

機関番号：32644

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590385

研究課題名 (和文) シグナル伝達制御による特殊な酸化ストレス防御の分子機構の解析

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of particular defense system against oxidative stress induced by the control of signaling

研究代表者

竹腰 進 (TAKEKOSHI SUSUMU)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：70216878

研究成果の概要 (和文) : Protein kinase C (PKC)は、細胞内情報伝達系の Key 分子であり、phosphatidyl serine あるいは diacylglycerol (DAG) などの脂溶性情報伝達物質によって活性化されることが大きな特徴である。最近、脂質の過酸化反応が細胞内情報伝達系に及ぼすことが判明し、更に我々は DAG の過酸化物質 (過酸化 DAG) が強力な人工的な活性化物質である PMA に匹敵する PKC 活性化作用を有することを明らかにした。本研究では、過酸化 DAG により引き起こされた PKC 分子の過剰活性化により誘導される病変に対し特異的に対応する新しい防御機構を解析することを目的として、四塩化炭素投与ラット肝臓および虚血再灌流ラット脳における過酸化 DAG 量の変化と PKC  $\delta$  SV (PKC delta の splicing variant であり dominant negative 効果を有すると考えられる) の発現を観察した。さらに PKC  $\delta$  SV を高発現させた PC12 細胞の過酸化 DAG に対する防御作用を解析した。その結果、過酸化 DAG は四塩化炭素投与ラット肝臓および虚血再灌流ラット脳において有意に増加した。一方、PKC  $\delta$  SV の遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、このベクターを用いて PKC  $\delta$  SV を PC12 細胞に高発現させたところ、この PKC  $\delta$  SV 高発現細胞では、PKC 活性化物質による PKC の過剰活性化が抑制されることが判明し、PKC  $\delta$  SV は PKC 分子依存性シグナルに抑制的に作用する分子であることが強く示唆された。以上の結果から、酸化ストレスが負荷された in vivo の組織中では過酸化 DAG が増大し、情報伝達異常・細胞傷害が誘導されることが判明し、PKC  $\delta$  SV はその傷害作用に対して抑制因子として働いていることが強く示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Protein kinase C (PKC) is a key molecule for intercellular signaling pathway in physiological conditions. PKC is an enzyme which is activated by calcium ion and lipids such as phosphatidylserine and 1,2-diacylglycerol (DAG). In recent years, many evidences that lipid peroxidation participates in intracellular signal transduction in physiology and pathology of aerobic organisms have been presented. We further demonstrated that 1,2-diacylglycerol hydroperoxide (oxidized-DAG) activated rat brain PKC as efficiently as phorbol ester, powerful artificial PKC activator. In this study, to elucidate the mechanism of novel and specific defence system against aberrant over-activation of PKC signaling by oxidized-DAG and subsequent to cell injury, we observed oxidized-DAG content and the expression of PKC  $\delta$  SV (which is PKC  $\delta$  splicing variant and may be considered as a dominant negative mutant of PKC  $\delta$  molecule) in two animal models such as carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-treated rat liver and ischemia-reperfusion (IR)-injured rat brain. In addition, the protective effects of PKC  $\delta$  SV on oxidative stress were analyzed using PKC  $\delta$  SV over-expressed PC12 cell. Oxidized DAG was significantly increased in both models. PKC  $\delta$  SV was barely detected in normal and carbon tetrachloride-treated rat liver. On the other hands, PC12 cells over-expressing PKC SV resistant to over-activation of

PKC signaling. These results suggested that oxidized-DAG is a key molecule for oxidative stress and PKC  $\delta$  SV may have a specific function for the protection of oxidative stress caused by oxidized DAG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010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：基礎医学・実験病理学

キーワード：細胞

### 1. 研究開始当初の背景

PKCは、イノシトール燐脂質情報伝達系のkey enzymeであり、種々のlipid mediatorの中でもDAGによって活性化されることにより様々な細胞応答に重要な役割を果たしている。我々はDAGが過酸化されることによりnative DAGの約3倍のPKC活性化作用を持つ強力な活性化物質に変質することを証明し、機能性脂質(DAG)の過酸化によるPKC過剰活性化と蛋白質リン酸化反応の異常亢進による病変発生の可能性を示唆した。生体内には活性化剤に対する感受性や局在部位などが異なる11種のPKCアイソザイムが存在することが知られている。我々は、過酸化DAGがこれら既存のPKCアイソザイムの中でも $\delta$ 分子種を特異的に強く活性化するというユニークな特性を明らかにした。更に、アデノウイルスベクターを用いてPKC $\delta$ 分子種を高発現させたラット胎児大脳皮質初代培養神経細胞に過酸化DAGを作用させるとMAPキナーゼカスケード(Raf→MEK→ERK)の過剰活性化とともに、最終的にはtau蛋白の過リン酸化を生じ細胞変性・細胞死に至ることが明らかとなった。更に、過酸化DAGがPhospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (PHGPx)により還元消去されることを見出し、過酸化DAGによる細胞傷害を防御する因子としてのPHGPxの役割を示した。一方、過酸化DAGによる神経細胞傷害の機序を追求する過程で、われわれはPKC $\delta$ (シグナル伝達促進性)と同様に過酸化DAGに強い結合性を有するがシグナル伝達特性の全く異なる新しいPKC分子(PKC $\delta$ SV:シグナル伝達抑制性)が存在することを見だし、本研究を着想するに至った。KC $\delta$ SVは、PKC $\delta$ 分子の制御領域(活性化物質の結合部位)のみからなる

alternative splicing variantとして報告されている分子と同一のものであることが判明しており、過酸化DAGに強く結合するが蛋白質リン酸化活性を持たないことから過酸化DAGによる情報伝達異常亢進を抑制(dominant negative効果)しうる分子であることが強く示唆される。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、脂溶性情報伝達経路の核に位置するジアシルグリセロール(DAG)の過酸化とそのプロテインキナーゼC(PKC)活性化作用の変質(過剰亢進)により誘導される病変に対し特異的に対応する新しいシグナル伝達制御の分子機構をin vivo脳組織内において厳密に検証し、酸化ストレス防御システムとしてのシグナル伝達制御の役割を追求する。過酸化DAGに対する応答性の異なる2種のPKC分子種(PKC $\delta$ およびPKC $\delta$ SV)によるシグナル伝達促進・抑制の分子機構をin vivo脳組織内において精査し、酸化ストレス傷害におけるこれらの正負のシグナル伝達分子の役割を追求する。

### 3. 研究の方法

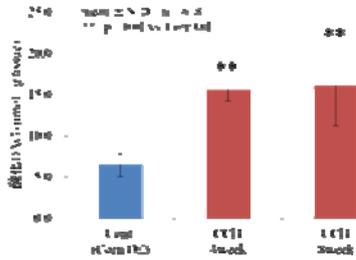
- (1) 四塩化炭素投与あるいは虚血再灌流により酸化ストレスを負荷したモデル動物における過酸化DAG産生を検討する
- (2) 1の動物モデルにおけるPKCシグナル伝達系(MAPキナーゼ)およびレドックスシグナル系の活性化の動態を観察する。
- (3) 1のモデル動物組織におけるPKC $\delta$ SVの発現動態を解析する。
- (4) PKC $\delta$ SVを高発現させたPC12細胞の過酸化DAGに対する感受性を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 酸化ストレス負荷モデル動物組織における過酸化DAGおよびPKCシグナル系の動態

四塩化炭素投与ラット肝臓では過酸化DAGが有意に増加した(図1)。

図1



虚血再灌流ラット脳でも同様に過酸化DAGの量が有意に増加していた。

また、四塩化炭素投与により過酸化DAGが増大した肝組織では、PKC $\alpha$ および $\delta$ 分子種が活性化されていることが判明した。さらにPKCの標的分子となることが報告されているNf $\kappa$ B分子の活性化が促進すると共に、TNF $\alpha$ の発現量が増加することが免疫組織化学およびreal-time RT-PCR法により明らかとなった。しかし、PKCの標的分子として知られているMAPキナーゼカスケードの分子の活性化は認められなかった。

(2) 酸化ストレスを負荷した動物組織におけるPKC $\delta$ SVの動態

正常ラット肝臓および四塩化炭素を投与したラット肝臓ではPKC $\delta$ SVの発現は殆ど認められなかった。

(3) PKC $\delta$ SVを高発現する細胞

アデノウイルスベクターを用いてPKC $\delta$ およびPKC $\delta$ SVを高発現させた細胞を作成した。PKC $\delta$ を高発現する細胞では過酸化DAGによるPKCの過剰活性化に対する感受性が著しく増大した。一方、PKC $\delta$ SVをこう発現させた細胞では、ホルボールエステルなどの強力なPKC活性化剤によって誘導される作用を抑制することが判明した。以上の結果から、酸化ストレスが負荷されたin vivoの組織中では過酸化DAGが増大し、情報伝達異常・細胞傷害が誘導されることが判明し、PKC $\delta$ SVはその傷害作用に対して抑制因子として働いていることが強く示唆された。

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11件)

1) Noboru Egashira, Susumu Takekoshi, Mao Takei, Akira Teramoto and Robert Yoshiyuki Osamura Expression of FOXL2 in Human Normal Pituitaries and Pituitary Adenomas. Modern Pathology in press

2) Emiko Akasaka, Susumu Takekoshi, Yosuke Horikoshi, Kentarou Toriumi, Muneo Miyasaka and Akira Ozawa Protein oxidative damage and heme oxygenase in sunlight exposed human skin: Role of MAPK responses to oxidative stress. Tokai Journal Experimental Medicine 2010:35:152-164

3) Xiaoyan Tang, Susumu Takekoshi, Johbu Itoh, Shinobu Umemura, Sunao Shoji, and Robert Yoshiyuki Osamura. Somatostatin analogue inhibits the mobility of prostate carcinoma cells: a new therapeutic method for advanced prostate carcinoma. Int J Oncol 2010:37:1077-1083

4) Katsuhiko Miyajima, Susumu Takekoshi, Johbu Itoh, Kochi Kakimoto, Takashi Miyakoshi and Robert Yoshiyuki Osamura. Inhibitory Effects of Anti-VEGF Antibody on the Growth and Angiogenesis of Estrogen-induced Pituitary Prolactinoma in Fischer 344 Rats: Animal Model of VEGF-targeted Therapy for Human Endocrine Tumors. Acta Histochemica Cytochemica 2010:43:33-44

5) Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Yoshiyuki Osamura, Susumu Takekoshi, Yoshio Suzuki. Microtomographic Analysis of Neuronal Circuits of Human Brain. Cerebral Cortex 2010:20:1739-1748

6) Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Yoshiyuki Osamura, Susumu Takekoshi, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki. Submicrometer tomographic resolution examined using a micro-fabricated test object. Micron 2010:41:90-95

7) Hanako Kajiya, Susumu Takekoshi, Mao Takei, Noboru Egashira, Takashi Miyakoshi, Robert Y Osamura. Selection of buffer pH by the isoelectric point (pI) of the antigen for the efficient heat-induced epitope retrieval: Re-appraisal for nuclear protein patho-biology. Histochem Cell Biol. 2009:132:659-667

8) Yoshiyuki Osamura, Noboru Egashira, Hanako Kajiya, Mao Takei, Maya Tobita, Takashi Miyakoshi, Chie Inomoto, Susumu Takekoshi, and Akira Teramoto Pathology, Pathogenesis and Therapy of

Growth Hormone (GH)-producing Pituitary Adenomas: Technical Advances in Histochemistry and Their Contribution. Acta Histochemica Cytochemica 2009:42:95-104

9) Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Susumu Takekoshi, R. Yoshiyuki Osamura and Yoshio Suzuki X-ray microtomographic imaging of three-dimensional structure of soft tissues. Tissue Engineering 2008:14:359-363

10) Kochi Kakimoto, Susumu Takekoshi, Katsuhiko Miyajima and R. Yoshiyuki Osamura. Hypothesis for the mechanism for heat-induced antigen retrieval occurring on fresh frozen sections without formalin-fixation in immunohistochemistry. Journal of Molecular Histology 2008:39:389-399

11) Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Masami Ohyama, Susumu Takekoshi, R. Yoshiyuki Osamura, Yoshio Suzuki Three-dimensional microtomographic imaging of human brain cortex Brain Research 2008:1199:53-61

[学会発表] (計 5 件)

1) 酸化ストレスによる細胞形態変化の分子機構解析 第 42 回日本臨床分子形態学会総会 ワークショップ 2010 年 9 月

2) 免疫組織化学の高感度検出法 ~技術と応用~ 第 50 回日本組織細胞化学会総会 ランチョンセミナー 2009 年 9 月

3) レーザーマイクロダイセクション法の分子生物学への応用 ニューマイクロスコピー研究会 2009 年 3 月

4) Advantages of Laser Microdissection in Histochemistry, Molecular Biology and Pathology 13th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry 2008 年 8 月 Workshop lecture

5) 四塩化炭素による酸化ジアシルグリセロール産生増加と肝細胞傷害 日本酸化ストレス学会 2008 年 6 月

[図書] (計 3 件)

1) R. Mizutani, A. Takeuchi, K. Uesugi, S. Takekoshi, R.Y. Osamura, Y. Suzuki Unveiling 3D Biological Structures by X-ray Microtomography Microscopy: Science, Technology, Applications and Education (2010)

2) 竹腰進、平林華子、江頭登、梅村しのぶ、長村義之 レーザーマイクロダイセクション法を用いた分子病理学的解析 細胞 Vol.42 No.2 2010 年 ニューサイエンス社

3) Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Susumu Takekoshi, R. Yoshiyuki Osamura, Yoshio Suzuki Three-dimensional microstructural analysis of human brain tissues by using synchrotron radiation microtomographs. In Handbook on White Matter Editor: T. B. Westland, R. N. Calton, pp247-277 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹腰 進 (TAKEKOSHI SUSUMU)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号 : 70216878

### (2) 研究分担者

瀧澤 俊也 (TAKIZAWA SHUNNYA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号 : 70197234

### (3) 連携研究者

長村 義之 (OSAMURA YOSHIYUKI)

国際医療福祉大学・大学院・教授

研究者番号 : 10100992