

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16555

研究課題名（和文）UCP4発現誘導による脳虚血耐性獲得メカニズムの解明と新たな脳梗塞治療法への挑戦

研究課題名（英文）Elucidation of the cerebral ischemic tolerance by inducing UCP4 expression, and challenging of the novel therapeutic approach for cerebral infarct

研究代表者

福司 康子（Fukushi, Yasuko）

静岡大学・電子工学研究所・学術研究員

研究者番号：50722683

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア脱共役蛋白質 uncoupling protein 4 (UCP4) は、小脳室頂核 (FN) の電気刺激による脳梗塞の虚血耐性獲得に重要な役割を果たすと考えられている。本研究ではUCP4の発現誘導メカニズムを検討した。UCP4の発現は脳部位によって異なるものの、FN刺激を行うと大脳皮質神経細胞で有意な増加を示した。またUCP4の発現はカルバコール投与で亢進しアトロピンで抑制されたことから、FN電気刺激によってコリン作動性神経回路が活性化され大脳皮質に作用しUCP4の発現が誘導されることを明らかにした。UCP4の発現によって活性酸素の発生が抑えられ細胞死を防ぎ、神経保護に働くと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UCP4の役割や機能については一定の見解が得られていないものの、脳梗塞の細胞死を抑制できる可能性だけではなく、アルツハイマー病の治療にも関係する可能性が考えられ（アルツハイマー病ではUCP4の発現が低下していることが報告されている）、新たな治療戦略としても期待される。

研究成果の概要（英文）：The mitochondrial uncoupling protein 4 (UCP4) is thought to play an important role in acquiring ischemic tolerance in cerebral infarction by electrical stimulation of the cerebellar fastigial nucleus (FN). In this study, we elucidated the mechanism of UCP4 expression induction. It was suggested that UCP4 expression was significantly increased in cerebral cortical neurons by FN stimulation, although the expression of UCP4 varied depending on the brain region. UCP4 expression was enhanced by carbachol administration and suppressed by atropine, indicating that FN electrical stimulation activates the cholinergic pathway and acts on the cerebral cortex to induce UCP4 expression. The expression of UCP4 might suppress the generation of reactive oxygen species and prevents cell death, thus contributing to neuroprotection.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：ミトコンドリア脱共役蛋白質 脳虚血 神経保護 虚血性神経細胞障害 低酸素 脳電気刺激

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ラット中大脳動脈閉塞後に1時間の小脳室頂核(FN)電気刺激を行うと脳梗塞が縮小することが報告されている。またこれまでの研究で、FN刺激によって大脳に虚血耐性を獲得することが明らかにされてきた。さらにこのとき大脳皮質に、ミトコンドリア脱共役蛋白 uncoupling protein 4 (UCP4) の発現が亢進しており、UCP4 が FN 電気刺激による虚血耐性獲得に重要な役割を果たす可能性が示唆されている。

しかしながら、UCP4 の発現と FN 刺激による虚血耐性の関係やそのメカニズムは不明である。UCP4 が神経細胞を酸化ストレスから守る可能性は示唆されているものの、UCP4 に関する研究は少なく、その役割や機能は解明されていない。

2. 研究の目的

FN 電気刺激による脳虚血耐性獲得のメカニズム解明に関して、UCP4 の発現メカニズムを明らかにする。コリン作動性経路で UCP4 の発現が誘導されるのか、また虚血による細胞死を抑制するかどうか、臨床応用に向けた基礎実験として、細胞レベルだけではなく個体レベルでの検証も行う。

3. 研究の方法

- (1) FN 電気刺激による UCP4 の発現がコリン作動性経路を介して行われるという仮説を立て、アセチルコリン受容体の作動薬であるカルバコール (CCh) 投与によって UCP4 の発現が誘導されるか検証した。まず UCP4-tdTomato (UCP4 promote 赤色蛍光タンパク質 tdTomato レポーターベクター) を作製し、tdTomato の赤色蛍光を観察することで UCP4 の発現を評価する方法を確立した。培養細胞を用いた実験においては、生後1日齢 Wistar ラットの初代培養大脳皮質神経細胞に UCP4-tdTomato をトランスフェクション後 1 μM CCh を投与して、培養蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス撮影を行い UCP4 の発現を観察した。また個体レベルの検討には、SHR ラット (12 週齢オス) を用いた。ラット脳室にカニュラを設置し、UCP4-tdTomato をリポフェクション法にて脳室内に投与後、インフュージョンポンプを使用して脳室内に 10 μM CCh を投与した。その後脳スライスを作製し発現の観察を行った。
- (2) UCP4 の発現局在を明らかにするため、ラット初代培養大脳皮質細胞を用いて免疫染色を行った。さらにラットに FN 電気刺激を行ったときの UCP4 の脳内発現量 (大脳皮質、脳幹、中脳、海馬) を Western blot によって評価した。
- (3) 脳虚血時に細胞代謝にストレスをもたらすものとして酸素濃度の低下が挙げられることから、初代培養大脳皮質神経細胞を用いて低酸素低グルコース負荷 (OGD) を行った。酸素濃度を 0.1% ~ 21.0% まで 0.1% 単位で制御可能な CO_2 インキュベーターシステムを使用し、また培地内の溶存酸素濃度を制御して、細胞での疑似的な虚血モデルを構築した。1 μM CCh 投与または $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ チャネル開口薬のジアゾキシド (500 μM) 投与によって虚血耐性を獲得するかどうか、生存率での評価を行った。

4. 研究成果

- (1) 初代培養大脳皮質神経細胞に CCh を投与すると、UCP4 の発現はコントロール群と比較して 1.4 倍増加した。またアトロピンによってその発現は抑制された (図 1)。SHR ラットを用いた実験においても、脳室内に CCh 投与を行うと、大脳皮質広範に UCP4 の発現が誘導され、その発現量はコントロール群に比べて有意に増加していた。これらの結果より、コリナジックな経路で (アセチルコリン受容体を介して) UCP4 の発現が誘導されることを明らかにした。

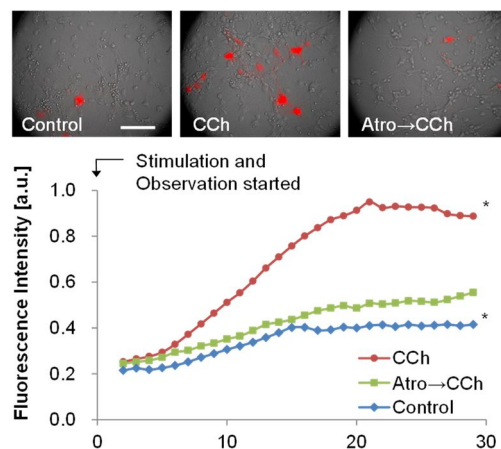


図 1. CCh 投与による UCP4 発現

(2) UCP4は神経細胞に多く発現する(図2)。UCP4の発現は脳部位によって異なるものの、FN刺激を行うことで大脳皮質のUCP4発現が有意に増加することが示唆された(FN刺激あり・なしの条件で、大脳皮質、脳幹、中脳、海馬でのUCP4発現を観察)。

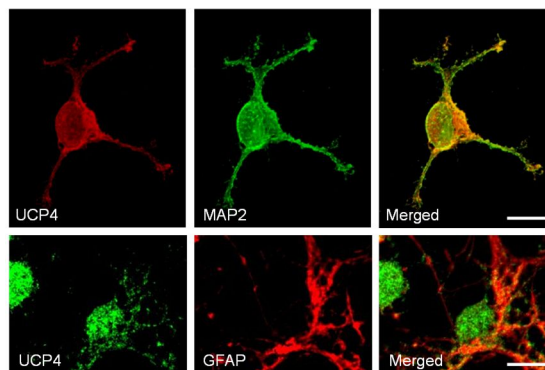


図2. UCP4の局在

(3) まず1~6% OGD負荷によって細胞生存率が低下することを確認した。次に、OGD負荷の前にCCh投与を行い生存率を評価したところ、CCh投与の有無による生存率の有意差は認められなかった。一方、ジアゾキシド投与後にOGD負荷を与えると、生存率が68%から76%に有意に増加した(図3)。これは虚血時のmitoK_{ATP}チャネル開口によって細胞死が抑制される可能性を示唆している。

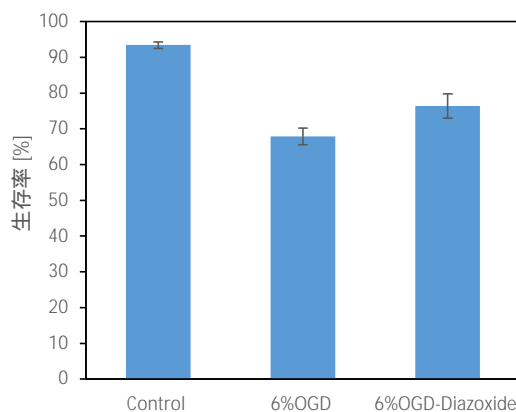


図3. OGD負荷による生存率

以上、FN電気刺激によってコリン作動性神経回路が活性化され大脳皮質に作用してUCP4の発現が誘導されることを明らかにした。UCP4の発現によって活性酸素の発生が抑えられ細胞死を防ぎ、神経保護に働くと考える。

<引用文献>

Reis DJ, Berger SB, Underwood MD, Khayata M. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus reduces ischemic infarction elicited by middle cerebral artery occlusion in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 11:810-818, 1991.
 Yamamoto S, Golanov EV, Reis DJ. Reductions in focal ischemic infarctions elicited from cerebellar fastigial nucleus do not result from elevations in cerebral blood flow. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 13:1020-1024, 1993.
 Golanov EV, Yamamoto S, Reis DJ. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus fails to rematch blood flow and metabolism in focal ischemic infarctions. *Neuroscience Letters*. 210:181-184, 1996.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 1. 著者名 Chuanqi Sun, Yasuko Fukushi, Yong Wang, Seiji Yamamoto | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Astrocytes Protect Neurons in the Hippocampal CA3 Against Ischemia by Suppressing the Intracellular Ca ²⁺ Overload | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 1-10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2018.00280 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 1. 著者名 Fukushi Yasuko, Golanov Eugene V, Koizumi Shinichiro, Thura Min, Ihara Hayato, Yamamoto Seiji | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 The Cholinergic Pathway and MitoKATP Induce UCP4 Expression Involved in Neuroprotection of FN Stimulation in Rats | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Stroke: Vascular and Interventional Neurology | 6. 最初と最後の頁 1-12 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/SVIN.122.000362 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Yasuko Fukushi, Chuanqi Sun, Seiji Yamamoto |
| 2. 発表標題 Contribution of astrocytes related to neuroprotection against delayed neuronal cell death in hippocampus |
| 3. 学会等名 Brain and Brain PET 2019（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Yasuko Fukushi, Chuanqi Sun, Seiji Yamamoto |
| 2. 発表標題 Expression of Mitochondrial Uncoupling Protein 4 (UCP4) in Association with ATP-dependent K ⁺ Channel Opening in Neuron |
| 3. 学会等名 Neuroscience 2019（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 福司康子、孫伝奇、山本清二 |
| 2. 発表標題 Carbachol induces expression of the mitochondrial uncoupling protein 4 (UCP4) in neurons |
| 3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|-------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 山本 清二 (Yamamoto Seiji) | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|