

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19591004
 研究課題名（和文） 酸化型ガレクチン-1のマクロファージを介した末梢神経損傷後再生機構の解明
 研究課題名（英文） Regeneration research of peripheral nerve injury via macrophage stimulated by oxidized galectin-1
 研究代表者
 吉村 和法（YOSHIMURA KAZUNORI）
 日本医療科学大学・保健医療学部・教授
 研究者番号：20158497

研究成果の概要（和文）：

マクロファージを酸化型ガレクチン添加により刺激し、蛍光差異二次元電気泳動法(2D-DIGE)を用いて、酸化型ガレクチン-1のシグナル伝達経路に関与する蛋白質を経時的に同定した。それら蛋白質はアルギナーゼ、GRP70,トランスアルドラーゼ、GMF、マレイン酸デヒドロゲナーゼ等であり、さらにリアルタイムPCR、ウエスタンブロット、カルシウムイメージングなどによる詳細な解析を行っているところである。

研究成果の概要（英文）：

We identified several kind of proteins related with signal transduction of oxidized galectin-1 in macrophages stimulated with oxidized galectin-1 by fluorescence two dimensional difference gel electrophoresis (2D DIGE). The proteins were arginase, GRP78, transaldolase, glia maturation factor, and malate dehydrogenase. We have been investigating about macrophages stimulated by oxidized galectin-1 in detail with Real Time RT-PCR, Western blot, Calcium Imaging, and proteome analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態生化学・神経再生促進

1. 研究開始当初の背景

神経の再生機構を解明することは様々な外科治療において非常に重要な課題である。末梢神経は損傷後神経再生を行うが、軸索再生がどのような因子により誘導されているのかの詳細は不明である。国内で連携して研究を行っている堀江らのグループが、腎由来

のCOS1細胞の培養上清中に末梢神経再生促進因子が存在し、それがガレクチン-1であること、しかもレクチン活性を持たない酸化型ガレクチン-1であることを突き止めた。

末梢神経が損傷されると、その軸索やシュワン細胞から還元型ガレクチン-1が放出され、酸化型ガレクチン-1に変えられる。酸

化型ガレクチン-1がマクロファージの未知のレセプターに結合すると、未知のシグナル伝達が生じ、結果として神経栄養因子が放出される。放出された栄養因子は損傷末梢神経に作用し、神経再生が促進される。これら一連のプロセスの中で、酸化型ガレクチン-1に対するマクロファージのレセプター、および酸化型ガレクチン-1がマクロファージのレセプターに結合した後のシグナル伝達経路、および分泌される神経栄養物質の解明はされていなかった。

2. 研究の目的

自ら確立した高感度2次元電気泳動、液体クロマトグラフィー質量分析装置を組み合わせたプロテオーム解析技術(吉村和法.埼玉医科大学雑誌 第31巻第3号 p175-p176. 2004)を用いてマクロファージにおける酸化型ガレクチン-1のレセプター、その情報伝達経路、および培養液中に分泌される神経栄養因子の解明を進め、末梢神経損傷後再生機構の解明を目指す。

このことは、神経再生・修復を含む再生医学および神経再生の新薬の開発にもつながり、再生医療に大いに貢献できるものと思われる。

3. 研究の方法

(1) マクロファージの表面レセプターの同定

酸化型ガレクチン-1に対するマクロファージ表面レセプターを同定するために、酸化型ガレクチン-1を添加し、刺激したものと刺激なしのマクロファージの膜蛋白質のみを7回膜貫通型蛋白質抽出キットを用いて抽出した。膜タンパク質抽出キットで得られた蛋白質を酸化型ガレクチン-1をリガンドとしたアフィニティカラムにアプライして結合したタンパク質を回収した。回収したタンパク質を2次元電気泳動で精製してから液体高速クロマトグラフィー/タンデム型質量分析装置で酸化型ガレクチン-1に結合するレセプタータンパク質を同定につなげる予定である。

(2) 酸化型ガレクチン-1のシグナル伝達経路に関与する蛋白質の同定

蛍光差異2次元電気泳動法(2D-DIGE)を用いて、酸化型ガレクチン-1の刺激で差異のある蛋白質の候補を抽出し、LC-MS/MSによる分析によって同定した。

(3) 酸化型ガレクチン-1で誘導されて分泌される神経栄養因子の同定

酸化型ガレクチン-1を添加し、刺激したマクロファージの培養液と、刺激なしのマクロファージの培養液の濃縮をし、サンプルを集めた。またコントロールとして還元型ガレクチン-1あるいはウシ血清アルブミンで刺激

した培養上清を集めた。それらの上清を炭酸水素アンモニウムに透析してから凍結乾燥後、2次元電気泳動用緩衝液に可溶化してから2次元電気泳動を行ない、SyproRubyで蛍光染色した。それらを画像取り込み装置Typhoon9410にかけて画像を取り込んだ。取り込んだ画像を比較解析して酸化型ガレクチン-1で特異的に分泌増加されていると推測されるスポットを切り出してトリプシンで酵素消化後、LC-MS/MSでペプチド解析を行ない、目的のタンパク質を同定する。高感度2次元電気泳動法で解析、神経栄養因子を同定につなげる予定である。

(4) 同定された物質についての確認実験
ウェスタンブロット、ELISA、およびリアルタイム RT-PCRなどの手法を用いて確認実験を行った。

4. 研究成果

(1) マクロファージの表面レセプターの同定

膜タンパク質回収が終了したところで表面レセプターの同定に至っていない。

(2) 酸化型ガレクチン-1のシグナル伝達経路に関与する蛋白質の同定

30分刺激で発現差異のある蛋白質として以下の結果を得ていた。

GRP78, Rho, arginase 1, hsp8, transaldolase 1, GMF、マレイン酸デヒドロゲナーゼ等であった。1時間刺激についてさらに2D-DIGEを行い、解析した。解析で得た結果は以下のようなものであった。(図1, 2参照)

SyproRuby post DIGE cs/ox/bsa-Macrophage kDa

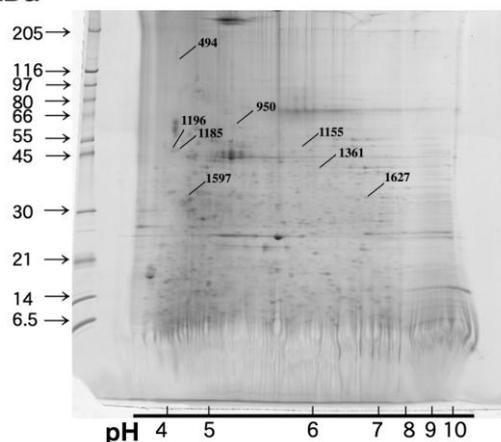
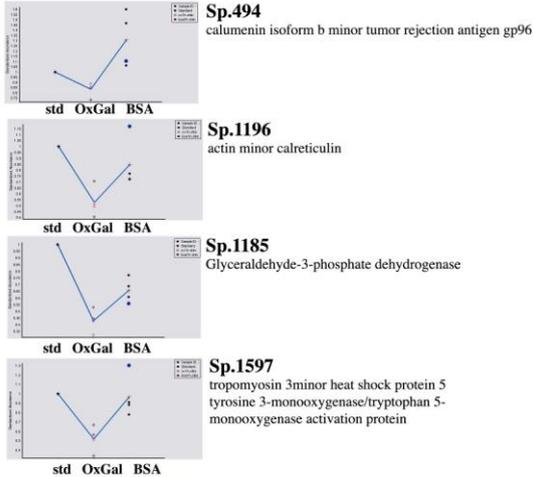
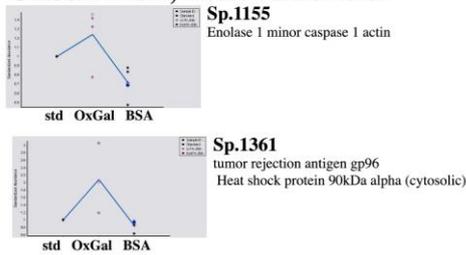


図1. マクロファージ2次元電気泳動像
(1時間刺激解析時マスターゲル)

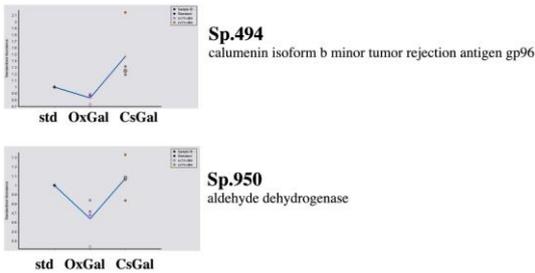
OxGal <BSA, T-test value <0.05



OxGal >BSA, T-test value <0.05



OxGal <CsGal, T-test value <0.05



OxGal >CsGal, T-test value <0.05

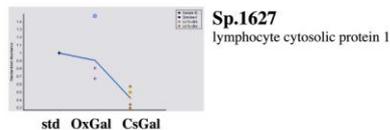


図2. 1時間刺激時解析結果
さらに刺激時間を2時間にし、解析を試みる予定であり、サンプル調整が終わったところである。

(3) 酸化型ガレクチン-1で誘導されて分泌される神経栄養因子の同定
酸化型ガレクチン-1を添加し、刺激したマクロファージの培養液と、刺激なしのマクロファージの培養液を集め、濃縮、透析、凍結乾燥したサンプルを2次元展開した結果は右図のようであった。(図3、図4参照)

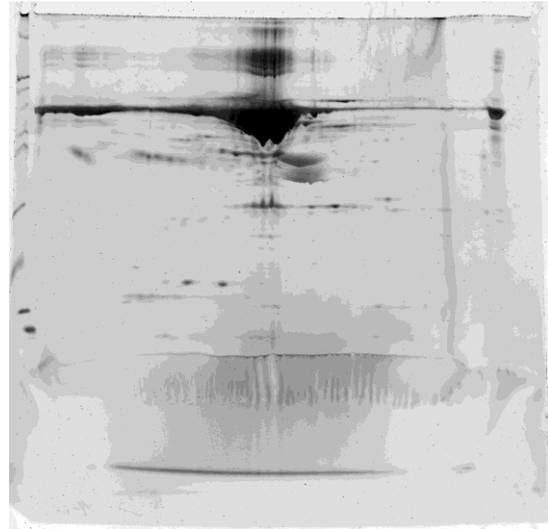


図3. 酸化型ガレクチン-1添加前マクロファージ培養上清の2次元電気泳動像

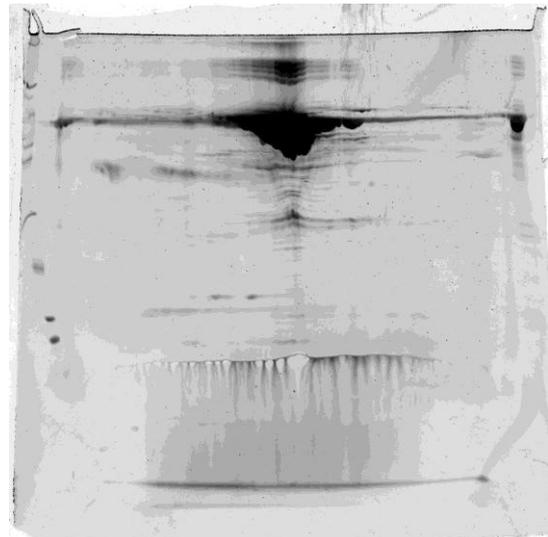


図4. 酸化型ガレクチン-1添加後マクロファージ培養上清2次元電気泳動像
特に21 kD ~45 kDのスポット群に差異がありそうな結果を得たので、さらに再現性を確認し、詳細な統計解析を行う予定である。

(4) 同定された物質についての確認実験
①既に同定済みであった30分酸化型ガレクチン-1刺激によって有意な差異があったタンパク質 GRP78, Rho, arginase 1 について、さらなる詳細な解析をリアルタイムPCRで行った。
(図5参照)

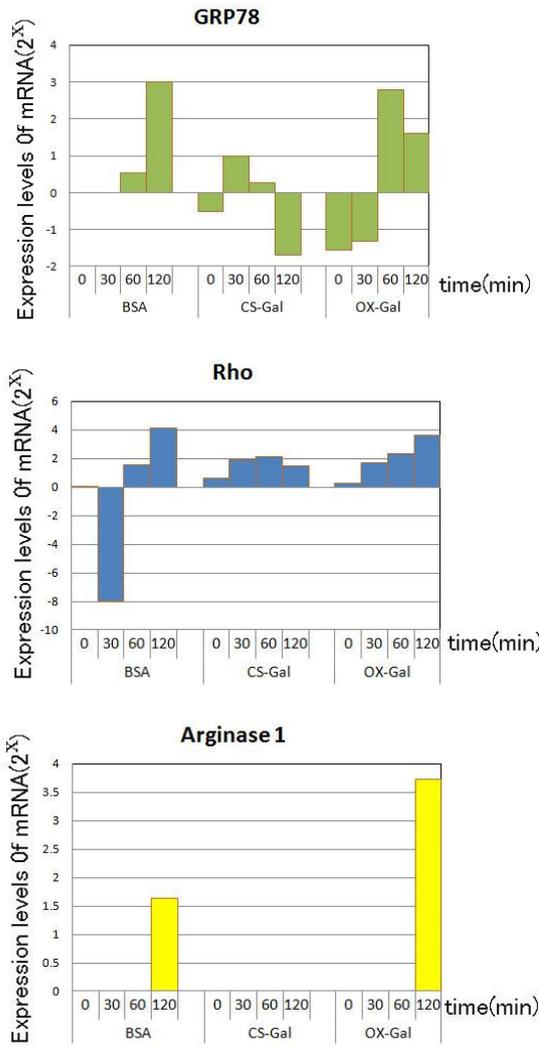


図5. リアルタイム PCR の結果

プロテオーム解析との明らかな相関はみられなかった。しかし、リアルタイム PCR の結果により、刺激時間の違いで mRNA の興味深い挙動の変化がみられた。

②また、arginase 1 については Western blot による発現解析を行った。(図6参照)

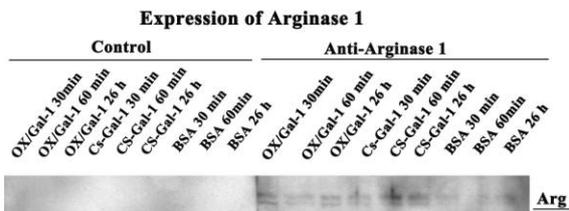


図6. Western blot による発現解析

酸化型ガレクチンで、arginase 1 の発現が

60 分で一回抑制され、その後また増加していた。還元型ガレクチン、BSA では時間経過による増加傾向がみられた。

リアルタイム PCR の結果、Western blot の結果から、プロテオーム解析においても、刺激時間を振っての解析を組み合わせることで、相関を見ることができるともかもしれない。

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 21 件)

① Nakamura A, Kawamura K, Kametani F, Nakamoto H, Goto S. Biological significance of protein modification in aging and calorie restriction. Ann New York Acad Sci 2010, (in press). (査読有)

② Yokomori H., Oda M., Yoshimura K., Watanabe S., Hibi T.: Aberrant expressions of aquaporin-1 in association with capillarized sinusoidal endothelial cells in cirrhotic rat liver. Med Mol Morphol., 2010, 43(1):6-12 (査読有)

③ Nagane, M., Yoshimura, K., Watanabe, SI., Nomura, M. A possible connection between psychosomatic symptoms and daily rhythmicity in growth hormone secretion in healthy Japanese students. J Circadian Rhythms. 2009, 7:10. Doi :10.1186/174-3391-7-10 (査読有)

④ Yokomori, H., Oda, M., Yoshimura, K., Nagai, T., Fujimaki, K., Watanabe, S., Hibi, T. Caveolin-1 and Rac regulate endothelial capillary-like tubular formation and fenestral constriction in sinusoidal endothelial cells. Liver Int. 2009 Feb;29(2):266-276. (査読有)

⑤ Yamamoto, K., Yoshimura, K., Kitada, K., Nakahara, J., Seiwa, C., Ueki, T., Shimoda, Y., Ishige, A., Watanabe, K., Asou, H. A new monoclonal antibody, A3B10, specific for astrocyte-lineage cells recognizes calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1. J Neurosci Res. 2009, 87(2):503-513. (査読有)

⑥ Sawashita J, Kametani F, Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Zhang B, Yan J, Mori M, Naiki H, Higuchi, K. Amyloid fibrils formed by selective N-, C-terminal sequences of mouse apolipoprotein A-II. Biochim Biophys Acta 2010, 1794:1517-1529. (査読有)

⑦ Kojima Y, Sakai K, Ishida C, Asaka T,

Hamaguchi T, Nozaki I, Fukushima K, Tsuchiya A, Kametani F, Yazaki M, Okino S, Yamada M. Hereditary rimmed vacuole myopathy showing interstitial amyloid deposition in muscle tissue. Muscle & Nerve 2009, 40:472-475. (査読有)

⑧Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. Hum Mol Genet 2009, 18:3353-3364. (査読有)

⑨Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, Hasegawa M. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. Biochem Biophys Res Commun 2009, 382:405-409. (査読有)

⑩Yamashita M, Nonaka T, Arai T, Kametani F, Buchman VL, Ninkina N, Bachurin SO, Akiyama H, Goedert M, Hasegawa M. Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. FEBS Lett 2009, 583:2419-2424. (査読有)
[学会発表] (計8件)

①Masami Nishina, Masahiko Suzuki, Naomi Takehara, M Matsushita, Kazunori Yoshimura, Sho Matsushita. Cerebral metabolism of glucose in chronic intermittent hypoxia: a nuclear magnetic resonance spectroscopy study. Program/Abstract#482.5/RR38. Society for Neuroscience 2008 Meeting. Washington Convention Center, C. Washington Convention Center, 801 Mount Vernon Place, NW, Washington, DC.

② Hongying Duan, Kazunori Yoshimura, Nobuharu Kobayashi, Akira Takagi, Masanori Matsui, Satoshi Ohno, Kazuo Sugiyama, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Toshitaka Akatsuka. Analysis of the topology of the microsomal epoxide hydrolase on the cell surface with monoclonal antibodies with different epitope specificities. Program/Abstract #479.31. Experimental Biology 2008 Meeting. San Diego Convention Center, CA, U. S. A.

③ Kazunori Yoshimura, Fuyuki Kametani, Kayo Fujimaki, Takashi Miyazaki, Hidenori Horie, Shu-Ichi Watanabe, Toshihiko Kadoya. Proteomic analysis of macrophages stimulated with oxidized galectin-1. 47th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology. Annual Meeting Program. No. 2015. December 1-5, 2007. Washington Convention Center Washington, DC. Washington Convention Center, 801 Mount Vernon Place, NW, Washington, DC.

④ Toshiko Maruo, Kazunori Yoshimura, Kayo Fujimaki, Masahio Nomura, Shu-Ichi Watanabe, Masahiko Suzuki, Hideki Miyao. Proteomic analysis of human astrocytes treated with propofol. 2007 Annual Meeting for Experimental Biology. Abstracts, Abstract No. 791. April 30, Monday, 2007. Washington Convention Center, 801 Mount Vernon Place, NW, Washington, DC.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 和法 (YOSHIMURA KAZUNORI)

日本医療科学大学・保健医療学部・教授

研究者番号：19491004

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

亀谷 富由樹 (KAMETANI FUYUKI)

(財) 東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：70186013

(H19→H20：分担研究者)

(4) 研究協力者

門屋 利彦 (KADOYA TOSHIHIKO)

前橋工科大学・工学部・生物工学科・教授

研究者番号：40551875

坂本 安 (SAKAMOTO YASUSHI)

埼玉医科大学・医学部・中央研究施設・施設長・教授

研究者番号：80178582

北村邦男 (KITAMURA KUNIO)

埼玉医科大学・保健医療学部・健康医療科学科・教授

研究者番号：70049857

宮崎 孝 (MIYAZAKI TAKASHI)

埼玉医科大学・医学部・地域医学医療センター・助教

研究者番号：30265417