

機関番号：22701

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2007～2009

課題番号：19591813

研究課題名（和文） 神経保護因子としてのエリスロポイエチンの新しい作用メカニズムの解明

研究課題名（英文） Novel mechanisms for neuroprotective actions of erythropoietin

研究代表者

安藤 富男 (ANDOH TOMIO)

横浜市立大学・大学院医学研究科・客員教授

研究者番号：00193110

研究成果の概要（和文）：ラット大脳皮質一次培養ニューロンにおいて、エリスロポイエチン（Epo）は正常状態では細胞内カルシウム濃度を増加させ、グルタミン酸受容体刺激状態では低下させた。Epoによるカルシウム濃度上昇は電位依存性Caチャネルを介するCa流入に依存しており、カルシウム濃度の低下はCa依存性Kチャネルの活性化に由来すると考えられる。細胞内カルシウム濃度の中等度の増加はsurvival signal活性化に、その低下はグルタミン酸の神経細胞毒性の軽減に寄与することが考えられるが、これらの意義はさらに検討を要する。

研究成果の概要（英文）：We found that Epo increased the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in primary cortical cultures in the normal condition but decreased the elevated  $[Ca^{2+}]_i$  in the excitotoxic condition. The Epo-induced increase involved  $Ca^{2+}$  influx through voltage-dependent Ca channels, whereas the Epo-induced decrease involved PI3 kinase-dependent activation of BK type Ca-activated K channels, at least in part. The pathophysiological significance of our findings needs to be investigated in further studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経保護

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：神経保護、エリスロポエチン、イオンチャネル、細胞内カルシウム濃度

## 1. 研究開始当初の背景

エリスロポイエチン(Erythropoietin: 以下Epoと略す)は、赤血球造血に必須の糖蛋白であり、赤芽球に作用してその生存を維持し、分化、増殖を促進する。この作用は、赤血芽球系細胞のアポトーシスをEpoが抑制することによって発現する。慢性腎不全では、腎によるEpo産生が低下するために腎性貧血

となり、その治療にヒト組み換え型Epoが広く使用されている。Epoはtype 1 cytokine superfamilyに属する30kDaのサイトカインであり、その特異的受容体であるEpo受容体(以下EpoRと略す)は、type 1 cytokine receptor familyに分類される。Epoの産生は低酸素によって強く刺激され、転写因子であるhypoxia inducible factor-1(以下

HIF-1・と略す)によって制御される。したがって、Epo の機能は組織酸素レベルの低下に応じて赤血球数を増加させるように腎一骨髄間で働くことであると考えられてきた。しかし、Epo および EpoR は脳神経系、心血管系、骨格筋などにも広く発現、分布し、脳、心臓、腎臓などの臓器や血管の障害に対して保護作用をもつことが最近の研究から明らかになってきた。神経系については、脳梗塞や脳脊髄外傷、てんかん重積状態などの種々の病態モデルにおいて、外因性 Epo の末梢投与が神経障害軽減に有効であることが多数報告されている。

## 2. 研究の目的

Epo の神経保護作用のメカニズムとしては phosphoinositide 3 kinase (PI3 kinase), protein kinase B (Akt), RAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK), signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) などの生存を促進する種々の細胞内情報伝達因子の活性化が関与することが報告されている。細胞内カルシウム濃度は細胞の生死を規定する重要因子であり、Epo は神経細胞内のカルシウム濃度を増加させることが報告されているが、病態時の効果は検討されていない。この研究では正常時およびグルタミン酸受容体刺激時におけるニューロンの細胞内カルシウム濃度に対する Epo の効果を検討した。

## 3. 研究の方法

ラット大脳皮質一次培養ニューロンを用い、Fura2 を指示薬として、励起蛍光比 (340 nm と 380nm の励起光で励起される蛍光の比) により細胞内カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の変化を測定した。

### (1) 培養

胎生 18 日の胎児ラットをエーテル麻酔下に帝王切開により取り出し、脳を摘出した。大脳皮質を切り出し、トリプシン処理し、遊離細胞を得た。Neurobasal 培地に、メルカプトエタノール、B-27、牛胎児血清 10% を添加した培地に細胞浮遊液を作成し、ポリオルニチンで前処置したガラス底の培養チャンバーに移し、37°C 5%CO<sub>2</sub> の環境で培養した。4 時間後に培地を B-27 添加の Neurobasal 無血清培地に交換し、7 日間培養を行った。

### (2) 細胞内カルシウム濃度測定

培養 7 日後のラット大脳皮質一次培養ニュー

ロンを用いた。培地を吸引除去した後、Fura-2 6  $\mu$ M を添加した HEPES buffered saline (HBS) を培養チャンバーに加え、37°C 30 分間遮光して待機した。その後、HBS で 2 回洗浄し、倒立型蛍光顕微鏡のステージに移し、加温プレートにて液温が約 34°C に安定する 15 分間を待機した。340nm と 380nm の励起光で励起された 510nm の蛍光を 20 倍の対物レンズを用いて 5 秒毎に測定した。記録と 340nm/380nm の蛍光強度の比の測定には CCD カメラ () と C-imaging software を用い、視野内の少なくとも 10 個以上の細胞体の蛍光比の経時的変化を解析した。正常な状態として Mg 2 mM を含む HBS を用い、最終濃度が 0.4 または 4.0 u/ml になるように human recombinant Epo の生理食塩溶解液 20  $\mu$ l をチャンバー内に加え、蛍光比の変化を測定した。グルタミン酸受容体刺激状態として Mg を除きグリシン 100  $\mu$ M を添加した HBS を用い、同様に Epo を加えたときの蛍光比の変化を測定した。

### (3) 免疫染色

大脳皮質一次培養ニューロンの割合を調べるため、ニューロン特異的蛋白である microtubule-associated protein 2 (MAP2) の発現を免疫染色を用いて解析した。パラホルムアルデヒドで固定、Triton X で処理した後、培養細胞に抗 MAP2 ウサギ polyclonal 抗体を作用させ、洗浄後 2 次抗体として Alexa Fluor 546 でラベルしたヤギ抗ウサギ IgG 抗体を加えた。Hoechst 33342 にて核染色を行い、200 個の細胞のうち 2 次抗体で染色された細胞の割合を計算した。

## 4. 研究成果

### (1) 免疫染色

MAP2 発現細胞の割合は、3 回の培養についてそれぞれ、92, 96, 98% であり、平均は 96% であった。したがって、ほぼ純粋なニューロンの培養であった。

### (2) 正常状態での細胞内 Ca 濃度の変化

正常状態において、Epo 0.4 u/ml の添加では一過性の軽度の蛍光比の増加が見られた。Epo 4 u/ml 添加では少なくとも 12 分以上持続する蛍光比の増加を示した。Epo 添加の 2 分後ではどちらの濃度でも蛍光比は有意に増加したが、12 分後では 4 u/ml でのみ有意な増加がみとめられた。Epo 4 u/ml による蛍光比の増加は、可溶性 Epo 受容体

で前処置した後では、完全に消失したので、Epo に特異的な変化であると考えられた。HBS 内のカルシウムを除去し、カルシウム キレート剤である EDTA を添加した条件では、Epo による蛍光比増加作用は見られなかった。

次に電位依存性カルシウムチャネルの非選択的阻害薬であるカドミウムの効果を調べた。カドミウム 200 microM の前処置をすると Epo 添加後の蛍光比増加が見られなかった。L-type Ca channel blocker であるニカルジピンで前処置すると、Epo 投与 2 分後の上昇は抑制されたが、12 分後にはカルシウム濃度の増加がみられ、部分的に阻害された。P/Q type Ca channel blocker である  $\omega$ -agatoxin の存在下では、2 および 12 分後の蛍光比増加はともに抑制されたが、消失しなかった。

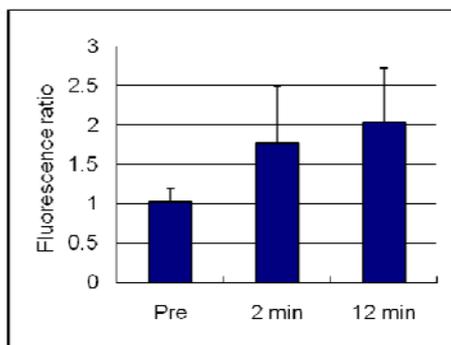
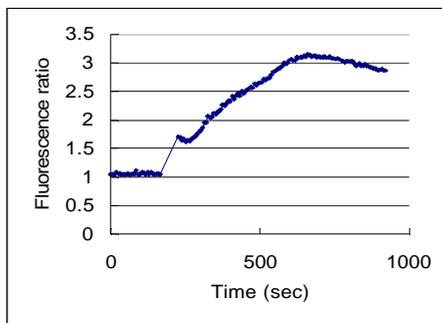


図 1 A, B: 正常状態における Epo 4 u/ml 添加による蛍光比の変化

(3) グルタミン酸受容体刺激状態での細胞内 Ca 濃度の変化

Mg 除去、グリシン添加した条件では、Epo 添加前に蛍光比が周期的に増加し、添加前の平均の蛍光比は正常状態に比べて有意に増加した。この周期的増加は、NMDA 型グルタミン酸受容体の選択的拮抗薬である D-AP5 を投与すると消失した。また、電位依存性ナトリウムチャネルの阻害薬である tetrodotoxin 投与でも同様にスパイク様の蛍光比上昇は

消失した。グルタミン酸受容体刺激状態では Epo 0.4 または 4 u / ml を投与すると蛍光比の周期的増加は抑制された。

Epo 受容体の情報伝達系を占める Janus kinase 2 (JAK2) の阻害薬である AG490 の前処置によって、Epo の蛍光比低下作用は完全に消失した。さらに下流の情報伝達物質である phosphoinositide 3 kinase (PI3 kinase) の阻害薬である LY294002 および wortmannin の前処置では Epo による蛍光比低下作用は消失し、むしろ蛍光比の上昇が見られた。カルシウム依存性 K チャネルブロッカーである iberiotoxin 1 nM の前処置でも Epo 添加後の蛍光比増加の消失と蛍光比の増加が見られた。

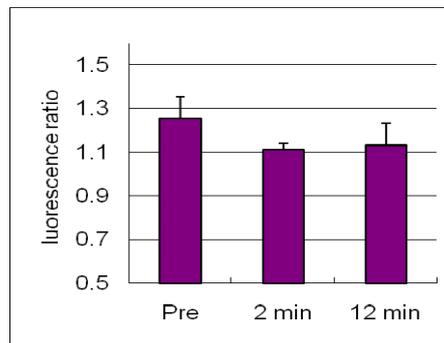
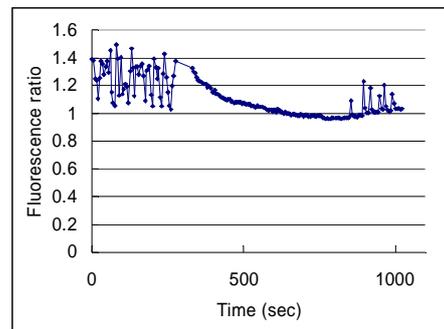


図 2 A, B: グルタミン酸受容体刺激状態における Epo 4 u/ml による蛍光比の変化

(4) 考察

正常状態では、Epo は大脳皮質一次培養ニューロンにおいて細胞質カルシウム濃度を濃度依存性に有意に増加させた。この増加は可溶性 Epo 受容体で阻害されたので、(きょうぞつ物などではなく) Epo 自体による作用と思われる。Epo の効果は、溶液からのカルシウムの除去および、カドミウム添加によって阻害されたので、電位依存性カルシウムチャネルを介する細胞外からのカルシウム流入によって生じると考えられる。これまで海馬ニューロンでは Epo が L type channel を介する Ca 流入をもたらす可能性が報告さ

れている。本研究では L type および P/Q type channel がそれぞれ部分的に仲介している可能性が示された。

Mg 除去、グリシン添加の条件では、正常状態に比べてカルシウム濃度が周期的に増加し、この変化は NMDA 型グルタミン酸受容体阻害薬、tetrodotoxin によって消失した。したがって、この条件では従来の報告どおり、活動電位と NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化によって細胞質カルシウム濃度が周期的に増加したと考えられる。本条件では Epo は増加したカルシウム濃度を有意に低下させ、この効果は JAK2 および PI3 kinase 阻害薬およびカルシウム依存性 K チャネル阻害薬で消失した。したがって、Epo の細胞質 Ca 濃度低下作用には、PI3 kinase による Ca 依存性 K チャネルの活性化が関与していることが考えられる。同様のメカニズムによる細胞質 Ca 濃度の低下作用は、leptin でも報告されている。Leptin は leptin 受容体に結合し、JAK2, PI3K を活性化することが知られている。さらに興味深いことに leptin は種々の実験モデルにおいて、神経保護効果、神経細胞死の抑制作用を示すことが報告されている。したがって、Epo と leptin は類似のメカニズムを介した神経保護効果を示す可能性が考えられる。

Epo が添加前のグルタミン酸受容体刺激の有無により、細胞質カルシウム濃度に対して増加と低下という反対の作用をもつことが示された。相反する作用が生じるメカニズムなどは本研究からは明らかではない。しかし、仮説としては次のようなものが考えられる。例えば、Epo は電位依存性カルシウムチャネルの活性化作用と、Ca 依存性 K チャネルの PI3 kinase 依存性の活性化作用という反対方向の効果を持つ作用をもっているが、細胞内カルシウム濃度や NMDA 型グルタミン酸受容体の刺激状態などによって、一方の作用が減弱したり、他方の作用が優位となる可能性が考えられる。PI3 kinase 阻害薬や Ca 依存性 K チャネル阻害薬の存在下では、Epo の細胞内カルシウム濃度の低下作用が消失するばかりでなく、カルシウム濃度の増加作用が発現した。この現象も反対方向の作用のうち一方が抑制されたことによって生じていると考えられる。さらに検討すべき点と思われる。

#### (5) 結論

結論として、大脳皮質ニューロンにおいて、

Epo は正常状態では細胞内カルシウム濃度を増加させ、グルタミン酸受容体刺激状態では低下させた。細胞内カルシウム濃度の中程度の増加は survival signal 活性化に、その低下はグルタミン酸の神経細胞毒性の軽減に寄与することが考えられる。これらの Epo の神経細胞内カルシウム濃度に対する効果の意義については、さらに検討が必要である。

#### 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)

- ① 安藤富男、エリスロポエチンの神経保護作用とその臨床効果、帝京医学雑誌、査読有、32 巻、2009、319-328

[学会発表] (計 3 件)

- ① 越後憲之、紙谷義孝、後藤隆久、安藤富男、ラット大脳皮質一次培養ニューロンの細胞内カルシウム濃度に対する erythropoietin の効果、日本麻酔科学会第 56 回学術集会、2009 年 8 月、神戸越後憲之、紙谷義孝、後藤隆久、工藤一大、安藤富男、病態時の神経細胞内カルシウム濃度に対する Erythropoietin の効果、日本麻酔科学会第 57 回学術集会、2010 年 6 月、福岡 Echigo N、Kamiya Y、Goto T、Andoh T、Effects of erythropoietin on intracellular calcium concentration of rat primary cortical neurons, Euroanesthesia 2009, June 2009, Milano Italy.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 富男 (ANDOH TOMIO)

横浜市立大学・大学院医学研究科・客員教授  
研究者番号：00193110

(2) 研究分担者

水野 祐介 (MIZUNO YUSUKE)

横浜市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：80433192

越後 憲之 (ECHIGO NORIYUKI)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：00363797

紙谷 義孝 (KAMIYA YOSHITAKA)

横浜市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 90381491