

機関番号：32645

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591819

研究課題名 (和文) アストロサイト由来 Int6・HIF2 α を標的とした新規脳蘇生法確立の試み研究課題名 (英文) New approach to establish brain resuscitation targeting for Int6-HIF2 α originated from astrocyte.

研究代表者

内野 博之 (UCHINO HIROYUKI)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：60266476

研究成果の概要 (和文)：アストロサイト由来 Int6・HIF2 α を標的とした新規脳蘇生法確立の試み研究成果の概要 (英文)：New approach to establish brain resuscitation targeting for Int6-HIF2 α originated from astrocyte.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：アストロサイト、Int6-HIF2 α 、脳蘇生、脳虚血、神経栄養因子、ミトコンドリア、

1. 研究開始当初の背景

虚血性神経細胞死と Int6-HIF2 α 情報伝達系の連関解析は全くなされておらず、脳虚血後の脳内での分布、血管新生との連関、脳保護作用を発現する因子についての解析や虚血性神経細胞死に重要な役割を担うカルシニューリン/イムノフィリン情報伝達系と脳ミトコンドリア機能不全との関係解析は手付かずの状態である。Int6-HIF2 α 情報伝達系の変動は、脳虚血後の神経細胞死誘発あるいは神経保護の両面に関与する可能性が高いと考えている。そこで、我々は本研究で、Int6-siRNA 発現ベクターの実

験から preliminary に得られた血管新生と脳保護作用の成果を新規脳保護法確立のためのメカニズム解析に展開し、ニューロンの周辺に高度なバックアップシステムを形成するグリア細胞の機能を踏まえた脳虚血性神経細胞死の実態を明確にし、新規の防御法を開発し、麻酔科領域での安全性と信頼性を高めることを目的とするという研究着想に至った。

2. 研究の目的

今回の研究期間では、虚血性神経細胞死誘発に関与すると思われる細胞内低酸素によって誘発される因子でアストロサイトに発現する HIF2 α

とその制御因子である **Int6** に着目して、虚血性神経細胞死においてはこれまで未知であった **Int6・HIF2 α 情報伝達系**の役割を明確することを目指した。そのために以下の4点を中心に解析を行うことを本研究課題の具体的な**研究目的**とした。①前脳虚血時の脳内での経時的な HIF2 α および Int6 の発現の分布、局在を前脳虚血モデルを用いて免疫組織化学的に解析した。②凍結損傷モデルに対して Int6-siRNA 発現ベクターを投与し、脳梗塞巣に対する保護作用について病理学的な解析を行った。③Int6-siRNA 投与による脳保護効果に対する海馬での各種神経栄養因子との連関解析を行った④前脳虚血モデルに対する Int6-siRNA の脳保護作用を病理学的解析と脳内ミトコンドリアの酸素代謝の観点から比較検討した。

【研究代表者と連携研究者、研究協力者の相互関係】

本研究遂行に当たり、内野博之は研究の総括、ラットの前脳虚血モデルの作製と **Int6-siRNA** 発現ベクターの投与による**組織学的解析(病理組織学的解析と免疫組織化学的解析)**、ミトコンドリア機能解析を担当する。**連携研究者**の芝崎は **Int6-siRNA** 発現ベクターの脳内への導入の指導と研究への助言、組織学的解析を担当した。他の**連携研究者**の陳は、研究分担者の福井秀公を指導し **Int6-siRNA** 発現ベクターの作製と提供、免疫染色の補助を担当した。さらに、培養神経細胞とラットおよびマウス脳内への **Int6-siRNA** 導入実験とミトコンドリア機能解析は、研究代表者が、2009年からは、八王子から新宿へ移動となったことからいくつかの実験に必要な装置や解析システムを有する東京都臨床医学総合研究所内において継続して実験を行う形をとった。そこで、東京都臨床医学総合研究所からは、培養神経細胞とラットおよびマウスの供与を受け、ラットやマウスの飼育に

必要な餌は我々が負担をする形をとった。また、ミトコンドリア機能解析は**研究協力者**であるスウェーデンルンド大学 **Esil Elmer** と連携を取って進めた。さらに、ミトコンドリア機能解析技術の供与のためにスウェーデン・ルンド大学より諸田沙織、Eleonor Asander を招聘し研究分担者の奈倉武郎が指導を受け、ミトコンドリア機能解析を行った。免疫染色は、**研究協力者**の横山智仁、宮下亮一が担当、補佐した。

3. 研究の方法

【Int6-siRNA 発現ベクターについて】

陳リー等によって酵母 Two Hybrid 法を用いて、ヒトの心筋ライブラリーから、HIF2 α と相互作用を示す因子として新たに Int6 因子が同定された (Liet.al 2007)。本研究で用いる予定の siRNA は、人由来の Int6-siRNA で、19 個の塩基からなる 2つのプライマー (5'-AAgAACCCACAgTggTTgCA-3 と 5'-AAgCATggTTTTAggCAgg-3') を用いて cDNA を作成し、発現ベクター (pSilencer:Ambion) に組み込むことで生成される。実験で用いるベクターには EGFP (蛍光蛋白質) 遺伝子が同時に組み込まれており脳での局在や分布が簡単に判定できる利点がある。また、**Negative control** として **non-codingRNA** を組み込んだベクターを用いる。投与されたベクターから合成される **Int6-siRNA** が機能するのに約 6 - 8 時間を見込んだ。また、ラットやマウス脳凍結損傷モデルによる予備実験では片側の外頸動脈から与されたベクターから合成された **Int6-siRNA** は脳保護効果を発現し、投与側のみに拮がり、半対側には分布しなかったため、前脳虚血モデルでも非投与側との比較により脳保護効果の解析が可能と考えた。また、予備実験での種差を超えた脳保護効果から、siRNA を用いた将来の臨床応用へ繋がる可能

性が示唆された。毎回、実験について使用する Int6-siRNA は、連携研究者である東京都臨床医学総合研究所 芝崎 太、陳リーの研究室で研究分担者の福井秀公が指導を受けて作製し、供与された。

①脳虚血時の脳内での経時的な HIF2 α および Int6 の発現の分布、局在の解析

第8—10週令の雄性 Wister rat (体重250—300g)を用いて両側総頸動脈結紮及び脱血による10分間の前脳虚血モデルを作製する。脳虚血後1、6、12時間後、1、2、7日(各時間とも5匹の動物を使用)に脳の凍結切片(25 μ m)を作製し、HIF2 α および Int6 の抗体を用いた免疫組織化学的解析を施行し、脳における両因子の発現や分布の相違を比較する。さらに、GFAP や Neu にて二重染色を行い、両因子の発現が神経由来かグリア由来かを特徴付け、脳虚血が Int6 \cdot HIF2 α 情報伝達系に及ぼす影響を解析した。

②Int6-siRNA 投与による脳保護効果、海馬での経時的な HIF2 α および Int6 の発現の分布、局在と血管新生の解析

第8—10週令の雄性 Wister rat (体重250—300g)を用いて同様に凍結損傷モデル(以後TBIモデルとする)を作製し、虚血1時間後に外頸動脈から Int6-siRNA 発現ベクター(Int6-siRNA 導入群)とネガティブコントロールベクター(NC 導入群)を 50,100,200 μ g 投与群の3群に分けて(各群どちらも5匹ずつ)注入し、脳梗塞巣に対する保護作用について虚血7日後に病理組織的解析を行った。その後に脳保護作用を発現する至適量の siRNA を用いてTBIモデルで実験を行い、投与された Int6-siRNA による脳内での HIF2 α 発現への影響の解析を、各ベクター投与後6、12時間、虚血後1、2、7日の脳(各時間とも5匹の動物を使用)で免疫組織化学的解析を行った。

③Int6-siRNA 投与による脳保護効果に対する

海馬での脳内神経栄養因子(Brain Derived Neurotrophic Factor:BDNF)との連関解析

10分間のラット needle lesion 前脳虚血モデルを作製し、虚血1時間後に Int6-siRNA 導入群と NC 導入群に対して外頸動脈から至適量のベクターを投与して海馬 CA1 錐体細胞の遅発性神経細胞死に対する保護作用について Int6-siRNA の脳内各栄養因子(BDNF,GDNF, サイトカイン等)やマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPS)への関与をベクター投与後6、12時間、虚血後1、2、7日目に脳を取り出し凍結切片(25 μ m)を作製し免疫染色にて検討を行った。

④Int6-siRNA 投与による培養神経細胞内各栄養因子(VEGF:vascular endothelial growth factor, PDGF:platelet-derived growth factor)の発現解析

脳神経芽細胞腫であるSH-SY5Y細胞を培養し、Int6-siRNA 導入群と NC 導入群に分けて実験を行う。western blot 法で HIF2 α および Int6 と他の各栄養因子(VEGF およびPDGF)の発現を蛋白として証明し、培養上清を用いて超高度生体内情報測定システム(MUSTag:Multiple Simultaneous Tag)法にて分泌蛋白の測定を経時的(12、24、48時間後)に行った。

⑤脳内ミトコンドリアの呼吸能からみた Int6-siRNA 投与による脳保護効果の解析

ラット凍結損傷虚血モデルを作製し、凍結損傷作成1時間後に Int6-siRNA 導入群と NC 導入群に対して外頸動脈から至適量のベクター(50,100,200 μ g)を投与して7日後に凍結損傷作成側の脳内ミトコンドリアの呼吸能を測定し脳機能の観点から検討を行う(各群毎10匹ずつの動物を使用)。Isolation Buffer にて homogenize 後に 40,26,12%の濃度の異なる Percoll を重層した溶液に重層して3回の超遠心後ミトコンドリアを分離する。蛋白定量後、25 μ g/mlのミトコンドリアを KCLbuffer に加えてクラー

ク酸素電極を用いてミトコンドリアの呼吸基質である 5mM マレイン酸とグルタミン酸を加えた後 200 μ MADP 添加して酸素消費量を ADP 添加前 (state3) と添加後 (state4) で計測して両者の比として Respiratory Control Ration(RCR)を計算し、Int6-siRNA 投与が脳内ミトコンドリア呼吸能に与える効果を解析した。ミトコンドリアの Ca 取り込み量 (Calcium Retention Capacity: CRC) の測定は、CaCl₂(0-1000 \cdot mol/mgprotein) で負荷を加えて 520nm で light scattering を行い MPT に伴うミトコンドリアの膨化率を測定することで解析した。

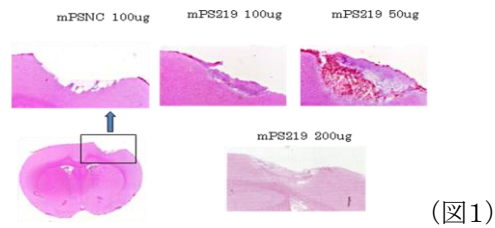
4. 研究成果

①脳虚血時の脳内での経時的な HIF2 α および Int6 の発現の分布、局在の解析

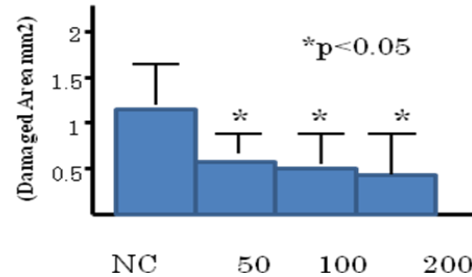
第8—10週令の雄性 Wister rat 両側総頸動脈結紮及び脱血による前脳虚血モデルにて脳虚血後に脳の凍結切片 (25 μ m) を作製し、HIF2 α および Int6 の抗体を用いた免疫組織化学的解析を施行し、脳における両因子の発現や分布の相違を比較したが、作製した抗体のバックグラウンドが強く、GFAP や Neu にて二重染色を行った際にも、HIF2 α および Int6 の局在が明らかとならなかった。

②Int6-siRNA 投与による脳保護効果、海馬での経時的な HIF2 α および Int6 の発現の分布、局在と血管新生の解析

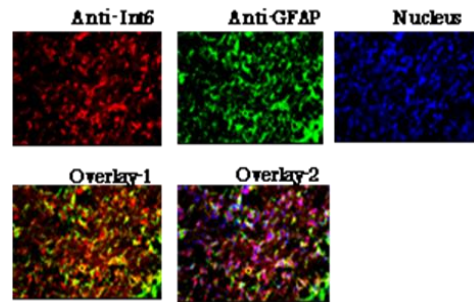
ラット凍結損傷モデルに Int6-siRNA 発現ベクター (Int6-siRNA 導入群) を 50, 100, 200 μ g 投与群の3群に分けて注入し、脳梗塞巣に対しての縮小作用あるいは毒性について虚血7日後に病理組織的解析を行った結果、Int6-siRNA はすべての濃度において有意な脳梗塞縮小効果を示した (図1、2)。また、Int6-siRNA の脳内での分布は凍結損傷を作成した周囲の神経細胞とグリアに主に広がっていた (図3)。HIF2 α は、神経細胞においても観察された (図4)



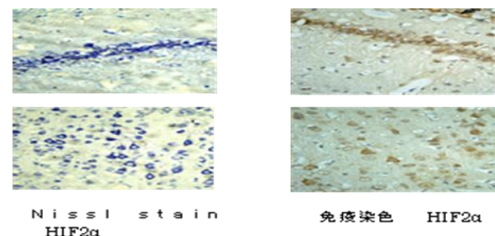
(図1)



(図2)



(図3)



(図4)

③Int6-siRNA 投与による脳保護効果に対する海馬での脳内神経栄養因子 (Brain Derived Neurotrophic Factor:BDNF) との関連解析

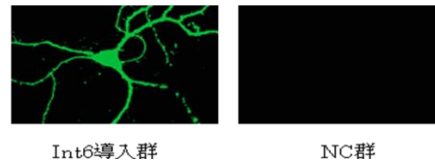
10分間のラット needle lesion 前脳虚血モデルを作製し、虚血1時間後に Int6-siRNA 導入群と NC 導入群に対して外頸動脈から至適量のベクターを投与して海馬 CA1 錐体細胞の遅発性神経細胞死に対する保護作用について Int6-siRNA の脳内栄養因子 (BDNF) やマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPS) への関与をベク

ター投与後6、12時間、1、2、7日目に脳を取り出し凍結切片(25 μ m)を作製し免疫染色にて検討を行ったが、ベクターの脳内への広がりが十分でなく、脳内各栄養因子(BDNF,GDNE,サイトカイン等)やマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPS)に対する免疫染色では各因子を染色にて捉えることが困難で、その影響を解析することができなかった。

④Int6-siRNA 投与による培養神経細胞内各栄養因子 (Brain Derived Neurotrophic Factor:BDNF, VEGF:vascular endothelial growth factor, PDGF:platelet-derived growth factor)の発現解析

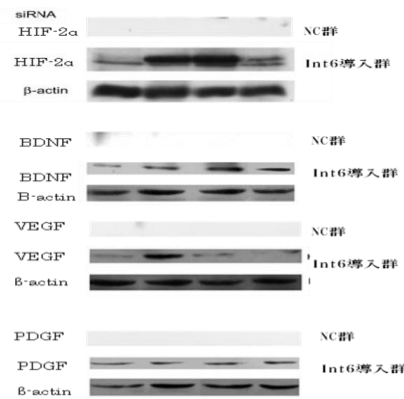
Int6-siRNA 導入群とNC 導入群に分けて実験を行った。Int6 の発現は GFP で確認し(図1)、NC 群での発現は認められなかった。Int6-siRNA 導入群とNC 導入群のBDNF,VEGF,PDNF の変動は、当初 RT-PCR にて mRNA 発現の確認を試みたが、発現がばらつき正確に捉えることができなかった。そのため、western blot(図2)に変更し、超高感度生体内情報測定システム(MUSTag:Mulotiple Simultaneous Tag)法(図3)にて経時的(Pre、Int6-siRNA 導入1、24、48時間後)に測定、解析を行った。また、Int6-siRNA 導入12時間後のサンプルからの測定では、両法に於いて、原因は明確ではないが各栄養因子の値を正確に捕捉できなかった。また、NC 群ではどの栄養因子の発現も認められなかった。VEGF は、Int6-siRNA 導入1時間後に有意に増加した。PDGF は全経過を通じて有意な増加を示さなかった。免疫染色によりBDNFを捕捉することが困難であったため、MUSTagにより再度BDNFを測定したところ、Int6-siRNA 導入1、24、48時間後において有意な増加を認めた。また、western blot の変化とほぼ一致した。

Int6 の発現



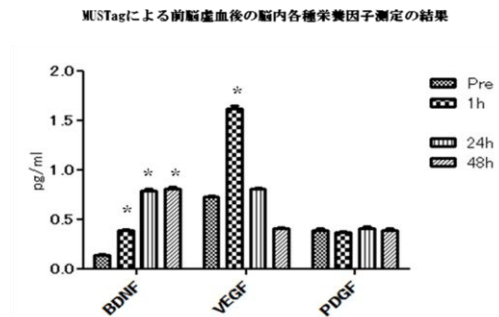
(図1)

western blot によるBDNF,VEGF,PDNF の変動解析



(図2)

MUSTag による前脳虚血後の脳内各種栄養因子測定の結果



(図3)

⑤脳内ミトコンドリアの呼吸能からみたInt6-siRNA 投与による脳保護効果の解析

ラット凍結損傷虚血モデルに外頸動脈からInt6-siRNA ベクター (50, 100, 200 μ g) を投与して、1週間後の大脳ミトコンドリアの呼吸能: Respiratory Control Ratio(RCR)を測定した。RCRは50 μ gでコントロール(虚血群)と有意さなく、100, 200 μ g群で有意な差を認めた(表1)。カルシウム取りこみ能: Calcium Retention Capacity(CRC)は、

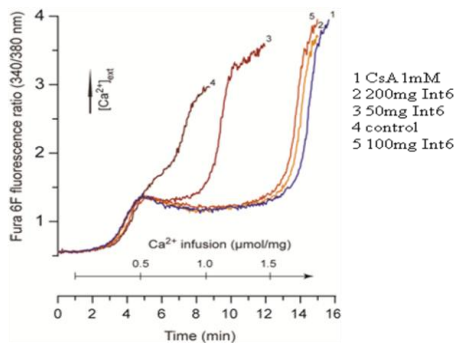
CsA 群、50 μ g, 100, 200 μ g 群でコントロール群に比較して有意な差を認めた (図 1, 2)。

表 1 ミトコンドリアのRCRの比較

Brain	State2	State3	State4	RCR
NC	33.5 ± 7.5	148.5 ± 25.5	30.5 ± 20.5	4.2± 1.5
Int6SiRNA 50ug	32.5 ± 3.5	150.5 ± 20.5	31.5 ± 8	4.7± 1.6
Int6SiRNA 100ug	35.5 ± 6.5	220.5 ± 31.5	42.8 ± 6.8	5.2± 1.9*
Int6SiRNA 200ug	37.5 ± 4.5	250.5 ± 34.5	40.6 ± 6.1	6.2±2.6 *

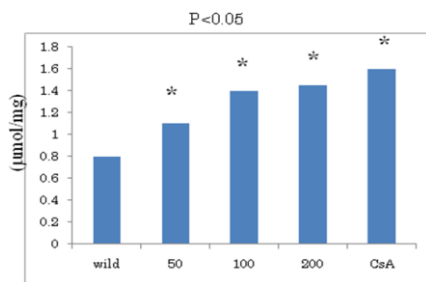
*p<0.05

ミトコンドリアのCRCの比較



(図 1)

SiRNA Int6の量とCRCの比較



(図 2)

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 15 件)

1.Evaluation of putative inhibitors of mitochondrial permeability transition for brain disorders--specificity vs. toxicity.

Morota S, Månsson R, Hansson MJ, Kasuya K, Shimazu M, Hasegawa E, Yanagi S, Omi A,

Uchino H, Elmér E. Exp Neurol. 218(2):353-62, 2009

2. ラット脳虚血モデルにおける超高感度生体内情報測定システム(MUSTag:Multiple Simultaneous Tag)を用いた早期脳障害マーカー捕捉への試み 宮下亮一, 内野博之, 芝崎太 東京医科大学雑誌 67 巻 4 号 Page495-496:2009

3. Cyclophilin D-sensitive mitochondrial permeability transition in adult human brain and liver mitochondria.

Hansson MJ, Morota S, Chen L, Matsuyama N, Suzuki Y, Nakajima S, Tanoue T, Omi A, Shibasaki F, Shimazu M, Ikeda Y, Uchino H, Elmér E J Neurotrauma. 28(1):143-53, 2011 他 1 2 件

[学会発表] (計 9 件)

1. 脳虚血性神経細胞死メカニズムと Int6/HIF2 α 情報伝達系の連関解析 宮下亮一, 内野博之, 陳リー, 櫻井陽, 芝崎太 2010年 第164回東京医科大学医学学会総会

2. 超高感度生体内情報測定システム(MUSTag:Multiple Simultaneous Tag)を用いた早期脳障害マーカー捕捉への試み 宮下亮一, 武田明子, 関根秀介, 宮田和人, 福井秀公, 小澤拓郎, 内野博之 2009年 第28回日本蘇生学会 他 7 件

[図書] (計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

内野 博之 (ウチノヒロユキ)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号:

60266476

(2)研究分担者

福井 秀公 (フクイヒデキミ)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90349499

奈倉 武郎 (ナグラタケロウ)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80421030

(3)連携研究者

芝崎 太 (シバサキ フトシ)

研究者番号: 30300954

陳 リー (チン リー)

研究者番号: 30425681