

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月17日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592302

研究課題名 (和文)

低酸素ストレス負荷における脳内グリア細胞の応答と神経細胞に与える影響

研究課題名 (英文)

Neuronal and glial responses in the brain under hypoxic stress

研究代表者

伊関 憲 (ISEKI KEN)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：70332921

研究成果の概要 (和文)：

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロール (DG) の代謝を介して細胞内情報伝達に重要な役割を果たす。我々は、DGK アイソザイムの1つである ζ 型 DGK が核移行シグナルを有し核内に存在すること、一過性脳虚血 (20分間) モデルラットの海馬 CA1 錐体細胞において核から細胞質に移行し再還流後も核内に戻ることはないことを報告してきた。しかし、虚血ストレスにおける ζ 型 DGK の核外移行に関する詳細なメカニズムおよび機能的意義は未だ不明である。本研究では、脳虚血負荷実験をシミュレートするためにラット海馬スライスに酸素グルコース欠乏負荷 (oxygen-glucose deprivation: OGD) を与え、 ζ 型 DGK の細胞内局在の経時的変化を詳細に検討した。 ζ 型 DGK は動物モデル実験と同様、OGD 負荷 20分後から徐々に核外に移行し、その後、酸素グルコースを含む通常培養条件下に戻しても再び核内に戻ることはなかった。一方、OGD 負荷 10分後では ζ 型 DGK の核外移行は認められないが、その後、通常培養条件下に戻すと 60分後には ζ 型 DGK が完全に核外へ移行することが明らかとなった。以上より、10分間の OGD 負荷により細胞死カスケードが作動し、 ζ 型 DGK の核外移行が誘導された可能性が示唆された。さらにグルタミン酸毒性との関連性を追求するために、通常培養条件下において NMDA を添加すると ζ 型 DGK の核外移行が誘導され、一方 OGD 負荷時に NMDA 受容体を阻害すると ζ 型 DGK の核外移行は認められなくなった。また、細胞外 Ca^{2+} をキレートし OGD 負荷を行うと ζ 型 DGK の核外移行は起こらなかった。以上より ζ 型 DGK の核外移行には、NMDA 受容体刺激による細胞外 Ca^{2+} の細胞内流入が重要であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Diacylglycerol kinase (DGK) plays a key role in pathophysiological cellular responses by regulating the levels of a lipid messenger diacylglycerol. Of DGK isozymes, DGK ζ localizes to the nucleus in various cells such as neurons. We previously reported that DGK ζ translocates from the nucleus to the cytoplasm in hippocampal CA1 pyramidal neurons after 20 min of transient forebrain ischemia. In this study, we examined the underlying mechanism of DGK ζ translocation using hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation (OGD) to simulate an ischemic model of the brain. DGK ζ -immunoreactivity gradually changed from the nucleus to the cytoplasm in CA1 pyramidal neurons after 20 min of OGD and was never detected in the nucleus after reoxygenation. Intriguingly, DGK ζ was detected in the nucleus at 10 min OGD whereas the following 60 min reoxygenation induced complete cytoplasmic translocation of DGK ζ . Morphometric analysis revealed that DGK ζ cytoplasmic translocation correlated with nuclear shrinkage indicative of an early process of neuronal degeneration. The translocation under OGD conditions was blocked by NMDA receptor (NMDAR) inhibitor, and was induced by activation of NMDAR. Chelation of the extracellular Ca^{2+} blocked the translocation under OGD conditions. These results show that DGK ζ cytoplasmic translocation is triggered by

activation of NMDAR with subsequent extracellular Ca(2+) influx. Furthermore, inhibition of PKC activity under OGD conditions led to nuclear retention of DGK ζ in about one-third of the neurons, suggesting that PKC activity partially regulates DGK ζ cytoplasmic translocation. These findings provide clues to guide further investigation of glutamate excitotoxicity mechanisms in hippocampal neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 救急医学

キーワード：

- (1) 生体ストレス応答 (2) OGD 酸素グルコース欠乏 (3) 海馬神経細胞
 (4) 核内脂質代謝酵素 (5) 細胞死

1. 研究開始当初の背景

交通事故等による外傷性脳損傷、および心血管系の閉塞や破綻に起因する脳虚血・脳梗塞・脳出血は、救急医学において生命維持に関わる代表的な病態である。これらの病態に共通する現象は、「血液還流障害による脳の低酸素ストレス負荷」と総括できるように思われる。従来行われてきた脳損傷や虚血モデル研究においては、グリア細胞と神経細胞の動態を別個に扱った研究が大部分であった。本研究ではこの点に着目し、申請者らがこれまで解析してきた細胞内二次メッセンジャー代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) の動態を指標として、同一モデルによる神経細胞とグリア細胞の経時的動態解析を全体の研究目標に設定した。

2. 研究の目的

これまで、一過性脳虚血ラットモデルを用いた実験により、DGK ζ は海馬 CA1 錐体ニューロンにおいて不可逆的に核から細胞質へ移行すること、また中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルラットの大脳皮質ニューロンにおいて DGK ζ が早期に消失することが報告されており、DGK ζ の核から細胞質への移行や消失が虚血による神経変性障害の早期過程に何らかの役割を担っている可能性が示唆されている。本研究では、海馬スライス培養と OGD 負荷を用いた実験系により脳虚血状態をシミュレートし、DGK ζ の細胞内局在の経時的変化とそのメカニズムを詳細に検討した。

3. 研究の方法

Sprague Dawley ラットの海馬を取り出したのち、人工脳脊髄液内でロータースライサーにて 500 μ m 厚の海馬スライスを作成した。

その後、無酸素無グルコース (oxygen-glucose deprivation: OGD) 負荷実験として、glucose 0 mM の培養液にて OGD 負荷を与えた。その後、再還流状態を模倣するために通常チャンバー内に戻して培養した。また、阻害実験としてグルタミン酸受容体からのシグナルとの関連を調べるために、NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬である DL-AP5 50 μ M、代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬である MCPG 500 μ M、AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗薬である DNQX 20 μ M、IP₃ 受容体拮抗薬である 2-APB 10 μ M、電位依存性 Ca チャンネル阻害剤である CdCl₂ 200 μ M をそれぞれ OGD 負荷 10 分前に通常チャンバー内に加え、実験終了時まで負荷した。

また、Ca²⁺との関連も調べるため Ca²⁺を除いた人工脳脊髄液 (NaCl 124 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, KCl 3.0 mM, MgSO₄ 2.0 mM, NaHCO₃ 22 mM, MgCl₂ 2.5 mM, glucose 10 mM) を用いて同様の実験も行った。

また、カルシウムシグナリングとの関連を調べるために CaMKII 阻害剤である KN-62 10 μ M、CaN 阻害剤である FK506 10 μ M、PKC 拮抗薬である W7 100 μ M、PKC 阻害薬である GF 109203X 1 μ M をそれぞれ OGD 負荷 10 分前に通常チャンバー内に加え、実験終了時まで負荷した。

刺激実験として、30 分間 30°C にて通常チ

チャンバー内で培養した海馬スライスを control とした。

電位依存性 Ca チャネル刺激時は、脱分極をおこすため人工脳脊髄液のカリウム濃度を 52 mM とし、その他の受容体の影響をなくすために DNQX 20 μ M、DL-AP5 50 μ M も加えた。

AMPA 型グルタミン酸受容体刺激時は AMPA 100 μ M に加え、その他の受容体の影響をなくすために CdCl₂ 200 μ M、DL-AP5 50 μ M、Na チャネル阻害剤である TTX 0.5 μ M も添加した。

NMDA 型グルタミン酸受容体刺激時は NMDA 1 mM に加え、CdCl₂ 200 μ M、DNQX 20 μ M、TTX 0.5 μ M も添加した。さらに Mg²⁺による NMDA 型グルタミン酸受容体ブロックの影響も考慮し Mg²⁺フリーの人工脳脊髄液を用いた。

また、Ca²⁺との関連も調べるため、Ca²⁺を強制的に細胞内へ流入させるカルシウムイオノフォアである A23187 1 μ M を通常チャンバー内に加え、負荷した。

それぞれに対して、免疫化学染色を行い比較検討した。

4. 研究成果

OGD 負荷による DGK ζ の細胞内局在変化

OGD 負荷 10 分後では DGK ζ の免疫反応は核に強く認められるが、OGD 負荷 20 分後より徐々に細胞質に強く検出されるようになり、OGD 負荷 30 分後では明らかに細胞質に強くなった。以上より、20 分間の持続的 OGD 負荷により、DGK ζ の局在が変化する可能性が示唆された。

OGD 負荷後の酸素・糖再添加による DGK ζ の細胞内局在変化

CA1 ニューロンにおいて、DGK ζ の免疫反応は 10 分間の OGD 負荷直後では核内に認められるが、酸素・糖を再添加して通常培養条件に戻すと次第に細胞質に強く検出されるようになり、60 分後には DGK ζ は完全に核外へ移行し、再び核内へ戻ることはなかった。

そして、8 分間の OGD 負荷が海馬 CA1 錐体ニューロンにおける DGK ζ 核外移行の最小負荷条件であることが示唆された。

OGD 負荷による DGK ζ の細胞内局在の変化と細胞障害

持続的に OGD 負荷を加えると錐体ニューロンの核は徐々に委縮し、30 分後以降では有意差を示すに至り、この時 DGK ζ の免疫反応も細胞質に認められた。5 分間の一過性 OGD 負荷後に 60 分間の酸素・糖を再添加培養を行った海馬スライスでは、CA1 ニューロンにおいて核の委縮や DGK ζ の核内局在の変化も認められなかったが、OGD 負荷を 10 分間に

すると、60 分間の酸素・糖を再添加培養後には核の委縮が認められ、DGK ζ も完全に細胞質へ移行することが明らかとなった。

このことから DGK ζ の細胞質移行は細胞死のカスケードと関連することが示唆された。

DGK ζ は NMDA 型グルタミン酸受容体からの Ca²⁺細胞内流入により核から細胞質に移行する

代謝型グルタミン酸受容体阻害剤である MCPG を添加してもコントロールと同様に DGK ζ は細胞質へと移行したが、AMPA 型グルタミン酸受容体阻害剤である DNQX や NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤である DL-AP5 を添加すると、一過性 OGD 負荷を与えても DGK ζ は核にとどまり、細胞質への移行が抑制されることが明らかとなった。

DGK ζ は、AMPA を添加し培養した海馬スライスではコントロールと同様に核に認められるが、NMDA を添加した海馬スライスにおいて、OGD 負荷と同様に核から細胞質へ完全に移行することが明らかとなった。以上より、DGK ζ の核から細胞質への移行は NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化により引き起こされることが示唆された。

そこで電位依存性 Ca チャネルの阻害薬である CdCl₂、及び Ca イオノフォアである A23187、また Ca²⁺をキレートした培養溶液を用いて実験を行い、DGK ζ の核から細胞質への移行は NMDA 型グルタミン酸受容体を介した細胞内への Ca²⁺流入により生じることが明らかとなった。

細胞内 Ca シグナルと DGK ζ の局在変化

CaM、CaMK II、CaN の阻害剤存在下においても、一過性 OGD 負荷後に DGK ζ の細胞質移行は抑制されなかった(図 8)。一方、PKC 阻害剤の存在下では、一部の海馬 CA1 ニューロンにおいて一過性 OGD 負荷による DGK ζ の細胞質移行が抑制されることが明らかとなった。以上より、DGK ζ の細胞質移行には PKC シグナリングが一部関与している可能性が示唆された。

OGD 負荷による DGK ζ 及び PKC γ の細胞内局在

CA1 錐体ニューロンにおいて、OGD 負荷前および OGD 負荷 5 分後では PKC γ は細胞膜に、DGK ζ は核に強い免疫反応が認められた。OGD 負荷 10 分を経過すると DGK ζ は未だ核に強い免疫反応を示すにも関わらず、PKC γ の免疫反応は徐々に減弱し、形質膜周辺に散在して認められるようになり、OGD 負荷 20 分後には PKC γ の免疫反応は完全に消失した。この時、PKC 活性阻害剤を添加すると一部の海馬 CA1 ニューロンにおいて PKC γ の免疫反応は細胞膜に残存し、それらのニューロンに

において DGK ζ も核内にとどまることが明らかとなった。

以上より、PKC γ は持続的 OGD 負荷時において DGK ζ の細胞質移行に先立ち消失すること、また PKC 活性の阻害により一過性 OGD 負荷後でも一部のニューロンにおいて PKC γ の免疫反応が保持され、DGK ζ も核内にとどまることが明らかとなった。

本研究にて、DGK ζ が OGD 刺激によりその局在が核から細胞質へと極めて早期に移行する分子であり、局在変化には NMDA 型グルタミン酸受容体からの Ca²⁺の細胞内流入が必要であり、PKC 活性と関連がある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 7 件)

①Suzuki Y, Yamazaki Y, Hozumi Y, Okada M, Tanaka T, Iseki K, Ohta N, Aoyagi M, Fujii S, Goto K. NMDA receptor-mediated Ca(2+) influx triggers nucleocytoplasmic translocation of diacylglycerol kinase ζ under oxygen-glucose deprivation conditions, an in vitro model of ischemia, in rat hippocampal slices. *Histochem Cell Biol.* 査読有、2012 ;137(4):499-511.

②Iseki K, Hagino S, 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.* 査読有、2011;32(6):373-8.

③Evangelisti 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.* 査読有、2010 ;9(2):384-8.

④Hozumi Y, Watanabe M, Goto K. Signaling Cascade of Diacylglycerol Kinase β in the Pituitary Intermediate Lobe: Dopamine D2 Receptor/ PhospholipaseC β 4/ Diacylglycerol Kinase β / Protein Kinase C α . *J Histochem Cytochem.* 査読有、2009

⑤Nakano T, Iseki K, Hozumi Y, Kawamae K, Wakabayashi I, Goto K. Brain trauma induces expression of diacylglycerol kinase zeta in microglia. *Neurosci Lett.* 査読有、2009;461(2):110-5.

⑥Nakano T, Hozumi Y, Goto K, Wakabayashi

I. Localization of diacylglycerol kinase epsilon on stress fibers in vascular smooth muscle cells. *Cell Tissue Res.* 査読有、2009 Jul;337(1):167-75.

⑦Hozumi Y, Watanabe M, Otani K, Goto K. Diacylglycerol kinase beta promotes dendritic outgrowth and spine maturation in developing hippocampal neurons. *BMC Neurosci.* 査読有、2009;10:99.

[学会発表] (計 5 件)

①岡田雅司、後藤薫、Nuclear assembly protein は DGK ζ の核細胞質間輸送を制御する、第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学大会合同大会、2010 年 12 月 7~10 日 (神戸、神戸国際会議場)

②田中俊昭、後藤薫、細胞質局在型ジアシルグリセロール ζ は細胞死を抑制する、日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 2010 年 9 月 25~26 日 (旭川、旭川医科大学)

③鈴木祐輔、後藤薫、海馬スライスにおける酸素グルコース欠乏負荷による ζ 型ジアシルグリセロールキナーゼの細胞内局在の変化、第 55 回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会、2009 年 9 月 26~27 日 (仙台、東北大学医学部)

④Iseki K, Goto K, Upregulation of agrin in the reactive astrocytes after brain injury.、9th European Meeting on Glial Cells、2009.9.11 (パリ、フランス)

⑤Suzuki 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、2009.10.18 (シカゴ、アメリカ)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：