

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591835

研究課題名（和文）核内転写因子 PPAR γ の虚血性神経細胞障害保護機構の解明研究課題名（英文）Neuroprotective effects of PPAR γ on ischemic neuronal injury

研究代表者

木内 博之（KINOUCHI HIROYUKI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30241623

研究成果の概要（和文）：

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 作動薬であるチアゾリジン誘導体は、2 型糖尿病治療薬として使用されているが、この他にも多面的効果を持つ。虚血性神経細胞傷害に対する保護効果も有するが、その機序は明らかではない。本検討では、一過性前脳虚血モデルを用い、PPAR γ 作動薬の神経保護効果の機序を検討した。その結果、PPAR γ は虚血後主に CA1 神経細胞で発現が亢進し、この作動薬の投与により、Akt/GSK-3 β および STAT3 経路の活性化を介し、神経細胞傷害が軽減することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands, thiazolidinediones, are used for the treatment of type 2 diabetes. In addition, they have pleiotropic effects such as neuroprotective effects against ischemic neuronal injury; however, the mechanism of neuroprotective effects is still obscure. In this study, we examined the expression of PPAR γ after transient forebrain ischemia, and assessed the neuroprotective effects of thiazolidinediones in this model. We also studied the effects of thiazolidinediones on Akt/GSK-3 β and STAT3, key pathways of prosurvival signaling after ischemia. We revealed that PPAR γ is upregulated mainly in neurons after ischemia, and thiazolidinediones have a neuroprotective effects against ischemic neuronal injury via activation of Akt/GSK-3 β and STAT3 pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：PPAR γ 、脳虚血、アポトーシス、Akt

1. 研究開始当初の背景

Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) は、脂溶性リガンドに対する核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子であり、標的遺伝子の発現を調節する。PPAR γ の外因性リガンドとして作用するチアゾリジン誘導体は、血糖低下とアディポネクチン遺伝子の転写促進によるインスリン抵抗性改善の作用を有し、2型糖尿病薬として用いられている。この PPAR γ 作動薬は2型糖尿病の大規模多施設研究では大血管病障害の既往を有するハイリスク症例において、心筋梗塞や脳梗塞の再発を30~40%も抑制することが示され、その多面的効果が注目されている。

動物モデルを用いた脳虚血研究においても、主にラット一過性中大脳動脈閉塞を用いて、PPAR γ 作動薬の保護効果が報告されている。このような保護効果として、サイトカインによる炎症反応の抑制や抗酸化酵素である CuZn-SOD の誘導による血流再開後の過酸化障害の抑制が示唆されているが、十分には解明されていない。更なる機序解明が、新規脳梗塞治療の開発に大きく貢献するものと期待されている。

2. 研究の目的

脳虚血後には、様々な情報伝達経路が活性化されるが、この情報伝達経路には細胞死シグナルと細胞生存シグナルが存在し、この両者のバランスが細胞の運命に大きな影響を与える。Akt は細胞生存シグナルの中心的役割をなし、神経栄養因子などの刺激が加わると、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) によりリン酸化され、活性化した Akt は、glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) などのアポトーシス誘導蛋白をリン酸化し、不活化することにより細胞生存を促進すると

考えられている。また、Janus-kinase(JAK)-signal transducers and activators of transcription(STAT)経路は炎症や虚血などの多くの病態に深く関与し、なかでも STAT3 は神経細胞や心筋の細胞保護機序に関与していることが明らかにされている。

本研究は、PPAR γ 作動薬の虚血性神経細胞傷害に対する保護効果およびその機序を明らかにすることを目的とする。細胞保護の機序としては、細胞保護シグナルである Akt 経路と STAT3 に着眼し、PPAR γ 作動薬のこれら経路に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) Pioglitazone の投与 : Pioglitazone (0.2 mg/kg/day, 2 mg/kg/day, 20 mg/kg/day) はメチルセルロースに溶解し、虚血手術5日前より断頭日まで一日一度、経口内服させた。Vehicle 群では、溶媒 (メチルセルロース) のみを内服させた。

(2) 一過性前脳虚血モデル : 虚血モデルには、ラット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5分間遮断し、前脳虚血を作成した。

(3) Western blot 解析 : 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 μ g 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。一次抗体には、抗 PPAR γ 抗体

(Millipore 社、1:1000)、抗リン酸化 Akt (Ser473)抗体(Cell Signaling 社、1:1000)、抗 Akt 抗体 (Cell Signaling 社、1:1000)、抗リン酸化 GSK-3 β (Ser9) 抗体 (Cell Signaling 社、1:1000)、抗 GSK-3 β 抗体 (Cell Signaling 社、1:1000)、抗リン酸化 STAT3 (Tyr705)抗体(Cell Signaling 社、1:1000)、抗 STAT3 抗体 (Cell Signaling 社、1:1000)、抗 β -actin 抗体 (Sigma-Aldrich 社、1:5000) を使用した。

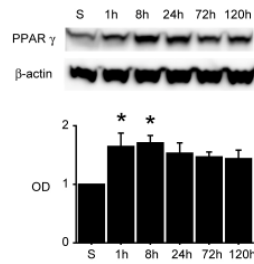
(4) 免疫染色：虚血 1、8、24、72、120 時間後に、4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定後、脳を摘出し、ビブラトームで 50 μ m 厚の脳冠状切片を作成した。PPAR γ と、NeuN または GFAP との蛍光二重染色を行い、PPAR γ 発現の局在を検討した。

(5) 虚血性神経細胞死の検討：虚血性細胞傷害は虚血 120 時間後の切片を TUNEL 染色により評価した。虚血 120 時間後に灌流固定し、パラフィン包埋した。切片をマイクロトームで 6 μ m に薄切し、TUNEL 染色を行い、陽性細胞をカウントし定量的に解析した。

4. 研究成果

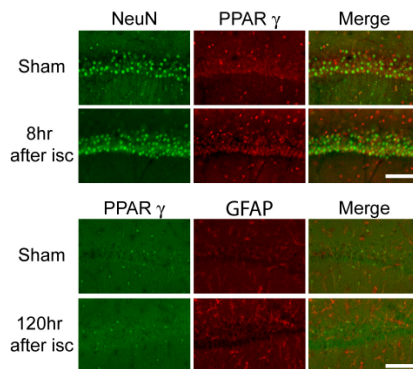
(1) 虚血後海馬 CA1 領域における PPAR γ 発現

Western blot 解析により、海馬 CA1 領域での PPAR γ の発現は虚血後 8 時間をピークとして亢進することが認められた。半定量解析を行うと、虚血後 1、8 時間での PPAR γ の発現は sham 動物に比べ有意差を持って亢進していた (n=4, *P<0.05) (図 1)。



(図 1) Western blot による PPAR γ の脳虚血後発現解析

免疫染色を行うと、sham 動物の海馬 CA1 領域では、神経細胞とアストロサイトに PPAR γ の発現を認め、アストロサイトでの発現が比較的強かった。虚血後 8 時間では、神経細胞での PPAR γ の発現が亢進していた。虚血 120 時間後では、海馬 CA1 神経細胞での NeuN の発現は消失し、これら細胞での PPAR γ の発現も低不明瞭だった。一方、GFAP の発現亢進を伴うアストロサイトの活性化を認め、これらアストロサイトに PPAR γ の発現が見られた (図 2)。



(図 2) PPAR γ 蛍光免疫染色

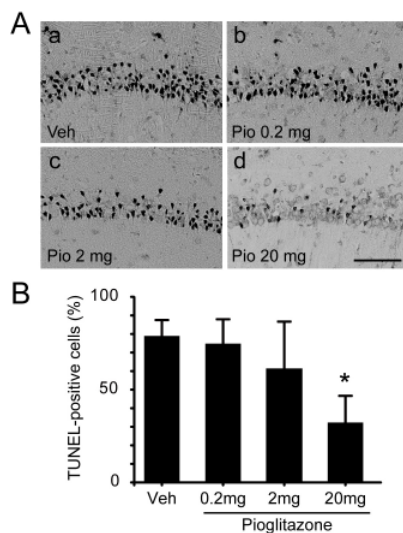
(2) Pioglitazone 投与の生理学的パラメーターへの影響

虚血手術前の血糖値は、vehicle 投与群では 187.3 \pm 7.8 mg/ml、pioglitazone 20 mg 投与群では 197.0 \pm 5.2 mg/ml であり、両群

間に明らかな差を認めなかった。また虚血前後の動脈血液ガス分析値、平均動脈血圧、ヘマトクリット値も両群間での差を認めなかった。

(3) Pioglitazone 投与の虚血後神経細胞死への効果

虚血 120 時間後の海馬 CA1 領域の TUNEL 陽性細胞は、pioglitazone 濃度依存的に減少した。Pioglitazone 20 mg 投与群での TUNEL 陽性細胞数は、vehicle 群に比べ有意差を持って減少していた (n=6, *P<0.05) (図 3)。



(図 3) TUNEL 染色

(4) Pioglitazone 投与の PPAR γ 発現への効果

Western blot 解析により pioglitazone 20 mg/day の投与が PPAR γ 発現へ及ぼす効果を検討した。Pioglitazone 投与により、虚血後海馬 CA1 領域における PPAR γ の発現亢進が僅かに抑制される傾向を認めたが、vehicle 群と pioglitazone 投与群間で明らかな有意差は認めなかった。

(5) Pioglitazone による神経保護効果の機序

Pioglitazone の神経保護効果の機序を解明するため、pioglitazone 20mg/day 投与が Akt、GSK-3 β 、STAT3 の活性化へ及ぼす影響を検討した。これら蛋白質の活性化は、western blot 解析によりリン酸化状態を解析することで検討した (図 4)。

①Akt のリン酸化への効果

Vehicle 群では、serine 473 部位での Akt のリン酸化は虚血 8 時間後に sham に比べて有意に亢進していた。このリン酸化は pioglitazone の投与により、虚血 1、8 時間後の時点で vehicle 投与に比べて有意差を持って亢進した (n=4, *P<0.05)。Akt の発現は虚血後も差を認めず、vehicle 群、pioglitazone 投与群の両群間で差を認めなかった。

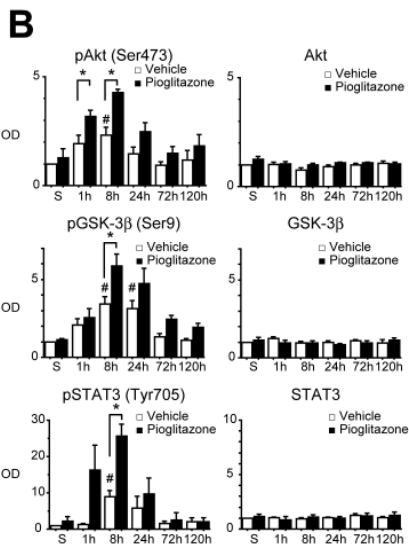
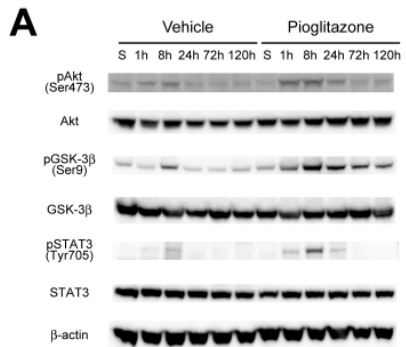
②GSK-3 β のリン酸化への効果

Akt の下流に存在する GSK-3 β の serine 9 部位でのリン酸化は vehicle 群では虚血後 8、24 時間後に亢進していたが、このリン酸化は虚血後 8 時間の時点で pioglitazone 投与群で vehicle 投与群に比べて有意差を持って亢進していた (n=4, *P<0.05)。GSK-3 β の発現は虚血後も差を認めず、vehicle 群、pioglitazone 投与群の両群間で差を認めなかった。

③STAT3 のリン酸化への効果

Tyrosine 705 部位での STAT3 のリン酸化は vehicle 投与群では虚血 8 時間後に亢進していた。同部位での STAT3 のリン酸化は、虚血 8 時間後に pioglitazone 投与群で vehicle 投与群に比べて有意差を持って亢進していた (n=4, *P<0.05)。STAT3 の発現は虚血後も差を認めず、vehicle 群、pioglitazone 投与群の両群間で差を認めなかった。

(図 4) Western blot による Akt、GSK-3 β 、STAT3 のリン酸化解析



考察

本研究の主たる成果は、虚血後海馬 CA1 領域で PPAR γ の発現が亢進し、このアゴニストである pioglitazone の投与は、Akt/GSK-3 β 経路および STAT3 の活性化を介し、虚血性傷害に対する神経保護効果を示すことを明らかにした点である。

脳虚血後に PPAR γ の発現が亢進することは、これまでも同様の結果が報告されており我々の結果と一致する。しかしながら、その局在に関しては現在まで一定の見解が得られていない。Victor らは、中大脳動脈閉塞 24 時間後に神経細胞で PPAR γ の発現が劇的に亢進したと報告している (Eur J Neurosci, 2006)。また、Kinouchi らも中大脳動脈閉塞 24 時間後に神経細胞での発現が亢進することを報告しているが、神経細胞と共に血管内皮細胞でも発現が亢進したと報告している

(Stroke, 2012)。一方、Lee らは一過性前脳虚血 4-7 日後にマイクログリアでの PPAR γ の発現が亢進したと報告している (J Neurol Sci, 2011)。これらの結果からは、虚血後早期には神経細胞もしくは血管内皮細胞で PPAR γ の発現が亢進し、虚血後晚期にはグリア系細胞での発現が亢進する可能性が考えられる。

今回の検討では、PPAR γ の発現は虚血 8 時間後をピークに亢進し、この時点での発現亢進は CA1 錐体神経細胞で見られたことより、一過性前脳虚血後の海馬神経細胞傷害においては、神経細胞の PPAR γ が重要な役割を担うと推測される。しかしながら、本検討の免疫染色の結果からは、アストロサイトにおいても PPAR γ の発現が見られており、それぞれの細胞内での PPAR γ の役割に関しては、今後の更なる検討が必要である。

PPAR γ 作動薬の虚血性神経細胞傷害に対する神経保護メカニズムに関しては、現在まで様々な報告が見られるが、IL-6、Nuclear factor- κ B、inducible NOS などの発現を抑制し炎症反応を抑制すること、および抗酸化酵素である CuZn-SOD の誘導により過酸化障害を抑制することが主なメカニズムとして報告されている。今回の我々の検討により、Akt/GSK-3 β および STAT3 の代表的な二つの細胞生存シグナルの活性化が PPAR γ 作動薬の神経保護メカニズムに関与することが解明された。

PPAR γ 作動薬の神経細胞保護効果に Akt が関与することは、in vitro の実験では報告されている。すなわち、PPAR γ 作動薬は SK-N-SH 細胞を用いた化学的虚血再灌流実験において、細胞保護効果を示し、この効果は Akt リン酸化の亢進を伴ったと報告されている (Brain Res, 2011)。また、神経細胞-マイクログリア共培養系に対する

lipopolysaccharide による細胞傷害は PPAR γ 作動薬により軽減され、これら細胞における Akt のリン酸化が PPAR γ 作動薬により亢進していたと報告されている (J Neuroinflammation, 2008)。このように in vitro 実験では報告されているものの、in vivo 脳虚血実験においては PPAR γ 作動薬の Akt 活性化は、現在まで報告されておらず、本検討が初めての報告である。GSK-3 β はアポトーシス誘導蛋白として知られている。この GSK-3 β は活性化 Akt によりリン酸化されると、不活性化され、アポトーシスが抑制される。この Akt/GSK-3 β 経路は脳虚血に対する細胞保護効果があることが報告されており (J Cereb Blood Flow and Metab, 2006)、本検討での神経細胞保護効果にもこの機序が関与しているものと思われる。PPAR γ 作動薬の Akt 活性化機序については十分に解明されていない。脂肪細胞や骨格筋細胞における PPAR γ のブドウ糖取り込み亢進には、phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) の抑制が重要な役割を果たすと考えられている。この PTEN は Akt を抑制することが知られており、PPAR γ の投与による PTEN の抑制が Akt の活性化を促す可能性が推察できるが、PPAR γ の Akt 活性化機序に関しては今後の更なる検討を要する。

STAT3 の活性化は、近年非常に注目されている細胞生存シグナルである。虚血性神経傷害にも関与し、虚血耐性現象における神経保護作用などで重要な役割を担うことが報告されている (Brain Res, 2011)。今回の検討からは、STAT3 の活性化に必須の Tyrosine 705 部位のリン酸化が PPAR γ 投与により亢進しており、STAT3 の活性化も PPAR γ 作動薬の細胞保護機序の一つと考えられる。Kinouchi らは、卵巣摘出雌性ラット中大脳動脈閉塞モ

デルを用いた検討により、PPAR γ 投与がリン酸化 STAT3 の発現を亢進し、梗塞巣の縮小をきたすことを報告しており、我々の検討結果と矛盾しない。転写因子である STAT3 の下流シグナルに関しては、前述の Kinouchi らの報告では、PPAR γ 作動薬により発現が亢進した PPAR γ とリン酸化 STAT3 が複合体を形成し、Bcl-xL や Bcl-2 などの抗アポトーシス遺伝子や MAP-2 などの細胞生存遺伝子の転写が促進したとされている。今後の検討を要するが、本検討においてもこれらの遺伝子の転写促進が神経細胞保護に働いた可能性が考えられる。STAT3 は granulocyte colony stimulating factor、neuregulin-1 β 、secretoneurin など様々な因子により活性化することが知られているが、PPAR γ 作動薬による STAT3 活性化機序は解明されておらず、今後の更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

杉田 正夫 (SUGITA MASAO)
山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70235886
(H21 年度のみ)

(3) 連携研究者

なし