

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591806

研究課題名(和文) 遅発性神経細胞死における細胞内エネルギー代謝調節酵素に関する研究

研究課題名(英文) The Research of Intracellular Energy-Related Metabolic Regulatory Enzymes on Delayed Neuronal Cell Death

研究代表者

福田 志朗 (FUKUDA SHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70322245

研究成果の概要(和文):ラット断頭モデルでは断頭後60分後に p-AMPK α 2 および p-AMPK β 1 で増加傾向が認められ、脳虚血による AMPK 活性化の可能性が示唆された。ラット局所性脳梗塞モデルでは、AMPK 活性促進剤である AICAR を投与したところ、梗塞体積の減少傾向を認めた。スナネズミ前脳虚血モデルでは、AMPK 阻害剤である compound C 投与で海馬神経細胞傷害が増悪したが、AICAR 投与群でも同様であった。

研究成果の概要(英文): The tendency of increasing in p-AMPK α 2 and p-AMPK β 1 was observed in the brain samples 60 minutes after decapitation of rats. This result suggested that AMPK was activated by neuronal ischemia. Infarction volumes in focal ischemia with rat model were decreased by AICAR, which is one of the activators of AMPK. However, AICAR exacerbated neuronal damage in gerbil forebrain ischemia, and the same exacerbation was observed in the administration of Compound C, one of the AMPK inhibitors.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：麻酔・蘇生学

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：AMP-activated Protein Kinase、脳虚血、ラット、AICAR、compound C

1. 研究開始当初の背景

中枢神経組織は虚血・低酸素に脆弱で臨床での有効性が認められているのは傷害発生機序の解明や薬物治療法の基礎研究が多くなされているが、低体温や血糖の厳密なコントロールに限られているのが現状である。虚血・低酸素にともなう酸素供給の低下ないし途絶が神経細胞内において嫌気性エネルギー代謝をもたらし、細胞内での乳酸の蓄積、アシドーシスの助長による細胞傷害を増悪

させる一因と考えられている。この細胞傷害に対し、低体温は細胞内でのエネルギー需要を抑制すること、高血糖の補正は嫌気性代謝進行の原因である過剰な細胞内グルコースを除去することで虚血・低酸素による脳障害の増悪を改善させる効果をもたらすと考えられる。当施設においても、中枢神経の保護効果をもたらす有効な治療法として低体温療法 (Haranishi, et al. 2004; Wakamatsu, et al. 1999; Matsumoto, et al. 1997) および

血糖コントロールに関連する研究 (Tsuruta, et al. 2006) を続けてきた。

このように神経細胞内でのエネルギー代謝は虚血・低酸素性脳障害の機序において非常に重要な位置を占めるが、このエネルギー代謝を調節する重要な酵素として、AMP-activated Protein Kinase (AMPK)が最近注目されている。

AMPK は低酸素状態やストレス負荷によるATPの枯渇を感知し、その細胞内での産生を高めることで、細胞内エネルギー代謝のバランスを保つように調節する重要な酵素である(J Biol Chem. 41: 39653-61, 2003)。低酸素状態下での嫌気性代謝の進行は細胞内の乳酸の蓄積およびアシドーシスを助長し、細胞傷害を増悪させるが、McCulloughらによるマウス局所性脳虚血モデルでは、虚血侵襲が神経細胞内のAMPKを活性化するが、AMPK活性抑制薬はその梗塞体積を縮小させると報告している(J Biol Chem. 21: 20493-502, 2005)。しかし海馬神経細胞で観察される遅発性神経細胞死におけるAMPKの役割、さらに軽度低体温および血糖の厳密なコントロールによる脳保護効果の機序について、AMPKによるエネルギー代謝の調節と関連して検討したものはない。

2. 研究の目的

虚血・低酸素性神経細胞傷害発生の機序における、細胞内エネルギー調節酵素AMP-activated Protein Kinase (AMPK)の役割を解明する。さらにAMPK活性を促進・抑制する薬物を用いて、虚血性脳障害がいかに修飾されるかを観察し、その薬物的治療効果を検討する。

今回の研究では、AMPK活性を亢進する薬物(AICAR)および抑制する薬物(Compound C)を用いて、AMPK活性に対する薬物的修飾効果および神経細胞傷害の変化を観察する。AMPK活性を抑制することで神経細胞を虚血・低酸素から保護する報告が局所脳虚血モデルでみられるが、詳細ではない。本研究は虚血性脳障害におけるAMPKによる細胞内エネルギー代謝調節の解明、AMPKの活性を修飾する薬物を用いることで、中枢神経系に対して低体温療法や血糖の厳密な補正に代わる、より簡便かつ効果的な治療戦略を導き出す可能性の解明を目的とした。

3. 研究の方法

実験(1)

脳虚血後のAMPK活性の変化を観察した。脳虚血モデルとして、虚血状態が確実である点に基づき、ラット断頭モデルを用いた。生後7週齢(体重250-280g)のウィスター系雄ラットを5%イソフルランおよび酸素を投与し侵害刺激に反応しない深麻酔状態としたの

ちに断頭した。頭部を直ちにプラスチックバッグに入れ、37℃の高温槽に保存した。断頭後0分、30分、60分、120分後に頭部から脳標本(小脳を除く)を摘出し、液体窒素を用いて急速凍結した後に-80℃の冷凍庫に保管した。標本をSucrose-Tris緩衝液中でhomogenizeし免疫プロット法のための試料を作成した。試料は電気泳動の後、免疫プロット法によってp-AMPK α 、p-AMPK α 2、およびp-AMPK β 1を測定した。

実験(2)

AMPKの活性亢進を促す薬物AICARを虚血開始時に腹腔内投与し、AMPK活性を修飾することで梗塞体積がどのように変化するかを検証した。ウィスター雄性ラット(週齢8-9週)による右中大脳動脈永久閉塞モデルを作成し、虚血後約24時間に深麻酔下に脳を採取し2%TTC染色法(生食を溶媒として標本を染色液に30分間incubate)を用いて梗塞体積を評価した。投与薬物はAICAR500 μ gを生食1mlに溶解したもの、ないし生食1mlのみとした。実験にあたっての麻酔方法はイソフルラン吸入によるマスク麻酔・自発呼吸下で行った。脳虚血実験には3-0ナイロン糸を右内頸動脈から留置し同動脈を結紮して右中大脳動脈を閉塞させた。Sham実験では3-0ナイロン糸は挿入せず、その他は脳虚血実験と全く同じ手術操作を行った。本実験群を1)脳虚血-生食投与群(I-P)、2)脳虚血-AICAR投与群(I-A)、3)Sham実験-生食投与群(S-P)、4)Sham実験-AICAR投与群(S-A)に分けた(各群n=4)。梗塞体積は視交叉レベルでの脳冠状切断面において完全に脳梗塞に陥った領域をNIH imageソフトによって測定した。

実験(3)

AMPK活性の前脳虚血に対する影響を検証した。Mongolian gerbil雄性(雄性;体重60 \pm 7g)による前脳虚血モデルを作成した。再灌流後7日目に深麻酔下に4%ホルムアルデヒド灌流液で脳を固定・採取しヘマトキシリン・エオジン法を用いて海馬CA1での神経細胞数から遅発性神経細胞傷害の重症度を評価した。投与薬物はAICAR 500mg/kgないしCompound C 20mg/kg(20%DMSO溶解生食液で希釈)を虚血開始直前に腹腔内投与した。実験にあたっての麻酔方法は1.5%イソフルラン+30%亜酸化窒素+70%酸素吸入によるマスク麻酔・自発呼吸下で行った。両側総頸動脈を露出した後に血管クリップで一時的に遮断した。虚血中に側頭筋温を37.0 \pm 0.5℃に保った。本実験群を1)対照群、2)虚血3分間群、3)虚血5分間群、4)虚血3分間+AICAR投与群、5)虚血5分間+Compound C投与群の5群に分けた(各群n=4~5)。神経細胞数は、視交叉より尾側

2mmの冠状切片(厚さ5 μ m)での海馬CA1領域において光学顕微鏡400倍・1視野のもとでカウントし、両側神経細胞数の平均値をその値とした。

4. 研究成果

実験(1)

p-AMPK α では明かな変化は得られなかった。p-AMPK α 2、およびp-AMPK β 1は断頭60分後に増加し120後に減少する傾向があった。このことから、ラット全脳虚血状態において、AMPK α 2、およびAMPK β 1は経時的に活性が高まると共に虚血1時間後程度で活性が減少する可能性が示唆された。一般的にAMPKのサブユニットは α 、 β 、 γ の3つとされる。そのうち、 α は触媒性、 β は調節性、 γ はAMP:ATP比の調整に深い関係があるとされている。断頭モデルを用いたことから、脳-脊髄間の影響が排除された点では臨床での虚血障害の状況とは異なるものの、確実な虚血をもたらすという点で、脳細胞でのAMPKの変化を明かにすることができた。P-AMPK抗体の変化は、直接的なAMPK活性測定ではないが、そのリン酸化は間接的にAMPK活性を反映するものと考えられる。脳細胞障害の進行に伴いAMPKが活性化され60分程度でピークに達するとともに、おそらく自己融解などの影響を受けてAMPK自体が分解ないし非活性化することで、p-AMPKが低下したと考えられる。

実験(2)

1)脳虚血-生食投与群(I-P)、2)脳虚血-AICAR投与群(I-A)、3)Sham実験-生食投与群(S-P)、4)Sham実験-AICAR投与群(S-A)のうち、結果として、梗塞面積は1)では18336(標準偏差 \pm 2955)、2)では8874(標準偏差 \pm 9855)であり、3)4)はともに0で梗塞部位を認めなかった。この結果から、I-P群の梗塞体積を100としてI-A群は平均48.4であったが梗塞体積の個々のばらつきが大きく統計学的に有意差は得られなかった。S-P・S-A群では脳梗塞像は認められなかった。AICARは脳梗塞体積を減少させる傾向を示し、かつ虚血脳への明らかな障害を及ぼさなかった。脳虚血モデルとして、ナイロン糸を用いた中大脳動脈閉塞モデルはかつ臨床における血栓・塞栓症による脳梗塞として比較的良好に認められる点、さらに前脳虚血(全脳虚血)モデルにくらべ虚血が高度でなく、ペナンプラ領域をある程度もつという点で臨床治療に反映しやすいと考えられる。本実験では比較的低容量のAICARによって梗塞面積が低下する現象が認められた。ただし、今回の実験ではドプラーを用いるといった脳血流低下の確認がされていないため、脳虚血の程度を評価するという点で十分なモデル作成がなされていないこと、また各群の数が十分でないことから、

AICARだけが梗塞面積の減少を引き起こしたとは断言できないと考える。

実験(3)

1)対照群、2)虚血3分間群、3)虚血5分間、4)虚血3分間+AICAR投与群、5)虚血5分間+Compound C投与群の5群の結果として、海馬CA1での神経細胞数を1)において100とし、他群を比較した(n=5)。結果(±標準偏差)、1)100(±8.7)、2)82.0(±13.8)、3)36.1(±26.3)、4)56.8(±39.8)、5)12.2(±15.4)となった。1)と比較し2)、3)でそれぞれ82%、36%と神経細胞数が減少した。2)と比較し4)は細胞数が69%減少するとともに、5)は3)と比較し34%減少した。Compound CはAMPK活性を抑制し、AICARは活性化する。AMPK活性の過剰な抑制も促進と同様に神経細胞傷害が増悪することが示唆された。前脳虚血モデルは実験(2)の局所脳虚血モデルと比較し、虚血侵襲の程度が高い。McCulloughらの報告(J Biol Chem 2005)ではマウス中大脳動脈閉塞モデルにおいて、AMPK阻害剤であるCompound Cが梗塞体積を減少、活性促進剤であるAICARが梗塞体積を増加させる、という報告であった。本実験は、Compound CおよびAICARをともにMcCulloughらの報告と同量かつ同じ時点での薬剤投与によって、その虚血侵襲がいかに修飾されるか、を確認するものであった。ただし、虚血時間を異なるものとし、結果として、保護的作用をもつとされたCompound Cには虚血5分間、虚血侵襲を増悪させるとされたAICARには虚血3分間として比較を試みた。結果、虚血3分間より5分間の方が神経細胞傷害はより大きかったが、保護的に作用すると予想されたCompound Cはさらに増悪傾向を示し、一方AICARは障害を軽減しなかったものの、Compound Cほどではなかった。もちろん、本実験では同じ虚血時間による両薬剤投与の群が存在せず、かつ異なる薬剤量の群を作成していないため、一概にCompound Cの方がAICARと比較して脳虚血に関して障害をもたらしやすい、つまり脳虚血での神経細胞内におけるATP消費の抑制の方が消費促進よりも神経傷害をもたらす、とは断言できない。とはいえ、虚血モデルの違い、つまり虚血侵襲の大きさの相違によって、AMPK活性化による神経細胞障害の進行も同様に相違を生じる可能性は十分にあると考えられた。また、従来指摘されてきたが、同じ虚血モデルではあっても、局所脳虚血と前(全)脳虚血モ

デルでは、その病態に大きな違いがあることが示唆されたと言える。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 志朗 (FUKUDA SHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70322245

(2) 研究分担者

松本 美志也 (MATSUMOTO MISHIYA)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60243664

石田 和慶 (ISHIDA KAZUYOSHI)

山口大学・医学部付属病院・講師

研究者番号：80314813

(3) 連携研究者

なし