

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592314

研究課題名(和文) 脳が虚血耐性を獲得するための分子基盤の解明～一過性全脳虚血モデルによる検討～

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of ischemic tolerance in the brain

研究代表者

中島 崇行 (Takayuki, Nakajima)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：30333644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海馬が虚血耐性を獲得するための分子基盤を明らかにすることを目的とし、ラットを用いて、弱い虚血後の海馬で発現量が変化するタンパク質をプロテオーム解析法により同定した。3分の虚血を受けた脳では、その後に加えられる5分虚血によって誘導される神経細胞死が抑制されることがわかっているため、今回、3分の虚血後の海馬CA1領域におけるタンパク質の発現変化を調べた。その結果、aconitase2、tubulin alpha 1A、PIMT、VDAC1の発現量が減少していることがわかった。3分の虚血後のこれらのタンパク質の発現量低下の機能的意義については今後さらに調べる必要がある。

研究成果の概要(英文)：Neurons are vulnerable to ischemia, while they become tolerant to ischemia following exposure to a brief non-lethal period of ischemia known as ischemic preconditioning. This phenomenon is known as ischemic tolerance. We previously have reported that 3 min of ischemic preconditioning reduced 5 min ischemia-induced neuronal cell death in the hippocampal CA1 region. The aim of this study is to examine the altered expression of proteins in the CA1 region subjected to 3 min ischemic preconditioning using proteomic analysis. Proteomic analysis revealed that aconitase2, tubulin alpha 1A, protein-L-isoaspartate O-methyltransferase and voltage-dependent anion channel 1 were down-regulated in the CA1 region subjected to 3 min ischemic-preconditioning. The functional significance of the down-regulation of these proteins after 3 min ischemic preconditioning remains to be further studied.

研究分野：中枢神経

キーワード：脳神経疾患 脳虚血 海馬 虚血耐性 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

ヒトが呼吸や心拍の一時停止に陥ると、一命は取り留めたとしても、脳に障害が残ることがある。脳の中でも特に海馬、大脳皮質、小脳が酸素不足(虚血)の影響を受け易く、認知や感情、運動機能に障害が及ぶ。ヒトでは虚血が4~5分続くと脳の神経細胞が損傷する。ところが、神経細胞に傷害を及ぼさないくらいの非常に弱い虚血を前もって負荷すると、その後の強い虚血に対して抵抗性を示す。これを虚血耐性という。

虚血耐性はラットなどの実験動物の脳はもちろん、初代培養神経細胞でも認められる。ヒト臨床では、脳梗塞発症前に一過性脳虚血発作を経験した患者は、その後起こった脳梗塞による予後が良い傾向があり、虚血耐性はヒトでも起こりえるとされている(Nat. Rev. Neurosci. 2006; 7:437-448.)。過去、虚血耐性の分子メカニズム解明は脳虚血の画期的な治療方法の開発につながるとの期待感から、研究が盛んに行われてきたが、現在にいたるまで、その詳細については不明である。

脳に血液を供給する総頸動脈と椎骨動脈を一時的に閉じる全脳虚血処置は、海馬神経細胞の顕著な脱落を招く(Stroke 1979; 10:267-272.)。これは一時的な心停止後に見られる脳の病態に類似している。本申請者は全脳虚血処置ラットを用いた海馬での虚血耐性の研究で、以下の結果を得た(Neurologic. Sci., 32:229-239. 2011.)。

ラットに5分虚血を負荷すると、海馬の神経細胞が脱落するが、前もって3分虚血(3分虚血は神経細胞を脱落させない)を負荷すると、その後の5分虚血負荷による神経細胞の脱落の程度が減る。すなわち、3分虚血は虚血耐性を誘導する。5分虚血を負荷した海馬では、細胞死との関係が深いプロテアーゼであるカルパイン活性が上昇するが、3分虚血を前もって負荷した海馬では、その後5分虚血を負荷したとしてもカルパイン活性の上昇が起らなくなる。このカルパイン活性の違いはカルパインの発現量の変化とは無関係である。

しかしながら、これらの結果は、すでに虚血耐性を獲得した海馬での現象を示しているだけで、虚血耐性がいかにして成立されるのかという、本質的な問題は未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、海馬が虚血耐性を獲得するための分子基盤を明らかにすることを目的とする。本研究で計画する主な項目は、「ラットを用いて、弱い虚血負荷後の海馬で発現量が変化するタンパク質をプロテオーム解析法により同定すること」、「ラット胎仔海馬初代培養細胞への遺伝子導入により同定したタンパク質の発現量変化が虚血に対して神経保護効果を発揮するかを検討すること」である。本研究は、虚血性神経細胞死予防のための新たな創薬標的の解明に向けた基礎的研究である。

3. 研究の方法

(1) ラットへの虚血負荷

一過性全脳虚血は左右椎骨動脈と左右総頸動脈の閉塞による4血管閉塞法によって行った。虚血時間は3分である。コントロールとして、血管を露出させた偽手術処置ラットを使用した。

(2) プロテオーム解析

3分虚血負荷ラットと偽手術ラットから経時的に海馬を採取した。

採取した海馬組織を破砕後、細胞分画作製用試薬を用いてS1、2、3、4の4つの分画溶液を用意した。

それぞれの分画溶液を2次元電気泳動にかけることでタンパク質を分離した。

□タンパク質を分離したゲルをCBB染色あるいは銀染色することでゲル上のタンパク質スポットを可視化し、3分虚血負荷ラットと偽手術ラットのサンプル間でスポットの染色強度が異なるタンパク質スポット(発現量の異なるタンパク質スポット)を選択し、そのスポット部分を切り出した。

切り出したスポット部分のゲルをプロテアーゼ処理することで、ゲル中に含まれるタンパク質をペプチド断片にした。

得られたペプチド断片の質量分析を液体クロマトグラフ質量分析装置(LCMS-IT-TOF分析装置)を用いて行い、選択したスポットに含まれるタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) プロテオーム解析

CBB染色後、偽手術処置を行った海馬CA1と3分虚血を行った海馬CA1間で染色強度が異なるいくつかのスポットがS1サンプル

を分離したゲルで認められた。偽手術処置を行った海馬 CA1 と 3 分虚血を行った海馬 CA1 由来の S1 サンプルを分離した CBB 染色ゲルでは平均 140 個のスポットが検出された。これらのスポットのうち 2 つのスポット (spot 1, 2) を偽手術処置を行った海馬 CA1 と 3 分虚血を行った海馬 CA1 間で比較するために、任意に選択した。Spot 2 の染色強度は偽手術処置を行った海馬 CA1 に比べて、3 分虚血を行った海馬 CA1 で有意に減少していた。LCMS-IT-TOF 解析の結果、spot 2 にはミトコンドリアアコニターゼ

(aconitase2) が含まれていた。S2, 3, 4 のサンプルを分離した CBB 染色ゲルでは偽手術処置を行った海馬 CA1 と 3 分虚血を行った海馬 CA1 間で染色強度が異なるスポットは認められなかった。偽手術処置を行った海馬 CA1 と 3 分虚血を行った海馬 CA1 由来の S1 サンプルを分離した銀染色ゲルでは平均 240 個のスポットが検出された。また、偽手術処置を行った海馬 CA1 と 3 分虚血を行った海馬 CA1 由来の S4 サンプルを分離した銀染色ゲルでは平均 160 個のスポットが検出された。銀染色で可視化されたスポットのうち、5 つのスポット (spot 3, 4, 5, 6, 7) の染色強度を偽手術処置を行った海馬 CA1 と 3 分虚血を行った海馬 CA1 間で比較するために、任意に選択した。その結果 spot 3, 4, 6 の染色強度は偽手術処置を行った海馬 CA1 に比べて、3 分虚血を行った海馬 CA1 で有意に減少していた。LCMS-IT-TOF 解析の結果、spot 3, 4, 6 には α -tubulin, protein-L-isoaspartate O-methyltransferase (PIMT), voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) がそれぞれ含まれていることがわかった。S2 と S3 サンプルを分離した銀染色ゲルでは、染色強度の異なるスポットは認められなかった。

(2) ウェスタンブロット

プロテオーム分析の結果をウェスタンブロットにより検証した。マイクロアレイを用いた過去の研究では虚血性プレコンディショニングは細胞の代謝を抑制する可能性のあることを示唆している。Aconitase2 はクエン酸回路の重要な調節酵素であり、VDAC1 はミトコンドリア外膜の陰イオンチャンネルであり、ともに細胞の代謝に関するタンパク質であるため、今回はこれら 2 つの

タンパク質に着目した。3 分虚血後の aconitase2 の発現量低下はウェスタンブロットでも確認できた。一方、VDAC1 も 3 分虚血後に発現量は低下する傾向を示したが、偽手術処置ラットとの間で有意な差は得られなかった。

(3) 免疫染色

Aconitase2 は海馬 CA1 領域の錐体細胞および CA1 領域に散在する介在細胞に局在していた。CA1 領域におけるミトコンドリアアコニターゼ染色強度は 3 分虚血をすると減少する傾向にあった。この結果はプロテオーム解析およびウェスタンブロット解析の結果を支持している。

(4) 結果のまとめ

今回、aconitase2 は 3 分虚血によって発現量のレベルが減少することを確認することができた。しかしながら、現段階では、3 分虚血後の海馬 CA1 領域における aconitase2 の発現量低下の機能的意義については明らかにしていない。Aconitase2 発現量低下の機能的意義については現在、本研究で計画していた胎子海馬初代培養細胞への遺伝子導入実験により、解析を行っている。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

中島崇行、竹中重雄. 脳が虚血耐性を獲得するための分子基盤の解明 ~ 一過性全脳虚血モデルによる検討 ~ (日本獣医解剖学会若手勉強会・北海道大学・2014 年 9 月 8 日)

中島崇行、竹中重雄. プロテオーム解析によるラット海馬虚血耐性現象の分子基盤の解明 (日本解剖学会・神戸国際会議場・2015 年 3 月 23 日)

[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：
出願年月日：
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

中島崇行 (NAKAJIMA Takayuki)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：30333644

(2) 研究分担者

竹中重雄 (TAKENAKA Shigeo)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：10280067

(3) 連携研究者

()

研究者番号：