

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592116

研究課題名（和文） 脳損傷時における脂質代謝酵素の発現解析

研究課題名（英文） Expression of a lipid-metabolizing enzyme, diacylglycerol kinase, after brain damage

研究代表者

川前 金幸 (KAWAMAE KANEYUKI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70254026

研究成果の概要（和文）：ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）は細胞内情報伝達系の制御因子であり、脳内ニューロンに広く発現する。脳が損傷を受けると、壊死領域の癒痕化等によるリモデリングがなされ、損傷の限局化や神経再生の足場が形成される。本研究では、凍結脳損傷モデルにおけるゼータ型 DGK（DGK $\zeta$ ）の発現局在を解析した結果、正常ではニューロンに限局する DGK $\zeta$ が脳内の貪食細胞であるミクログリアに発現することを見出した。これらの結果より、DGK $\zeta$ は損傷を受けた脳の修復機構に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Diacylglycerol kinase (DGK) plays an important role in the intracellular signal transduction through the metabolism of a second messenger diacylglycerol. One of the DGK isozymes, DGK $\zeta$  was originally shown to be expressed in neurons under physiological conditions. However, we found that under pathological conditions, a cryoinjury brain model, DGK $\zeta$ -immunoreactivity is detected in activated microglia that phagocytose the debris after brain injury. These results suggest that DGK $\zeta$  participates in the remodeling of the brain after injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：麻酔科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：脳損傷、脂質代謝酵素、ミクログリア

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 脳は、神経細胞とグリア細胞の密接な連係の下で制御される生体情報コントロールセンターである。この情報中枢がひとたび障害されると、個体全体が制御不能に陥り、最悪の場合には死に至る。

(2) この原因として頻度の高いものは、交通事故等による脳損傷や脳動脈の閉塞や破綻に起因する虚血・出血性脳障害である。このような脳障害に関わる神経細胞およびグリア細胞における分子機構を理解することは、発症後の神経細胞保護ひいては個体蘇生の観点からも非常に重要である。

(3) また虚血・出血性障害に引き続いて梗塞巣が形成されるため、グリア細胞が主体となる壊死組織のリモデリング機構の理解も重要である。

(4) ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はプロテインキナーゼ C (PKC) の生理的活性化因子である DG のリン酸化酵素であり、DG の代謝を介して PKC 活性を制御すると考えられている。

(5) 我々はこれまでに正常ではニューロンに発現する DGK $\zeta$  (ゼータ) がラット脳虚血モデルの梗塞壊死領域においては貪食細胞に発現することを見出した。

(6) 脳損傷後に形成される癒痕組織にはミクログリア/マクロファージ、アストロサイト、新生血管など多様な細胞が含まれ、その相互作用によって組織の修復が行われる。

## 2. 研究の目的

本研究では凍結脳損傷モデルにおける DGK $\zeta$  の発現を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) ラット脳損傷モデルとして、液体窒素により冷却した鉛を経頭蓋骨に1分間接触させ凍結損傷を誘導した。

(2) このモデル動物の損傷直後、1日、4日および7日後の大脳皮質において DGK $\zeta$  抗体による免疫組織化学的解析を行った。

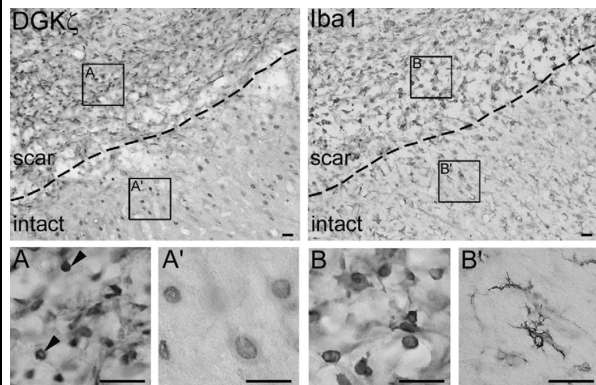
(3) また、貪食細胞のマーカーである Iba1 抗体、さらにミクログリアのマーカーである抗 GLUT5 抗体との二重染色を用いて DGK $\zeta$  発現細胞の同定を行った。

## 4. 研究成果

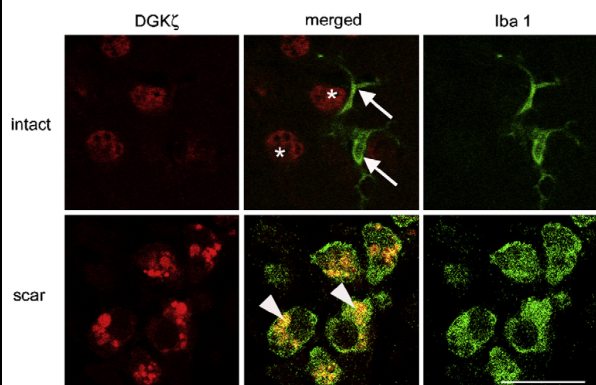
(1) DGK $\zeta$  抗体による免疫染色の結果、虚血モデルの梗塞壊死領域と同様に癒痕領域にも免疫陽性細胞が検出された。これらの細胞は Iba1 抗体陽性反応を呈することから、ミクログリア/マクロファージなどの貪食細胞であることが明らかとなった。

(2) また細かい突起を持たず、球形の形状を示すことから、これらの DGK $\zeta$  陽性細胞は、

活性化型の貪食細胞であると考えられた。

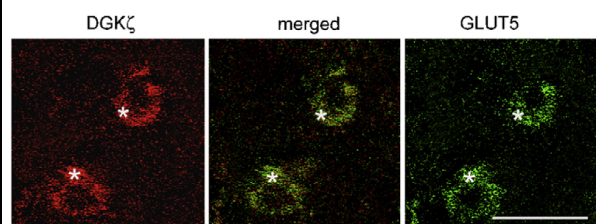


図の説明：凍結脳損傷7日目の大脳皮質の免疫組織化学像。癒痕化領域 (scar) では、DGK $\zeta$  および Iba1 の免疫陽性細胞が増加し球形あるいは楕円形の形状を示すことから、活性化型の貪食細胞に発現することを示唆している (A,B)。一方、癒痕化領域に近い正常領域 (intact) においては、DGK $\zeta$  はニューロンにのみ発現を示し (A')、一方 Iba1 は突起を持つ不活性化型のミクログリアに発現する (B')。

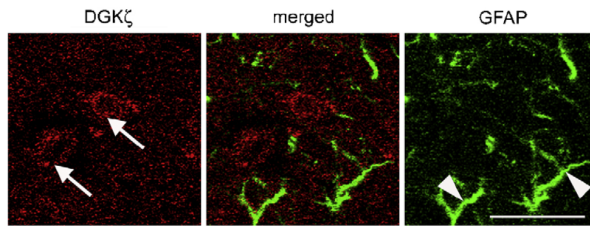


図の説明：正常領域 (intact) において DGK $\zeta$  と Iba1 はそれぞれ、ニューロン (\*) とミクログリア (矢印) に発現するが、癒痕化領域 (scar) において両者は、球形あるいは楕円形の活性化型貪食細胞に共発現する (矢頭)。

(3) これらの細胞はさらに、ミクログリアのマーカーである抗 GLUT5 抗体にも陽性反応を示す一方で、アストロサイトのマーカーである抗 GFAP 抗体には陰性であることから、癒痕領域の DGK $\zeta$  陽性細胞はミクログリアであると同定された。



図の説明：癩痕化領域において、DGK $\zeta$  とミクログリア特異マーカーである GLUT は共局在を示す (\*)。



図の説明：癩痕化領域において、DGK $\zeta$  (矢印) とアストロサイト特異マーカーである GFAP (矢頭) は共局在を示さない。

(4) この時、DGK $\zeta$  免疫反応は核内ではなく細胞質に認められることから、活性化型ミクログリアにおいては、虚血ストレス下における神経細胞と同様に、細胞質に DGK $\zeta$  の局在を示すことが明らかとなった。

## 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 13 件)

- ① Okada M, Hozumi Y, Ichimura T, Tanaka T, Hasegawa H, Yamamoto M, Takahashi N, Iseki K, Yagisawa H, Shinkawa T, Isobe T, Goto K. NAP Interaction of nucleosome assembly proteins abolishes nuclear localization of DGK $\zeta$  by attenuating its association with importins. *Exp Cell Res*. 2011;317:2853-63. (査読有)
- ② Saino-S S, Hozumi Y, Goto K. Excitotoxicity by kainate-induced seizure causes diacylglycerol kinase  $\zeta$  to shuttle from the nucleus to the cytoplasm in hippocampal neurons. *Neurosci Lett*. 2011;494:185-9. (査読有)
- ③ Iseki K, Hagino H, Zhang Y, Mori T, Sato N, Yokoya S, Hozumi Y, Goto K, Tase C. Altered expression pattern of testican-1 mRNA after brain injury. *Biomed Res*. 2011;32:373-8. (査読有)
- ④ 川前金幸, 鮎川勝彦, 内野博之, 中敏夫, 西田修, 成松英智, 池田寿昭. 集中治療室における危機管理体制の現状-全国調査-. 日本集中治療医学会. 2011;18:116-25. (査読有)
- ⑤ Endo S, Shibata S, Sato N, Hashiba E, Tajjimi K, Saito K, Kawamae K, Nakane M, Murakawa M, The Tohoku ALI Study Group. A prospective cohort study of ALI/ARDS in the Tohoku district of Japan(second report). *J Anesth*. 2010;24:351-358. (査読有)
- ⑥ Evangelisti C, Gaboardi GC, Billi AM, Ognibene A, Goto K, Tazzari PL, McCubrey JA, Martelli AM. Identification of a functional nuclear export sequence in diacylglycerol kinase- $\zeta$ . *Cell Cycle*. 2010;9,1-6. (査読有)
- ⑦ 岡田真行, 高田康輔, 川前金幸: 手術中に覚醒を必要とする脳神経外科手術 (awake craniotomy) の麻酔管理におけるレミフェンタニルの有効性. 麻酔. 2010;59:75-81. (査読有)
- ⑧ 永野達也, 伊関 憲, 仁木敬夫, 杉浦明日美, 二藤部丈司, 川前金幸: アナフィラキシージョックの治療に  $\beta$  遮断薬が影響を及ぼした心肺停止に陥った 1 症例. 日本集中治療医学会雑誌. 2010;17:207-10. (査読有)
- ⑨ Nakano T, Iseki K, Hozumi Y, Kawamae K, Wakabayashi I, Goto K: Brain trauma induces ex- pression of diacylglycerol kinase  $\zeta$  in microglia. *Neurosci Lett*. 2009 ; 46 : 110-115(査読有)
- ⑩ Evangelisti C, Astolfi A, Gaboardi GC, Tazzari P, Pession A, Goto K, Martelli AM. TIS21/BTG2/PC3 and cyclin D1 are key determinants of nuclear diacylglycerol kinase-  $\zeta$  -dependent cell cycle arrest. *Cellular Signalling* 2009;21:801-9. (査読有)
- ⑪ 伊関 憲, 永野達也, 杉浦明日美, 金井雅代, 仁木敬夫, 堀寧, 川前金幸: 嫌酒者によるメタノール中毒の 1 例. 中毒研究. 2009 ; 22(3) : 238-239. (査読有)
- ⑫ Hasegawa H, Nakano T, Hozumi Y, Takagi M, Ogino T, Okada M, Iseki K, Kondo H, Watanabe M, Martelli AM, Goto K. Diacylglycerol kinase  $\zeta$  is associated with chromatin, but dissociates from condensed chromatin during mitotic phase in NIH3T3 cells. *J Cell Biochem*. (2008)105:756-65. (査読有)
- ⑬ 大瀧恵, 伊関 憲, 池谷龍一, 奥山志野, 永野達也, 山川光徳, 川前金幸: 剖検により判明した心サルコイドーシスの 1 例. 日本救急医学会雑誌. 2008;19:229-234. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① Nakane M, Kurita S, Takahashi N, Yoshioka J, Oda S, Kawamae K. Inspiratory Trigger and Expiratory Termination Sensitivity of New Anesthesia Ventilators. American Society of Anesthesiologists annual congress 2010, San Diego ; October 2010
- ② 川前金幸, 鮎川勝彦, 内野博之, 中敏夫, 西田修, 成松英智, 池田寿昭, 日本集中治療医学会危機管理委員会: 各施設の集中治

- 療部における危機管理体制の現状. 第 37 回日本集中治療医学会 広島; 2010 年 3 月
- ③ 岡田雅司、後藤 薫: Nuclear assembly protein は DGK $\zeta$  の細胞内局在を制御する. 第 115 回 日本解剖学会総会、盛岡; 2010 年 3 月
- ④ 田中俊昭、後藤 薫: DNA 損傷におけるジアシルグリセロールキナーゼ $\zeta$  と p53 の役割. 第 115 回 日本解剖学会総会、盛岡; 2010 年 3 月
- ⑤ 鈴木祐輔、後藤 薫: 無酸素無グルコース負荷 (OGD) による $\zeta$ 型ジアシルグリセロールキナーゼの細胞内局在の変化: 海馬スライスを用いた検討. 第 115 回 日本解剖学会総会、盛岡; 2010 年 3 月
- ⑥ Tanaka T, Okada M, Goto K. Cytoplasmic lipid kinase suppresses p53 stability. 39th Annual Meeting of Neuroscience, Chicago, USA; October 2009
- ⑦ Suzuki Y, Yamazaki Y, Kaneko K, Fujii S, Iseki K, Goto K. Nucleocytoplasmic translocation of diacylglycerol kinase zeta under oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal slices. 39th Annual Meeting of Neuroscience, Chicago, USA; October 2009
- ⑧ Iseki K, Goto K. Upregulation of agrin in the reactive astrocytes after brain injury. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Paris, France; September 2009
- ⑨ 中野知之、若林一郎、後藤 薫: ジアシシルグリセロールキナーゼの血管内皮細胞における発現解析. 第 114 回 日本解剖学会総会、岡山; 2009 年 3 月
- ⑩ Nakano T, Goto K, Wakabayashi I. Expression and subcellular localization of diacylglycerol kinase isozyme in rat aortic endothelial cells. 48th American Society for Cell Biology, San Francisco, USA; December 2008
- ⑪ Hozumi Y, Iseki K, Kawamae K, Goto K. Diacylglycerol kinase  $\beta$  accumulates on the perisynaptic site of medium spiny neurons in the striatum. 38th Annual Meeting of Neuroscience, Washington DC, USA; October 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川前 金幸 (KAWAMAE KANEYUKI)  
山形大学・医学部・教授  
研究者番号: 70254026

### (2) 研究分担者

後藤 薫 (GOTO KAORU)  
山形大学・医学部・教授  
研究者番号: 30234975  
伊関 憲 (ISEKI KEN)  
山形大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70332921