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()