

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861475

研究課題名(和文) 神経細胞死後の二次変性・他細胞障害に至る経路の解明

研究課題名(英文) Research into the mechanisms of secondary neuronal cell death and cytotoxic reaction

研究代表者

石川 裕人 (ISHIKAWA, HIROTO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10434945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障は中枢神経系の障害であり、神経細胞保護がその障害を治療していく上での重大な課題である。我々は2013年に脳梗塞が全身諸臓器に悪影響を与える事を示唆した(Stroke, 2013)。本研究ではin vitro 脳梗塞モデルを用い、他細胞を傷害する可能性のある液性因子と思われる物質を同定し、中枢神経系疾患の新しい治療薬を開発することを目的とした。残念ながら、有効な液性因子の同定には至らず、障害を受けた神経細胞から液性因子が放出されるという仮説は覆された。むしろ、液性因子によるものではなく、細胞間インタラクティブである可能性が高いと結論付けた。今後も更なる追加検討が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma is common ocular disease, characterized by optic nerve disorders as results of retinal ganglion cells (RGCs) death. Optic nerve belongs to central nervous system (CNS), so it is very important to avoid RGC and CNS damage for rescue patients with glaucoma. We had reported that ischemic stroke brain send indirect cell death signals to other organs. Thus, we have tried to identify some molecules from in vitro ischemic model of cultured neural cells that have a possible relationship between damaged neural cells and another cell death, and explored new drug targets with neuroprotective effects. Unfortunately, we failed to identify possible molecules in the culture medium from oxygen glucose deprivation (OGD) model for the cell death signalling pathway. This suggested that the molecules were not released from damaged cells to the culture medium and the signal might be send via cell-cell interaction. So we need further examination for the mechanism of impacts of damaged cells.

研究分野：眼科学

キーワード：神経細胞 OGDモデル アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は日本においてすでに中途失明原因の第一位となっている(中江ら、厚労科研難治性疾患克服研究事業 2006)。また中枢神経系の障害の代表である、脳梗塞に至っては世界的にみても、死亡原因の上位、身体障害の後遺症をのこす原因疾患の上位である。これら中枢神経系の障害時に、障害部位近傍の神経組織障害、すなわち二次変性や、他臓器の障害を来すことが知られている(H Ishikawa et al. Stroke, 2013)。当然のことながら、中枢神経は一度障害をうければ再生できる組織ではなく、現在の治療はあくまでも障害範囲を限局化させ、二次変性や他臓器への影響を極力抑えることが行われている。眼科領域では、緑内障が慢性的な網膜神経節細胞(RGCs)のアポトーシスに伴う視神経軸索障害と考えられているが、既存の治療は眼圧をコントロールしてこのRGCs死を抑制することが主目的であった。

本研究では、中枢神経系の障害時に起こる、隣接する神経細胞・組織への二次変性や、障害部位からは遠く離れた組織・臓器への障害を来す機序を解明することを目的とした。2013年当時、我々は *in vivo*, *in vitro* 両方の脳梗塞モデルを用いて、障害を受けた中枢神経組織からなんらかの因子が放出され、他臓器である心筋が障害されることを *in vitro*, *in vivo* で証明した(H Ishikawa et al. Stroke, 2013)。ただし、その原因となる物質の特定とまでは至っておらず、本研究ではその物質を特定し、障害された中枢神経細胞の他細胞への影響を調べ、二次変性、他組織・臓器への影響の機序を解明する一端になると確信している。

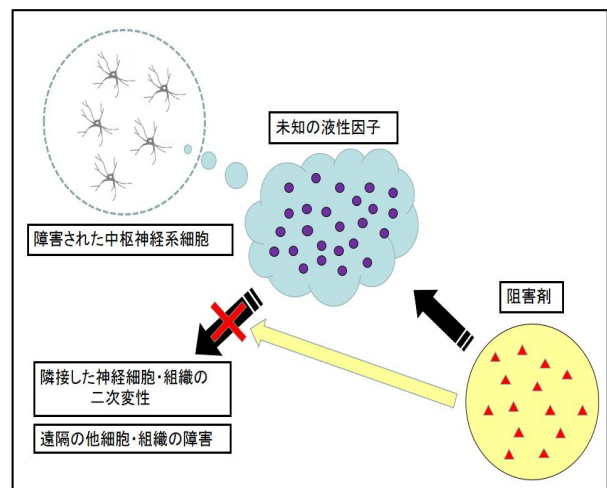
本研究は中枢神経障害後の二次変性や多臓器障害といった“負の連鎖”を断つことに重きを置いている。先にも述べたが、障害された中枢神経系組織の再生は実験レベルでは幹細胞治療や遺伝子治療などで一定の成果を得ている。しかしながら、完全に障害前の状態に還元できる状態ではなく、また高等哺乳類であるヒトでの成果は技術的・倫理的にもいまだ成果を上げているとは言い難い。中枢神経系障害の治療という大きなカテゴリーでは、その戦略は、障害を正常なものに置き換える再生という柱と、障害自体を軽度にするという神経細胞死保護という柱の2本立てであると考えられる。本研究では、後者の神経細胞死保護に焦点をあて、障害を受けた神経細胞がどのような因子を放出し他の細胞に影響を及ぼすのかを検討する。そして、その結果をもとに効率よく二次変性を予防することが可能になるかを研究していく予定である。将来的に、再生医療の実用化の目途が立った際に、この神経細胞死保護の技術が確立されていれば、治療効果が相乗的に増強することは容易に想像できる。

研究代表者は眼科医であるが、Neuroscience 領域での research fellow を

University of South Florida で修了しており、これまでの脳梗塞領域での研究成果を眼科領域に応用していくことが可能である。また、脳梗塞や cell therapy の分野で世界的な権威である Dr. Cesar V Borlongan と共同研究を現在でも行っており、眼科領域のみならず、脳科学の分野においても本研究の成果を応用することが可能となるであろう。

### 2. 研究の目的

本研究では、神経細胞死保護に焦点をあて、障害を受けた神経細胞がどのような因子を放出し他の細胞に影響を及ぼすのかを検討する。そして、その結果をもとに効率よく二次変性を予防することが可能になるかを研究し、神経保護作用をもつ新規物質の創薬を目的とする。



### 3. 研究の方法

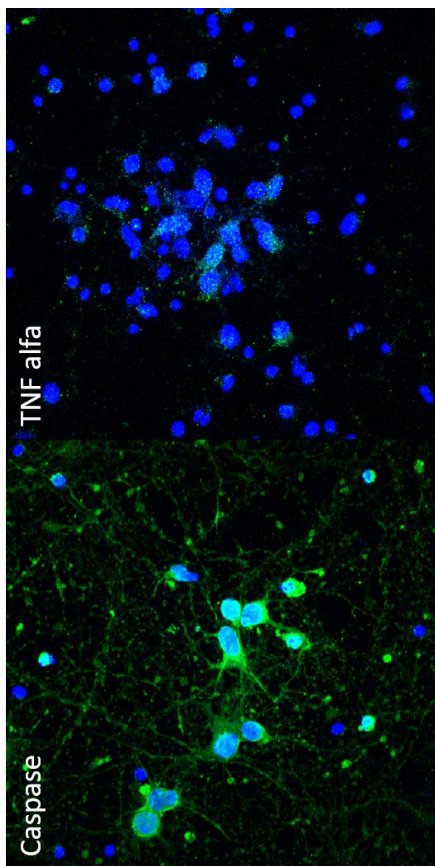
障害された中枢神経系細胞から放出される液性因子の同定が本研究の最大の目的である。具体的には H26 年度は *in vitro* で培養細胞を用いた実験を行う。この培養実験とは培養神経細胞の oxygen glucose deprivation (OGD) モデルのことであり、次のようなプロトコールで行った。OGD: The neuronal cells were initially exposed to OGD medium (no Glucose) and incubated in an anaerobic chamber containing 95% nitrogen- 5% carbon dioxide mix gas for 90 min at 37C (hypoxic-ischemic condition). After the condition for neuronal cells, the culture was reintroduced under the no hypoxic-ischemic condition like a “reperfusion” containing 5mM glucose in the normoxic incubator for 2 hours. Then the supernatant was collected from the culture and subjected to following experiments.

次に、培養上清の解析、soluble factors の同定を行い、同定には高速液体クロマトグラフィを用い、成分分析を行う。同定さ

れた候補物質を網羅的に Western blot 法、PCR 法、フローサイトメトリー法を用いて細胞上清・正常培養細胞・障害培養細胞での発現を調査する。H27 年度は、H26 年度の解析結果より候補となる物質を選別し、in vivo でどのように発現しているかを動物実験を行い判定する。In vitro, in vivo 両方で evidence のある結果が出た場合には、H28 年度に拮抗する物質の作製に着手する

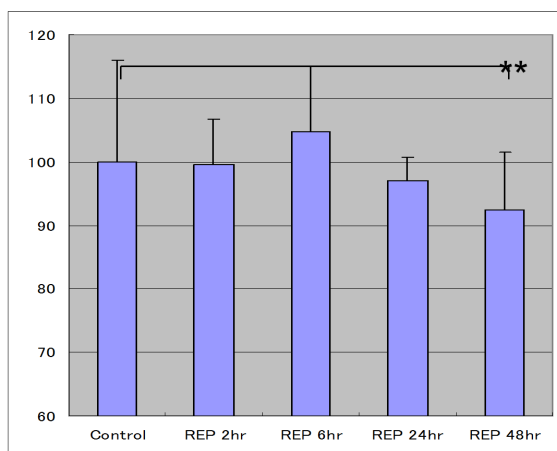
#### 4. 研究成果

1) 培養神経細胞における脳梗塞モデルの確立：ラット大脳皮質細胞の組織培養を行い、in vitro 脳梗塞モデルである OGD モデルの確立にまず注力した。我々の検討では、低酸素(酸素濃度 1%) 培養液を PBS に置換し、90 分間培養した。培養神経細胞は細胞死マーカーとしてアポトーシス・オートファジー・ネクローシス関連抗体にて免疫細胞染色、PCR を行った。結果、アポトーシス、オートファジーを認めるものの、ネクローシスを引き起こしている細胞の数は少なく、いわゆる死にかけ dying の状態の細胞を培養することが可能であった。



アポトーシスはある程度惹起されている(Caspase positive)が、ネクローシスはほとんど起こっていない(TNF alpha negative)

また培養神経細胞のミトコンドリア活性を調べるために MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) アッセイを行った。MTT アッセイにて OGD モデルにおける培養神経細胞のミトコンドリア活性の減少を証明した。



#### 2) 培養上清の解析

OGD モデルを確立し、その上清の解析へと研究はシフトした。液体クロマトグラフィを用い、上清内タンパクの同定を開始するも、ベース培養液との差異は認められなかった。実験の手法の問題か、実際に上清中にタンパクが存在しないのかという判断に苦しみ、ここで実験が停滞を迎えた。最終的に、液性因子の同定は不可能であったが、以上の問題点を今後は解決すべく、予算的に可能であれば細胞間インタラクションを解明する方向で考えている。

#### 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)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 裕人 (ISHIKAWA, Hiroto.)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10434945

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )