Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Combined metabolic and transcriptional profiling identifies pentose phosphate pathway activation by HSP27 phosphorylation during cerebral ischemia

Imahori, Taichiro

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2017-09-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6981号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006981

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Combined metabolic and transcriptional profiling identifies pentose phosphate pathway activation by HSP27 phosphorylation during cerebral ischemia

代謝プロファイリングと転写プロファイリングを併用して，脳虚血時における熱ショックタンパク質27のリン酸化によるペントースリン酸経路活性化を同定した

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
脳神経外科学
（指導教員：甲村英二教授）

今堀　太一郎

【背景と目的】

脳卒中は全世界において死因や介護要因の大きな割合を占める。脳卒中のうち9割が虚血性脳卒中であるが、代謝学的な病態生理は十分に解明されていない。

今回われわれは、包括的代謝プロファイリング（メタボローム解析）に転写プロファイリング（トランスクリプトーム解析）を併用して脳虚血ラットの脳組織を解析し、これら一次スクリーニングの結果から、さらに脳虚血に特異的な代謝経路および変動を調べた。

【対象と方法】

雄ウィスターラットを使用して実験を行った。虚血群は、吸入麻酔下に頚部内頚動脈からの糸栓子挿入による中大脳動脈閉塞ラットを作成し、虚血後30分、60分、120分の時点で、動脈閉塞に対する再灌流処置を加えずに、大脳皮質領域の組織を採取した。対照群は、糸栓子による閉塞を行わない偽手術ラットを使用し、同様に組織を採取した。組織サンプルを、メタボローム解析とマイクロアレイ解析を行い、得られたデータから、急性期脳虚血に特異的な代謝物および遺伝子変動に関連する代謝経路について的を絞り、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応とウェスタンブロッティング、酵素活性測定、NADPH測定などで詳細を調べた。

【結果】

①メタボローム解析

ガスクロマトグラフ質量分析装置（GC/MS）を用いたメタボローム解析により、主に水溶性代謝物である92代謝物が測定された。主成分分析では、第一主成分で虚血群（120分虚血ラット10匹）と対照群（120分対照ラット10匹）が明瞭に分離された。また、虚血群において、虚血後30分（6匹）と120分（4匹）の間も分離された。これらの分離は、ヒートマップにおいても明瞭であった。ボルケーノプロットを用いて解析を行い、有意に虚血群と対照群の分離に寄与する32代謝物を同定すると、その多くが炭水化物代謝経路であった。特に、ペントースリン酸経路に含まれるフルクトース6リン酸とリブロース5リン酸は、虚血時に経時的に有意な減少を認め、脳虚血時にペントースリン酸経路が亢進していることが示唆された。ペントースリン酸経路は、NADPH を産生して還元型グルタチオンの再生産を促進し活性酸素を処理して抗酸化状態を維持するのに貢献するため、脳虚血において注目すべき経路であると考えられた。

②トランスクリプトーム解析

虚血群（120分虚血ラット5匹）と対照群（120分対照ラット5匹）を用いてマイクロアレイ解析を行い、11633 遺伝子が同定された。遺伝子セットの解析から、Toll-like receptor 経路や mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル経路など、23の経路で有意な変化を認めた。ペントースリン酸経路に関しては、MAPK シグナル経路中の熱ショックタンパク質 27（heat shock protein 27, HSP27）が亢進しているのが注目された。熱ショックタンパク質は、細胞に対する様々なストレスにより誘導されるタンパク質であるが、そのファミリーである HSP27 は、ペントースリン酸経路の律速酵素であるグルコース 6 リン酸脱水素酵素（glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD）を活性化することが報告されている。G6PD は NADP を NADPH へ還

元させ、NADPH は酸化型グルタチオンの再還元に寄与し、その結果として抗酸化作用を果たす。
以上のメタボローム解析とトランスクリプトーム解析の結果から、脳虚血時の HSP27 と G6PD の変動についてさらに詳細を解析することとした。

③HSP27 と G6PD の mRNA とタンパク質レベルでの発現

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応では（各群 5 匹）、HSP27 は mRNA レベルで、30 分虚血では有意変化を認めなかったが、60 分虚血と 120 分虚血では有意な増加を認めた。しかし、G6PD は 120 分の虚血では変化を認めなかった。

ウェスタンブロッティングでは（各群 4 匹）、HSP27 はタンパク質レベルで、虚血時にわずかに増加する程度であり、G6PD も変化を認めなかった。一方、リン酸化 HSP27 は、60 分虚血で有意に増加し、120 分虚血でも増加を維持していた。

④G6PD 活性と NADPH/NADP+比

HSP27 のリン酸化亢進が、ペントースリン酸経路の亢進と関連するかを調べるために、G6PD 活性と NADPH/NADP+比を測定した（各群 4 匹）。G6PD 活性と NADPH/NADP+比は、虚血 60 分では有意な変化を認めなかったが、虚血 120 分では有意な増加を示した。これらの結果より、虚血時には HSP27 のリン酸化により G6PD が活性化され、ペントースリン酸経路が亢進し、NADPH が増加することが示唆された。

⑤ATM キナーゼによる HSP27 のリン酸化阻害

HSP27 のリン酸化は、これまでにプロテインキナーゼ D や ataxia telangiectasia mutated（ATM）キナーゼの関与が報告されており、今回これらの阻害による変化を調べた。術前にプロテインキナーゼ D 阻害剤および ATM キナーゼ阻害剤の脳室内投与を加えた中大脳動脈閉塞ラットにおいて脳組織を採取した。ウェスタンブロッティングでは、プロテインキナーゼ D 阻害剤投与では変化を認めなかったが、ATM キナーゼ阻害剤投与では濃度依存性に HSP27 のリン酸化が阻害されることが示された。

以上により、脳虚血急性期の脳皮質では、ATM キナーゼによる HSP27 リン酸化が生じることにより G6PD が活性化され、ペントースリン酸経路が亢進し、その結果、NADPH が増加することが示された。生体内抗酸化能の維持に働く NADPH の増加は、脳虚血に対する生体防御機構の一部であると考えられた。ATM キナーゼや HSP27 リン酸化が新たな脳虚血治療のターゲットとなる可能性が考えられる。

【結論】

代謝プロファイリングと転写プロファイリングを併用して、脳虚血時における熱ショックタンパク質 27 のリン酸化によるペントースリン酸経路活性化を同定した。脳虚血時には、このペントースリン酸経路活性化によって、NADPH が増加し、脳虚血に対する生体防御機構として働くことが示唆された。ATM キナーゼや HSP27 リン酸化が新たな虚血性脳卒中治療のターゲットとなる可能性が考えられる。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2710 号	氏　名	今堀　太一郎
論文題目 Title of Dissertation	Combined metabolic and transcriptional profiling identifies pentose phosphate pathway activation by HSP27 phosphorylation during cerebral ischemia 代謝プロファイリングと転写プロファイリングを併用して，脳虚血時における熱ショックタンパク質 27 のリン酸化によるペントースリン酸経路活性化を同定した		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	匂坂敏朗 中田隆一 溝渕知司	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【背景】

虚血性脳卒中における代謝学的な病態生理は十分に解明されていない。本研究者らは、包括的代謝プロファイリングに転写プロファイリングを併用して脳虚血ラットの脳組織を包括的に解析し、これらを一次スクリーニングとして脳虚血に特異的な代謝経路および変動を調べた。

【方法・結果】

雄ウィスターラットを使用し、脳虚血モデル（虚血群）と対照（対照群）を作成して実験を行った。虚血群は、中大脳動脈閉塞ラットを作成し、虚血後 30 分、60 分、120 分の時点で、大脳皮質領域の組織を採取した。対照群は、偽手術ラットに対して同様に組織を採取した。メタボローム解析とマイクロアレイ解析を行い、得られたデータから脳虚血に特異的な代謝物および遺伝子変動に関連する代謝経路について的を絞り、さらにリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応とウェスタンブロッティング、酵素活性測定、NADPH 測定などで調べた。

①メタボローム解析

ガスクロマトグラフ質量分析装置を用いたメタボローム解析により、主に水溶性代謝物である 92 代謝物が測定された。主成分分析では、第一主成分で虚血群と対照群が明瞭に分離された。虚血群と対照群の分離に有意に寄与する 32 代謝物を同定すると、その多くが炭水化物代謝経路であった。特に、ペントースリン酸経路に含まれるフルクトース 6 リン酸とリブロース 5 リン酸は、虚血時に有意な減少を認め、脳虚血時にペントースリン酸経路が亢進していることが示唆された。ペントースリン酸経路は、NADPH を産生して還元型グルタチオンの再生産を促進し、活性酸素を処理するのに貢献するため、脳虚血において注目すべき経路であると考えられた。

②トランスクリプトーム解析

マイクロアレイ解析により、11633 遺伝子が同定された。遺伝子セットの解析から、23 の経路で虚血群において有意な変化を認めた。ペントースリン酸経路に関して、MAPK シグナル経路中の熱ショックタンパク質 27（heat shock protein 27, HSP27）の亢進が注目された。熱ショックタンパク質のファミリーである HSP27 は、ペントースリン酸経路の律速酵素であるグルコース 6 リン酸脱水素酵素（glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD）を活性化することが報告されている。G6PD は NADP を NADPH へ還元し、さらに NADPH は酸化型グルタチオンの再還元に寄与する。以上の結果から、脳虚血時の HSP27 と G6PD の変動についてさらに調べた。

③HSP27 と G6PD の mRNA とタンパク質レベルでの発現
リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応では、HSP27 は 60 分虚血と 120 分虚血では有意な増加を認めたが、G6PD は変化を認めなかった。ウェスタンブロッティングでは、HSP27 と G6PD は有意な変化を認めなかったが、リン酸化 HSP27 は 60 分虚血と 120 分虚血で有意な増加を認めた。

④G6PD 活性と NADPH/NADP+比
G6PD 活性と NADPH/NADP+比は、虚血 60 分では有意な変化を認めなかったが、虚血 120 分では有意な増加を示した。これらの結果より、虚血時には HSP27 のリン酸化により G6PD が活性化され、ペントースリン酸経路が亢進し、NADPH が増加することが示唆された。

⑤ATM キナーゼによる HSP27 のリン酸化阻害
HSP27 のリン酸化は、これまでにプロテインキナーゼ D や ataxia telangiectasia mutated（ATM）キナーゼの関与が報告されており、これらの阻害による変化を調べた。術前にこれらの阻害剤を追加したラットで組織を採取した。ウェスタンブロッティングでは、プロテインキナーゼ D 阻害剤投与では変化を認めなかったが、ATM キナーゼ阻害剤投与では濃度依存性に HSP27 のリン酸化が阻害されることが示された。

【結論】
本研究で、脳虚血急性期のラット脳皮質では、ATM キナーゼによる HSP27 リン酸化が生じることにより G6PD が活性化され、ペントースリン酸経路が亢進し、その結果、NADPH が増加することが明らかになった。生体内抗酸化能の維持に働く NADPH の増加は、脳虚血に対する生体防御機構の一部であると考えられる。

本研究は、代謝プロファイリングと転写プロファイリングを併用して、脳虚血時における熱ショックタンパク質 HSP27 のリン酸化によるペントースリン酸経路活性化を同定し、ペントースリン酸経路活性化により NADPH が増加し、脳虚血に対する生体防御機構として働くことを発見した。ATM キナーゼや HSP27 リン酸化が新たな虚血性脳卒中治療のターゲットとなる可能性を示すものであり、虚血性脳卒中の病態を解明するうえで価値ある集績と認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。