

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 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791046

研究課題名（和文）ヒトてんかん原性脳組織における酸化損傷タンパク質の網羅的探索と細胞毒性の解析

研究課題名（英文）Proteomic analysis of oxidatively damaged proteins in the sclerotic hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy

研究代表者

古川 絢子（FURUKAWA AYAKO）

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手

研究者番号：10455537

研究成果の概要（和文）：急性脳障害後の重篤な後遺症の一つであるてんかん発作では、神経細胞の異常な興奮が繰り返し生じることから、てんかん焦点は慢性的な興奮毒性に曝されていると考えられる。本研究では、ヒトてんかん外科切除脳組織の海馬硬化組織において、特定のタンパク質が酸化障害を強く受けており、興奮毒性による酸化ストレスに脆弱なタンパク質の存在が示唆された。これらのタンパク質は、てんかんの治療戦略における標的分子となる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Free radicals play a critical role in excitotoxin-induced neuronal death. However, it remains unclear which proteins are particularly vulnerable to excitotoxin-induced oxidative damage in the epileptogenic lesion of patients with hippocampal sclerosis. To identify potential proteins specifically damaged in sclerotic hippocampus of epileptic patients, we performed proteomic analysis of carbonylated proteins in the hippocampus and temporal neocortex prepared from patients with and without hippocampal sclerosis. We found some target proteins that were particularly carbonylated in the sclerotic hippocampus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：神経科学、生化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：てんかん、酸化ストレス、興奮毒性、プロテオミクス、酸化損傷タンパク質、海馬硬化

1. 研究開始当初の背景

低酸素性虚血性脳症（HIE: Hypoxic-ischemic encephalopathy）は、新生児死亡の原因となる他、速やかに蘇生され

一命を取りとめたとしても、脳性麻痺や発達障害など発達期脳障害の原因となる。これは、単回の低酸素虚血によって一過性に生じる興奮毒性の結果と捉える事ができる。それに対し、てんかん患者では神経細胞の異常な興

気泳動とウェスタンブロット法によりカルボニル化タンパク質検出の実験条件を検討した。次に症例数を増やしてカルボニル化タンパク質の定量解析を行うことにしたが、海馬硬化症と剖検脳の比較では薬剤投与などの背景が異なるため、対照として用いる組織を再検討した。内側側頭葉てんかん患者の海馬硬化の程度を Watson らの分類に従って評価し、顕著な海馬硬化が認められる Grade IV を 5 例、対照として海馬硬化が認められない Grade 0/I を 5 例用いることとした。各標本から海馬 CA1 領域と組織学的に著変が認められない側頭葉新皮質を切り出し、2次元電気泳動とウェスタンブロット法によりカルボニル化タンパク質を検出した (図 1)。各タンパク質のカルボニル化量の評価は、てんかんの影響を受けていない側頭葉新皮質のカルボニル化量を基準として、同一患者由来の海馬のカルボニル化量の増減を算出した。カルボニル化の増加パターンとしては、Grade 0/I、Grade IV 共に側頭葉新皮質と比較して海馬で増加するタンパク質 (図 1 青色矢印で示す) と、Grade IV の海馬硬化組織で増加が認められるが、対照である Grade 0/I の海馬では増加が認められないタンパク質 (図 1 赤色矢印で示す) が存在した。

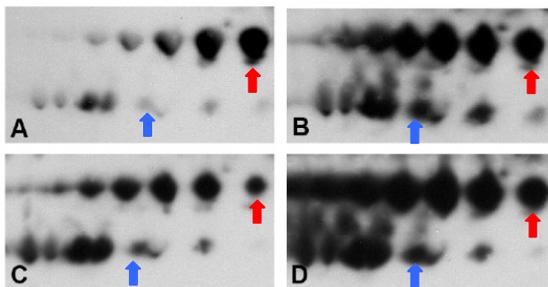


図 1. カルボニル化タンパク質生成の網羅的解析

- (A) Grade 0/I : 側頭葉新皮質
- (B) Grade 0/I : 海馬 CA1
- (C) Grade IV : 側頭葉新皮質
- (D) Grade IV : 海馬 CA1

ここで認められたカルボニル化量の増加が、タンパク質発現増加に由来するのか酸化損傷が増加したのかを明らかにするために、タンパク質発現量変化の網羅的解析を行った。蛍光標識二次元ディフレンスゲル電気泳動によりタンパク質発現量解析を行った結果、カルボニル化の増減と同様に組織依存的な発現変動と病変依存的な発現変動が認められた。これらの結果を合わせて、Grade IV の海馬組織のみで強くカルボニル化されるタンパク質を絞り込み、同定する事をめざしている。

我々は以前、興奮毒性のモデル動物を用い

て酸化損傷タンパク質の生成を解析し、興奮毒性の超急性期に、神経細胞死が起きるより早く酸化傷害を受けるタンパク質を同定して報告したが、本研究の結果から、慢性的な興奮毒性に曝されているてんかん焦点においても、酸化ストレスによって特定のタンパク質に酸化傷害が蓄積することが明らかになった。これらのタンパク質の酸化傷害が、てんかん焦点でどのような役割を果たすのかを解明する事は、HIE の後遺症としてのてんかんにおける神経細胞死の機序を明らかにする一助となり、てんかんの治療戦略において標的分子となる可能性があると考えます。

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 8 件)

① Furukawa A, Kawamoto Y, Chiba Y, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Kawamura N, Yoshikawa K, Hosokawa M, Oikawa S, Kato M, Shimada A. Proteomic identification of hippocampal proteins vulnerable to oxidative stress in excitotoxin-induced acute neuronal injury. *Neurobiol. Dis.* 査読有 43:706-714, 2011.

② Chiba Y, Takei S, Kawamura N, Kawaguchi Y, Sasaki K, Hasegawa-Ishii S, Furukawa A, Hosokawa M, Shimada A. Immunohistochemical localization of aggresomal proteins in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 査読有 2011. doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01229.x.

③ Yoshikawa K, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Furukawa A, Kawamura N, Hosokawa M, Woodward DF, Watanabe K, Shimada A. Preferential localization of prostamide/prostaglandin F synthase in myelin sheaths of the central nervous system. *Brain Res.* 査読有 1367:22-32, 2011.

④ Hasegawa-Ishii S, Takei S, Inaba M, Umegaki H, Chiba Y, Furukawa A, Kawamura N, Hosokawa M, Shimada A. Defects in cytokine-mediated neuroprotective glial responses to excitotoxic hippocampal injury in senescence-accelerated mouse. *Brain Behav Immun.* 査読有 25:83-100, 2011.

⑤ Hasegawa-Ishii S, Takei S, Chiba Y, Furukawa A, Umegaki H, Iguchi A, Kawamura

N, Yoshikawa K, Hosokawa M, Shimada A. Morphological impairments in microglia precede age-related neuronal degeneration in senescence-accelerated mice. *Neuropathology*. 査読有 31:20-8, 2011.

⑥ Furukawa A, Oikawa S, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Kawamura N, Takei S, Yoshikawa K, Hosokawa M, Kawanishi S, Shimada A. Proteomic analysis of aging brain in SAMP10 mouse: a model of age-related cerebral degeneration. *Mech Ageing Dev*. 査読有 131:379-88, 2010.

⑦ Furukawa A, Oikawa S, Harada K, Sugiyama H, Hiraku Y, Murata M, Shimada A, Kawanishi S. Oxidatively generated DNA damage induced by 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole, a metabolite of carcinogenic amitrole. *Mutat Res*. 査読有 694:7-12, 2010.

⑧ 古川 絢子、及川伸二 酸化ストレスに着目したプロテオミクス解析-モデル動物を用いた酸化損傷タンパク質の網羅的解析- 内分泌・糖尿病・代謝内科 査読有 30:319-326, 2010

[学会発表] (計 5 件)

① 古川 絢子、樋口善博、島田厚良 興奮毒性による海馬神経細胞死に關与する酸化損傷タンパク質の網羅的解析 日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 29 日、札幌

② 古川 絢子、柿田明美、千葉陽一、武井史郎、石井さなえ、河村則子、細川昌則、高橋均、島田厚良 内側側頭葉てんかん患者の海馬における酸化損傷タンパク質の解析 第 52 回日本神経病理学会 2011 年 6 月 3 日、京都

③ 古川 絢子、島田厚良、千葉陽一、武井史郎、石井さなえ、河村則子、及川伸二、細川昌則 興奮毒性による海馬損傷における酸化損傷タンパク質の生成 第 63 回日本酸化ストレス学会 2010 年 6 月 25 日、横浜

④ 古川 絢子、島田厚良、及川伸二、千葉陽一、石井さなえ、河村則子、武井史郎、吉川圭介、細川昌則 脳の加齢に伴う神経変性に關与するタンパク質発現変化のプロテオミクス解析 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 29 日、東京

⑤ 古川 絢子、島田厚良、河村則子、武井史郎、千葉陽一、石井さなえ、細川昌則 興奮毒性による海馬損傷における酸化損傷タンパク

質の生成 第 51 回日本神経病理学会 2010 年 4 月 23 日、東京

[図書] (計 1 件)

① Shimada A, Hasegawa-Ishii S, Furukawa A: SAMP10 strain as a model for the study of brain aging. In: The senescence-accelerated mouse (SAM): Achievements and Future Directions. (Toshio Takeda, ed.), Amsterdam, Elsevier, in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 絢子 (FURUKAWA AYAKO)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手
研究者番号: 10455537

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し