

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591717

研究課題名（和文） ミトコンドリアによる細胞死調節機構を応用した脳保護法の開発

研究課題名（英文） The mechanism of neuronal death regulated by the mitochondria and the development of brain protection

研究代表者

飯島 毅彦 (IIJIMA TAKEHIKO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：10193129

研究成果の概要（和文）：脳障害には apoptosis が関連している。apoptosis はその関連タンパクが徐々に切断されるが、このカスケードの発生をとらえることが脳障害の発生機序を解明するために重要なツールとなる。初代神経培養細胞において apoptosis の発生をとらえるために FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）を応用し、apoptosis 関連タンパクの切断の画像化を試みた。その結果、初代培養細胞において FRET の変化をとらえることに成功し、その定量的な解析方法を考案した。

研究成果の概要（英文）：Apoptosis is deeply related to neuronal injury. Apoptosis-related proteins are incrementally cleaved, and it would be a good tool for the research of neuronal injury to catch this initial step of the apoptotic cascades. We applied the technique of FRET (Fluorescence of resonance energy transfer) to the neuronal death model of primary neuronal culture, and tried to make a resolutional image of cleavage of apoptosis-related protein. We have developed the protocol of quantitative analysis of FRET change of apoptosis-induced neuronal culture.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
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・麻酔蘇生学

キーワード：FRET, apoptosis, YFP, CFP, venus, neuronal death

1. 研究開始当初の背景

(1) 周術期の合併症

麻酔の安全性はこの 30 年の間、格段に向上した。現在、麻酔による手術直後の死亡率は約 10 万例に 1 例となり、その安全性は極めて高いものである。しかし、長期予後を見ると 65 歳以上の高齢者においては術後 1 年以内の死亡率は約 10% とかなり高いことが報告されている。また、発達期の小児では麻酔薬投与によりその後の脳の成長に影響を与

えることが懸念されている。これは中枢神経も含めた臓器の恒常性に麻酔薬が何らかの影響を与えていることが示唆される。

2. 研究の目的

新しい麻酔薬の開発、臨床応用および各種モニターの導入により、近年、安全性は格段に進歩した。しかしながら、手術中の急激な出血や心停止に伴う脳障害は未だ最も重篤な麻酔合併症として解決すべき課題である。脳保護法を開発するには、虚血に伴う神経細胞

死のメカニズムを明らかにし、その進展を抑制する介入点を明らかにする必要がある。

(2) 虚血性神経細胞死の研究

虚血に伴う神経細胞死のメカニズムは世界的に広く研究されてきた。神経細胞死を防ぐための多くの有力なメカニズムが提唱され、介入すべき箇所が提案されてきた。近年で最も有力であった仮説はグルタミン酸による細胞死である。このため、グルタミン酸のレセプターである NMDA レセプターの拮抗薬が開発され、神経保護作用を示すことが期待されたが、結局は副作用が強く、開発が断念された。次なる有力な仮説は活性酸素の細胞障害作用である。フリーラジカルが虚血後再灌流時の神経細胞死の原因とされ、フリーラジカルを排泄させるあるいは捕捉する物質が開発され、神経保護薬として臨床応用されている。しかし、十分な効果が出ているかどうかは明らかではない。このように虚血性神経細胞死における神経保護作用をもつ薬剤の開発は、実験モデルにおいて発見される細胞障害作用があると考えられる物質をブロックするものを中心になされてきた。しかし、注目を受ける物質は次々と現れるが、細胞死を引き起こす主たる原因物質ではなく、単に随伴する物質である可能性が高い。したがって、このような研究方法では、莫大な研究費を費やしてもその薬剤に効果がある保障はない。近年、明らかになってきたミトコンドリアによる細胞死の制御機構の解明は、これまでの研究に明るい方向性を示すものであるといえる。より理論的な神経細胞死のコントロールの方法を導き出すものである。免疫抑制薬であるサイクロスポリン A (CsA) の神経保護作用はミトコンドリアで発生する Ca²⁺ イオンの放出をコントロールするものであり、理論的にもより裏づけの薬剤であるといえる。しかしながら、CsA による細胞保護作用の応用はミトコンドリアをターゲットにした薬剤の端緒に過ぎない。今後、ミトコンドリアの細胞死のメカニズムが明らかになることにより、ターゲットを絞ったより優れた薬剤が開発されることになると考えられる。

(3) ミトコンドリアとアポトーシス

ミトコンドリアではアポトーシスを誘導するタンパクが多く存在し、細胞死を制御している。アポトーシスの進展過程はこれまで幅広く研究されてきたが、多くの研究はアポトーシスが終了した時点での画像を示すものが多かった、薬理的にアポトーシスの進展過程に介入するには、その早期から介入しなければならない。そのためには、生きた細胞内でのアポトーシス関連タンパクの動態を可視化することが必要である。この過程のうち、caspase8 の動向を捉えることができれば、細胞が死に向かうか生存するかの極めて

初期の時点特定することができる。本研究では FRET 解析という手法を用い、Bid の分解を可視化することが可能となった。この技術を発展させることが脳保護法を実用化するために極めて重要である。

3. 研究の方法

(1) 基本的設定

初代ラット海馬培養細胞を35mmディッシュに調整する。グリア細胞の増殖を防ぐために AraC を培養初期に加えたものを使用する。この条件は過去8年にわたり使用してきたものであり (Brain Res, 2003 993: 140-145 Neurochem Int. 2003 43(3):263-269)、30分のOGD (無酸素無糖培養) にてapoptosis を起こし、120分のOGDにてnecrosisを起こすものである。この条件にて1-2週間培養し、ネットワークの確立したものを用いた。

(2) Venusを用いたpFRET (BidのFRET 解析用プラスミド) の導入

Bidは、アポトーシスが発現する際にカスパーゼにより切断されるタンパクである。このタンパクの両端にCFPおよびYFPを付けたものがFRET現象 (蛍光共鳴エネルギー移動、Fluorescence resonance energy transfer) を起こす。このプローブは産業開発機構より提供を受けている。

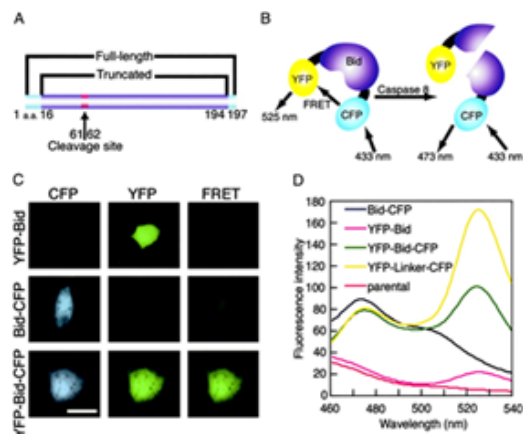


図1 Bid 切断によるFRET消失の説明

Bidの両端にYFPとCFPの蛍光物質がつくようにデザインされている。Bidが切断される前はCFP、YFPの位置が近接しているためFRET現象が起こり、433nmの光で525nmの励起光が発生する。しかし、切断されるとFRET現象が喪失するので473nmの励起光が発生する。

(Onuki R, Nagasaki A et al, PNAS 99(23) 14716-14721より引用)

上述のFRETprobeを用いたが、初代培養細胞での発現は弱いため、より明るいプローブが必要である。Venusは現在、最も明るい蛍光を発するタンパクである。このVenusをYF

Pの代わりに入れたデザインのプローブが開発されこれを利用した。この明るいFRET解析プローブを用いるとより弱い光で撮影が可能となるため、経時的に何度も撮影が可能であるため、Bidの切断をreal timeで可視化することが可能となった。上述の培養細胞にこの新しいpFRETをtransfectionさせる。導入された培養細胞にstaurosporine (STS) などによりアポトーシスを誘導させ、FRETの変化が得られるかを確認した。この両者のprobeを用いて実験を行った。

(3) 測定条件

蛍光顕微鏡(励起光 $440 \pm 20 \mu\text{m}$, 観察光 YFP $535 \pm 26 \mu\text{m}$, CFP $480 \pm 30 \mu\text{m}$)にて観察した。アポトーシス誘導は Staurosporin(STS) $1 \mu\text{M}$, 30分, 120分無糖無酸素培養(300GD, 1200GD), 30minOGD後24時間再酸素化(reO2)でおこなった。

(4) FRET画像の解析方法の検討

STS負荷後約2時間でFRETの変化が観察されたが、個々の細胞においてもFRETの変化は細胞内の部位により異なることが観察され、主にミトコンドリアにてその変化が大きいことが認められた。mitotrackerを用い、その局在を確認した。

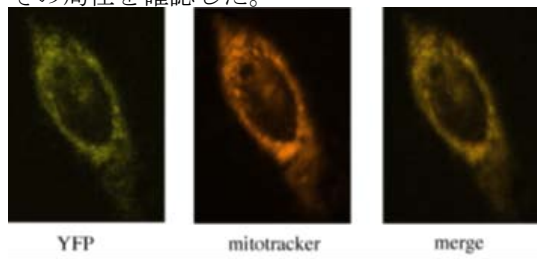


図2 YFP-mitotrackerとその融合画像

YFP画像における粒状物がmitochondriaと重なることが確認された。

そのため、画像処理ソフトを用いてpixel analysisにより、それぞれのpixelの強度分布を示すこととした。

(5) caspase活性の定量的解析

96穴マイクロタイタープレートに同様にマウス神経細胞を培養し、カスパーゼ8の定量分析を酵素活性測定法 e Caspase-GloTM Assay (Promega, USA)を用いて行った。測定には luminometer (GLOMAX; Promega, USA)を用いて定量分析を行った。

4. 研究成果

(1) positive controlとしてのFRETの変化

STS負荷後のFRETの変化をtime lapseによる継続的な撮影により観察した。FRETの変化が発生する時間を特定することは困難であったが約80-100分後に変化が起こることを確認した。強い蛍光によるbleachingが起こるため、約60分間は撮影を行わず、その後time lapseによる撮影を行うこととし

た。得られた画像はcontrolと比較してCFPが強くなり、FRETの消失が示唆された。

STSにてアポトーシスを誘導した細胞ではCFPの蛍光部分がYFPの蛍光部分より多く、FRETが消失していることが観察された。今回用いた初代培養神経細胞は継代細胞と比較すると融合蛋白質の発現量が少ないため、FRETの有無を明らかに示すことは困難であった。しかし、FRETを失ったCFPの画像を観察するとミトコンドリアに局在しており、この部分を観察することで評価することができた。またCFPがミトコンドリアと思われる部位に移動しているのが観察された。細胞内でYFP, CFPの蛍光している部分の細胞全体に対する比率を算出すると定量的に評価することが可能であった。

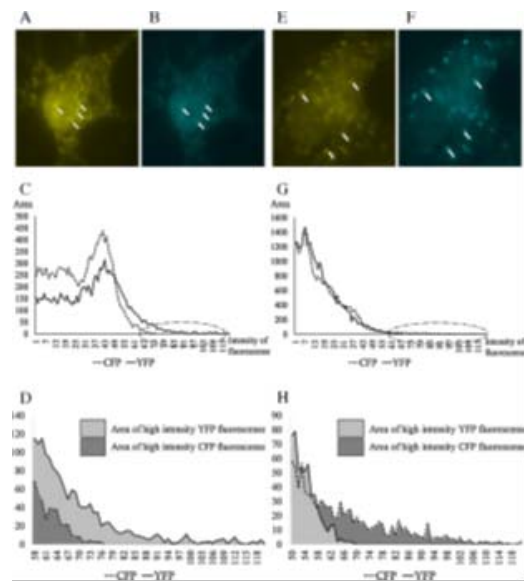


図3 YFPおよびCFP画像のpixel解析

A:controlのYFP画像、B:controlのCFP画像 C:AおよびBのpixelの分布、D:Cのpixel分布の内mitochondriaの粒子に相当するintensityの高い部位のpixelの分布 E:STS負荷後のYFP画像、F:STS負荷後のCFP画像 G:AおよびBのpixelの分布、H:Cのpixel分布の内mitochondriaの粒子に相当するintensityの高い部位のpixelの分布 AおよびBとEおよびFを比較するとFのCFP画像の明るさが強い印象がある。これをPixel分析するとcontrolではYFP優位であるがSTS負荷後ではCFP優位であることを半定量的に分析することができる。

(2) control, 300GD, 1200GD, re O2におけるFRETの変化

positive controlの結果を受けて、OGD条件下でのFRET変化の観察を行った。現在までには十分な結果が得られておらず、継続してさらなる観察を行っている。

(3) luminescence による caspase8 の活性の定量分析

にて測定した発光強度は control で 4098, STS で 42538, 300GD で 12928, 1200GD で 10079, re O2 で 2615 であり, STS を投与した細胞でカスパーゼ 8 の活性が有意に高いことが示された. FRET 解析と同様に培養された細胞においての定量分析で caspase 8 の活性が上がっており, FRET 解析で見られた分析法を裏付けた。

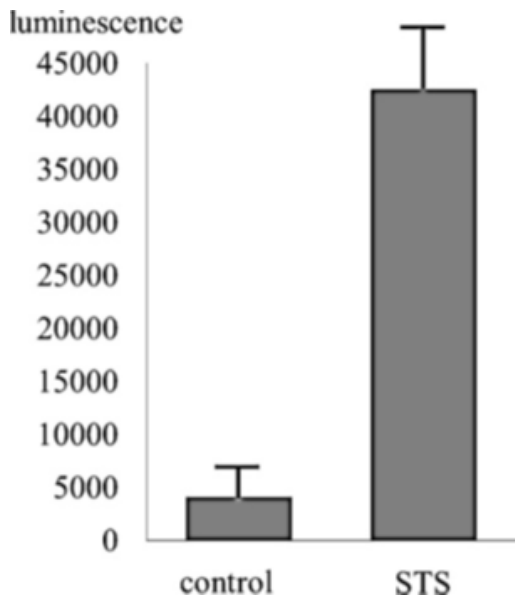


図 4 luminescence による caspase8 の活性の定量分析

STS 負荷後 caspase8 活性が上昇していることが示された. FRET 解析での変化が caspase8 活性を伴っていることが裏付けられた。

(4) 考察

脳保護方法の開発は遺伝子の網羅的解析やあるいは再生医療の応用といった様々はアプローチで検討されている。かつてはグルタミン酸により神経細胞死のメカニズムが説明されたためにそれに関連するレセプター作動薬の開発に多くの労力が注がれた。しかし、ひとたびその仮説が覆るとこれまでの研究成果の価値がほとんどなくなるという事態になってしまう。特に NMDA レセプターの拮抗薬に対する開発とその終焉が象徴的である。本研究では神経細胞死のメカニズムを追及し、その初期段階で介入が可能であるかを検討するものである。apoptosis は DNA の断片化を指標に画像化されてきたが、これはすでに細胞死が完結した段階を示すものであり、すでに介入できる段階を示すものではない。本研究では、細胞内で起こる細胞死の過程のより早期のイベントを可視化することを目標としている。遺伝子導入などの技術を用いて細胞内イベントの可視化を試み

ている。FRET の技術は開発されてすでに 10 年以上が経過しているが、主に継代細胞で利用されている。本研究は遺伝子導入効率が低い初代培養神経細胞に応用した。初代培養細胞での FRET 解析の報告はほとんどなく、本研究がこの領域の研究者にとって参考になるものと考えられる。

現段階では方法論を確立するところまでで終了しているが、当初の目的である虚血脳に準じた無酸素無糖培養細胞での結果を得ていき、神経細胞死を抑制できる方法論を確立していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Nakazawa H, Nishimura A, Suga K, Mishima T, Yorozu T, Iijima T. FRET-based evaluation of Bid cleavage in a single primary cultured neuron. *Neurosci Lett.* ;536:24-8.

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 中澤 春政, 飯島 毅彦 初代培養神経細胞におけるカスパーゼ 8 活性の可視化 第 14 回日本神経麻酔・集中治療研究会 長野 平成 22 年 4 月 24 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 毅彦 (IIJIMA TAKEHIKO)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号: 10193129

(2) 研究分担者

西村 晶子 (NISHIMURA AKIKO)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号: 551227