

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08827

研究課題名（和文）脳虚血耐性阻害に関する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of inhibition of ischemic tolerance

研究代表者

福永 優子（Fukunaga, Yuko）

千葉科学大学・危機管理学部・教授

研究者番号：80254522

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞は、脳への血流が途絶え（虚血）、脳の細胞が壊死してしまう病気です。一過性の脳虚血発作を起こすと、その後脳梗塞による侵襲に対し抵抗性を示すことが報告されており、この現象は「虚血耐性」と呼ばれています。一方、私達のこれまでの研究により、脳神経系には、虚血耐性を抑制するように働く経路が存在することが示唆されています。しかし、その特性や分子メカニズムは明らかになっていませんでした。今回、虚血耐性獲得を阻害する分子メカニズムの一端を解明しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳虚血耐性のメカニズムを解明することは、脳梗塞治療の開発に役立つと考えられ、これまでに国内外で多くの研究がなされています。虚血耐性に対する内在性の阻害経路の存在は、脳梗塞における障害の程度が、虚血耐性に関わる神経保護活性と、その阻害活性の両方の制御によって決まることを示唆しています。従って、虚血耐性阻害の分子機構を解明することは重要な課題です。本研究によって脳虚血耐性阻害の分子メカニズムの一端が解明されました。今後これを足掛かりとして、詳細な分子メカニズムの全容が解明できれば、より効果的な虚血耐性の獲得につながり、臨床面への応用が期待されます。

研究成果の概要（英文）：Cerebral infarction is a disease in which blood flow to the brain is disrupted (ischemia), in consequence, necrotic death is induced in brain cells. It has been reported that after a transient ischemic attack, the brain becomes resistant to the subsequent invasion by cerebral infarction (ischemia tolerance). On the other hand, our previous studies have suggested that there are pathways in the central nervous system that suppress ischemic tolerance. However, its molecular mechanisms have not been clarified. In this study, we have elucidated one part of the molecular mechanism that inhibits the ischemic tolerance.

研究分野：神経生物学

キーワード：虚血耐性 海馬 神経保護

1. 研究開始当初の背景

脳虚血耐性とは、あらかじめ傷害を与えない程度に短時間だけ脳虚血状態にしておくこと(プレコンディショニング)で、その後の致死的な虚血負荷に対して抵抗性を獲得する現象であり、現在では、生体だけでなく、培養細胞においても同様の効果が得られることや、プレコンディショニングとして短時間の **NMDA** 型グルタミン受容体 (**NMDA** 受容体) 刺激によっても虚血耐性が獲得できることが報告されている。プレコンディショニングによる強い神経保護作用から、虚血耐性の機序の解明は、脳梗塞治療の開発に役立つと考えられている。さらに、このような神経保護作用は、致死的な虚血負荷の後に与えても(ポストコンディショニング)同様の効果が得られることが見出されたことで臨床応用の可能性が生まれ、虚血耐性の解明はますます重要性を増している。

申請者らはこれまでに、海馬神経細胞において、主に **NR2A** サブユニットを含む **NMDA** 受容体 (**NR2A-NMDA** 受容体) で構成されるシナプス局在性 **NMDA** 受容体 (**synNMDA** 受容体) の活性化は、転写調節因子 **CREB** のリン酸化を介した神経保護作用を示すに対し、主に **NR2B** サブユニットを含む **NMDA** 受容体 (**NR2B-NMDA** 受容体) が存在しているシナプス外領域に存在する **NMDA** 受容体 (**extNMDA** 受容体) の活性化は、細胞死を誘発することを見出した。その後、この **NR2A-NMDA** 受容体を介する **CREB** リン酸化が、脳虚血耐性の獲得に関与していることが報告され、多くの研究によって詳細な検討が進められている。一方、**NR2B-NMDA** 受容体は、虚血耐性を抑制するように働く可能性が示唆されているが、その詳細や分子メカニズムは明らかになっていない。申請者はこれまでに、海馬培養神経細胞を用いて、虚血耐性を誘導することが知られている短時間の **NMDA** 処置によって上昇した **CREB** のリン酸化が基底レベルに戻った後は、**synNMDA** 受容体を刺激しても **CREB** のリン酸化が起こらなくなっていることを明らかにした。この結果は、プレコンディショニングにより細胞間で増加したグルタミン酸が **NR2A-NMDA** 受容体と **NR2B-NMDA** 受容体の両方を活性化することで、神経保護機構が促進されると同時に、これを阻害する細胞内経路も活性化されることを示している。

2. 研究の目的

虚血耐性の獲得は、神経保護の促進と抑制の両経路の総和として表れている現象であると言える。従って、虚血耐性を脳梗塞治療戦略に結び付けるためには、虚血耐性の獲得だけでなく、それを阻害する分子メカニズムの解明が重要な課題となる。これが本研究課題の学術的「問い」である。

本研究では、**NR2B-NMDA** 受容体を介する脳虚血耐性阻害の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 海馬スライス培養

出生 7 日目の **SD** ラットをペントバルビタール深麻酔下で安楽死させた。摘出した脳から、ティッシュチョッパーを用いて厚さ **250 μm** の海馬スライスを作製した。組織培養用の **Millicell** 上に 7 匹分の海馬スライスをマウントし、**CO2** インキュベーター内で成長培地にて **14** 日間気液界面培養した。

(2) 海馬初代分散培養

妊娠 **19** 日目 **SD** ラットをペントバルビタール深麻酔下で安楽死させた。胎児から海馬を摘出し、**0.25%** トリプシン溶液で処理後、海馬細胞を分散させ、**14** 日間の初代培養をおこなった。

(3) リン酸化 **CREB** 量の定量化

海馬スライス培養細胞にプレコンディショニング処置を施し、その 1 時間後に **synNMDA** 受容体を刺激するために、**50 μM** の **bicuculline** (**GABA_A** 受容体アンタゴニスト) を **10** 分間処置した。細胞を固定し、リン酸化 **CREB** に対する抗体で免疫蛍光染色した。蛍光顕微鏡で撮影し、**CA1** 領域の蛍光強度を定量化した。

海馬初代培養細胞にプレコンディショニング処置を施し、その1時間後に **50 μM** の **bicuculline** を **10** 分間処置し、サンプルバッファーで細胞を回収した。ウエスタンブロッティング法によって、リン酸化 **CREB** 量を定量化した。

(4) 死細胞レベルの定量化

海馬スライス培養細胞にプレコンディショニング処置を施し、その **24** または **48** 時間後に、細胞死を誘導する刺激として、**NMDA** またはグルタミン酸を処置した。その **24** 時間後に、死細胞染色色素であるヨウ化プロピジウムで細胞を染色した。蛍光顕微鏡で撮影し、海馬 **CA1** 領域の蛍光強度を定量化した。

4. 研究成果

(1) 神経保護作用に関わる経路の抑制作用を示すプレコンディショニング条件

プレコンディショニング条件として、**NMDA** の処置濃度と処置時間の最適化を行うために、培養 **13-15** 日目の海馬スライス培養細胞に **NMDA** 処置 **1** 時間後、**10** 分間の **bicuculline** 処置によるリン酸化 **CREB** 量の変化を定量化した。その結果、プレコンディショニングとして、**2** 分間の **50 μM NMDA** 処置 (**pcNMDA**) が、**1** 時間後の **bicuculline** 処置によるリン酸化 **CREB** 量の増加を再現性よく阻害した (図1)。一方、**1 μM NMDA** の **30** 分または **1** 時間処置、**10 μM NMDA** の **15** 分、**30** 分または **1** 時間処置、**50 μM NMDA** の **10** 分処置では、安定した結果が得られなかった。また、培養 **13-17** 日目の海馬初代培養細胞を用いて同様の検討を行い、ウエスタンブロッティングによってリン酸化 **CREB** 量を定量化した実験では、培養細胞が安定せず、再現性あるデータを得られなかったため断念した。

(2) プレコンディショニングによる神経保護作用の阻害に関わる分子メカニズム

Bicuculline 処置によるリン酸化 **CREB** 量増加に対するプレコンディショニングによる阻害効果に関与する **NMDA** 受容体のサブタイプを調べるために、**NR2B-NMDA** 受容体アンタゴニストである **Ro 25-6981** (**1 μM**)、または **NR2A-NMDA** 受容体アンタゴニストである **NVP-AAM077** (**50 nM**) の影響について検討を行った。これらアンタゴニストを培養 **13-15** 日目の海馬スライス培養細胞に **30** 分間の前処置後、プレコンディショニングと同時に処置をした。その **1** 時間後に **bicuculline** 処置によるリン酸化 **CREB** 量の変化を測定したところ、プレコンディショニングによる阻害効果は **Ro 25-6981** では影響が認められず、**NVP-AAM077** によって阻害された (図1)。本結果は **synNMDA** 受容体の主な構成要素である **NR2A-NMDA** 受容体の興奮は神経細胞保護に関わるという従前の知見とは矛盾していた。

(3) NMDA 受容体を介する細胞死を抑制するプレコンディショニング条件の検討

(1) で得られたプレコンディショニング条件によって、虚血耐性を獲得できているか確認した。培養 **13-15** 日目の海馬スライス培養細胞に対し、**pcNMDA** の **24** または **48** 時間後に致死的処置として酸素グルコース欠乏負荷 (**oxygen-glucose deprivation : OGD**) 実験を行ったが、ポジティブコントロールにおいて十分

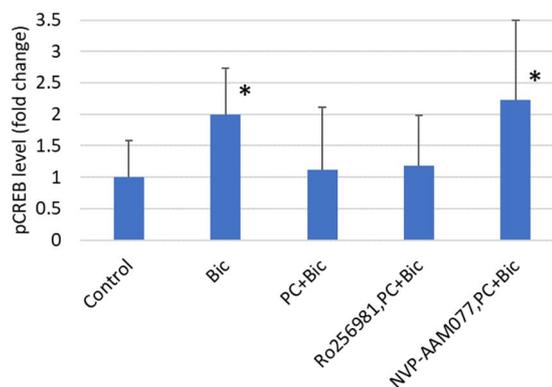


図1 海馬スライス培養細胞の pCREB レベル

Ro256981 または **NVP-AAM077** は **30** 分の前処置の後、プレコンディショニングと同時に処置した。**Bic**: **Bicuculline**, **PC**: プレコンディショニング

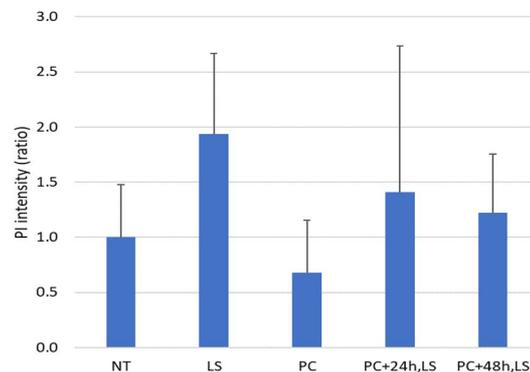


図2 海馬スライス培養細胞の死細胞レベル

Ro256981 または **NVP-AAM077** は **30** 分の前処置の後、プレコンディショニングと同時に処置する。**LS**: 致死的刺激, **PC**: プレコンディショニング

な細胞死を確認できなかった。そこで致命的処置として、**50 μ M NMDA**10 分間の処置を行い、その **24** 時間後に死細胞レベルを定量化した。その結果、致命的処置による死細胞レベルの上昇は、プレコンディショニングにより阻害される傾向にあった。また、培養 **13-17** 日目の海馬初代培養細胞を用いて同様の検討を行ったが、培養細胞が安定せず、再現性あるデータを得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------