

令和元年6月11日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15672

研究課題名(和文)低酸素環境が神経障害性疼痛に与える影響についての実験的アプローチ

研究課題名(英文)Experimental approach to the influence of hypoxia on neuropathic pain

研究代表者

秋元 亮 (AKimoto, Ryo)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：40594677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：AMPKの蛋白発現は、野生型の培養細胞では低酸素負荷により時間依存的に増加した。一方DGK発現減少細胞におけるAMPK蛋白は、正常酸素圧で既に高い発現レベルを示していたが、逆に低酸素負荷により次第に減少することが明らかとなった。低酸素刺激によって活性型AMPKの発現が増加したが、DGK発現減少細胞においては、野生型と比較してより高い活性化が生じていることが判明した。しかしそれらの制御機構については解明に至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMPKを中心とした細胞のエネルギーセンサーの、低酸素環境下で振る舞いを実験的に検討した。これまでDGKと低酸素負荷との関係の報告は少ないが、今回DGKが細胞のエネルギー調節に関わっている可能性が示唆され、またDGK発現減少細胞は低酸素負荷に脆弱な可能性が考えられた。しかし、その詳細なメカニズムまでは解明に至らなかったが、今後の研究や治療のヒントとなる知見を得られた。

研究成果の概要(英文)：The expression of AMPK increased in a time-dependent manner by hypoxic loading in wild type cultured cells. On the other hand, in DGK-KO cells, AMPK already showed high expression levels at normoxic pressure, but gradually decreased due to hypoxic load. Hypoxic stimulation increased expression of active AMPK. DGK-KO cells had higher activation than wild type. However, their control mechanisms have not been elucidated.

研究分野：麻酔科学

キーワード：低酸素 ジアシルグリセロールキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄後角では、HDAC の発現が増加する。臨床の現場においても、慢性疼痛患者に対して抗てんかん薬のバルプロ酸を投与することがあるが、このバルプロ酸は HDAC の阻害作用も持つことが明らかとなっている。

AMPK は飢餓や低酸素、熱刺激などで活性化される、いわば細胞の“エネルギーセンサー”であり、AMPK は HDAC に対して抑制的に作用することが報告されている。

我々は、脂質性二次伝達物質代謝酵素 DGK のノックアウト細胞(DGK<sup>-</sup>KO)において、AMPK、HDAC の発現量が変化することを発見した。

しかしながら、AMPK と DGK がどのような分子メカニズムを介して HDAC の調節に関与するのか、そして疼痛制御にどのように影響を及ぼすかは未だに解析はなされていない。

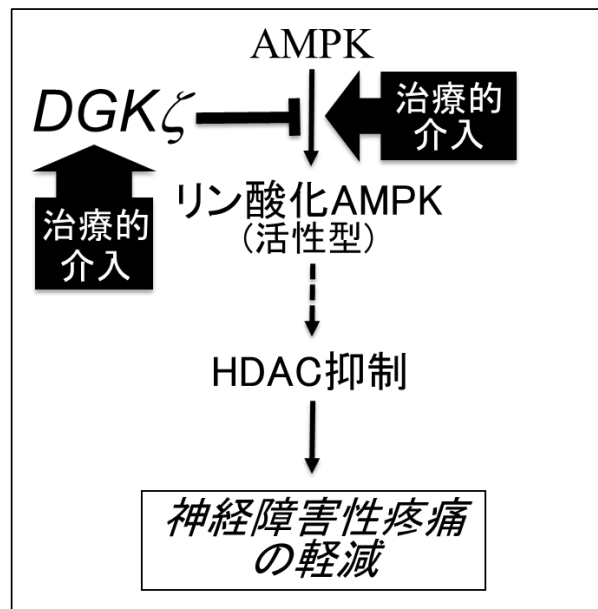
## 2. 研究の目的

癌や物理的外傷等に起因する神経障害性疼痛には、未だ決定的な治療法が開発されていない。

神経障害性疼痛モデルマウスでは、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が増加するとの報告があり、DNA/ヒストン蛋白の“エピジェネティック(経験依存的)”な機序の関与が示唆されている。

近年、細胞内エネルギーセンサーである AMP 依存性プロテインキナーゼ(AMPK)が、HDAC の制御に関与することが明らかになり、また我々は予備実験において、ゼータ型ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK $\zeta$ )がこの AMPK の活性化と HDAC の発現制御に関与する知見を得ている。

本研究では AMPK と DGK $\zeta$  を介する HDAC 等の関連タンパクの制御機構を追求し、神経障害性疼痛の分子メカニズムの解明および疼痛緩和の方策を模索する。



## 3. 研究の方法

インキュベーター内部を 1%酸素 / 5%二酸化炭素 / 94%窒素に設定し、種々の培養細胞を 24 時間培養後、AMPK の活性化をウエスタンブロットティングで検討する。AMPK 活性化の程度と種々の HDAC サブタイプの発現量の変化を検証する。

内因性 DGK を変化させた細胞 (DGK ノックダウン細胞、DGK ノックアウト細胞) を用いて、上記の実験を施行する。AMPK の活性化と HDAC アイソザイムの発現変化が、DGK の発現レベルによってどのように影響されるかを検討する。また、その周辺蛋白の発現量や活性化や、細胞内の ATP についても検討する。

## 4. 研究成果

ジアシルグリセロール (DG) のリン酸化酵素であるジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) ファミリーのうちゼータ型 DGK (DGK $\zeta$ ) の発現減少による影響を、培養細胞を用いて検討した。DGK 発現減少細胞を樹立し、低酸素刺激によるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) アイソザイム、及び脱アセチル化活性を持つ NAD<sup>+</sup>依存性の脱アセチル化酵素 (SIRT) の発現変化を調べた。

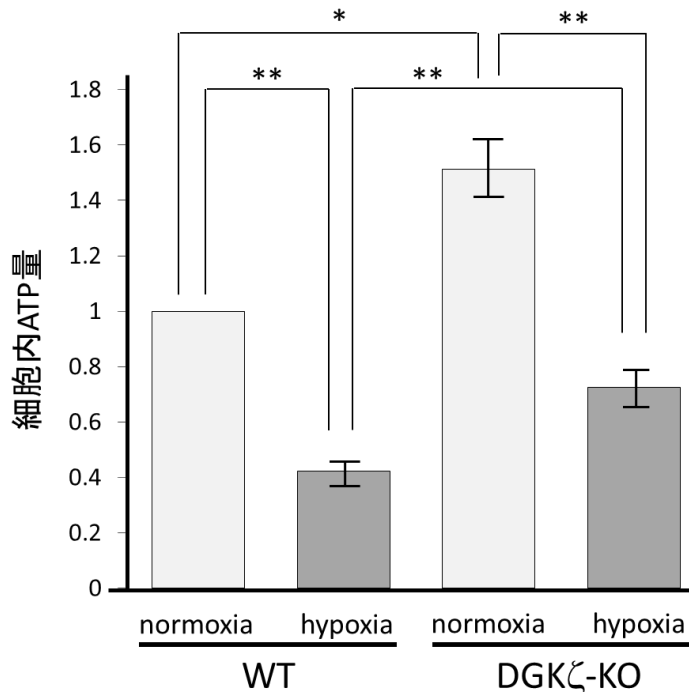
DGK 発現減少細胞において、HDAC1~6 のアイソザイムの内 HDAC3 の発現が減少していた。また低酸素刺激により HDAC3 は減少するが、DGK 発現減少細胞では HDAC3 の減少の程度が著しいことを見出した。また、SIRT1 および SIRT7 でも同様の傾向を認めた。これらの変化は統計学的にも有意であった。

AMPK の蛋白発現は、野生型においては低酸素負荷により時間依存的に増加した。一方 DGK 発現減少細胞における AMPK 蛋白は、正常酸素圧で既に高い発現レベルを示していたが、逆に低酸素負荷により次第に減少することが明らかとなった。次にリン酸化抗体を用いて活性化素刺激で増加するが、DGK 発現減少細胞においては、野生型と比較してより有意に高い活性化が生じていることが判明した。

以上より、DGK はタンパクの脱アセチル化やエネルギー関連タンパクにおいて何らかの影響を与えている可能性があり、また低酸素刺激によりその影響に変化が認められる可能性が示唆された。

実際の ATP 量をホタルルシフェラーゼ発光法で測定したところ正常酸素状態において、DGK<sup>-</sup>KO MEF の細胞内 ATP は、野生型の約 1.5 倍と高かった。24 時間の低酸素負荷を行うと、細胞内 ATP は両者とも正常酸素時の約 50% 程度に減少し、正常酸素の場合と同様に、DGK<sup>-</sup>KO MEF の細胞内 ATP は野生型の約 1.5 倍と高値であった。

DGK 発現減少細胞で AMPK の活性化が亢進していたため、AMPK のリン酸化酵素である LKB1、CaMKK についても解析を行ったが、その両者との因果関係は明らかではなく、他のリン酸化酵素との関連が示唆された。



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 件)

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

取得状況 (計 件)

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

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：川前 金幸

ローマ字氏名：KAWAMAE, kaneyuki

所属研究機関名：山形大学

部局名：医学部麻酔科学講座

職名：教授

研究者番号（8桁）：70254026

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。