

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860139

研究課題名(和文)低酸素/脳虚血負荷による神経細胞死誘導機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of ischemia-induced neuronal cell death

研究代表者

砂堀 毅彦 (SUNABORI, Takehiko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00407115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、細胞内の代表的な分解機構であるが、低酸素/脳虚血負荷後に起こる神経細胞死の一因ともなる。一方、自然免疫に関わるToll様受容体(TLR)2も障害後、早期炎症性サイトカインの過剰発現を誘発し神経細胞死を引き起こす。本研究では、低酸素/脳虚血後のTLR2とオートファジー誘導機構の関連を探索した。結果、TLR2シグナル経路の活性化がオートファジーを誘導することが示唆された。一方で、オートファジー不全マウスにおいても早期炎症性サイトカインの発現抑制が認められたことより、低酸素/脳虚血障害後TLRの活性化とオートファジー誘導は相乗的に惹起され神経細胞死を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Toll like receptors are one of the main contributors that induce inflammation under tissue injury and infection. We have previously reported that not only the excessive inflammation induced by TLR2, but also autophagy induction could aggravate disease states after neonatal hypoxic/ischemic (H/I) brain injury. Herein, we showed that the activation of TLR2 could directly induce autophagy after H/I injury. In contrast, the autophagy-impairment also revealed suppression of proinflammatory cytokine. Taken together, these data suggest that the activation of the TLR2-signaling pathway and autophagy induction leads to neuronal cell death in a synergistic action after neonatal-H/I brain injury.

研究分野：神経生物学

キーワード：低酸素 脳虚血 脳梗塞 神経細胞死 Toll様受容体 オートファジー 炎症性サイトカイン 海馬

1. 研究開始当初の背景

胎児、乳幼児における低酸素/脳虚血障害は小児脳梗塞の典型で約 5,000 人に 1 人が罹患することが知られており、重篤な場合将来にわたり脳性麻痺、精神遅滞、てんかんをはじめとした合併症を併発する。よって、同疾患の作用機序を理解することは患者の QOL の観点から非常に重要である。我々の研究室では、マウスを用いた小児と成人の脳梗塞モデルを比較した結果、その神経細胞死の機序が大きく異なっており、小児においては i). 本来細胞内の分解機構であるオートファジー (Koike et al., 2008, Am J Pathol.)、及び ii). 本来自然免疫に関与する Toll 様受容体 (TLR) の TLR2 が神経細胞死に関与することを見出している (Sunabori et al., 2016, Am J Pathol.)。しかし、その関連性、及び神経細胞死を誘発する機構に関しては不明であった。

2. 研究の目的

申請者は先に試験管内で TLR2 とオートファジー誘導の関連性を確認するため、予備実験として初代培養神経細胞を TLR2 特異的な agonist である Pam3csk4 で刺激した。結果、オートファジー誘導因子である Rapamycin 刺激と同様に GFP-LC3 の顆粒状の集積を確認した。また、オートファジー誘導の指標となる LC3 の I 型から II 型への転換も確認した。

上記のデータは、神経細胞において TLR 刺激がオートファジーを誘導することを示唆するものである。本課題では、低酸素/脳虚血負荷モデルにおいて生体内でも同様にオートファジー誘導が TLR を介して起こるかを検討した。

また、細胞特異的な TLR2 遺伝子欠損マウスを作製して、低酸素/脳虚血負荷後に神経細胞死を誘導するオートファジー、及び早期炎症性サイトカインを発現する細胞の特定を目指した。

3. 研究の方法

生後 7 日齢の新生仔 TLR2 遺伝子欠損マウス、オートファジー不全の Atg7 遺伝子欠損マウスにおいて低酸素/脳虚血負荷後、それぞれオートファジーが誘導されるか、また早期炎症性サイトカインの発現が亢進するかをウェスタンブロット法、定量的 PCR 法により検討することでシグナル経路の上下関係を明らかにすることを試みた。

神経細胞、ミクログリア細胞特異的に TLR2 遺伝子を欠損するマウスを作製し、低酸素/脳虚血負荷後の炎症性サイトカインの発現量、オートファジーの誘導、及び海馬における神経細胞死を検討することで、

どの細胞において誘導されるオートファジーが過剰な炎症反応を引き起こし、神経細胞死を誘発するのか、確認することを試みた。

4. 研究成果

-1 新生仔、低酸素/脳虚血負荷時におけるオートファジーの誘導に TLR が関与しているかを確認するために、TLR2 遺伝子欠損マウスで障害後オートファジーが誘導されるのか、ウェスタンブロット法により検討した。オートファゴソームの形成が盛んな術後 6 時間の海馬を摘出し、オートファジー誘導の指標となる LC3 の I 型から II 型への転換をウェスタンブロット法により確認した。さらに、オートファジー誘導に伴う mTORC1 の不活性化の指標となる S6K と 4EBP1 の脱リン酸化も併せて検討した。結果、図 1 に示すように、TLR2 遺伝子欠損マウスでは、野生型で観察された、LC3 の I 型から II 型への転換、並びに mTORC1 の不活性化は認められず、本系においては TLR2 が mTORC1 活性を上流で制御することが示唆された。一方で、オートファジー誘導が不全な *Atg7ff;Nestin-Cre* マウスにおいては、当初の予測通り、LC3 の I 型から II 型への転換も、S6K と 4EBP1 の脱リン酸化の亢進も確認されなかった。以上の結果は、新生仔、低酸素/脳虚血負荷に起こるオートファジーを伴う神経細胞死は TLR2 のシグナル経路の下流に位置することを示唆するものである。

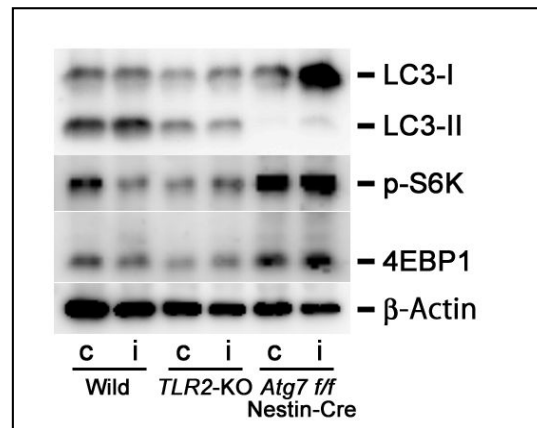


図 1. 低酸素/脳虚血負荷 6 時間後のマウス海馬のウェスタンブロット解析。生後 7 日齢の Wild、TLR2-KO、*Atg7ff;Nestin-Cre* マウスに低酸素/脳虚血負荷を施した 6 時間後の海馬の健常側 (c) と虚血側 (i) のウェスタンブロット像。野生型マウスでは、オートファジーの指標となる LC3 の蓄積、S6K、4EBP1 のリン酸化の減弱が認められるが、TLR2、*Atg7* の KO マウスでは確認できなかった。

-2 一方で、術後継時的に TLR の活性化の指標となる早期炎症性サイトカイン IL-1 β の発現量を虚血側海馬より調整した cDNA より定量的 PCR 法を用いて検討した。術後 6 時間までに 15 倍程度まで上昇したコントロール群と比較して、オートファジー誘導が不完全な *Atg7f/f;Nestin-Cre* マウスにおいては、TLR2 遺伝子欠損マウスと同様に 2~3 倍まで抑制されていた。よって、-1 の結果に加えて、オートファジーの抑制自体が TLR2 を介した過剰な炎症反応の誘発に関与していることが示唆された(図 2)。

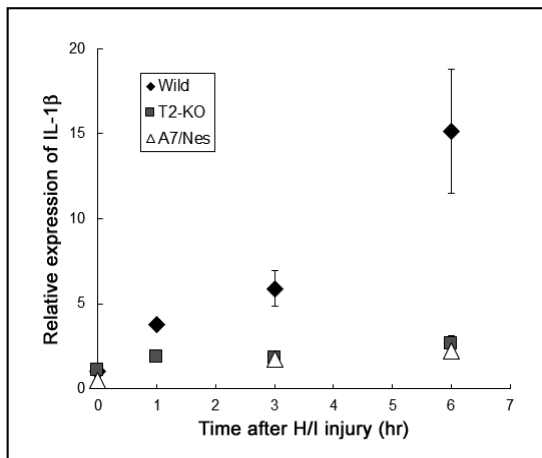


図 2 .低酸素/脳虚血負荷後のマウス海馬虚血側における早期炎症性サイトカイン IL-1 β の mRNA の発現量の定量化。生後 7 日 齢 の Wild 、 TLR2-KO 、 *Atg7f/f;Nestin-Cre* マウスに低酸素/脳虚血負荷を施し、虚血側における IL-1 β の発現量を q-PCR により定量化した。

以上の結果は、胎児、乳幼児の脳梗塞において TLR2 を介したオートファジーの誘導を抑制することで、神経細胞死を回避できることを示唆するもので今後、脳虚血に基づく低酸素ストレスによって誘導される障害から神経細胞を保護し、その機能の再生を促す薬剤を開発することの一助となると考える。

また、本課題では、低酸素/脳虚血負荷後に神経細胞死を誘導する早期炎症性サイトカインを発現する細胞、及びオートファジーとの関連を特定する目的として TLR2 の floxed-mouse を 2013 年度包括脳リソース・技術支援「遺伝子改変マウス作製ドライバーマウス支援」のもとで、新潟大学崎村建司教授との共同研究で作製した(図 3)。また、並行して TLR4 floxed-mouse マウスも併せて作製した(図 3)。二系統のマウスとも作製できたが、当初の予定より TLR2 floxed-mouse の樹立、繁殖に時間がかかり期間内に当初の目標まで到達できず、今後検討する予定である。

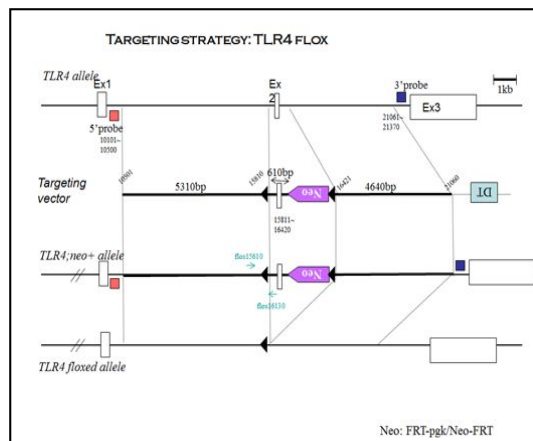
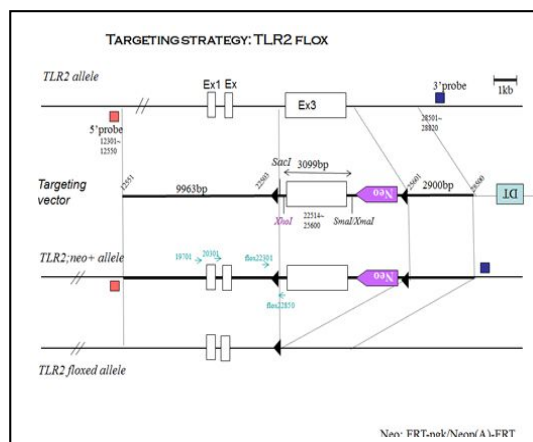


図 3 . TLR2、及び TLR4 floxed-mouse allele の模式図。いずれも、C57BL/6 由来の ES 細胞から樹立されており、戻し交配を必要としない。

また、本マウスをさまざまな Cre マウスと交配することで、多臓器における TLR と感染あるいは傷害の関与を厳密に検討することが期待できる。

< 引用文献 >

Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, Kawahara N, Kuida K, Nagata S, Kominami E, Tanaka K, Uchiyama Y.

“Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury.”

Am J Pathol. 2008, 172:454-469

Sunabori T, Koike M, Asari A, Oonuki Y, Uchiyama Y.

“Suppression of Ischemia-Induced Hippocampal Pyramidal Neuron Death by Hyaluronan Tetrasaccharide through Inhibition of Toll-Like Receptor 2 Signaling Pathway”

Am J Pathol. 2016, In Press

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2件)

Takehiko Sunabori, Masato Koike, Akira Asari, Yoji Oonuki, and Yasuo Uchiyama
“Suppression of Ischemia-Induced Hippocampal Pyramidal Neuron Death by Hyaluronan Tetrasaccharide through Inhibition of Toll-Like Receptor 2 Signaling Pathway”
The American Journal of Pathology, 2016, In Press,
DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.03.016>

Sally Mehanna, Chigure Suzuki, Masahiro Shibata, Takehiko Sunabori, Takanobu Imanaka, Kimi Araki, Ken-ichi Yamamura, Yasuo Uchiyama, Masaki Ohmuraya
Biochem Biophys Res Commun. 2016, 469:405-411.
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.002.

〔学会発表〕(計1件)

砂堀毅彦、名田茂之、岡田雅人、内山安男、小池正人
“オリゴデンドロサイト分化におけるmTORC1活性化の意義”
第121回日本解剖学会総会・全国学術集会ビッグパレットふくしま、福島

〔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
<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laborat>

ory/labo/shinkei_kozo/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂堀 毅彦 (SUNABORI, Takehiko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00407115