

## 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5月30日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659325

研究課題名（和文）血球細胞ストレス指標と低酸素脳症の相関性の検討

研究課題名（英文）Functional relation of stress response in blood cells and brain after hypoxia

研究代表者

後藤 薫 (GOTO KAORU)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：30234975

研究成果の概要（和文）：

救急医療の現場あるいは様々な外科的手術においては生体侵襲の大きさが問題となり、その時の生体ストレスは細胞内情報伝達系に多大な影響を与える。細胞内情報伝達機構において、細胞内セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロール（DG）のリン酸化酵素 DG キナーゼ（DGK）は様々な病態に関与すると考えられるが未だ不明な点が多い。本研究では、低酸素チャンバー（酸素濃度～5.0%）を用いた個体レベルの「低酸素脳症モデル」において、DGKファミリーの一つである DGK $\zeta$ （ゼータ）がどのような動態を示すかを検討した。その結果、負荷 24 時間以降における海馬の DGK $\zeta$  免疫反応は、核内から細胞質優位に変化することが明らかとなり、DGK $\zeta$  の核外移行は低酸素ストレスにおけるアポトーシスの指標となることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Biological stress determines recovery from emergency conditions, such as accidents and surgery and affects intracellular signal transduction. Diacylglycerol kinase (DGK) is an enzyme that metabolizes the second messenger DG in phosphoinositide turnover. Recent studies have indicated an involvement of diacylglycerol kinase (DGK) in various diseases such as cancer, diabetes, inflammation and stroke. In the present study we performed an experiment at the organismal level using hypoxic chamber stress (oxygen concentration 5%). After 3 days of transient hypoxic stress, we found that DGK $\zeta$  was translocated from the nucleus to the cytoplasm. These results provide an evidence that nucleo-cytoplasmic translocation of DGK $\zeta$  may be an index of early phase of apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	0	1,200,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,800,000	480,000	3,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：低酸素脳症、生体ストレス、脂質代謝酵素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 救急医療の現場あるいは様々な外科的手術においては生体侵襲の大きさが問題となり、その時の生体ストレスが病態の予後に大きな影響を与える。心肺蘇生患者においては低酸素脳症が予後を左右する。このような低酸素ストレスを含む様々な病態は、細胞内情報伝達系に多大な影響を与える。

(2) 細胞内情報伝達機構において、細胞内セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロール (DG) のリン酸化酵素 DG キナーゼ (DGK) は分子多様性ならびに生体臓器における遺伝子発現の多様性を示し、様々な病態に関与すると考えられるが未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

(1) これまでの動物実験から我々は、ラット脳の「一過性脳虚血・再還流モデル」において、DGK $\zeta$ が海馬ニューロンにおいて、20 分間の一過性虚血後に核から細胞質へと移行し、その後アポトーシス様の細胞死に至る現象を明らかにしてきた。

(2) 本研究では、この DGK $\zeta$ の核-細胞質移行の現象が低酸素ストレスによっても誘導されるかどうかを検討し、幅広い観点から解析することを目的とした。

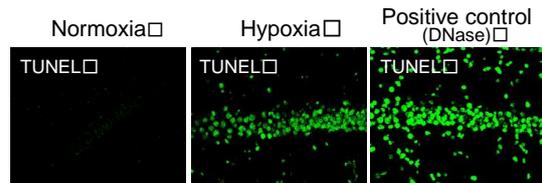
## 3. 研究の方法

(1) 低酸素負荷は、容積 8 リットルのプラスチックチャンパー内を 100% 窒素ガスで置換して行った。負荷時の室温は 23°C に設定し、低濃度酸素濃度計を用いてチャンパー内の酸素濃度を 4.5~5.0% で約 7 分間の低酸素ストレスに暴露した。

(2) 負荷後に脳切片の免疫組織化学を施行し、TUNEL 染色による神経細胞の障害度を評価した。また DGK $\zeta$ の特異抗体を用いて免疫染色を行い、細胞内局在を観察した。

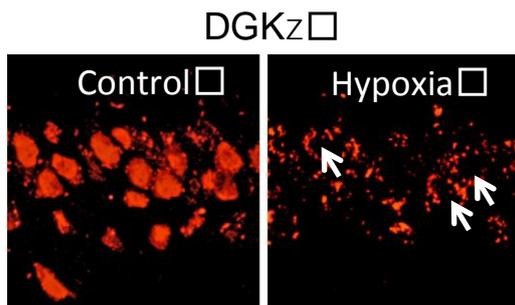
## 4. 研究成果

(1) 成体雄マウスを低酸素ストレス (酸素濃度 4.5~5.0%、6 分 40 秒間) に暴露し、負荷 72 時間後、摘出脳の切片を作製し、TUNEL 染色を施行した。コントロール個体において TUNEL 染色細胞は全く認められなかったが、低酸素負荷マウスの海馬錐体層においては、多数の TUNEL 陽性細胞が認められた。すなわち、今回の低酸素負荷条件によりマウス海馬錐体ニューロンにアポトーシスが誘導されることが示唆された。



図の説明：海馬における TUNEL 染色。低酸素負荷により、TUNEL 陽性を示す細胞が増加する。Normoxia (正常酸素)、Hypoxia (低酸素)、Positive control (DNase 処理によるポジティブコントロール)。

(2) この時、負荷 24 時間以降における海馬の DGK $\zeta$ と免疫反応は、一過性虚血負荷後と同様、核内から細胞質優位に変化することが明らかとなった。これらの実験から、DGK $\zeta$ の核外移行は一過性脳虚血同様、低酸素ストレスにおいても生じることが明らかとなった。



図の説明：海馬における DGK $\zeta$ 免疫組織化学染色像。コントロール群では、DGK $\zeta$ 免疫反応は核内に認められるのに対して、低酸素負荷群 (Hypoxia) では細胞質に検出される (矢印)。

## 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 10 件)

(1) Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, Evangelisti C. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta*. 2012, 1823:2168-78. (査読有)

doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.017.

(2) Okada M, Hozumi Y, Tanaka T, Suzuki Y, Yanagida M, Araki Y, Evangelisti C, Yagisawa H, Topham MK, Martelli AM, Goto K. DGK $\zeta$  is degraded through the cytoplasmic ubiquitin-proteasome system

under excitotoxic conditions, which causes neuronal apoptosis because of aberrant cell cycle reentry. *Cell Signal*. 2012, 24:1573-82. (査読有)

doi: 10.1016/j.cellsig.2012.03.021.

(3) Okada M, Hozumi Y, Iwazaki K, Misaki K, Yanagida M, Araki Y, Watanabe T, Yagisawa H, Topham MK, Kaibuchi K, Goto K. DGK $\zeta$  is involved in LPS-activated phagocytosis through IQGAP1/Rac1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012, 420:479-84. (査読有)

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.057.

(4) Suzuki Y, Yamazaki Y, Hozumi Y, Okada M, Tanaka T, Iseki K, Ohta N, Aoyagi M, Fujii S, Goto K. NMDA receptor-mediated Ca(2+) influx triggers nucleocytoplasmic translocation of diacylglycerol kinase  $\zeta$  under oxygen-glucose deprivation conditions, an in vitro model of ischemia, in rat hippocampal slices. *Histochem Cell Biol*. 2012, 137:499-511. (査読有)

doi: 10.1007/s00418-011-0907-y.

(5) Nakano T, Hozumi Y, Iwazaki K, Okumoto K, Iseki K, Saito T, Kawata S, Wakabayashi I, Goto K. Altered expression of diacylglycerol kinase isozymes in regenerating liver. *J Histochem Cytochem*. 2012, 60:130-8. (査読有)

doi: 10.1369/0022155411429154.

(6) Okada M, Hozumi Y, Ichimura T, Tanaka T, Hasegawa H, Yamamoto M, Takahashi N, Iseki K, Yagisawa H, Shinkawa T, Isobe T, Goto K. NAP Interaction of nucleosome assembly proteins abolishes nuclear localization of DGK $\zeta$  by attenuating its association with importins. *Exp Cell Res*. 2011, 317:2853-63. (査読有)

doi: 10.1016/j.yexcr.2011.09.014.

(7) Saino-Saito S, Hozumi Y, Goto K. Excitotoxicity by kainate-induced seizure causes diacylglycerol kinase  $\zeta$  to shuttle from the nucleus to the cytoplasm in hippocampal neurons. *Neurosci Lett*. 2011, 494:185-9. (査読有)

doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.062.

(8) Akiyama H, Hozumi Y, Nakano T, Kubota I, Goto K. Nuclear relocation of DGK $\zeta$  in cardiomyocytes under conditions of ischemia/reperfusion. *Histol Histopathol*. 2011, 26:1383-1390. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21938675>

(9) Martelli AM, Ognibene A, Buontempo F, Fini M, Bressanin D, Goto K, McCubrey JA, Cocco L, Evangelisti C. Nuclear phosphoinositides and their roles in cell

biology and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2011, 46:436-57. (査読有)

doi: 10.3109/10409238.2011.609530.

(10) Evangelisti C, Gaboardi GC, Billi AM, Ognibene A, Goto K, Tazzari PL, McCubrey JA, Martelli AM. Identification of a functional nuclear export sequence in diacylglycerol kinase-zeta. *Cell Cycle*. 2010, 9:1-6. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20023381>

[学会発表] (計 13 件)

(1) Hozumi Y, Goto K: Expression and localization of diacylglycerol kinase in rat retina. 42th Annual Meeting of Neuroscience, Convention Center, New Orleans, USA; October 13-17, 2012.

(2) Tanaka T, Goto K: Cytoplasmic localization of diacylglycerol kinase zeta suppresses p53 induction after DNA damage. 42th Annual Meeting of Neuroscience, Convention Center, New Orleans, USA; October 13-17, 2012.

(3) 後藤薫: 生体ストレスにおける脂質性二次伝達物質代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) の応答. 第 117 回日本解剖学会総会、甲府; 2012 年 3 月 26-28 日

(4) 後藤薫: Functional implication of diacylglycerol kinase in stress response. 第 89 回日本生理学会総会、松本; 2012 年 3 月 29-31 日

(5) 八月朔日泰和、後藤薫: イプシロン型ジアシルグリセロールキナーゼの小脳における発現局在解析. 第 117 回日本解剖学会総会、甲府; 2012 年 3 月 26-28 日

(6) 田中俊昭、岡田雅司、後藤薫: DGK $\zeta$  結合タンパク NAP は DGK $\zeta$  を細胞質へ移行させ細胞死を抑制する. 第 117 回日本解剖学会総会、甲府; 2012 年 3 月 26-28 日

(7) 松井祐興、後藤薫: 遺伝子導入培養細胞を用いた DGK $\varepsilon$  の細胞内局在解析. 第 117 回日本解剖学会総会、甲府; 2012 年 3 月 26-28 日

(8) 土谷理恵子、飯野光喜、後藤薫: DGK $\zeta$  と Retinoblastoma 蛋白の軟骨細胞分化調節における役割. 第 117 回日本解剖学会総会、甲府; 2012 年 3 月 26-28 日

(9) Tanaka T, Goto K: Cytoplasmic diacylglycerol kinase  $\zeta$  suppresses p53 stability and apoptosis. Gordon Conference, Ventura, CA, USA; February 27-March 4, 2011.

(10) Goto K: Functional significance of diacylglycerol kinase in stress

response. The 116th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 88th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, Yokohama, Japan; March 28-30, 2011.

(11) Hozumi Y, Goto K: Functional implications of diacylglycerol kinase  $\beta$  on the perisynaptic site in developing neurons. The 116th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 88th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, Yokohama, Japan; March 28-30 2011.

(12) Okada M, Goto K: DGK  $\zeta$  is a suppressor of excitotoxic neuronal cell death. The 116th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 88th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, Yokohama, Japan; March 28-30 2011.

(13) Tanaka T. Goto K: Cytoplasmic Diacylglycerol kinase zeta suppresses p53 stability and apoptosis. The 116th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 88th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, Yokohama, Japan; March 28-30 2011.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 薫 (GOTO KAORU)  
山形大学・医学部・教授  
研究者番号：30234975

### (2) 研究分担者

伊関 憲 (ISEKI KEN)  
山形大学・医学部・准教授  
研究者番号：70332921