

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月9日現在

機関番号：12501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591578
 研究課題名（和文） 脳梗塞急性期の神経細胞ストレス応答機構の分子基盤
 研究課題名（英文）
 The molecular mechanism underlying neuronal stress response in acute ischemic stroke
 研究代表者
 山口 淳 (YAMAGUCHI ATSUSHI)
 千葉大学・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：00314336

研究成果の概要（和文）：

脳血管障害は死因の第3位、患者数は第3位を占め、その治療法の開発は急務である。2005年より脳梗塞発症の急性期3時間以内にt-PA 静注療法が開始されたが、脳血流の再灌流に対する神経細胞のストレス応答機構は明らかでない。我々の研究グループは、ラット中大脳動脈閉塞・再灌流モデルのPenumbra 領域の神経細胞にMKP-1(MAP kinase phosphatase-1)が誘導されることを見出し、当該研究ではその意義を解析した。その結果、MKP-1を誘導することで、脳梗塞急性期の神経細胞死が抑制できる研究結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

MAP kinase phosphatase 1 (MKP-1) is an archetypal member of the dual-specificity protein phosphatase (DUSP) family, which inactivates JNK through dephosphorylation. Our findings indicate that over-expression of MKP-1 could suppress neuronal death through regulating JNK signaling and be a prominent neuroprotective target for the treatment of acute cerebral infarction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳梗塞、MKP-1、JNK

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は死因の第3位、患者数は第3位を占め、その治療法の開発は急務である。2005年より脳梗塞発症の急性期3時間以内にt-PA 静注療法が開始された。しかし、治療適応になる患者は全体の約5%であり、適応外の患者に対する新規の脳梗塞急性期の治療薬開発は急務である。

2. 研究の目的

当該研究の目的は、脳梗塞急性期における神経細胞のストレス応答機構を解明し、将来

的に脳梗塞急性期の新規治療薬開発のための礎を築くことである。

3. 研究の方法

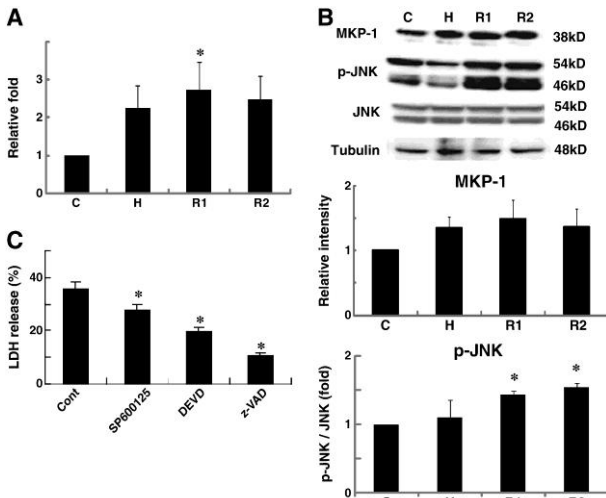
脳梗塞急性期における神経細胞のストレス応答機構を解明するため、低酸素ストレスで誘導される遺伝子をDifferential Display法で検索した結果、MKP-1(MAP kinase phosphatase-1)がmRNA転写レベルで誘導されることを見出した。当該研究では、ラット中大脳動脈モデル、初代培養神経細胞、神経細胞培養株を用い、MKP-1の脳梗塞急性期に

おける機能解析を行った。

4. 研究成果

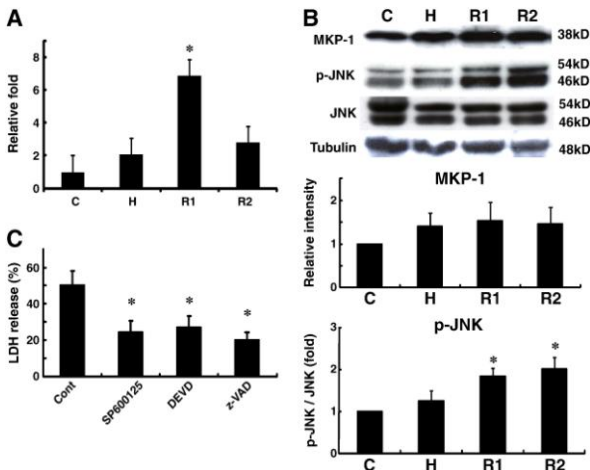
(1) 神経芽腫由来細胞株 N1E115 における MKP-1 の時間依存的発現解析

N1E115 細胞を低酸素-再酸素化ストレスに暴露し、Real-time PCR 法、Western blot 法により、再酸素化後に時間依存的に MKP-1 の mRNA 及びタンパク質が誘導されることを確認した(次図 A, B)。同時に、ストレスキナーゼ JNK の活性化(リン酸化)を認めた(次図 B)。また、LDH Assay を用いて再酸素化後に神経細胞死が誘導され、それは JNK 阻害剤により抑制されることを確認した(次図 C)



(2) 初代培養細胞における MKP-1 の時間依存的発現解析

ラット初代培養神経細胞を低酸素-再酸素化ストレスに暴露し、Real-time PCR 法、Western blot 法により、再酸素化後に時間依存的に MKP-1 の mRNA 及びタンパク質が誘導されることを確認した(次図 A, B)。同時に、ストレスキナーゼ JNK の活性化(リン酸化)を認めた(次図 B)。また、LDH Assay を用いて再酸素化後に神経細胞死が誘導され、それは JNK 阻害剤により抑制された(次図 C)。これは、N1E115 細胞での実験結果と同様であった。

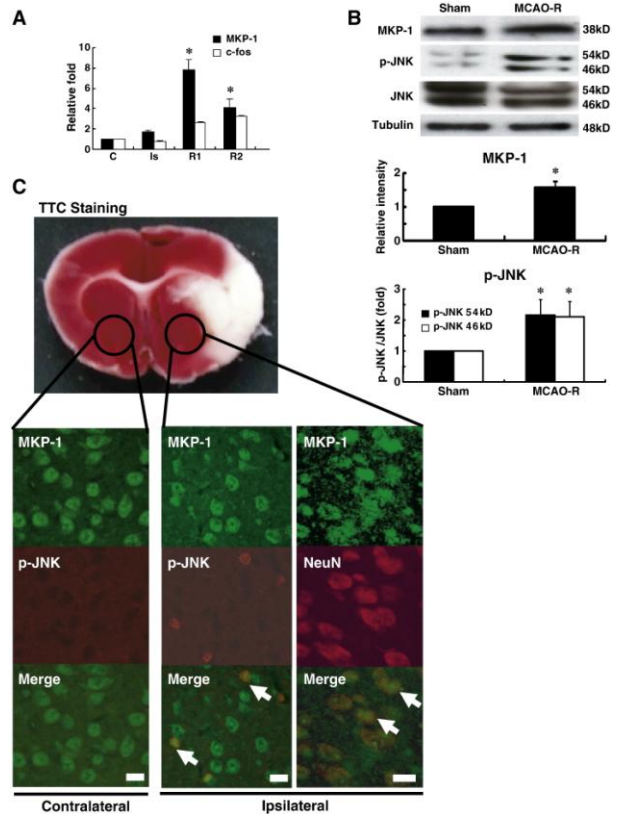


(3) ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける MKP-1 発現解析

脳梗塞の動物モデルとして、我々の研究グループは、ラットの一過性中大脳動脈閉塞モデルを採用した。ラットの内頸動脈からナイロン糸を挿入し、1 時間、中大脳動脈の起始部を閉塞した後、ナイロン糸を抜去して、1-2 時間の間、再還流を行った。免疫染色用の脳サンプルは、4.5% パラフォルムアルデヒドで還流固定し、クリオスタットで切片作製を行った。また、Real-time PCR 法、Western blot 法のサンプルは、梗塞側の脳ホモジネートを用いた。

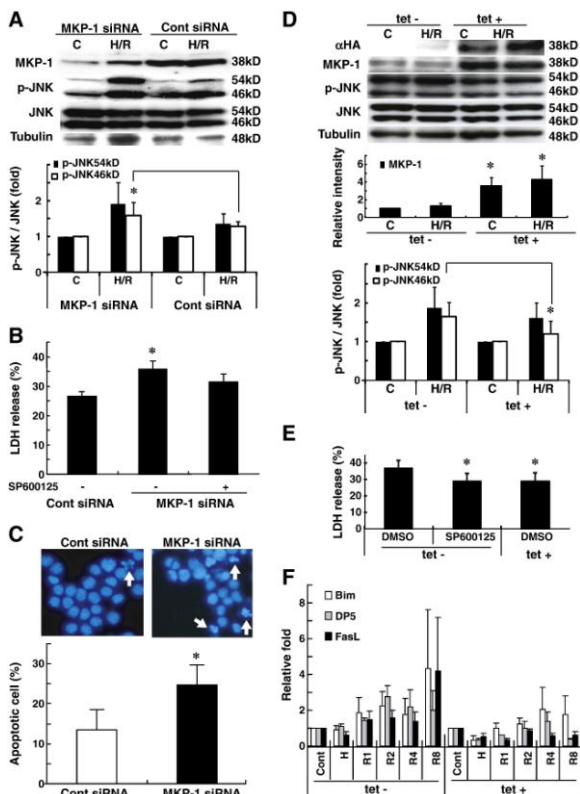
その結果、Real-time PCR 法、Western blot 法、蛍光組織免疫染色法を用い、一過性ラット中大脳動脈閉塞モデルの梗塞巣周囲領域の神経細胞に MKP-1、活性化 JNK が誘導されることを確認した(次図 A, C)。

また、MKP-1 が誘導された神経細胞の一部には活性化(リン酸化)JNK の誘導を認めた(次図 B,C)。



(4)MKP-1 の神経細胞保護作用の解析

siRNA 法を用いて、MKP-1 をノックダウンしたところ、低酸素/再酸素化(H/R)での JNK の活性化が増強し、神経細胞死が誘導された(次図 A,B,C)。更に、tet-on inducible MKP-1 発現系を N1E115 細胞を用いて構築し解析した。低酸素/再酸素化(H/R)において、MKP-1 の強制発現時には、JNK 活性化が抑制された(次図 D)。同時に神経細胞死が抑制されることを確認した(次図 E)。MKP-1 強制発現による神経細胞死の抑制作用のメカニズムとして、アポトーシス関連遺伝子(FasL, DP5)の発現が抑制されている事を認めた(次図 F)。



以上の結果より、当該研究では、脳梗塞急性期において MKP-1 を活性化することで、神経細胞が脳虚血ストレスから保護される事を明らかにした。

[雑誌論文] (計 4 件)

①Yamaguchi A, Kitajo K.

The Effect of PRMT1-Mediated Arginine Methylation on the Subcellular Localization, Stress Granules, and Detergent-Insoluble Aggregates of FUS/TLS
PLoS One. 2012;7(11):e49267. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0049267

②Koga S, Kojima S, Kishimoto T, Kuwabara S, Yamaguchi A.

Over-expression of map kinase phosphatase-1 (MKP-1) suppresses neuronal death through regulating JNK signaling in hypoxia/re-oxygenation
Brain Res. (2012)1436:137-46 査読有
doi: 10.1016/j.brainres.2011.12.004

③Vargas M, Yamaguchi A, Luo N, Kapahi P. The role of S6 Kinase and serotonin in maintaining nutrient balance in *D. melanogaster*.
Current Biology. (2010) 20(11):1006-11 査読有
doi: 10.1016/j.cub.2010.04.009.

④Kawaguchi K, Yamaguchi A. Temperature dependence rigidity of non-taxol stabilized single microtubules.
Biochem Biophys Res Commun. (2010) 402(1):66-9 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.112.

[学会発表] (計 4 件)

①S. KOGA, S. KOJIMA, T.KISHIMOTO, S. KUWABARA, A. YAMAGUCHI
Protective effects of MKP-1 on hypoxia/reoxygenation-induced neuronal death.
Neuroscience 2012

2012/10/13 New Orleans, USA.

②第 34 回日本神経科学大会

Identification of a novel binding partner for FUS/TLS

藤井 早紀子、宮地 秀明、古賀 俊輔、北城 敬子、山口 淳

2011 年 9 月 15 日 (木) パシフィコ横浜

③古賀 俊輔、小島 俊輔、岸本 充、山口 淳、桑原 聡

「低酸素低グルコース刺激による神経細胞死における MKP-1 の機能解析

A crucial role of map kinase phosphatase-1 (MKP-1) in neuronal death in oxygen glucose deprivation」 (演題番号 : P1-q06)

第 33 回日本神経科学大会/第 53 回日本神経化学会大会/第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会(Neuro2010)、

2010 年 09 月 02 日 神戸

④古賀 俊輔, 山口 淳

「脳梗塞における MKP-1 の機能解析」

Chiba neuroscience meeting、

2010 年 07 月 24 日 千葉

[その他]

ホームページ

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/neurobio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 淳 (YAMAGUCHI ATSUSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：00314336