

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591798

研究課題名(和文) 中枢神経系における神経保護作用の分子基盤の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of neuroprotection in astrocytes

研究代表者

田辺 久美子 (TANABE KUMIKO)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30402209

研究成果の概要(和文)：低分子量ストレス蛋白質のひとつである Heat shock protein (HSP) 27 は分子シャペロンとして知られており、近年、HSP27 が免疫応答において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。中枢神経系においては虚血など様々な刺激によりその発現およびリン酸化が促進することが知られているが、その役割の詳細は明らかではない。C6 グリア細胞において IL-1 β による IL-6 の産生における、HSP27 の役割を検討した結果、リン酸化 HSP27 は、IL-1 β による IL-6 の産生を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Heat shock protein 27 (HSP27), a low-molecular-weight HSP, is recognized as a molecular chaperone. In response to various stimuli, HSP27 expression is induced in the CNS. However, the exact roles of HSP27 in the CNS have not yet been clarified. We investigated the role of HSP27 in the IL-1 β -induced IL-6 synthesis in C6 cells. In conclusion, it is suggested that phosphorylated status of HSP27 has a switching role in the IL-1 β -induced IL-6 synthesis in C6 glioma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：麻酔・疼痛治療

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード：中枢神経保護、サイトカイン、Heat shock protein

1. 研究開始当初の背景

(1) グリア細胞は種々の神経栄養因子、神経生存因子を産生し、多くの神経伝達物質・調節物質の受容体を発現している。グリア細胞は、神経細胞との相互作用を介して神経細胞の生存・維持に関わっており、脳虚血、脳障害時に

は反応性アストロサイトとなり、病態の発症・進展・修復に重要な役割を担っていると考えられている。したがって、グリア細胞の機能低下・細胞死は中枢神経の機能に大きな影響を及ぼすと考えられる。

(2) 中枢神経系が障害を受けると活性化アストロサイト、マイクログリアが変性した神経細胞を貪食・処理すると同時に、サイトカイン、Nitric oxide (NO)、フリーラディカル、興奮性アミノ酸など神経障害因子を産生する。それにより神経細胞が障害されると同時に、interleukin (IL)-2、IL-3、IL-6、granulocyte macrophage colony-stimulating factor等の神経栄養作用を持つサイトカインや、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) など神経栄養因子、神経成長因子 nerve growth factor (NGF) の産生を誘導する IL-1、IL-4、IL-5、transforming growth factor (TGF) などのサイトカインの産生が促進され、神経細胞の障害を軽減させる方向に働く。

(3) ストレス蛋白質 (heat shock protein; HSP) は細胞が様々なストレスにさらされると発現し、その働きの一つに、分子シャペロンとして細胞保護作用があることが知られている。虚血後脳障害に関与しているという報告もなされている。低分子量ストレス蛋白質の活性化や不活性化により、神経細胞、グリア細胞の分化やその機能がどのように変化するかについて明確にした報告はなく、低分子量ストレス蛋白質がどのようなメカニズムで中枢神経系の働きを調節しているのかについては明らかではない。

2. 研究の目的

(1) 中枢神経障害時にアストロサイトから産生される、神経障害因子、神経栄養因子の産生機序を明らかにする。

(2) 中枢神経系における低分子量ストレス蛋白質の機能を明らかにすることにより、中枢神経保護作用の機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞死との関連が示唆されているサイトカイン (IL-1 β 、6、10、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interferon γ 等)、NO、フリーラディカル、興奮性アミノ酸などの合成・分泌に及ぼす影響を immunoblot 法、PCR 法、ELISA 法により検討する。

(2) 神経栄養因子として働くサイトカイン (IL-1、2、3、4、5、6、TGF- β)、

GDNF などの神経成長因子の合成・分泌に及ぼす影響を immunoblot 法、PCR 法、ELISA 法により検討する。

(3) HSP27 の siRNA を作成し、グリア細胞に HSP27 の siRNA を導入することで HSP27 をノックダウンさせ、種々の神経成長因子 (NGF、BDGF、neurotrophin-3、4、5 等)、神経伝達物質 (GABA、グリシン、ドーパミン、グルタミン酸等)、神経ペプチド (エンドルフィン、カンナビノイド) の反応性の変化を immunoblot 法、PCR 法、ELISA 法により検討する。

4. 研究成果

(1) 1、protein kinase C の活性化物質である TPA は時間依存性に HSP27 のリン酸化を促進した。2、adenylyl cyclase の活性化物質である forskolin、透過性 cyclic AMP アナログの dibutyryl-cAMP、adenylyl cyclase-cAMP 系を活性化する PGE₁、PGE₂ は TPA による HSP27 のリン酸化を抑制した。3、dexmedetomidine は単独では HSP27 の発現レベルおよびそのリン酸化には影響を及ぼさなかったが、forskolin、PGE₁、PGE₂ による HSP27 のリン酸化の抑制を解除した。dexmedetomidine は中枢神経保護作用を有すると報告されているがその作用機序は明らかではない。以上の結果から、グリア細胞において HSP27 は protein kinase C の活性化によりリン酸化されること、adenylyl cyclase-cAMP 系はこのリン酸化を抑制すること、dexmedetomidine は adenylyl cyclase-cAMP 系を抑制することにより、HSP27 のリン酸化に対して影響を及ぼしていることが明らかとなった。dexmedetomidine は HSP27 のリン酸化を制御することにより、中枢神経保護作用に影響を与える可能性が示唆された。

(2) 1、IL-1 β は時間、濃度依存性に GDNF の遊離を促進した。2、IL-1 β は STAT3、p38 MAP kinase、p44/p42 MAP kinase、SAPK/JNK、I κ B のリン酸化を促進した。3、IL-1 β による GDNF の遊離は JAK inhibitor 1 (STAT3 活性化 kinase 阻害剤)、SB203580 (p38 MAP kinase 阻害剤)、PD98059 (p44/p42 MAP kinase 活性化 kinase 阻害剤)、wedelolactone (IKK 阻害剤) によって抑制されたが、SP600125 (SAPK/JNK 阻害剤) には影響を受けなかった。以上より、グリア細胞において IL-1 β は STAT3、p38 MAP kinase、p44/p42 MAP kinase、I κ B の活性化を介して GDNF の遊離を促進することが示唆された。

(3) 1、TNF- α は IL-6 の遊離を促進し、MYPT-1

をリン酸化した。2、IL-6の遊離はY-27632とfasudil (Rho-kinase阻害剤)によって抑制された。3、I κ B阻害剤はTNF- α によるIL-6の遊離を抑制したが、Rho-kinase阻害剤はTNF- α によるI κ Bのリン酸化には影響しなかった。4、TNF- α はp38 MAP kinase、SAPK/JNK、p44/p42 MAP kinaseのリン酸化を促進し、IL-6の遊離はSB203580 (p38 MAP kinase阻害剤)、SP600125 (SAPK/JNK阻害剤)によって抑制されたが、PD98059 (p44/p42 MAP kinase活性化kinase阻害剤)には影響を受けなかった。5、Rho-kinase阻害剤はTNF- α によるp38 MAP kinaseとSAPK/JNKのリン酸化を抑制した。以上よりグリア細胞においてTNF- α によるIL-6の遊離は、p38 MAP kinase、SAPK/JNK、I κ Bの活性化を介している可能性を示した。Rho-kinaseはTNF- α によるIL-6遊離において、I κ B/NF κ B経路には関与せずp38 MAP kinaseおよびSAPK/JNKの上流において作用し、正の調節を行っていると考えられた。Rho-kinase経路は中枢神経系疾患の治療ターゲットとなる可能性があり、Rho-kinase阻害薬は中枢神経系疾患の新たな治療薬となる可能性が示唆された。

(4) 1、TNF- α はNF κ BのSer 536とSer 468のリン酸化を促進したがSer 276とSer529には影響しなかった。2、I κ B kinase阻害剤であるwedelolactoneはTNF- α によるIL-6遊離を抑制した。3、wedelolactoneはTNF- α によるI κ BおよびNF κ BのSer 536とSer 468のリン酸化を抑制した。4、TNF- α はSTAT3のリン酸化を促進した。5、TNF- α によるIL-6遊離はJAK inhibitor 1 (JAK阻害剤)によって抑制された。6、apocynin (NADPH oxidase阻害剤)はTNF- α によるIL-6のmRNA合成およびその遊離を抑制した。7、apocyninはTNF- α によるI κ B、NF κ B、p38 MAP kinase、SAPK/JNK、STAT3のリン酸化には影響を与えなかった。以上より、グリア細胞においてTNF- α はI κ B/NF κ B経路、p38 MAP kinase、SAPK/JNKの活性化に加えて、STAT3の活性化を介してIL-6の産生を促進することが示唆された。TNF- α によるIL-6の産生はNF κ BのSer 536とSer 468でのリン酸化を介していることが示唆された。加えて、NADPH oxidaseがこれらのkinaseの下流で作用し、TNF- α によるIL-6産生に関与していることが示唆された。中枢神経系においても酸化ストレスがサイトカイン産生に関与することが示唆された。

(5) 1、IL-1 β はIL-6の遊離、産生を促進したが、HSP27の誘導には影響しなかった。

2、HSP27を強制発現させた細胞においてIL-1 β によるIL-6の遊離が増強された。3、リン酸化型HSP27を強制発現させた細胞においては、非リン酸化型HSP27を強制発現させた細胞と比しIL-1 β によるIL-6の遊離、産生のレベルは抑制された。以上よりグリア細胞においてリン酸化HSP27は、IL-1 β によるIL-6の産生を制御していることが示唆された。今後、HSP27とそのリン酸化状態の制御が神経保護やその他の中枢神経系疾患において、重要な治療対象となる可能性が新たに示唆された。

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5件)

- ① Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Dohi S, Kozawa O: Phosphorylation status of heat shock protein 27 regulates the interleukin-1 β -induced interleukin-6 synthesis in C6 glioma cells. Neuroscience 査読有、170, 2010, 1028-1034
- ② Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Iida H, Dohi S, Kozawa O: Mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. J Neuroinflammation 査読有、7, 2010, 16
- ③ Yamaguchi S, Tanabe K, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Iida H, Kozawa O, Dohi S: Involvement of Rho-kinase in tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 release from C6 glioma cells. Neurochem Int. 査読有、55, 2009, 438-445
- ④ Tanabe K, Nishimura K, Dohi S, Kozawa O: Mechanisms of interleukin-1 β -induced GDNF release from rat glioma cells. Brain Res. 査読有、1274, 2009, 11-20
- ⑤ Tanabe K, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Dohi S, Kozawa O: α_2 Adrenoreceptor agonist regulates protein kinase C-induced heat shock protein 27 phosphorylation in C6 glioma cells. J Neurochem. 査読有、106, 2008, 519-528

[学会発表] (計4件)

- ① 田辺久美子、Tumor necrosis factor- α によるグリア細胞からのInterleukin-6産生機序、日本麻酔科学会第57回学術集会、2010.06.06、福岡
- ② 田辺久美子、Mechanisms of

interleukin-1 β -induced GDNF release from rat glioma cells、9th European Meeting on glial cells in health and disease、2009.09.09、France

③ 田辺久美子、Interleukin-1 β によるグリア細胞からのグリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)遊離機序、日本麻酔科学会第56回学術集会、2009.08.16、神戸

④ 田辺久美子、グリア細胞におけるprotein kinase CによるHSP27リン酸化に対するdexmedetomidineの作用、日本麻酔科学会第55回学術集会、2008.06.13、横浜

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 久美子 (TANABE KUMIKO)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30402209

(2) 研究分担者

小澤 修 (KOZAWA OSAMU)
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90225417

(3) 連携研究者

()

研究者番号：