主論文の要旨

Remote ischemic preconditioning protects human neural stem cells from oxidative stress

（**Remote ischemic preconditioning** による
神経幹細胞の酸化ストレスからの保護作用）

名古屋大学大学院医学系研究科　細胞情報医学専攻
脳神経病態制御学講座　脳神経外科学分野
（指導：若林 俊彦　教授）
本村 絢子

【緒言】

脳卒中は世界的に死亡および重度の長期的障害を招く原因の一つとして知られている。推定では 6 人に 1 人（16.67%）が、生涯に少なくとも 1 回の脳卒中を経験するが、その生存者の多くは永続的な神経学的障害を有する。ゆえに、脳虚血傷害に対する新規治療の発展が期待される。 Remote ischemic preconditioning (rIPC)は、遠隔臓器に短時間の反復する虚血・再灌流処理を行うことで、別の生命維持に関わる臓器に対して虚血傷害からの保護作用を示す現象で広く認識されている。後肢で rIPC は、心虚血および脳虚血からの保護のために最もよく用いられる手法の一つである。この手法の有効性は、心停止または広範な心虚血モデルを用いたいくつかの研究においても確認されている。これまでの研究により、このような四肢の rIPC が脳卒中に対する長期保護効果を有し、脳損傷を防ぐ可能性があることが示されている。しかしながら、rIPC の基礎となる機序は依然として不明である。

本研究では、脳虚血と同様の脱酸素・脱グルコース（OGD）条件下で培養したヒト神経幹細胞（NSC）において、rIPC 処理を行った血漿が保護作用および抗アポトーシス作用を有するかどうかを検証した。さらに液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS / MS）を用いて、rIPC 後の血漿より候補分子を同定し、OGD 誘導細胞死から神経幹細胞を保護するその役割を検討した。

【対象及び方法】

3 人の健康な成人男性に一過性の上腕虚血を繰り返し、rIPC の前後に血液サンプルを採取した。得られた血漿は cut-off 12-14kDa のセルロース膜を用いたチューブに入れ、24 時間透析にかけた。その後、疎水性タンパクを分画するために、透析液を C18 matrix を用いた逆相クロマトグラフィーに通し、得られた抽出物質を凍結乾燥して希釈し、その神経保護活性を評価した。rIPC 血漿から得られた凍結乾燥溶液は LC-MS/MS 法により、SwissProt 55.6 Homo sapiens データベース（20,009 項目）を基に分析した。その結果、得られたデータの中から一過性四肢虚血により放出されたと考えうる疎水性循環物質で、10-15kDa と低分子量かつ特異的なペプチドおよびタンパク質が選別された。

ヒト神経幹細胞（NSC）HB1F3（F3）を 35mm dish（1.0×10^{6} cells/dish）上、OGD 条件下で培養し、細胞実験系での細胞虚血モデルとした。24 時間 OGD により誘導されたアポトーシスを評価するため、NSC に対して TUNEL assays を行い、全細胞中の TUNEL 陽性細胞の比率を計算することにより評価した。ミトコンドリア Reactive oxygen species (ROS)は、RedoxSensor Red CC-1 を用いて染色細胞を定量・定性評価した。さらに、2′-7′-dichlorofluorescin diacetate（DCFDA）細胞性活性酸素種測定法にて、6 時間の OGD 後に細胞内 ROS 値を測定した。さらに、血漿抽出物質と Thioredoxin の神経保護活性を評価するため、NSC を 24 時間培養した後、pre-rIPC および post-rIPC 群での抽出物質溶液 20μl、または Thioredoxin（最終濃度 10μg/ml）を OGD 前に 10 分間培地に添加した。そして OGD 条件下で 24 時間インキュベートした。その後、TUNEL、

RedoxSensor、および DCFDA で染色した。さらに、Thioredoxin-ROS 経路の検証については、RT-PCR を用いて評価した。

【結果】

① rIPC 後血漿抽出物質による酸化ストレス、アポトーシスへの保護作用

NSC を 6、12、24 時間 OGD 処理した後、TUNEL および RedoxSensor にて評価した。TUNEL および RedoxSensor 陽性細胞は、OGD 24 時間後に最も顕著に観察された。OGD により TUNEL および RedoxSensor 陽性細胞の割合は、約 10～20%まで著しく増加した（Figure 1,2）。OGD が脳虚血のメカニズムと同様、酸化ストレスを誘導することによって神経細胞においてアポトーシスを活性化することを示した。OGD により、NSC は 16%～21%にアポトーシスを誘導したが、post-rIPC 群の血漿透析液からの凍結乾燥抽出物の溶液を添加することで、有意にアポトーシスは抑制された（Figure 1b）。 同様に、OGD が誘発する酸化ストレスについても抑制された（Figure 1c）。

② 液体クロマトグラフィー質量分析法での解析

LC-MS/MS から得られたデータについて、Post-rIPC 血漿に特異的に存在するタンパク（10～15kDa）を表 1 に挙げた。その中で可能性の高い候補タンパクがいくつか挙げられたが、特に分子量 12,015Da の Thioredoxin は抗酸化物質であり、酸化ストレスおよびアポトーシスに対して急性の保護効果を有する可能性が高く、一過性四肢虚血の後に放出された疎水性循環物質として最も妥当な候補であると考えられた。

③ Thioredoxin 処理による神経幹細胞への影響

OGD 自体は細胞増殖を抑制したが、OGD 前に Thioredoxin で処理すると、TUNEL および RedoxSensor 染色で確認される OGD 誘導細胞死および酸化ストレスの陽性率はそれぞれ 14%および 8%から、最大で 2%および 0.5%抑制された（Figure 2）。Thioredoxin-interacting protein (TXNIP)は Thioredoxin と共有結合し、Thioredoxin の ROS 除去能力や別のシグナル伝達分子への結合を阻害することでよく知られる。TXNIP 遺伝子はグルコース負荷によって誘導されるため、我々は OGD 施行 24 時間後の TXNIP の転写について検証した。TXNIP 値は OGD を施行して 24 時間後には非 OGD control 群の 20%まで顕著に減少し、Thioredoxin による前処理を行うと、TXNIP 値は約 70%まで回復した（Figure 3a）。さらに、OGD 24 時間後に RedoxSensor によって検出された ROS が TXNIP 減少に関与しているか検証するため、OGD 処理後のより早い段階、OGD 施行 6 時間後に DCFDA flow cytometry を行い、ROS 検出を試みた。 OGD 6 時間後、DCFDA 標識細胞の数は既に顕著に増加していたが、Thioredoxin を添加することより細胞は正常 control 群に近いレベルまで回復した（Figure 3b）。

【考察】

脳卒中は世界的に死亡原因の約 9%を占め、その大部分は虚血性脳卒中である。 最近の研究より、虚血性脳卒中患者では ROS が増加していることが報告されている。細胞が低酸素状態に陥ると ROS 産生が増加するが、これらの代謝変化はミトコンドリア

呼吸鎖と相互作用して、superoxide anion および過酸化水素の放出を増加させる。本研究では細胞虚血状態を模倣するために、神経幹細胞を OGD 条件下で培養した。我々は OGD が細胞死を誘導するだけでなく、RedoxSensor および DCFDA 染色によって測定される酸化ストレスを誘導することを確認した。

無作為化比較対照試験では、先天性心不全の修復術を受けた小児において、rIPC により心筋傷害が軽減されたことを報告している。 しかし、その機序は依然として不明である。 以前、我々はウサギにおいて冠動脈結紮および再灌流後の梗塞範囲が rIPC により著しく減少することを示した。 さらに、rIPC 処理を行った健常なウサギから得られた血漿、もしくは血漿透析液（cut-off 15kDa の透析膜を使用）にて前処理を行うことで、同様の心筋保護効果が見られた。 これまでに我々は、一過性の四肢虚血により心筋虚血・再灌流障害に対する強力な保護作用を誘導する低分子量（＜15kDa）の疎水性循環物質の存在を確認していた。本研究ではその物質の同定を試みた。

rIPC 血漿透析液を C18 カラムに通して抽出、凍結乾燥し、その濃縮液を LC-MS /MS にかけた結果、10-15kDa の候補タンパクのリストが得られた（Table 1）。OGD 誘導細胞死が酸化ストレスに関連していることを考慮して、我々は Thioredoxin（12kDa）に焦点を当てたが、他候補の可能性も否定はできない。

ROS は酸化還元系のタンパク修飾を介して細胞機能に影響を与える。Cysteine thiols の可逆的酸化還元系の修飾は、細胞分裂および分化、代謝および細胞死などの多様な細胞過程に影響を及ぼすタンパク活性を調節している。機序は明確にはされていないが、ROS は TXNIP 値を著しく低下させた。これは、虚血細胞が ATP を再生するためのエネルギー源を必要とすることを示唆した。TXNIP を減少させることで細胞内へのグルコース取り込みを増加させる必要があるものと考えられる。抗酸化タンパクである Thioredoxin は ROS に対する主要な防御因子の一つと考えられる。OGD 前に NSC を Thioredoxin で前処理した場合、ROS 誘導細胞死は細胞実験において有意に抑制された。TXNIP-Thioredoxin 相互作用は、ミトコンドリアの生物学的エネルギーおよび呼吸機能の調節に関与し、虚血損傷からの神経保護作用を有する可能性がある。

【結語】

動物実験における脳虚血に対する Thioredoxin の効果は、今後さらに評価する必要がある。本研究では、虚血性細胞モデルにおける rIPC の効果を評価し、虚血から心臓および脳を保護する可能性のある物質として Thioredoxin を同定した。