

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390345

研究課題名(和文) 脳電気刺激で誘導されるミトコンドリア蛋白UCP4による虚血耐性の検討とその応用

研究課題名(英文) The study of neuroprotection and the mitochondrial protein UCP4 induced by electrical stimulation of the brain

研究代表者

山本 清二 (Yamamoto, Seiji)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授

研究者番号：60144094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：小脳室頂核(FN)電気刺激により発現する脳特異的なミトコンドリア蛋白であるUncoupling Protein 4 (UCP4) に関して実験的検討を行った。FN電気刺激によりcholinergic pathwayを介してkATP-channel が開き、スーパーオキシドが産生され、UCP4発現が促進されて、虚血に対する神経保護をもたらすと想定された。低濃度ミトコンドリア毒(3-nitropropionic acid)による低酸素耐性獲得にもUCP4発現が誘導されており、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生時に、細胞毒となる活性酸素種の発生を抑え酸化ストレスに対する耐性を獲得すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We studied the neuroprotective mechanisms and the role of brain specific mitochondrial protein, uncoupling protein 4 (UCP4), induced by the electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus (FN) in rats. Preconditioning with FN stimulation decreased the infarct volume, and increased UCP4 mRNA level. The effect of FN stimulation was inhibited by kATP-channel opening blocker. Diazoxide, kATP-channel opener, increased fluorescence intensity of combination of UCP4-promoter and TOMATO (red fluorescent protein), indicating the up-regulation of UCP-4, as compared with that in the control brain. The up-regulation was inhibited by superoxide dismutase. Our results suggest that FN stimulation opens a mitochondrial kATP-channel, up-regulates UCP4 in the brain through the production of superoxide, stabilizes mitochondrial function against ischemia and thereby induces neuroprotection.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳血管障害 虚血耐性 脳電気刺激 ミトコンドリア蛋白

1. 研究開始当初の背景

生体には低酸素や血圧低下(ショック)に対して血圧上昇と脳血流増加をもたらす防御反応(diving reflex: イルカなど水中に長く潜る哺乳類にみられる潜水中の反応であるが、ヒトを含む哺乳類にも見られる)がある。これには延髄腹外側部や小脳室頂核(cerebellar fastigial nucleus; FN)などが関係する。ラット FN の電気刺激(1h)を中大脳動脈(MCA)閉塞後に行うことが、control に比べて脳梗塞を縮小させるという事実は、1991年 Reis DJらにより世界で初めて報告された(JCBFM 11:810,1991)。申請者の山本は、Reis の研究室(Cornell 大学)でそのメカニズムの解明に関する研究を行い、それが脳血流や脳代謝の変化とは無関係であり、1時間の電気刺激が72時間後をピークとして3週間まで持続する、すなわち FN 電気刺激により大脳に広範囲な虚血耐性が獲得できることを発見し報告した(JCBFM 13:1020,1993; Neurosci Lett 210:181,1996; Brain Res 780:161,1998)。その後、同様の電気刺激が、海馬遅発性神経細胞死(Neuroreport 9:819,1998)と excitotoxicity(J Neurosci 19:4142,1999)にも保護効果があることが、本申請の研究協力者である Golanov EV により明らかとなった。FN 刺激が実験動物やヒトにおける seizure の閾値を上昇させるなど古い報告があるが、神経保護のメカニズムに関しては長年不明であった。我々は diving reflex ではミトコンドリアの呼吸が aerobic から anaerobic へスイッチする可能性を想定し、ミトコンドリア蛋白である uncoupling protein (UCP)に注目して本研究を立案した。

2. 研究の目的

基盤研究(B)課題番号 20390380(平成20~22年度、代表者:山本)においてそのメカニズムの解明に努め、これまでに以下の知見を得てきた。

UCP family の中で brain-specific な UCP-4 は、FN 電気刺激後72h(神経保護効果が最大の時期)に有意に脳内発現が蛋白レベルと mRNA レベルで増加している。FN 電気刺激後72h で作製したラット脳スライスでは、chemical hypoxia に対するミトコンドリアの膜電位は有意に変化しにくい。

KATP-channel opening blocker により FN 刺激による神経保護効果が消去される。

UCP-4 に対する siRNA を脳室内投与することにより、FN 電気刺激による UCP-4 の発現が抑制(knock down)される。

UCP はミトコンドリア膜に存在する proton channel で、現在5つの subtype が発見されている。UCP-1 は酸化的リン酸化に際して proton の濃度勾配を崩し ATP 産生の代わりに熱を産生する役割を担い hibernation にも関

係している。UCP-2 は様々の組織に発現、UCP-3 は筋肉に特異的に発現しているが、脳特異的と考えられる UCP-4 は、脳の細胞・組織が低エネルギー状態でも耐えられるように内的環境を整える役割を果たしている可能性が高く、ミトコンドリアでの活性酸素の過剰産生を抑える働きが想定される。(NeuroMol Med 8:389,2006)。

本研究では、脳電気刺激により誘導される虚血耐性とミトコンドリア蛋白である UCP-4 の関係を検討するため実験を行い、脳電気刺激により UCP-4 発現が誘導されるメカニズムを検討した。

3. 研究の方法

3-1. 小脳室頂核(FN)電気刺激

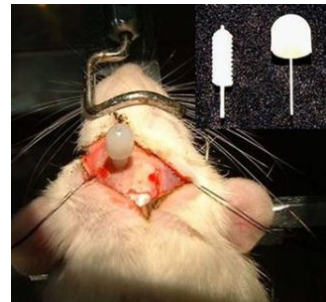
Spontaneously Hypertensive Rat (SHR)を全身麻酔下に管理し、定位脳手術的に monopolar stimulating electrode を刺入して1h(1s on-1s off; 0.5ms pulse duration; 50Hz; 100mA)電気刺激を行った。

3-2. UCP-4 が発現すると赤色蛍光も同時に発現し観察できるレポーターベクター

Rat UCP-4 mRNA と Rat 全ゲノム DNA 配列との照合から、予想される5'-転写調節プロモーター領域を PCR 法にてクローニングし、UCP-4 promote-赤色蛍光タンパク質 tdTomato レポーターベクターを構築した。これにより、UCP-4 が発現すると赤色蛍光が観察でき、蛍光蛋白の蛍光像を撮影することにより UCP4 発現を細胞や生体内(脳内)で検出することができる。

3-3. In Situ Lipofection 法によるアダルト脳への蛍光蛋白発現

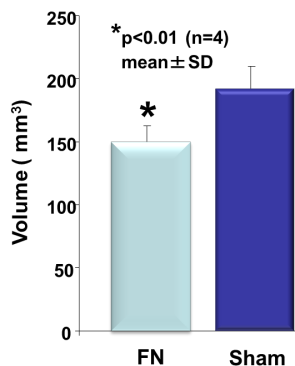
アダルトラットに脳室カニューラを設置し、1W 後にプラスミドを脳室内投与(DNA 量 16.7 μ g/kg 体重、DNA 2.5 μ g あたり Lipofectamine 3000 reagent 5 μ L、1日2回 \times 2日)した。



4. 研究成果

4-1. FN 電気刺激の脳梗塞巣体積への影響
FN 電気刺激の脳梗塞巣体積への影響を調べるため、SHR ラット(体重 300g、オス)の右 FN を monopolar stimulating electrode で1h 電気刺激72h 後に、顕微鏡下に中大脳動脈(MCA)を凝固後に切断して永久閉塞させ(permanent focal ischemia を作製し)24h 後に脳梗塞巣を Nissl 染色スライスで計測し、梗塞巣の体積を検討した。

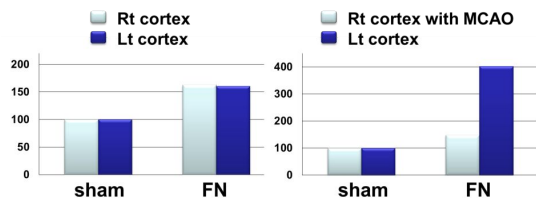
その結果、sham 刺激群：190.6 ± 5.1 mm² vs FN 刺激群：150.3 ± 11.1 mm²と有意にFN群で梗塞巣は縮小していた（神経保護効果が見られた）。



4-2. FN 電気刺激の UCP4 発現の影響

FN 電気刺激の脳 UCP4 発現への影響を調べるため、SHR ラット（体重 300 g、オス）の右 FN を monopolar stimulating electrode で 1h 電気刺激後 72h における UCP4 の mRNA level を quantitative RT-PCR により評価した。

その結果、FN 電気刺激により 72h 後には UCP4 の mRNA level は、中大脳動脈(MCA)を行っていない両側大脳で 160% に増加していた。FN 電気刺激後に中大脳動脈閉塞を行うと、72h 後には、虚血側で 150%、非虚血側で 400%まで UCP4 の mRNA level が増加していた。



4-3. ミトコンドリア kATP-channel と UCP4 発現の関係

4-3-1. 培養細胞における RT-PCR および Western blotting による検討

UCP4 発現を RT-PCR および Western blotting により検討した。その結果、初代培養した大脳皮質神経細胞にミトコンドリア kATP channel opener である diazoxide (30 μg) を投与して 1 時間 co-incubate すると 8h 後には UCP4 mRNA および UCP4 蛋白の発現増加を確認した。

Superoxide Dismutase (SOD 5 μM) によりスーパーオキシドを消去すると、ベースラインの UCP4 発現と diazoxide により誘発される UCP4 発現が抑制された。

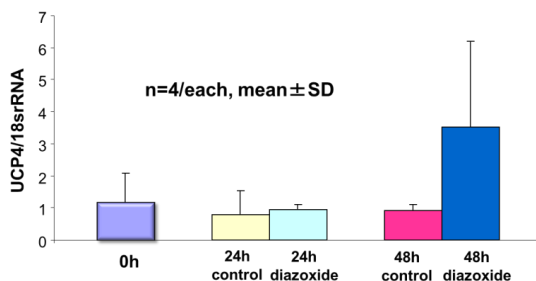
N2A 細胞 (Neuroblastoma cell line) を培養し、ミトコンドリア kATP channel opener である diazoxide (500 μM) を投与すると、48h 後には quantitative RT-PCR により評価した UCP4 mRNA level は有意に増加していた。

4-3-2. UCP-4 promote-赤色蛍光タンパク質 tdTomato レポーターベクターを用いた検討

4-3-2-1. 培養細胞における検討

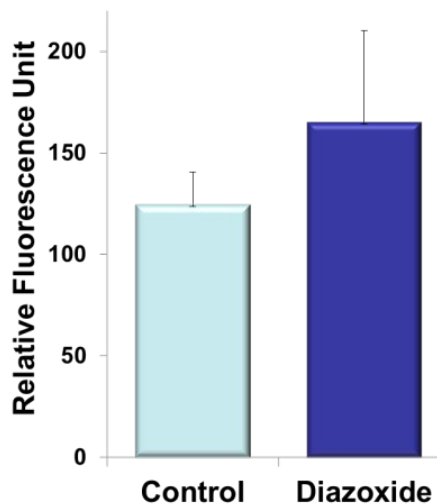
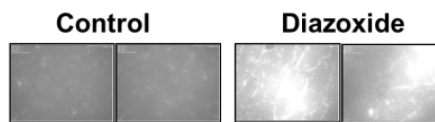
N2A 細胞 (Neuroblastoma cell line) を培養し、UCP4 promote-赤色蛍光タンパク質 tdTomato レポーターベクターを

transfection し、puromycin により purify し N2A-UCP4-TOMATO cell line を作製した後、500 μM diazoxide を投与して赤色蛍光を連続して観察すると、diazoxide 投与群で優位に蛍光強度の上昇、すなわち UCP4 発現の増加が確認できた。



4-3-2-2. アダルトラットでの検討

SHR ラット（体重 300 g、オス）に脳室カニューラを設置し、1週間後に2日間 UCP4 promote-赤色蛍光タンパク質 tdTomato レポーターベクターを脳室内投与（2回/日）した後、24h 後に kATP-channel opener である Diazoxide (10 mg/kg) を腹腔内投与すると、Tomato 赤色蛍光蛋白発現は大脳で diffuse に増加した。アトロピン投与（1.0 mg/kg）では、その蛍光強度に変化は無かった。



4-4. 低濃度 3-nitropropionoc acid (3NPA) による低酸素耐性獲得における UCP4 の関与

N2A 細胞 (Neuroblastoma cell line) を培養し、低濃度 3NPA 暴露による低酸素耐性獲得と、UCP4 発現の関係を調べた。N2A 細胞 (Neuroblastoma cell line) を培養し、UCP4 promote-赤色蛍光タンパク質 tdTomato レポーターベクターを transfection し、puromycin により purify した N2A-UCP4-TOMATO cell line を用い、蛍光強度の変化を追跡して UCP4 発現を検討した。

N2A 細胞は、3NPA (15 mM) 投与により 24 時間後に 88.6%が細胞死に至るが、sublethal な 3NPA (1mM、5mM、2 時間暴露)では 24 時間後に UCP4 が発現し 3NPA (15 mM) による細胞死を減らし低酸素耐性を獲得した。

4-5. まとめと結語

基盤研究 (B) 課題番号 20390380 (平成 20 ~ 22 年度、代表者: 山本) における結果と今回の成果をまとめると

- A) 1 時間の FN 刺激後 72 時間において
中大脳動脈閉塞後 24 時間の脳梗塞巣体積が 22%縮小 (神経保護効果) する UCP4 の大脳皮質での発現 (蛋白と mRNA レベル) が増加する
kATP-channel opening blocker により FN 刺激による神経保護効果が消去される
- B) 培養細胞およびラット個体レベルにおいて UCP4 発現は
ミトコンドリア kATP-channel の開放により発現が上昇する
それはスーパーオキシドの消去により抑制される
アダルトラット個体においてもミトコンドリア kATP-channel の開放により発現が上昇する
それはアトロピン投与によっても変化しない (FN 刺激の効果はアトロピン投与により消去される)

以上より、FN 刺激により、cholinergic pathway を介して、kATP-channel が開き、活性酸素 (スーパーオキシド) が産生され、UCP4 発現が促進され、虚血に対する神経保護をもたらすと想定された。低濃度 3NPA による低酸素耐性獲得にも UCP4 発現が誘導されていることからみて、低酸素 (虚血) 耐性において UCP4 はキーマディエータになっていると考察した。これまでの文献により、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生時に、細胞毒となる活性酸素種の発生を抑え、酸化ストレスに対する耐性を獲得すると考えられた。

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 英文 5 件)

1. Miura K and Yamamoto S. Pulmonary imaging with a scanning acoustic microscope discriminates speed-of-sound and shows structural characteristics of disease. *Laboratory Investigation*. 92:1760-1765, 2012
2. Miura K, Nasu H and Yamamoto S. Scanning acoustic microscopy for characterization of neoplastic and inflammatory lesions of lymph nodes. *Scientific Reports*. 3:1255;

DOI:10.1038/srep01255, 2013

3. Wu YY, Hirano T, Yamamoto J, Huang GW, Yamamoto S, Kohno E, Watanabe K, Misawa K, Mineta H*. Measurement of Singlet Oxygen Production in an Experimental Tongue Cancer Model as an Indicator for Photodynamic Therapy. *Practico-rhino-laryngologica*. 136:62-69, 2013
4. Miura K, Yamamoto S. Histological imaging from speed-of-sound through tissues by scanning acoustic microscopy (SAM). *Protocol Exchange* <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2581>.
5. Miura K, Egawa Y, Moriki T, Mineta H, Harada H, Baba S, Yamamoto S. Microscopic observation of chemical modification in sections using scanning acoustic microscopy. *Pathology International on-line* 2015 DOI: 10.1111/pin.12288

[学会発表] (国外 5 件、国内 2 件、計 7 件)

1. Thura M, Yamamoto S, et al. Ginkgolide B prevented neuronal damage in acute cerebral ischemia by suppressing calcium influx. XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and the Xth International Conference on Quantification of Brain Function with PET. 2011. 5. 25-28. Barcelona, Spain
2. Yamamoto S, et al. Real-time intravital fluorescence imaging reveals that hydroxyl radical plays a crucial role in delayed neuronal death. XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and the Xth International Conference on Quantification of Brain Function with PET. 2011. 5. 25-28. Barcelona, Spain
3. Koizumi S, Yamamoto S, et al. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus up-regulates mitochondrial protein and stabilizes mitochondrial function in the cortex. The Annual Meeting of Society for Neuroscience 2011. 2011.11.12-16. Washington DC, USA
4. Yamamoto S et al. kATP-channel opening up-regulates neuroprotective mitochondrial protein. The 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience USA. 2013.11.09-13. San Diego, CA, USA
5. Yamamoto S et al. Cerebellar fastigial nucleus stimulation up-regulates brain specific mitochondrial protein and induces neuroprotection against ischemia. The 14th

Asian Australasian congress of Neurological Surgeons. 2015.4.15-18, Jeju, Korea

6. 山本清二 他. 小脳室頂核の電気刺激による大脳皮質の uncoupling protein 4 発現とミトコンドリア機能安定化. 第34回日本神経科学大会 (Neuroscience2011). 2011. 9. 14-17 横浜市
7. 山本清二 他. kATPチャネルの開放は脳特異的なミトコンドリア蛋白を誘導する. 第36回日本神経科学大会. 第56回日本神経化学大会. 第23回日本神経回路学会大会 合同大会. 2013.6.20-23. 京都市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 清二 (YAMAMOTO SEIJI)
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授
研究者番号：60144094

(2)研究協力者

福司 康子 (FUKUSHI YASUKO)
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・特任研究員
研究者番号：50722683

Eugene V Golanov
Houston Methodist Hospital and Research Institute, Dept of Neurosurgery, USA