

令和元年6月24日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10112

研究課題名(和文) 興奮毒性による分子シャペロンVCP酸化損傷の意義およびHIE治療戦略への応用

研究課題名(英文) The role of molecular chaperone VCP in excitotoxin-induced cell death.

研究代表者

古川 絢子 (Furukawa, Ayako)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号：10455537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小胞体ストレスに関連するシャペロンタンパク質であるvalosin containing protein(VCP)が、興奮毒性モデルラットの脳内で活性化したアストロサイトに強く発現することを明らかにした。興奮毒性がグリア細胞に小胞体ストレスを引き起こす可能性が示唆された。VCPの役割を初代培養グリア細胞を用いて検討した結果、VCPの阻害はグルタミン酸による細胞死を促進することを明らかにしたが、この細胞死において小胞体ストレスマーカーの誘導が認められなかった。これらの結果から、グリア細胞においてVCPは細胞保護的に働くが、その機構には小胞体ストレスからの保護以外の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

興奮毒性は、神経細胞の過剰な興奮性シグナル伝達によって生じる。低酸素性虚血性脳症は、周産期の一過性の低酸素と虚血による興奮毒性をきっかけに、てんかんなどの後遺症を引き起こす。興奮毒性により、どのような分子が関与して脳内の環境が変化するのか、それらの分子が治療標的となり得るかを明らかにすることは、周産期の傷害をきっかけに生じる神経学的後遺症を改善する上で重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focused on the role of valosin containing protein (VCP) in excitotoxin-induced cell death. We elucidated that VCP was increased in reactive astrocyte in excitotoxin-treated rat hippocampus. In primary mixed glial cultures, Eeyarestatin I, which is an inhibitor of VCP, was shown to promote cell death by glutamate. These results suggest that VCP may act as a cytoprotective factor in glial cells. Eeyarestatin I induced ER stress marker proteins in glial cells, no induction of them were observed in eeyarestatin and glutamate-treated cells. Thus, the cytoprotective effect of VCP may not be an ER stress response.

研究分野：生化学、神経科学

キーワード：興奮毒性 VCP 酸化ストレス 細胞死

1. 研究開始当初の背景

興奮毒性は、神経細胞の異常な興奮により引き起こされ、細胞死の原因となる。周産期の低酸素性虚血性脳症 (HIE: Hypoxic-ischemic encephalopathy) では、急性期の興奮毒性による傷害が、てんかんなどの神経学的後遺症を引き起こす原因となり得る。興奮毒性による細胞死のメカニズムを詳細に解析し、有効な治療標的となる分子を同定することは、HIE の早期治療のみならず、その後の神経学的発達のフォローを行うために重要であると考えられる。

申請者はこれまで、興奮毒性に起因する酸化ストレスが神経細胞死に果たす役割を解明することを目的として、その原因となる分子メカニズムの探索を続けてきた。興奮毒性による海馬神経細胞死モデルラット (カイン酸の単回腹腔内投与) では、組織学的な神経細胞死の兆候が認められるより早期に、酸化損傷タンパク質の指標のひとつであるカルボニル化タンパク質の増加と、小胞体の膨化が認められることを明らかにした。さらに、神経細胞死に先立って酸化損傷されるタンパク質のひとつとして、小胞体ストレスに関連するシャペロンタンパク質である valosin containing protein (VCP) を同定した。これらの結果から、興奮毒性による酸化ストレスによって VCP が酸化されてシャペロン機能を失い、小胞体ストレスを介して細胞死が生じるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、興奮毒性による神経細胞死において、シャペロンタンパク質である VCP の役割を明らかにすることである。VCP が興奮毒性による細胞死に影響を与えるのか、またその機能の代償が細胞死抑制に有効であるか否かを検討し、VCP が興奮毒性による細胞死の治療標的分子となり得るかを明らかにしたい。

3. 研究の方法

3週齢の雄性ラットに、10mg/kg のカイン酸を腹腔内投与し、興奮毒性による神経細胞死のモデルを作成した。投与後 3、24、72 時間と 7 日後に脳をカルノア液で浸漬固定し、パラフィン包埋した。6 μ m の薄切標本作製し、HE 染色や免疫組織化学による検討を行った。また、活性酸素を除去するエダラボンを前投与し、カイン酸による細胞死が抑制できるか検討した。ラット胎児の大脳皮質から調整した mixed glial culture を用いて、興奮毒性による細胞死と VCP の発現変化および小胞体ストレスマーカーの発現を解析した。また、VCP の阻害剤と興奮毒性を共存させて、VCP の細胞死への関与を検討した。

4. 研究成果

これまでの研究から、10mg/kg のカイン酸を腹腔内投与したラットにおいて、タンパク質の酸化損傷の指標であるカルボニル化が、投与 3 時間後に増加することを報告している。カイン酸投与 3 時間後にカルボニル化が増加するタンパク質の一つとして、VCP を同定している。本研究では、はじめにカイン酸を腹腔内投与したラットを用いて VCP の発現を免疫組織化学により検討した。生理食塩水を投与したラットでは、VCP の発現は海馬の錐体細胞層や周囲のグリア細胞の細胞質に染色性が認められた。カイン酸投与 3 時間後の海馬では、生理食塩水と同様に錐体細胞層や周囲のグリア細胞の細胞質に染色性が認められた。カイン酸投与 24 時間後では、CA1 の錐体細胞層を中心に神経細胞死の特徴である空胞変性や濃縮した核が認められたが、VCP の染色性はカイン酸投与 3 時間とほぼ同じであった。カイン酸投与 72 時間および 7 日では、VCP の染色性は放線層や上昇層の突起を持った細胞に強く認められた (図 1 上段)。GFAP の染色を行い、VCP を発現する細胞が活性化アストロサイトであることを確認した (図 1 下段)。興奮毒性による神経細胞死には活性酸素の関与が考えられるため、次に、活性酸素を除去するエダラボンを前投与した後にカイン酸を投与したラットを作成し、細胞死の抑制効果と VCP の発現を検討した。10mg/kg のエダラボンを腹腔内投与あるいは尾静脈投与し、1 時間後に 10mg/kg のカイン酸を腹腔内投与した。カイン酸投与 72 時間後に脳を取り出し、パラフィン切片を作製した。エダラボンの尾静脈投与では、カイン酸による細胞死が抑制された。この時の VCP の発現パターンは、生理食塩水投与ラットと同様に錐体細胞層や周囲のグリア細胞の細胞質に染色性が認められた。エダラボンの腹腔内投与では、神経細胞

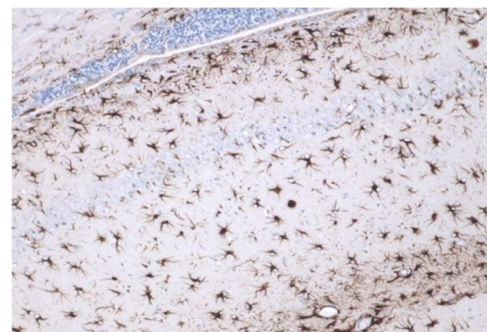
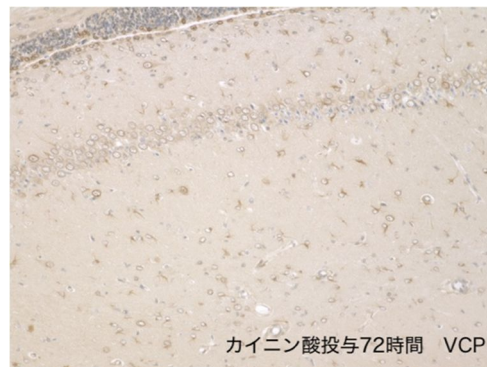


図 1 カイン酸投与 72 時間後の海馬錐体細胞層。上：VCP、下：GFAP

死は抑制されなかった。グリア細胞は脳内で神経細胞が生存できる環境を維持するために重要な細胞であり、グリア細胞の活性化とともに VCP の発現が増加することは興味深い結果である。これらの結果から、グリア細胞における VCP の働きに注目した。

次に、培養細胞を用いて、グリア細胞での VCP の役割を検討した。ラット胎仔の大脳皮質を取り出し、10%血清存在下で培養した mixed glial culture に、興奮毒性試薬としてグルタミン酸を、酸化ストレスとして過酸化水素を添加して細胞生存率を検討した。グルタミン酸は 20mM から生存率の低下が認められ、200mM では 10%以下の生存であった。過酸化水素は 0.3mM から生存率の低下が認められ、0.7mM での生存率は 10%以下であった。VCP は、生存率に関わらずほぼ一定の発現量を示した。そこで次に、VCP の阻害剤である Eeyarestatin I を用いてグルタミン酸や過酸化水素と組み合わせることで VCP の役割を検討した。Eeyarestatin I のみでは細胞死が起きない濃度でグルタミン酸と組み合わせると、グルタミン酸単独と比較して細胞生存率の顕著な低下が認められた(図2)。

一方、過酸化水素と Eeyarestatin I を組み合わせても細胞生存率の顕著な低下は認められなかった。このことから、VCP は興奮毒性からグリア細胞を保護していると考えられる。VCP の阻害により小胞体ストレスが増加すると考えられることから、小胞体ストレスによって誘導される CHOP の発現を検討した。Eeyarestatin I のみで CHOP の誘導が認められたが、Eeyarestatin I とグルタミン酸を組み合わせた条件では、細胞死が認められるにも関わらず CHOP の誘導は認められなかった。小胞体ストレスに関連して発現が増加する GRP78 についても、Eeyarestatin I のみで発現増加が認められたが、グルタミン酸と Eeyarestatin I の組み合わせでは発現増加がほとんど認められなかった。これらのことから、Eeyarestatin I によって促進されたグルタミン酸による細胞死は、小胞体ストレスが原因ではないと考えられた。

以上の結果から、カイン酸投与後のラット海馬で活性化アストロサイトに VCP が強く発現しており、興奮毒性時に VCP が何らかの役割を果たすと考えられた。VCP を阻害するとグルタミン酸による細胞死が促進されており、少なくともグリア細胞においては、VCP は細胞保護的であると考えられた。また、興奮毒性により引き起こされるグリア細胞死は、小胞体ストレスを介した経路ではない可能性が示唆された。VCP の阻害が興奮毒性による細胞死を促進するメカニズムの詳細を解析する事は、HIE などの興奮毒性による傷害の治療標的となる分子メカニズムの解明に繋がると考える。

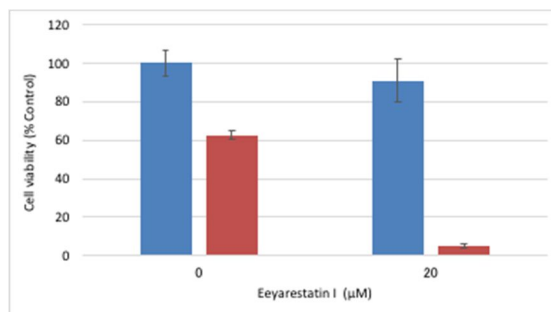


図2 VCP 阻害剤による細胞死増強効果。

青；対照、赤；150mM グルタミン酸

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

1. Protein Carbonylation-Dependent Photoreceptor Cell Death Induced by N-Methyl-N-nitrosourea in Mice. Furukawa A, Sugitani K, Koriyama Y. Advances in Experimental Medicine and Biology. 1074, pp. 297-302.2018.

2. A role of heat shock protein 70 in photoreceptor cell death: potential as a novel therapeutic target in retinal degeneration. Furukawa A, Koriyama Y. CNS Neuroscience & Therapeutics. 22, pp. 7-14. 2016.

[学会発表](計 5件)

1. Comprehensive analysis of protein expression profiles in sclerotic hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. Furukawa A, Kakita A, Chiba Y, Kameyama S, Shimada A. 19th International Congress of Neuropathology (ICN), 2018 Tokyo.

2. グルタミン酸によるグリア細胞死誘導におけるグルタチオン減少と GRP78 発現増加の役割 古川絢子、松野夏紀、樋口善博 ConBio2017 (2017 神戸)

3. 内側側頭葉てんかん患者の海馬硬化組織におけるタンパク質発現変動解析 古川絢子、柿田明美、千葉陽一、樋口善博、亀山茂樹、島田厚良 第 58 回日本神経病理学会 (2017 東京)

4. グルタミン酸興奮毒性における酸化ストレスの役割解明 古川絢子、細井礼子、樋口善博 日本薬学会第 137 年会 (2017 仙台)

5. グルタミン酸によるグリア障害に関わる酸化損傷タンパク質の同定 古川絢子、細井礼子、樋口善博 第 89 回日本生化学会大会 (2016 仙台)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：郡山 恵樹

ローマ字氏名：KORIYAMA, yoshiki

所属研究機関名：鈴鹿医療科学大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70397199

(2)研究協力者

研究協力者氏名：千葉 陽一

ローマ字氏名：CHIBA, yoichi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。