

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592088

研究課題名(和文)脳虚血耐性現象におけるエピジェネティクスを介した神経保護機序の解明

研究課題名(英文)The roles of epigenetic mechanism in cerebral ischemic preconditioning

研究代表者

吉岡 秀幸 (YOSHIOKA, Hideyuki)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20402076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティクスとは、クロマチンの化学的、構造的な修飾による遺伝子発現制御である。一方、非致死的な短時間の虚血負荷により誘導される虚血耐性現象には、多くの遺伝子発現変化が関与するとされるが、そのメカニズムは解明されていない。本研究では、虚血耐性獲得における遺伝子発現変化に対し、エピジェネティクスが果たす役割をラット虚血モデルで検討した。その結果、耐性獲得脳ではヒストン蛋白質のメチル化に変化を認め、apoptosis関連遺伝子や炎症反応関連遺伝子などの誘導が著明に抑制された。今後更なる検討を要するものの、虚血耐性獲得にエピジェネティクスが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic mechanism such as DNA methylation and modifications of histone proteins controls heritable change in gene expression. On the other hand, ischemic preconditioning involves numerous gene expression changes; however, its mechanism is still obscure. In this study, we evaluated the roles of epigenetic mechanism in ischemic preconditioning. Our results show that methylation of histone proteins was modified, and gene expressions related to apoptosis and inflammation were down-regulated in the preconditioned brains. Further studies are necessary to clarify the relationship between epigenetic mechanism and gene expression changes.

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：脳虚血耐性 虚血性神経細胞傷害 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

ゲノムの持つ遺伝情報の発現は、DNA 塩基配列のみならず、クロマチンの化学的、構造的な修飾 (エピゲノム修飾) によっても制御されている。このような遺伝子発現制御は “エピジェネティクス” と呼ばれ、生命現象を操る新たなるドグマとして近年大変に注目されている。そのメカニズムは主に DNA のメチル化およびヒストン蛋白質の化学修飾から成り立っており、ヒストンの高アセチル化および Lys4 (H3K4) のメチル化は転写を活性化し、ヒストン H3 Lys9 (H3K9) および Lys27 (H3K27) のメチル化は転写を不活化する。

一方、非致命的な短時間の虚血負荷 (preconditioning) は、引き続き致命的虚血に対する耐性現象を誘導することが知られている。この虚血耐性現象には、多くの遺伝子の発現変化が関与することが報告されており、細胞死シグナル関連遺伝子や代謝関連遺伝子の発現が抑制されること、および細胞生存シグナル関連遺伝子の発現が亢進することなどが報告されている (Lancet 2003, J Cereb Blood Flow Metab 2004)。しかしながら、これら遺伝子制御メカニズムは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

様々な刺激や環境変化によりエピゲノム修飾が惹起されることより、このような虚血耐性獲得関連遺伝子の発現変化にエピジェネティクスが関与している可能性が考えられる。近年、虚血耐性現象におけるエピジェネティクスの関与を示唆する実験結果が報告されているものの (Science signaling 2010, Brain Res 2010)、断片的な報告にとどまり十分に検討されていない。本研究の目的は、虚血耐性現象におけるエピジェネティクスの役割を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 一過性前脳虚血モデル

雄性 SD ラット (250~320g) を用い、虚血モデルには一過性前脳虚血モデル (Smith モデル) を使用した。脱血により平均動脈血圧を 30-35 mmHg に低下させた状態で両側総頸動脈を遮断し、前脳虚血を作成した。非致命的虚血群では 3 分間、致命的虚血群では 5 分間の総頸動脈遮断を行った。虚血耐性群では、3 分間の非致命的虚血による preconditioning 48 時間後に 5 分間の総頸動脈遮断を施行した。

(2) DNA アレイ解析

致命的虚血群、非致命的虚血群、虚血耐性群のサンプルを検討した。最終虚血 48 時間後に海馬 CA1 領域を摘出した。サンプルから cDNA を合成した後、発現解析アレイにハイブリダイゼーションし、マイクロアレイスキャナーを用いて発現解析した。発現量は sham との比較により検討した。

(3) Western blot 解析

致命的虚血群および虚血耐性群のサンプルを検討した。最終虚血 1、8、24、72、120 時間後に海馬 CA1 領域を摘出し、蛋白質サンプルを抽出した。30 µg のサンプルを 10% NuPAGE Bis-Tris gel を用いて電気泳動し、polyvinylidene difluoride 膜へ転写した。膜はブロッキング後、一次抗体および二次抗体と反応させ、結合抗体を chemiluminescence 法で発光した。Fuji LAS 4000 Lumino Image Analyzer (Fuji Film 社) で検出した。

4. 研究成果

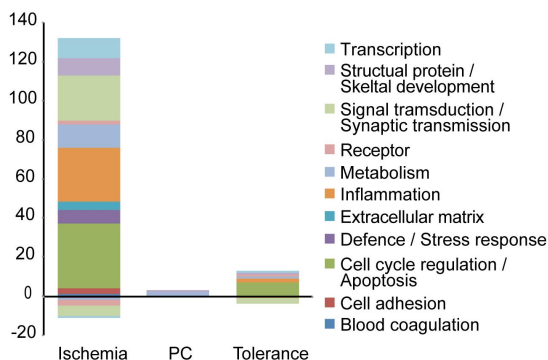
(1) 脳虚血耐性の獲得

5 分間の致命的脳虚血群では、虚血 3 日後より海馬 CA1 で神経細胞死が出現し、5 日後

には 91% の神経細胞が脱落した。3 分間の虚血負荷では遅発性神経細胞死は生じなかった。この 3 分間の非致死性虚血を preconditioning とし、48 時間後に 5 分間の致死性虚血を負荷すると虚血に対する耐性が獲得され、CA1 神経細胞死は 15% に抑制された ($P < 0.01$)。

(2) 虚血脳および虚血耐性獲得脳における遺伝子発現変化

術 2 日後の海馬 CA1 での遺伝子発現を DNA アレイ解析により網羅的に解析した (図 1)。3 分間の非致死性脳虚血では、4 つの遺伝子 (代謝関連 2、構造蛋白質関連 1、不明 1) に発現変化を認めただけであったが、5 分間の致死性脳虚血では、cell cycle 関連遺伝子、apoptosis 関連遺伝子、炎症反応関連遺伝子、シグナル伝達関連遺伝子などの発現誘導をはじめ、計 192 の遺伝子に発現変化が認められた。一方、虚血耐性獲得群では、致死性虚血で誘導された cell cycle 関連遺伝子、apoptosis 関連遺伝子、炎症反応関連遺伝子の誘導が著明に抑制された。

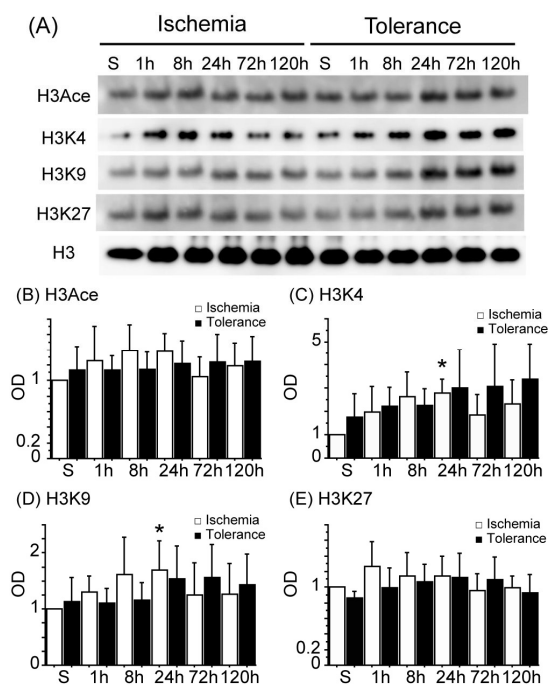


(図 1) DNA : マイクロアレイ解析結果 (虚血 2 日後海馬 CA1 領域での遺伝子発現変化)。Ischemia : 致死性虚血群、PC : 非致死性虚血群、Tolerance : 虚血耐性群

(3) 虚血脳および虚血耐性獲得脳におけるヒストン蛋白質修飾

致死性脳虚血群および虚血耐性群の海馬 CA1 蛋白質を抽出し、虚血後ヒストン修飾の

経時的変化を western blot 解析で検討した。



(図 2) Western blot 解析結果 (脳虚血後ヒストン修飾の変化)

H3 のアセチル化は致死性虚血群および虚血耐性群の両者において明らかな虚血後発現変化を認めなかった。H3K4 のメチル化は、致死性虚血群において虚血後の発現亢進が認められ、ピークに到達した虚血 24 時間後には、その発現は sham に比べて有意差を持って亢進していた ($P < 0.05$)。一方、虚血耐性群においても虚血後に H3K4 メチル化の発現が亢進する傾向を認め、この発現亢進は虚血 72-120 時間後にも持続する傾向を認めた。H3K9 メチル化の虚血後発現変化も H3K4 メチル化と類似しており、致死性虚血群では虚血 24 時間後に sham と比べ有意に発現が亢進していた ($P < 0.05$)。虚血耐性群では、虚血後に H3K9 メチル化発現が亢進し、虚血 72-120 時間後にも発現が持続する傾向が認められた。H3K27 メチル化に関しては明らかな発現変化を認めなかった (図 2)。

以上より、虚血耐性が獲得された脳では、H3K4 や H3K27 のメチル化発現の亢進が持続す

る可能性があり、これが cell cycle 関連遺伝子、apoptosis 関連遺伝子、炎症反応関連遺伝子の発現を調節している可能性が推測された。H3K4 や H3K27 のメチル化とこれら遺伝子制御に関しては、現在更に検討を進めているところである。

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)

[学会発表](計 1 件)

1. 2012年12月4日 山梨大学国立精神・神経医療研究センター合同シンポジウム(東京) 脳虚血における神経細胞障害および保護機構の解明にむけて. 木内博之、吉岡秀幸、八木貴、堀越徹

[図書](計 1 件)

1. 吉岡秀幸、木内博之. 脳虚血のニューロサイエンス. 清水宏明編:脳神経外科診療プラクティス. 脳血管障害の急性期マネジメント. P10-14、2014、文光堂

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉岡 秀幸 (YOSHIOKA, Hideyuki)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20402076

(2)研究分担者

木内 博之 (KINOUCHI, Hiroyuki)
山梨大学・医学工学総合研究部・教授
研究者番号: 30241623

(3)連携研究者

なし