

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592083

研究課題名(和文)アンジオテンシン受容体制御による虚血性脳損傷抑制のメカニズムに関する研究

研究課題名(英文)Protective effects of angiotensin receptor control on ischemic neuronal injury

研究代表者

柳澤 俊晴 (Yanagisawa, Toshiharu)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20311574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：アンジオテンシン受容体阻害薬は脳虚血後のスーパーオキシド産生を抑制することが報告されていたが、ミトコンドリア依存性アポトーシスを修飾するかどうかは明らかでなかった。ラットにAT1R阻害剤カンデサルタンを経口投与し、全脳虚血を行った。対照群では殆どの神経細胞が死滅したが、カンデサルタン投与群では生存細胞数は30%であった。分子生物学的手法(Western blot, 細胞分画法, 免疫染色)により検討を行うと、カンデサルタン投与群ではcytochrome cのミトコンドリア外漏出が抑制されていた。脳虚血後にはアンジオテンシン受容体を介したアポトーシスにより細胞死が起こっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial apoptosis after cerebral ischemia is known to mediate neuronal injury. Angiotensin II type 1 receptor activation results in production of superoxide, but whether angiotensin II type 1 receptor blockade prevents mitochondrial apoptosis after ischemia remains unclear. Normotensive rats received the angiotensin II type 1 receptor blocker, candesartan or only vehicle before induction of global cerebral ischemia. Approximately 30% of the hippocampal CA1 neurons survived in candesartan-treated animals, whereas only 2% of neurons survived in vehicle-treated animals. Superoxide production and cytochrome c release were significantly less in these vulnerable neurons in candesartan-treated animals than in vehicle-treated animals. Angiotensin II type 1 receptor may have an essential role in apoptotic cell death in vulnerable neurons after global cerebral ischemia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：アンジオテンシン受容体 脳虚血 神経細胞死 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

レニン-アンジオテンシン系は血管平滑筋, 心臓, 腎臓に作用して血圧調節, 水代謝などに重要な働きをするとされてきた。最近, angiotensin II 受容体のサブタイプである angiotensin II receptor 1(AT1R)が脳内にも分布することが報告され, angiotensin II の脳内での新たな役割が注目されている。げっ歯類の海馬において, AT1R は虚血に対して脆弱な海馬の神経細胞に偏在しており, 短時間の全脳虚血後に起こる AT1R 発現の変化と神経細胞死の間に密接な関係があることが Hauserらにより明らかにされた。また, Saavedra らは AT1R の阻害がラットにおいて虚血後神経細胞死と脳浮腫を軽減すると報告した。これらの報告より, angiotensin II は脳血流の調節に関係し, AT1R の発現は神経細胞の虚血耐性に関連する可能性が示唆された。

虚血に対して脆弱な海馬の神経細胞は全脳虚血後に遅発性神経細胞死を起こすことが知られている。ラット全脳虚血モデルはこの現象を再現性良く生じ, 遅発性神経細胞死の研究に広く用いられている。このモデルでは短時間(5-10分)の全脳虚血後に海馬 CA1 領域の錐体細胞の約 90%が選択的に虚血 2-3 日後に脱落する。これらの細胞群では虚血後早期に superoxide の過剰産生が起こり, 次いでアポトーシス促進要素である cytochrome c がミトコンドリアから漏出する。その後 caspase-9, -3, -7 などが順次活性化されて DNA 修復酵素 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)などの不活性化を来し, 最後に核の断片化, DNA 損傷を起こして細胞死に至る。また, 最近の AT1R の基礎研究により, 血管内皮細胞などでは下図(図1)のように, アンジオテンシン I I が AT1 受容体に結合すると NOX を含む complex を介して superoxide (O_2^-), H_2O_2 などの酸化ストレスを細胞内に発生することが明らかとなった。

2. 研究の目的

AT1R の局在する海馬において虚血後にアンジオテンシン I I の作用により AT1R の活性化が起こり, NOX complex を介して酸化ストレス (superoxide (O_2^-), H_2O_2) が過剰に発生する。このストレスがミトコンドリア膜の電位・透過性の変化を生じさせ, ミトコンドリアからの cytochrome c の漏出が起こり, ミトコンドリア依存性アポトーシスを来たして細胞死を招来するという仮説を検証すること。

3. 研究の方法

Cytochrome c 依存性アポトーシスの関与に関する検討

成熟雄性SDラットに7日間candesartan(0.1, 1, 10 mg/kg/day)またはvehicleを経口投与し, 前述のSmith法により全脳虚血(5分間, 31-35 mmHg)を行い, 虚血後もARBまたはvehicleの投与を継続する。この2群において下記のcytochrome c依存性アポトーシスに関する検討を行う。

免疫組織染色

6ミクロンのパラフィン切片を cytochrome c, caspase-3, 7, 9 に対する抗体を用いて免疫染色する。また, これらの蛋白を表出している細胞を特定するため, GFAP (glial fibrillary acidic protein) あるいは NeuN (neuron specific nuclear protein)との二重染色を行う。また, これらの蛋白のミトコンドリア内外の局在を確かめるため, ミトコンドリアマーカー MitoTracker との二重染色もあわせて行う。

蛋白定量評価

免疫染色と同じ時期に海馬 CA1 領域(約 50mg/匹)を摘出する。正常状態でミトコンドリア内に局在する蛋白, cytochrome c, caspase-9 用には細胞質分画, ミトコンドリア分画を選択的に採取する。低速(750 x g)で遠心して細胞膜, 核を pellet として取り除き, supernatant を高速(10000 x g)で遠心してミト

コンドリア画分を pellet として保存する．最後に supernatant の細胞質画分から粗面小胞体やリボゾームを除くために超高速(100000 x g)で遠心する．caspase-3, 7 用には全細胞分画を採取するので抽出した組織をそのまま超音波破碎して低速で短時間遠心し(750 x g で 5 分程度), 全細胞分画を用いる．抽出した蛋白は SDS-PAGE 法を用いて Western blot を行う．内部標準として β -actin を染色し, densitometer で統計学的に評価する．これらのサンプルを用いて Western blot 法で蛋白の定量, 細胞内移動を評価する．

4．研究成果

AT1Rの阻害が海馬CA1領域の神経細胞死を抑制する．

ラットにAT1R阻害剤 (ARB) である candesartan(0.1, 1, 10 mg/kg/day)またはvehicle を経口投与し, 前述のSmith法により全脳虚血(5分間, 31-35 mmHg)を行った．虚血後も candesartanまたはvehicleの投与継続し, 虚血後5日に経心的に灌流固定し, 海馬CA1領域の生存神経細胞を評価した．Vehicle群では殆どの神経細胞が細胞質の変形や好酸性変化, 核の濃縮像を起こして死滅し, 生存する細胞はわずかに5%以下であったが, candesartan 1 mg/kg/day投与群では生存細胞数は30%と増加した．

AT1R阻害薬投与群と非投与群で酸化ストレスの発生に差がある．

同様の実験系を用いてhydroethidine法により酸化ストレスの発生を観察した．AT1Rを阻害したグループでは虚血に対して脆弱な海馬CA1領域の神経細胞における虚血後酸化ストレス (superoxide) の発生が抑制された．

AT1R阻害剤投与群でアポトーシス経路のどのレベルで阻害されているか．

分子生物学的手法 (Western blot, 細胞分画法, 免疫染色) により検討を行い, 投与群ではcytochrome cのミトコンドリア外漏出が統計学的優位差をもって多かった．

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1件)

Takahashi Y, Sugawara T, Toshio Miyazaki, Hideaki Itoh, Kazuo Mizoi: Aberrant increase in cytochrome c oxidase subunit I precedes neuronal death after cerebral ischemia. Neuroreport 24:872-877, 2013

〔学会発表〕(計0件)

Takahashi Y, Sugawara T, Toshio Miyazaki, Hideaki Itoh, Kazuo Mizoi: Remarkable increase of cytochrome c oxidase subunit I after global cerebral ischemia. Brain 2013, Shanghai, China, May 20-23, 2013

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織
(1)研究代表者
柳澤俊晴 (Yanagisawa Toshiharu)
秋田大学・医学研究科・助教
研究者番号：20311574

(2)研究分担者

菅原卓 (Sugawara Taku)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：80241660

(3)連携研究者

()

研究者番号：