

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462154

研究課題名(和文) 虚血耐性現象におけるNrf/ARE signaling pathwayの関与

研究課題名(英文) Involvement of Nrf / ARE signaling pathway in ischemia tolerance phenomenon

研究代表者

八木 貴 (YAGI, Takashi)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：90345702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの一過性前脳虚血モデルを用いて、虚血耐性現象のNrf2/ARE signaling pathwayの関与と神経保護機序を検討した。一過性前脳虚血後、Nrf2の発現は神経細胞、アストロサイト、ミクログリアの各細胞に発現が見られ、致死性虚血と非致死性虚血との間でその発現動態に差が見られた。虚血耐性モデルでは、Nrf2の発現が長期に亘って増幅、維持されている傾向を認めた。虚血耐性現象の神経保護機序には、神経細胞の内因性保護機序に加え、グリア細胞のNrf2経路の活性化も関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the involvement of Nrf2 / ARE signaling pathway and the neuroprotective mechanism of ischemic tolerance phenomenon using rat transient forebrain ischemia model. Following transient forebrain ischemia, expression of Nrf2 was observed in neuronal cells, astrocytes, and microglial cells, and the expression kinetics differed between lethal ischemia and non-lethal ischemia. In the ischemia tolerance model, the expression of Nrf2 tended to be amplified and maintained over a long period of time. It was suggested that the neuroprotective mechanism of the ischemic tolerance phenomenon may involve the activation of the Nrf2 pathway of glial cells in addition to the intrinsic protective mechanism of neuronal cells.

研究分野：脳虚血基礎

キーワード：neuroprotection ischemic tolerance

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、神経変性疾患や癌、および加齢などの病態に深く関わっている。炎症性細胞から産生される reactive oxygen (ROS) や nitrogen species (RNS) は酸化ストレスを惹起し、これが癌細胞の形成や他の多数の疾患に関わっている。脳虚血における神経細胞障害においても酸化ストレスの重要性は確立している。

アストロサイトは、神経細胞の栄養補給や環境維持の観点で神経細胞と密接に相互作用しているのみならず、神経細胞の興奮性の調節や神経伝達にも深く関与している。近年では、酸化ストレスが関与している ALS や Parkinson disease、さらに Alzheimer disease などの神経変性疾患モデル動物で、アストロサイトでの Nrf2 の活性化による神経細胞保護効果が示されている。

虚血耐性とは、先行する短時間の虚血負荷が、引き続き致死性虚血に対して一過性に強力な抵抗性を獲得する現象で、低体温療法と並んで確実な脳保護効果を示すとされ、脳梗塞治療の観点から注目されている。近年では、脳微小血管・アストロサイト・神経細胞を一つの機能構造体とする Neurovascular unit (NVU) という概念が提唱され、これを標的とした治療戦略の必要性が強調されている。すなわち脳虚血においては、脳血管関門 (blood-brain barrier : BBB) の変化やアストロサイトの応答についての研究が進められているが、脳虚血耐性現象におけるアストロサイトの関与については未だ十分に解明されていない。

2. 研究の目的

Keap1/Nrf2 システムは、生体防御のための普遍的かつ広範な酵素群の主要な制御機構であり、酸化ストレスに対する細胞防御機構として種々の疾患において治療のターゲットとされる。中枢神経においては、アストロサイトを中心に Nrf2-ARE signaling pathway

が活性化され、神経保護に関与していることが示唆され、ALS や Alzheimer disease 等の難治性疾患の治療アプローチとしても注目されている。脳虚血においては、Nrf2 の活性化による神経細胞保護効果が示唆されているものの、アストロサイトの関与する細胞保護機序に関しては十分に解明されていない。本研究の目的は、ラット一過性前脳虚血モデルを用いて虚血耐性現象の Nrf2/ARE signaling pathway の関与と神経細胞保護機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 両側頸動脈の遮断と低血圧を併用したラット一過性前脳虚血モデル (Smith モデル) を使用した。このモデルでは、3 分間の非致死性虚血負荷単独では遅発性神経細胞死は生じないが、5 分間の致死性前脳虚血後、3 日目以降にほとんどの海馬 CA1 錐体細胞に遅発性細胞死が生じる。しかし、preconditioning として 3 分間の非致死性虚血負荷後、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、約 85% の CA1 神経細胞が保護される。これを虚血耐性モデルとして使用した。

(2) 免疫染色: 3 分の非致死性虚血群、5 分の致死性虚血群、虚血耐性群の各群で、虚血再灌流後 1, 4, 8 時間、1, 2, 3, 7 日の各タイムポイントにおいて、パラフォルムアルデヒドで灌流固定後、脳を摘出し、ピプラトームで 50 μm 厚の脳冠状切片を作成し、Nrf2 の局在と発現の経時的変化について検討した。また NeuN, GFAP, Iba-1 との蛍光二重染色を行い、Nrf2 の局在を検討した。

(3) Western blot: 虚血前、虚血後 1, 4, 8 時間、1, 2, 7 日目の時点でラットを深麻酔下に断頭し、brain matrix を用いて脳冠状断を作成し、氷上で両側海馬を削出し、顕微鏡下に大脳皮質または海馬 CA1 領域、顆粒層を摘出する。脳を lysis buffer を用いてホモジネートし、4 で遠沈後、上清を抽出して

全分画のサンプルを作成した。それぞれの群において、虚血後に発現する Nrf2 の動態を各抗体を用いて検討した。

(4) 虚血耐性群では、3 分の非致死的虚血負荷後、2 日のインターバルを経て 5 分間の致死的虚血を負荷し、その後 1, 4, 8 時間、1, 2, 7 日目の各タイムポイントで、免疫染色用の標本では灌流固定を行い、Western blot 用の標本では、氷上で海馬を作出し海馬 CA1 領域、顆粒層を摘出し、サンプルを作成した。

(5):Nrf2 刺激薬 trichostatin A(TSA), Sulforaphane(SF)および Nrf2 阻害薬投与による虚血耐性の脳保護効果に与える影響の検討

Nrf2 刺激薬および阻害薬は、非致死的虚血直前、および致死的虚血直前の二つのタイムポイントで脳室内投与を行う。脳室内投与後、海馬の免疫染色および Western blot のサンプルを用いて、アストロサイトにおける Nrf2 発現の増幅および抑制を確認する。Keap1/Nrf2 pathway を活性化する薬剤の SF は、同様に非致死的虚血直前、および致死的虚血直前のタイムポイントで 10 または 50mg/Kg の量で全身投与する。さらに、最終の致死的脳虚血負荷後 5 日目に、断頭しクレシルバイオレットおよび TUNEL 染色を行い、海馬 CA1 の細胞傷害の評価を行う。

4 . 研究成果

(1) 虚血耐性モデルの確立 約 50 匹の虚血モデルを作成し、海馬 CA1 領域に遅発性細胞死が誘導された。さらに、虚血耐性モデルとして 3 分間の非致死的虚血負荷後、48 時間後に 5 分間の致死的虚血負荷を加え、その 5 日後に断頭し虚血耐性現象による神経保護効果を確認した。虚血耐性モデルでは、非致

死的虚血負荷後の神経細胞死が約 70%減少することを確認した。

Table1

Group	Number of viable	
	neurons	% control
Sham	166 ± 9.95 (n=5)	100%
3 min ischemia	163.6 ± 5.22 (n=5)	98.6 ± 3.14%
5 min ischemia	2.2 ± 1.72 (n=5)	1.3 ± 1.2%
3+5 min ischemia	130.4 ± 19.74 (n=5)	78.6 ± 0.1%*

*P < 0.01 Vs 5 min ischemia group

(2) 免疫染色による Nrf2 発現の検討 脳冠状断スライスの 3 分間の非致死的虚血群と、5 分間の致死的脳虚血群において、両群間で虚血から 8 時間以降に海馬 CA1 神経細胞層および顆粒層での Nrf2 の発現が確認され、その発現は脳虚血負荷から 7 日まで継続していた。免疫二重染色により局在を確認すると、Nrf2 は神経細胞、アストロサイト、ミクログリアの全てで発現が検出された。神経細胞への発現は、両群で虚血後 8 時間の早期に主に CA1 神経細胞層で発現の増幅が見られたが、非致死的虚血から 2 日目で神経細胞に強く見られた。一方、アストロサイト、ミクログリアへの発現は虚血後 7 日目に主に顆粒層で最も明瞭に見られた。5 分の致死的虚血群では、虚血から 7 日目の神経細胞死が生じる時期には、神経細胞への Nrf2 の発現は顕著に低下した。

(3)western blot では、海馬 CA1 領域のサンプルで、3 分間の非致死的虚血群では、虚血後 8 時間から 2 日にかけて Nrf2 の発現の増幅が確認され、7 日目には発現は低下した。5 分間の致死的虚血群では、虚血後 8 時間で増幅を認めるが、虚血後 1 日以降は発現の低下がみられた。顆粒層のサンプルでは、虚血後

7日目に Nrf2 の発現増幅がみられた。免疫染色の結果を踏まえると、CA1 サンプルでの発現増幅は神経細胞での Nrf2 の発現増幅が示唆され、顆粒層での発現増幅はアストロサイトまたはミクログリアでの発現増幅が示唆された。

非致死性虚血と致死性虚血で Nrf2 発現の動態に差があり、一過性全脳虚血負荷後の Nrf2 の各細胞への発現が神経細胞生存の制御に関わっていることが示唆された。

(4) 2回の虚血負荷を行う虚血耐性群では、海馬 CA1 サンプルにおいて Nrf2 の発現増幅は致死性虚血負荷後1時間の早期から増幅が見られ、2日まで維持され、7日後にもコントロールレベルに維持されていた。非致死性虚血群と比較し、全体に Nrf2 の発現が長期に亘って増幅、維持されている傾向を認めた。顆粒層サンプル群では、虚血負荷後2日から7日で Nrf2 発現の増幅がみられ、神経細胞死にいたる致死性虚血群と比較すると早期から発現の増幅が確認された。

一過性前脳虚血後、神経細胞およびグリア細胞の両者に発現がみられた。神経細胞は早期に、グリア細胞は虚血負荷後2日以降の晩期に発現がみられた。

考察

本研究の現時点での成果としては、ラットの一過性脳虚血負荷後に、海馬の神経細胞や顆粒層のアストロサイト、ミクログリアに Nrf2 の発現がみられ、虚血の程度によってその発現動態が異なることが示されたことである。細胞死にいたる虚血と至らない虚血で動態に差があることは、Nrf2 が神経細胞のみならず、グリア細胞においても細胞の生存の制御に関与していることが示唆された。

虚血耐性群では、海馬 CA1 神経細胞で Nrf2 の発現が長期にわたって見られること、晩期にグリア細胞で発現が維持されていた結果からは、虚血耐性現象の神経保護機序には、

神経細胞の内因性保護機序に加え、グリア細胞の Nrf2 経路の活性化も関与している可能性が示唆された。

今後、Nrf2-ARE signaling pathway の下流遺伝子の発現を検討することで、神経保護機序をさらに解明する必要がある。また、虚血耐性群において、Nrf2 刺激薬の投与と Nrf2 阻害薬の投与における神経保護効果への影響は十分に検討できていないため、今後の課題である。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 貴 (YAGI, Takashi)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：90345702

(2) 研究分担者

吉岡 秀幸 (YOSHIOKA, Hideyuki)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：20402076
木内 博之 (KINOUCHI, Hiroyuki)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：30241623