

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790780
 研究課題名（和文）低酸素性虚血性脳症の治療標的としての酸化損傷タンパク質を探る
 機能プロテオミクス
 研究課題名（英文）Proteomic analysis of oxidatively modified proteins
 in excitotoxicity-induced hippocampal injury.
 研究代表者
 古川 絢子 (FURUKAWA AYAKO)
 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 病理学部 研究員
 研究者番号：10455537

研究成果の概要（和文）：周産期の低酸素性虚血性脳症では、グルタミン酸の興奮毒性による神経細胞死が引き起こされ、脳性麻痺や発達障害など発達期において重篤な神経学的障害をもたらす原因となる。本研究は、興奮毒性が生じてから非常に短時間で酸化ストレスが産生され、特定のタンパク質を酸化的に傷害する事を見いだした。酸化傷害を受けたタンパク質の機能の変化や喪失が、興奮毒性による神経細胞死の原因となる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Free radicals have recently been suggested to play a critical role in excitotoxicity-induced neuronal death. However, it is unclear when free radicals injure neurons and which proteins are especially damaged. In this study, we found oxidative stress acts upstream of KA-induced neuronal death. We identified some target proteins that were especially prone to oxidization by reactive oxygen species upon excitotoxicity. These proteins may be involved in the mechanisms underlying acute neuronal death by excitotoxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：神経科学、生化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：酸化ストレス、興奮毒性、プロテオミクス、カルボニル化タンパク質、低酸素性虚血性脳症、神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

低酸素性虚血性脳症（HIE: Hypoxic-ischemic encephalopathy）は、神経細胞死によって新生児死亡だけでなく、後

障害としての脳性麻痺や発達障害など、発達期脳障害の原因となる。その細胞死のメカニズムとしてグルタミン酸興奮毒性が知られている。愛知県心身障害者コロニー中央病院新生児集中治療室においても入院新生児の

約10%をHIEが占めており、HIE患者の神経学的発達のフォローを適切に行うためにも、発達期脳障害にどのような分子が関与するかを解明することは必須である。最近、HIE患者の髄液や尿中で、酸化的DNA損傷の指標である8-OHdGが有意に高く、尿中については生後約3年でも高値を示す事が報告された。このことは、HIE患者が慢性的に高い酸化ストレス状態にあることを示している。我々の研究チームでは、興奮毒性試薬であるカイニン酸をラットに投与したモデル動物を用いて、周産期HIEに起因する急性期及び慢性期の神経細胞死のメカニズムを研究している。興味深い現象として、カイニン酸投与後30日でも、継続的に神経細胞死が起こることが認められている。また、グルタミン酸の興奮毒性による神経細胞死に、酸化ストレスが関与する事が知られている。これらの知見や我々の実験結果から、酸化ストレスが慢性的な神経細胞死に関与する事が考えられた。酸化ストレスが、DNAやタンパク質のような生体高分子に酸化損傷を引き起こすことは、これまで多くの研究がなされている。ここでは周産期のHIEによって生じる大脳皮質や基底核の壊死、萎縮のような急性の障害に加えて、その後の持続的な高い酸化ストレス状態による慢性的なDNAやタンパク質の酸化損傷の蓄積が、脳性麻痺や発達障害の病態形成に関与するのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、HIEの実験的モデルとして、グルタミン酸アゴニストで、興奮毒性を引き起こすカイニン酸をラットに腹腔内投与し、急性期あるいは慢性期における酸化損傷タンパク質に注目した機能プロテオミクス解析を行って、酸化損傷タンパク質を網羅的に同定した。とりわけ、カイニン酸投与後の時間変化に注目し、酸化損傷が蓄積するタンパク質を探索し、HIEを含めた周産期の脳障害を原因とする発達期脳障害に関与するタンパク質を同定する事を目的とした。このようにして同定した酸化損傷タンパク質に特異的な抗体を用いて免疫組織化学的染色を行い、酸化損傷を受けたタンパク質が脳組織のどの細胞に発現しているかを明らかにし、神経細胞死やアストロサイト、ミクログリアの活性化の評価と合わせて、どのような酸化損傷タンパク質が発達期脳障害の病態形成に関与しているのかを明らかにする事を目指した。

3. 研究の方法

(1) 酸化損傷タンパク質の局在の検討と酸

化ストレスの組織学的評価

3週齢の雄ラットに、興奮毒性試薬であるカイニン酸を腹腔内投与した。1, 3, 24, 72時間と7日後に脳を取り出し、カルノア液にて浸漬固定し、パラフィン包埋した。マイクロトームにて6 μ mの切片を作製した。

①HE染色、クレシル紫染色などの組織染色を行い、カイニン酸による神経細胞死の時間変化を評価した。

②タンパク質の酸化損傷の指標のひとつであるカルボニル化タンパク質の生成を、特異的抗体を用いて検出した。タンパク質が酸化傷害を受けるとアミノ酸の側鎖にカルボニル基が生成する(カルボニル化タンパク質)。カルボニル基とヒドラジンが共有結合する性質を利用し、組織切片を2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)と反応させ、タンパク質結合2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン(DNP)を生成させた。誘導体化した組織切片を用いて、抗DNP抗体による免疫組織染色を行い、カルボニル化タンパク質が生成する時間変化を検討した。また、脳内のカルボニル化タンパク質の局在を検討した。

③カイニン酸投与による酸化ストレスを評価する目的で、酸化的DNA損傷の指標である8-OHdGや脂質過酸化のマーカである4-hydroxynonenal(4-HNE)の抗体などを用いた免疫組織染色を行った。脳のどの部位に酸化ストレスが多いか、神経細胞とグリア細胞のどちらに多く発現しているかなどを評価した。また、カイニン酸投与後の経時変化を解析し、酸化ストレスの時間変化を評価した。これらの結果を合わせて、酸化ストレスがどの細胞のどのような機能を損傷して発達期脳障害の病態形成に関与するのかを解明した。

(2) 機能プロテオミクス解析

3週齢の雄ラットにカイニン酸を腹腔内投与した。1, 3, 24, 72時間と7日後に脳を取り出し、タンパク質を抽出してサンプルとした。DNPHと反応させる前処理を行った後、2次元電気泳動法により等電点と分子量でタンパク質を分離した。泳動後のゲルを膜に転写し、抗DNP抗体を用いたウェスタンブロット法を行い、酸化傷害を受けたタンパク質を特異的に検出した。タンパク質のカルボニル化量を定量し、カイニン酸を投与したラットとコントロールラットの比較、およびカイニン酸投与後の時間変化から、酸化傷害を受けたタンパク質を探索した。

酸化損傷が認められたタンパク質を同定する。タンパク質を2次元電気泳動し、泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルー(CBB)で染色した。目的のタンパク質スポットをゲルから切り出し、トリプシンで消化後、脱塩・濃縮し、質量分析を行った。得られた

ペプチドの質量をデータベースで検索してタンパク質を同定した（ペプチドマスフィンガープリンティング法）。また、タンデムマススペクトロメトリーによる、アミノ酸配列の同定も行った。

（3）2D-DIGE 法による発現プロテオミクス解析

タンパク質の発現変化を解析するために、蛍光標識2次元ディファレンスゲル電気泳動（2D-DIGE）を行った。（2）と同様に脳組織からタンパク質を抽出し、波長の異なる蛍光色素で、コントロールとカイニン酸投与ラットのタンパク質をそれぞれラベルした。ラベルしたタンパク質を等電点電気泳動と SDS-PAGE により2次元展開する。蛍光スキャナーで各サンプルの画像を取り込み、画像解析ソフトを用いて各タンパク質の発現量を定量解析した。カイニン酸を投与したラットとコントロールラットを比較し、発現の増減を明らかにした。増減が認められたタンパク質については、CBB 染色したゲルから切り出し、ペプチドマスフィンガープリンティング法にて解析、同定した。

4. 研究成果

HE 染色の結果、カイニン酸投与後1時間の脳は生理食塩水投与のコントロール群と比較してほとんど変化が認められなかった（図1A）。3時間後では海馬CA1領域の神経細胞の核にヘマトキシリンに染まる顆粒が散在し、クロマチンの凝集を思わせる変化を示す細胞が認められた。この変化は電子顕微鏡観察でも確認できた。しかし、細胞死を示す変化はまだ認められなかった。投与後24時間で海馬の神経細胞に空胞変性が認められ、濃縮した核を持つ細胞も認められた。このことは、カイニン酸投与24時間後から、神経細胞の特徴が現れたことを示す。72時間後には、海馬CA1領域の神経細胞が全層的に細胞死を起こし（図1B）、この神経細胞死は7日後まで持続した。

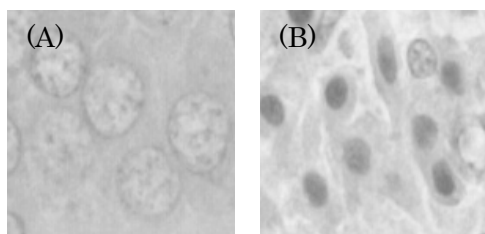


図1. HE 染色

(A) 正常な海馬CA1領域の錐体細胞。
(B) 細胞死を起こした神経細胞。濃縮した核が濃染している。

カイニン酸投与後の各時間におけるカル

ボニル化タンパク質の生成と、DNAの酸化傷害の指標である8-OHdGの生成を免疫組織学にて検討した。カイニン酸投与後1時間では、カルボニル化タンパク質の生成は認められなかった。投与3時間後にはカルボニル化タンパク質の染色性が認められ、特に錐体細胞の核に多く認められた。投与24時間後以降、神経細胞死が認められる時間では、錐体細胞の核におけるカルボニル化タンパク質の染色は認められなかった。投与72時間後以降では、グリア細胞の細胞質にカルボニル化タンパク質が認められた。8-OHdGについても、投与1時間後には生成が認められず、3時間後に錐体細胞の核に8-OHdGの生成が認められた。その後の神経細胞死が認められる時間には、錐体細胞の核での8-OHdGの生成は認められなかった。これらの結果から、酸化ストレスによるカルボニル化タンパク質や8-OHdGの生成が、神経細胞死に先立って起きる事が明らかになった。

神経細胞死に先立って酸化傷害を受けるタンパク質を同定するため、カイニン酸投与3時間後のラットの脳からタンパク質を抽出し、機能プロテオミクス解析を行った。

生理食塩水 カイニン酸

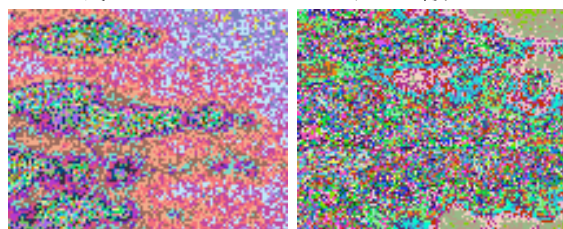


図2. 機能プロテオミクス解析

カイニン酸投与において、カルボニル化タンパク質が多く認められる。

DNP 処理を行ったタンパク質サンプルを2次元電気泳動にて展開し、PVDF膜に転写後、抗DNP抗体を用いたウェスタンブロットにて、カルボニル化タンパク質を検出した。生理食塩水を投与したコントロールと比較して、カイニン酸投与によりカルボニル化が増加したタンパク質が多く認められた（図2）。定量解析の結果、カイニン酸投与によって2倍以上のカルボニル化増加を示したタンパク質スポットが14個認められた。質量分析装置を用いて、これらのスポットの同定を試みた。その結果、熱ショックタンパク質、分子シャペロン、細胞骨格タンパク質などが同定できた。

これらのカルボニル化タンパク質の増加が、タンパク質の発現増加を反映しているのか、酸化傷害そのものが増加したのかを明らかにするため、カイニン酸投与3時間後の脳

におけるタンパク質発現変化を定量解析した。2D-DIGE法を用いて発現解析を行った結果、カイニン酸投与3時間後の脳で、発現が2倍以上増加するタンパク質スポットは認められなかった。この結果から、カイニン酸によるカルボニル化タンパク質の増加は、特定のタンパク質における酸化傷害の増加である事が示唆された。

以上の結果から、興奮毒性により産生された酸化ストレスが、いくつかのタンパク質を標的として特異的に傷害することが明らかになった。また、カイニン酸による神経細胞死は24時間以降で明らかとなることから、タンパク質の酸化損傷が興奮毒性に起因する神経細胞死のカスケードの上流に位置する可能性が考えられた。カイニン酸投与3時間後に酸化傷害を受けるタンパク質が、興奮毒性による神経細胞死にどのように関わるのかを解明することで、これらのタンパク質を予防、治療に応用できる分子として提唱できると考える。

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3件)

① Oikawa S, Yamada T, Minohata T, Kobayashi H, Furukawa A, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Murata M, Kikuchi M, Yamashita T. Proteomic identification of carbonylated proteins in the monkey hippocampus after ischemia-reperfusion. Free Radic Biol Med. 査読有 46, 2009: 1472-1477.

② Chiba, Y, Shimada, A, Kumagai, N, Yoshikawa, K, Ishii, S, Furukawa, A, Takei, S, Sakura M, Kawamura, N, Hosokawa, M. The Senescence-accelerated Mouse (SAM): a higher oxidative stress and age-dependent degenerative diseases model. Neurochem. Res. 査読有 34, 2009: 679-687.

③ 及川伸二、古川絢子、村田真理子、川西正祐 酸化ストレスによるDNAやタンパク質の損傷を介した老化促進機構 基礎老化研究 査読有 33, 2009: 9-15.

[学会発表] (計4件)

① 古川絢子、島田厚良、河村則子、武井史郎、千葉陽一、石井さなえ、細川昌則 興奮毒性による海馬損傷における酸化損傷タンパク質の生成 第32回日本神経科学大会 2009年9月18日 東京

② 古川絢子、島田厚良、及川伸二、千葉陽一、石井さなえ、河村則子、武井史郎、細川昌則 SAMP10 の加齢性神経変性に伴うタンパク質発現変化に関するプロテオミクス解析 第50回日本神経病理学会 2009年6月5日 高松

③ 古川絢子、島田厚良、及川伸二、千葉陽一、吉川圭介、石井さなえ、河村則子、細川昌則 SAMP10 の加齢性神経変性に伴う α -internexin の早期リン酸化に関するプロテオミクス解析 老化促進モデルマウス (SAM)研究協議会 2008年7月18日 京都

④ 古川絢子、島田厚良、及川伸二、千葉陽一、吉川圭介、石井さなえ、河村則子、細川昌則 SAMP10 の加齢性神経変性に伴うタンパク質発現変動のプロテオミクス解析 2008年6月12-13日 松本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 絢子 (FURUKAWA AYAKO)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 病理学部 研究員

研究者番号: 10455537

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し