

令和元年6月20日現在

機関番号：35409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07986

研究課題名(和文) SUMO化修飾を介した虚血耐性形成の分子機構解明 -冬眠動物を用いたアプローチ-

研究課題名(英文) Roles of protein SUMOylation in tolerances to ischemia and hypothermia in the hibernating hamster

研究代表者

渡邊 正知 (WATANABE, Masatomo)

福山大学・薬学部・准教授

研究者番号：30306203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：虚血耐性は、非侵襲的虚血などにより侵襲的虚血あるいは再灌流障害に対する耐性を獲得する現象であるが、その分子メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、自然の虚血耐性モデルと考えられている冬眠動物に着目し、脳内SUMO2/3化修飾が体温低下によって誘導されることを明らかにした。さらに、体温低下によって誘導されるSUMO2/3化修飾が虚血再灌流障害に対して保護的な役割を担っていることを明らかにした。一方、体温低下によって誘導されるSUMO2/3化修飾は、体温低下を抑制的に制御していることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、低体温による神経保護作用発現にはタンパク質SUMO2/3化修飾を介していることが明らかとなった。さらに、神経保護作用を有するSUMO2/3化修飾には、体温調節作用を有することも示した。それゆえ、SUMO化誘導による内因性の虚血耐性(神経保護作用)の腑活化が、脳血管障害の60%以上を占める虚血性脳梗塞の新たな治療戦略開発や、新生児低酸素性虚血性脳症に対する低体温療法の改良などに寄与すると期待された。

研究成果の概要(英文)：Ischemic tolerance is an endogenous process that provides robust neuroprotection. To clarify the roles of protein post-translational modification in tolerance to ischemia, protein SUMOylation in the hibernating hamster which is a natural model of tolerance to cerebral ischemia/reperfusion was investigated. Our results revealed that increased SUMO2/3 modification depended on the levels of hypothermia. In addition, we found that protein SUMO2/3 modification induced by hypothermia provided neuroprotection in cerebral ischemia/reperfusion injury. Furthermore, we showed that protein SUMO2/3 modification induced by hypothermia inhibited the decreases in core body temperature.

研究分野：薬学(薬理学)

キーワード：SUMO化修飾 脳虚血耐性 冬眠 体温

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2017年現在、脳血管障害の患者数は111.5万人(患者調査の概況)、年間死亡者数は約11.0万人にも上る(国内死因第3位、人口動態統計の概況)。また、脳血管疾患は後遺症が重く、我が国の要介護原因第二位(16.6%)に位置する(2016年国民生活基礎調査の概況)。中でも虚血性の脳梗塞は、脳血管障害の60%以上を占める。急激な超高齢化が進行する我が国において、脳梗塞の発症数、脳梗塞総患者数、脳梗塞による死亡者数、要介護者数は、今後ますます増加すると予想される。それゆえ、新たな治療方法の確立が急務とされている。

虚血耐性は、何らかの方法(非侵襲的虚血など)により侵襲的虚血あるいは再灌流障害に対する耐性を獲得する現象である。それゆえ、虚血耐性の分子メカニズム解明に基づく、内因性の神経保護作用の腑活化は、新たな脳梗塞の治療戦略として期待されている。しかし、これまで多くの報告がなされている[1,2]が、未だ、神経保護薬の開発には至っていない。

虚血耐性獲得方法には、低酸素、酸素/グルコース欠乏、高酸素、高圧酸素、低体温、麻酔などさまざまな処置による耐性獲得モデルが報告されている[2]が、そのメカニズムは不明な点が多い。我々は、体温の恒常性を積極的に破棄することが可能な冬眠行動に着目し、低体温による虚血耐性獲得メカニズムの解明に焦点を当てた。冬眠は、著しい血流量の低下(正常脳の5%以下の低血流量)かつ低体温(6℃)と通常では死に至らしめるような状況を経るにもかかわらず、脳や神経細胞に全くダメージを与えない。それゆえ、自然の虚血耐性モデルと考えられている[3]。冬眠動物における虚血耐性の分子メカニズムは未だ不明だが、エネルギーを消費する *de novo* タンパク合成[4]よりも、制限されたエネルギーを有効活用するタンパク質翻訳後修飾によって制御されていることが容易に推測される。一方、脳虚血モデル動物では、リン酸化・ユビキチン化・SUMO (small ubiquitin-related modifiers) 化などの翻訳後修飾レベルの変動が報告されている。中でも、SUMO 化修飾レベルの増加は、一過性脳虚血後の神経保護作用に関与していることが示唆されている[5,6]。それゆえ、冬眠動物で見られる自然の虚血耐性獲得プロセスにおいてもSUMO 化修飾の関与が推測された。

### 2. 研究の目的

事前実験において、冬眠ハムスターにおけるSUMO 化修飾タンパクを解析したところ、体温を低下させた冬眠時に顕著なSUMO 化修飾シグナルの増強が認められた。そこで本研究では、「体温依存的なSUMO 化修飾によるタンパク質の機能変化により、虚血耐性が形成される」という仮説を立て、これを明らかにすることを目的とした。具体的には、(1)体温変化(低体温)とSUMO 化修飾機構との関連性、(2)体温依存的なSUMO 化修飾による神経保護作用、(3)SUMO 化修飾による体温制御機構、(4)新規体温調節物質の探索、(5)虚血耐性におけるSUMO 化標的分子の同定とその機能解明により、新たな「SUMO 化修飾タンパク質を介した虚血耐性獲得機構」の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 虚血耐性モデル(冬眠)と虚血再灌流障害モデルの作成

すべての動物実験は、福山大学研究安全倫理委員会承認のもと、「福山大学動物実験指針」に基づき行った。虚血耐性モデルには、実験冬眠モデルを用いた。冬眠は、シリアンハムスター(*Mesocricetus auratus*: 以下ハムスター)を環境温度5℃、短日周期(明期8時間、暗期16時間)の寒冷環境下で2ヶ月以上飼育することにより誘発した。一方、虚血再灌流障害モデルには、一過性両側総頸動脈閉塞(tBCCAO)モデルを用いた。イソフルラン麻酔下で両側総頸動脈を30分閉塞し、その後再灌流を行った。

#### (2) 薬物による低体温の誘導と体温調節物質の探索

低体温の誘導には、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体アゴニスト (*N*<sup>6</sup>-Cyclohexyladenosine: CHA) やオピオイド  $\mu$  受容体アゴニスト ([D-Ala<sup>2</sup>, NMe-Phe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>]-enkephalin: DAMGO) を用いた。各種薬物は、側脳室に留置したカニューレを介して5 $\mu$ Lの用量で投与した。またハムスターの体温は、腹腔内にデータロガー(サーモクロン)を埋め込み、非拘束下で連続的に測定した。体温調節物質の探索も同様の実験系にて行った。

#### (3) SUMO 化修飾タンパク質の検出

海馬および視床下部組織中のSUMO1 化修飾およびSUMO2/3 化修飾レベルは免疫プロット法にて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 体温変化(低体温)とSUMO 化修飾機構との関連性

冬眠サイクルにおけるSUMO1 化修飾およびSUMO2/3 化修飾レベルに関して検討した。海馬におけるSUMO1 化修飾およびSUMO2/3 化修飾は、寒冷暴露や中途覚醒期には増加せず、深冬眠期にのみ増加することが明らかとなった(図1)。また、視床下部でも同様の傾向が認められ、SUMO 化修飾は外気温に関係なく、体温低下に依存することが示唆された。以降は、顕著な変化が認められたSUMO2/3 化修飾を解析した。

CHAにより低体温を誘導したところ、体温低下レベルに相関してSUMO2/3 化修飾レベル

が増加することが明らかとなった。さらに、CHA だけでなく DAMGO やペントバルビタールで低体温を誘導しても、同様の SUMO2/3 化修飾シグナルの増強が認められた (図 2)。これらの結果から、SUMO2/3 化修飾レベルの増加は、体温低下によって誘導される現象であることが明らかとなった。

## (2) 体温依存的な SUMO 化修飾による神経保護作用

虚血再灌流障害における SUMO2/3 化修飾の役割を明らかにするために、tBCCAO 処置を行い、その後の SUMO2/3 化修飾レベルの変動、血液脳関門 (BBB) の破綻および遅延性神経細胞死に対する影響を検討した。海馬の SUMO2/3 化修飾レベルは、虚血時あるいは再灌流直後に一過性に増大したが、数時間後にはコントロールレベルに低下した (図 3)。一方、BBB の透過性は再灌流 2-4 日後に亢進し、再灌流 14 日後には海馬錐体細胞の著しい脱落が認められた。そこで、低体温依存性の SUMO 化修飾の神経保護作用を明らかにするために、体温を 30 °C に保ち脳内 SUMO2/3 化修飾を誘導し tBCCAO 処置を行った。すると、再灌流後の BBB 透過性亢進や遅延性神経細胞死は著しく抑制された。これらの結果から、体温低下によって誘導される SUMO2/3 化修飾は、虚血再灌流障害に対して保護的な役割を担っていることが示唆された。

## (3) SUMO 化修飾による体温制御機構

体温制御に対する SUMO 化修飾の役割を明らかにするために、SUMO 化修飾活性化酵素 (E1) の阻害剤 Anacardic Acid (AA) や、SUMO 化修飾の律速酵素 (E2) の阻害剤 2-D08 を側脳室より前投与し、CHA 誘導低体温に対する影響を検討した (図 4A)。CHA による体温低下レベルは、AA や 2-D08 前投与により有意に亢進した。一方、脱 SUMO 化酵素 (SENP) の阻害剤 quercetin を側脳室より前投与し、CHA 誘導低体温に対する影響を検討したところ、CHA による体温低下レベルは有意に抑制された (図 4B)。これらの結果から、体温低下によって誘導される SUMO2/3 化修飾は、体温低下を抑制的に制御することが明らかとなった。

## (4) 新規体温調節物質の探索

新たな体温調節物質を探索したところ、ボンベシン様ペプチドは体温低下を抑制的に制御し、ガス状分子の硫化水素は体温低下を促進することが明らかとなった。また、ボンベシン様ペプチドは、体温低下を抑制し、冬眠導入を抑制的に制御していることが

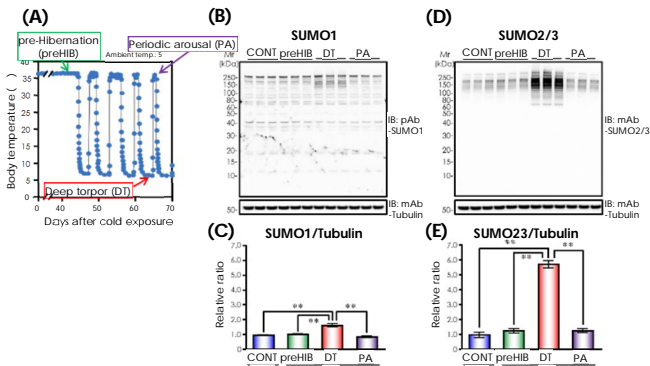


図 1 冬眠サイクルにおける SUMO 化修飾レベル 常温飼育した動物をコントロール (control: CONT) とした。寒冷環境下で 2 ヶ月以上飼育し、冬眠を開始していない個体を前冬眠群 (pre-Hibernation: preHIB)、冬眠した個体を深冬眠群 (Deep torpor: DT)、および中途覚醒した個体を中途覚醒群 (periodic arousal: PA) として用いた (A)。海馬における SUMO1 化修飾レベル (B, C)、SUMO2/3 化修飾レベル (D, E) をイムノブロットにて検討したところ、深冬眠時のみ、著しい変化が認められた。データは、one-way ANOVA 後、Tukey's 検定を用いて解析した。\*\*は、 $P < 0.01$  を示す。

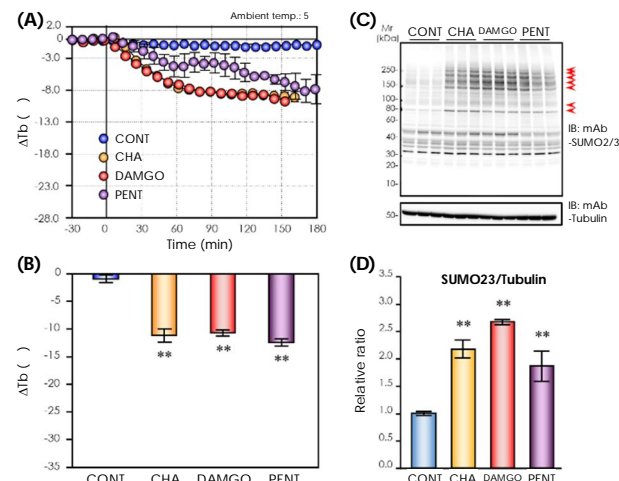


図 2 薬物による低体温誘導時における SUMO2/3 化修飾 CHA および DAMGO は側脳室より、ペントバルビタール (PENT) は腹腔より投与し、低体温を誘導した。(A) および (B) には、薬物投与後の経時的な体温変化 ( $\Delta T_b$ ) および最大変化を示す。それぞれの海馬組織における SUMO2/3 化修飾レベルをイムノブロット (C) にて検討し、定量的に比較した (D)。いずれの薬物による低体温誘導時でも、SUMO2/3 化修飾は増加した。データは、one-way ANOVA 後、Dunnnett's 検定を用いて解析した。\*\*は、コントロール (CONT) に比べ  $P < 0.01$  を示す。

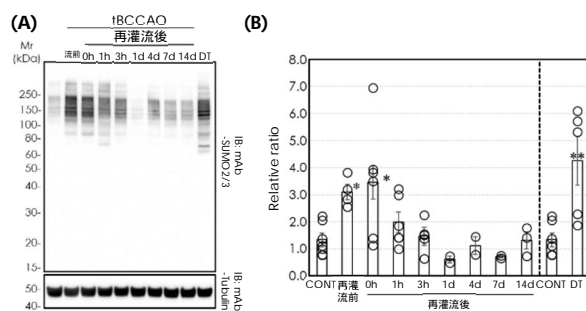


図 3 tBCCAO 処置後の海馬 SUMO2/3 化修飾の変化 両側頸動脈を 30 分閉塞させ、その後再灌流させた。海馬組織における SUMO2/3 化修飾レベルをイムノブロット (A) にて検討し、定量的に比較した (B)。SUMO2/3 化修飾レベルは、虚血中から再灌流直後で著しく増加するが、数時間でコントロールレベルに戻った。データは、one-way ANOVA 後、Dunnnett's 検定を用いて解析した。\*および\*\*は、コントロール (CONT) に比べ  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  を示す。

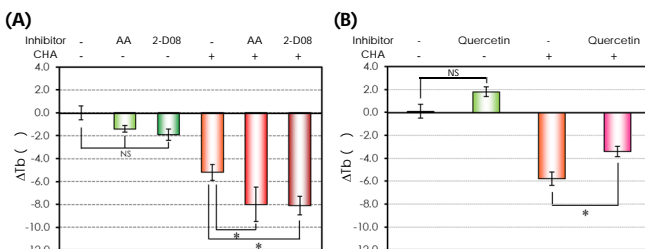


図 4 CHA 誘導低体温に対する SUMO2/3 化修飾サイクル阻害剤の影響 CHA 投与 30 分前に各種 SUMO 化修飾サイクル阻害剤を投与した。E1 阻害剤 (Anacardic acid; AA) や E2 阻害剤 (2-D08) は、CHA 誘導低体温を有意に増強した。一方、SENP 阻害剤 (Quercetin) は、CHA 誘導低体温を有意に抑制した。データは、one-way ANOVA 後、Tukey's 検定を用いて解析した。\*は、 $P < 0.05$  を示す。NS: not significant.

示唆された。一方、外因性の硫化水素は、オピオイド作動性神経系の賦活化を介した体温低下を促進的に制御することが明らかとなった。さらに、脳内で発生する内因性の硫化水素も体温制御に関与していることが示唆された。

(5) 虚血耐性形成における SUMO 化標的分子の同定とその機能解明

本研究により、虚血再灌流時に誘導される SUMO2/3 化修飾と虚血耐性モデルで誘導された SUMO2/3 化修飾は、ほぼ同じ分子を標的にしていることが明らかとなった (図 5)。しかし、個体から得られる内因性の SUMO2/3 化修飾タンパク質は極めて微量で、免疫沈降法 (IP, Seize<sup>®</sup>X, SUMO-QAPTURE<sup>®</sup>) などでは銀染色レベルですら精製することができなかった。それゆえ、現時点では標的タンパク質の同定には至っておらず、更なる検討が必要である。

以上より、本研究において、低体温依存的に誘導される SUMO2/3 化修飾には、神経保護と体温制御という二つの役割があり、これによって虚血耐性が形成されることが示唆された。

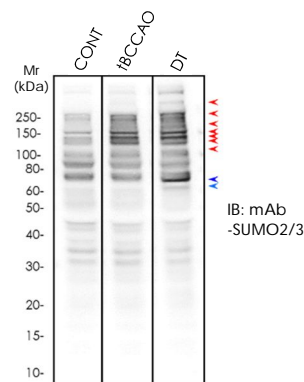


図 5 虚血再灌流障害モデルと虚血耐性モデルにおける SUMO2/3 化修飾タンパク質 虚血再灌流障害モデルには、一過性両側総頸動脈閉塞 (tBCCAO) モデルを用いた。虚血耐性モデルには、深冬眠 (DT) モデルを用いた。赤矢印で示すように、多くのシグナルが一致した。

<引用文献>

- [1] Ulrich Dirnagl, Kyra Becker, Andreas Meisel, Preconditioning and tolerance against cerebral ischemia: from experimental strategies to clinical use, *Lancet Neurol.* 2009, 8, 398-412.
- [2] Thushara Vijayakumar N, Amit Sangwan, Bhargy Sharma, Arshad Majid, Rajanikant GK, Cerebral Ischemic Preconditioning: the Road So Far..., *Mol Neurobiol.* 2015, DOI 10.1007/s12035-015-9278-z.
- [3] Kelly L. Drew, Jeffrey A. Zuckerman, Phillip E. Shenk, Lori K. Bogren, Tulasi R. Jinka, Jeanette T. Moore, Hibernation: a natural model of tolerance to cerebral ischemia/reperfusion, J.M. Gidday et al. (eds.), *Innate Tolerance in the CNS: Translational Neuroprotection by Pre- and Post-Conditioning*, Springer Series in Translational Stroke Research, Springer Science+Business Media New York 2013, 37-50.
- [4] Storey KB, Mammalian hibernation. Transcriptional and translational controls, *Adv Exp Med Biol.* 2003, 543, 21-38.
- [5] Myriam Peters, Betty Wielsch, Johannes Boltze, The role of SUMOylation in cerebral hypoxia and ischemia, *Neurochem Int.* 2017, 107, 66-77.
- [6] Joshua D Bernstock, Wei Yang, Daniel G Ye, Yuntian Shen, Stefano Pluchino, Yang-Ja Lee, John M Hallenbeck, Wulf Paschen, SUMOylation in brain ischemia; Patterns, targets, and translational implications, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2017, 38, 5-16.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 10 件)

渡邊 正知、門田 麻由子、入江 なる実、實井 佑華、田中 優太、田村 豊、虚血耐性形成と虚血再灌流障害におけるタンパク質 SUMO 化修飾の役割、第 134 回日本薬理学会近畿部会、2018 年 11 月。

渡邊 正知、冬眠ハムスターの脳組織における SUMO 化修飾の役割、第 2 回冬眠休眠研究会、2018 年 6 月。

村上 恵子、門田 麻由子、入江 なる実、實井 佑華、渡邊 正知、田村 豊、脳虚血耐性モデルにおける SUMO 化修飾の役割、第 138 回薬学会年会、2018 年 3 月。

湯澤 桃圭、門田 麻由子、吉岡 寛美、神川 澗香、宮本 玲菜、渡邊 正知、田村 豊、硫化水素によるハムスターの体温制御機構 冬眠時体温との関連、第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2017 年 10 月。

渡邊 正知、田村 豊、ゴールデンハムスターの冬眠時における中枢神経系を介した体温調節機構の解明、第 1 回冬眠休眠研究会、2017 年 7 月。

吉岡 寛美、湯澤 桃圭、河村 理沙、神川 澗香、宮本 玲菜、門田 麻由子、渡邊 正知、田村 豊、冬眠動物における硫化水素による体温制御機構、第 131 回日本薬理学会近畿部会、2017 年 6 月。

富田 貴之、門田 麻由子、河村 理沙、田中 翔子、峯岡 優菜、村上 恵子、渡邊 正知、田村 豊、冬眠時の体温調節機構における硫化水素の役割に関する研究、第 90 回日本薬理学会、2017 年 3 月。

渡邊 正知、門田 麻由子、境 謹士、河村 理沙、富田 貴之、田村 豊、ボンベシン様ペプチドによる冬眠開始時の体温制御機構、第 129 回日本薬理学会近畿部会、2016 年 6 月。

河村 理沙、門田 麻由子、田中 翔子、富田 貴之、峯岡 優菜、村上 恵子、渡邊 正知、田村 豊、ボンベシン様ペプチドを介した冬眠時の体温調節機構の解明、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月。

渡邊 正知、門田 麻由子、河村 理沙、田中 翔子、富田 貴之、峯岡 優菜、村上 恵子、田村 豊、冬眠時の体温調節機構におけるボンベシン様ペプチドの役割に関する研究、第 89 回日本薬理学会、2016 年 3 月。

〔その他〕

ホームページ

<http://rdbv.fukuyama-u.ac.jp/view/8lHAe/a.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：田村 豊

ローマ字氏名：(TAMURA, yutaka)

所属研究機関名：福山大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号：30217202

研究分担者氏名：門田 麻由子

ローマ字氏名：(MONDEN, mayuko)

所属研究機関名：福山大学

部局名：薬学部

職名：助手

研究者番号：10389075

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。