

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790239

研究課題名（和文） 低酸素負荷に対するヒアルロン酸4糖の細胞保護効果の検討

研究課題名（英文） The effect of HA4 against hypoxic-ischemic brain injury

研究代表者

砂堀 毅彦 (SUNABORI TAKEHIKO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00407115

研究成果の概要（和文）：

低酸素・脳虚血負荷時のヒアルロン酸4糖(HA4糖)投与による神経細胞保護効果を検討した。術後24時間で海馬錐体細胞層の神経細胞はHA4糖投与群において対照群と比較して死細胞が有意に減少していた。HA4糖投与群では、術後早期炎症性サイトカイン IL1- β の発現上昇が認められず、上流の転写因子であるNF- κ Bも抑制されていた。これらは、HA4糖がToll様受容体2に対して拮抗的に作用することに起因した。

研究成果の概要（英文）：

I found that hyaluronan tetrasaccharide (HA4)-treated mice rescued the hippocampal pyramidal neurons 24hours after H-I injury, and that the protective effect of neurons by HA4 reduced expression of inflammatory cytokines related to the inactivation of NF κ B. Both *in vivo* and *in vitro* data suggested that the reduced expression of inflammatory cytokines was due to the agonistic effect of HA4 against the Toll-like receptor 2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：解剖学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：低酸素、脳虚血、神経細胞死、ヒアルロン酸4糖、Toll様受容体、炎症性サイトカイン、海馬

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究室では、以前、神経細胞株を用いてヒアルロン酸(HA)の分子サイズに依存した生理活性の差異を検討した。その結果、低分子のヒアルロン酸4糖(HA4糖)に外傷性神経保護作用、神経細胞賦活化作用、神経突起伸張作用、炎症性サイトカインの抑制作用、ストレス蛋白質発現増強作用などが認められた(Xu et al., 2002 J Biol Chem.)。さらに、血清除去と共に誘導される細胞死への影響を検討したところ、細胞死を著明に抑制することが確認された(Xu et al., 2002 J Biol Chem)

2. 研究の目的

そこで、本研究課題では、低酸素障害時におけるHA4糖の作用機序の解明を目的として研究を遂行した。

申請者らは現在までに、K562細胞に対するhyperthermiaの系、PC12細胞における飢餓ストレスの系(Xu et al., 2002 J Biol Chem.)、新生仔マウスの低酸素脳虚血障害の系(Sunabori et al., unpublished data)において、HA4糖の細胞保護効果を明らかにしてきた。しかしながら、各々のモデル系においてHA4糖が同様の機構を介して作用しているのかは不明である。そこで、最も詳細な解析が進んでいるPC12細胞で明らかにされた作用機序(Xu et al., 2002 J Biol Chem.)

が他の実験系にも当てはまるか検討した。また、予測された機構と相違がある場合は、細胞死に関連する分子群の発現を中心に改めて解析することを目的とした。

3. 研究の方法

i). HA4 糖は低酸素脳虚血負荷に対して抵抗性を示すか

生後 7 日齢のマウスに HA4 糖を腹腔投与後、総頸動脈を結紮して、25 分間酸素濃度 8% のチャンバーに供した。24 時間後、海馬錐体細胞の神経細胞死を TUNEL 法により定量した。

ii). 神経細胞死が一過性のものであるかの検討

低酸素脳虚血負荷後の神経細胞死は、遅発的に起こる場合もあるとの報告に基づいて、術後 7 日の海馬の萎縮を観察した。

iii). 術後の早期炎症性サイトカインの発現に関する考察

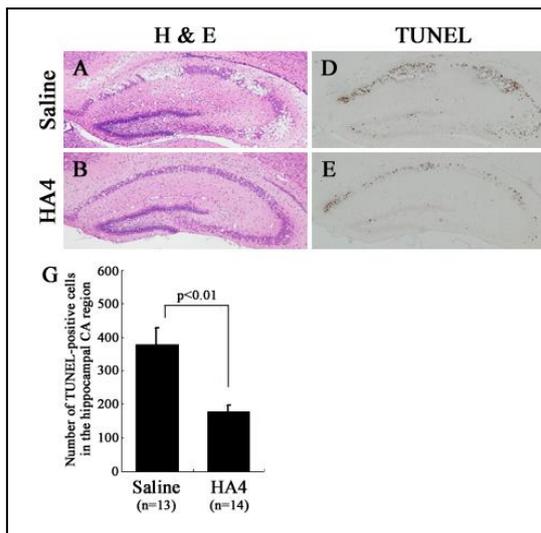
HA4 糖投与群と、対照群における、早期炎症性サイトカインの発現とその上流因子として知られる NF- κ B の活性化を探索した。

iv). HA4 糖の標的として Toll 様受容体 2/4 に着目し、遺伝子欠損マウスを用いて、低酸素脳虚血負荷後の神経細胞死を検討した。

4. 研究成果

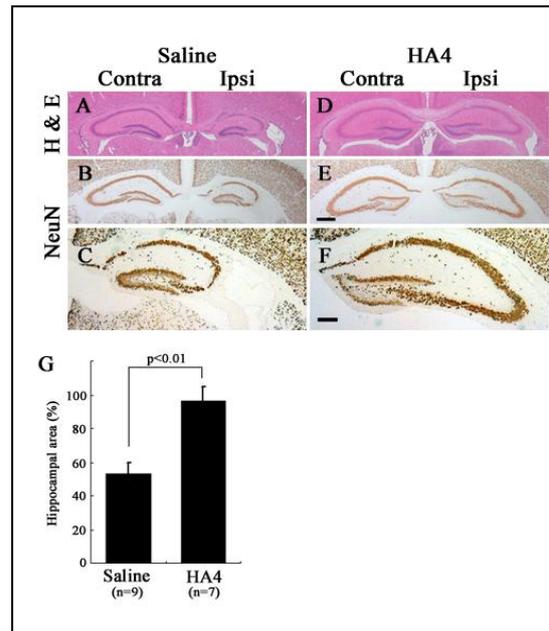
i). HA4 糖は低酸素脳虚血負荷に対して抵抗性を示すか

HA4 糖は生後 6 日齢のマウスに術前 12 時間前と手術直前の 2 回腹腔より投与した。術後 24 時間後に TUNEL 染色を指標として海馬錐体細胞層の細胞死を検討したところ HA4 糖投与群では、生理食塩水を投与した対照群と比較して死細胞数が有意に減少していることが確認された。



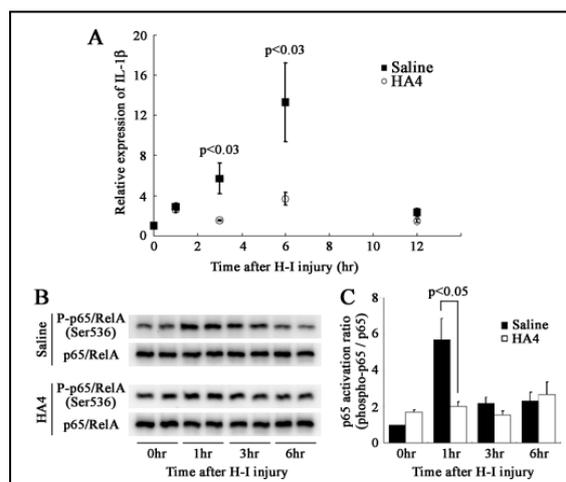
ii). 神経細胞死が一過性のものであるかの検討

HA4 の効果が一時的に細胞死を遅延させた可能性を検討するため、術後 7 日の海馬の萎縮を定量化したが、こちらにおいても HA4 投与群では対照群と比較して萎縮が著明に減少していた。



iii). 術後の早期炎症性サイトカインの発現に関する考察

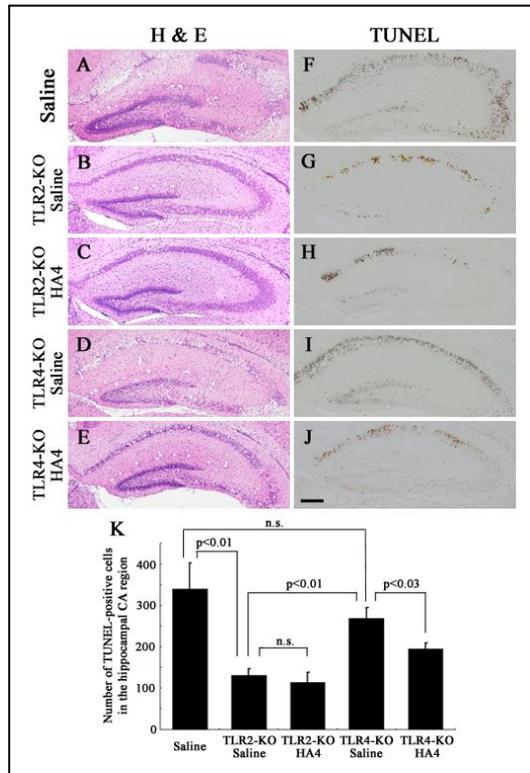
HA4 糖投与による神経細胞保護効果の分子機序を明らかにするために早期炎症性のサイトカインである IL1- β の発現を確認したところ、対照群で術後上昇する IL1- β の発現が HA4 糖投与群では有意に抑制されていた。また、IL1- β の転写に重要な役割をもつ NF- κ B 複合体の活性化も対照群と比較して HA4 糖投与群では抑制されていた。



iv). HA4 糖の標的として Toll 様受容体 2/4 に着目し、遺伝子欠損マウスを用いて、低酸

素脳虚血負荷後の神経細胞死を検討した。

NF- κ B 複合体の上流であり、かつ HA の受容体として知られている Toll 様受容体 2 または 4 の遺伝子欠損マウスに対して低酸素/脳虚血負荷を与えたところ、Toll 様受容体 2 遺伝子欠損マウスにおいて HA4 糖投与と同様の神経細胞保護効果を示した。



以上の結果より、HA4 が Toll 様受容体 2 に対して拮抗的に働くことで低酸素/脳虚血負荷における神経細胞の保護効果を示すことが強く示唆された。

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 3 件)

①Suyama S, Sunabori T, Kanki H, Sawamoto K, Gachet C, Koizumi S, Okano H. Purinergic signaling promotes proliferation of adult mouse subventricular zone cells. *J Neurosci*. 2012 年 第 32 卷 27 号 9238-9247

②Matsumoto A, Onoyama I, Sunabori T, Kageyama R, Okano H, Nakayama KI. Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of stemness and neuronal-glial differentiation in neural stem cells. *J Biol Chem*. 2011 年 第 286 卷 15 号 13754-13764

③Niibe K, Kawamura Y, Araki D, Morikawa S, Miura K, Suzuki S, Shimmura S, Sunabori T, Mabuchi Y, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. 「Purified mesenchymal stem cells are an efficient source for iPS cell induction.」 *PLoS One* 2011 年 第 6 卷 3 号 e17610

[学会発表] (計 6 件)

①砂堀毅彦、内山安男 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 Toll 様受容体を介したオートファジー誘導機構について 2013 年 3 月 高松

②砂堀毅彦、小池正人、内山安男 第 35 回日本神経科学大会 ヒアルロン酸 4 糖は低酸素/脳虚血負荷依存性に Toll 様受容体 2/4 の活性化を抑制することで海馬錐体細胞に神経保護効果を示す 2012 年 9 月 名古屋

③Takehiko Sunabori, Masato Koike, Yasuo Uchiyama Hershey Conference Inactivation of Toll-like receptors 2/4 by hyaluronan tetrasaccharide suppresses hypoxic-ischemic injury in hippocampal pyramidal neurons. 2012 年 6 月 London, UK

④砂堀毅彦、小池正人、内山安男 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 Protective effects of hyaluronan tetrasaccharide on hippocampal pyramidal neurons in neonatal mouse brains after hypoxic-ischemic injury 2012 年 3 月 山梨

⑤Takehiko Sunabori, Masato Koike, Yasuo Uchiyama 第 42 回北米神経科学学会 Neuro2011 Protective effects of hyaluronan tetrasaccharide on hippocampal pyramidal neurons in neonatal mouse brains after hypoxic-ischemic injury. 2011 年 11 月 Washington DC, USA

⑥砂堀毅彦、小池正人、内山安男 第 34 回日本神経科学大会 虚血性侵襲に対するヒアルロン酸 4 糖の神経細胞保護効果の検討 2011 年 9 月 横浜

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: オートファジー性細胞死抑制剤
 発明者: 内山安男、小池正人、砂堀毅彦、大貫洋二、三池神也
 権利者: 上記
 種類:
 番号: 特願 2011-054647

出願年月日：平成23年3月11日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/shinkei_kozo/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂堀 毅彦 (SUNABORI TAKEHIKO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00407115