

## 脳低温療法培養条件による神経幹細胞 (MEB5) のアポトーシス抑制機構と膜環境との関連性

### Involvement of membrane environment in apoptosis inhibition in neural stem cell (MEB5) under cerebral hypothermia condition

○濱中香織<sup>1)</sup>, 鈴木佑典<sup>2)</sup>, 石坂有梨弥<sup>1)</sup>, 上宮悠<sup>4)</sup>, 櫛泰典<sup>2)</sup>

○Kaori Hamanaka<sup>1)</sup>, Yusuke Suzuki<sup>2)</sup>, Yuriya Ishizaka<sup>1)</sup>, Hisashi Kamimiya<sup>3)</sup>, and Yasunori Kushi<sup>2)</sup>

Abstract: Cerebral hypothermia is one of the therapies for protection from acute brain injury caused by hypoxic-ischemic encephalopathy, cerebral edema, and cerebral infarction due to inflammation. Apoptosis has been regulated by the localizations of many kinds of receptors via changing lipid composition on cell membrane including lipid microdomain. Gangliosides are sialic acid-containing glycosphingolipids that are abundant in the lipid microdomain and gangliosides are important messengers of the adaptive responses to stress, including apoptosis. In this study, we analyzed the glycolipid composition and  $\beta$ 1-integrin expression in MEB5 under cerebral hypothermia condition by thin-layer chromatography and western blot analysis, respectively.

#### 1. 目的

近年、頭部に外傷を負った患者の脳浮腫や炎症反応による脳梗塞治療において、脳低温療法が臨床で応用されており、その有用性が明らかになりつつある。また、細胞膜上の脂質組成変化に伴う様々な受容体の局在変化によって、アポトーシスが制御されていることが報告されている。その中でシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは、膜マイクロドメインに存在し、アポトーシスを含む様々なストレス応答における重要な因子であることが知られている。

本研究では、脳低温療法培養条件における神経幹細胞の上皮成長因子(EGF)枯渇に伴うアポトーシス抑制機構解明を目的とし、通常条件と脳低温療法培養条件で培養した MEB5 の糖脂質およびアポトーシス関連因子である  $\beta$ 1-インテグリンの発現変化解析を行った。

#### 2. 方法

##### MEB5 細胞培養条件

MEB 細胞は、EGF、インスリン、トランスフェリン、ビオチン、亜セレン酸ナトリウムを添加した DMEM(高グルコース)培養液中で、37°C(通常条件)または 32°C(低温条件)で培養した。アポトーシス誘導は EGF 枯渇下、それぞれの温度条件にて誘起した。

##### 糖脂質およびタンパク質発現解析

通常または脳低温条件下、および EGF 存在/非存在下にて培養した MEB5 細胞から糖脂質

1: 日大理工・学部・応化 2: 日大理工・教員・応化 3: 日大理工・院(後)・応化

を抽出後, SepPakC18 にて脱塩し, 高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLC)にて糖脂質の解析を行った. また, 上記と同様に培養した MEB5 細胞からタンパク質を抽出し, ウェスタンブロット法により,  $\beta$ 1-インテグリンおよび  $\beta$ -アクチンの発現を解析した.

### 3. 結果・考察

MEB 細胞を通常または低温条件下, および EGF 存在/非存在下で 48 時間培養した結果, 細胞塊の大きさおよび数の違いが観察された(Fig. 1). 次にそれぞれの条件で培養した MEB5 細胞から糖脂質を抽出後, HPTLC により解析した結果, 37°C, EGF(-)のみガングリオシド GM3 および GD1a の発現が上昇していたが, 他の培養条件では, 大部分の発現が GD3 であった(Fig. 2). さらに,  $\beta$ 1-インテグリンの発現変化をウェスタンブロット法により解析した結果, 37°C, EGF(-)のみ, 発現が大きく減少していることが判った(Fig. 3). 以上のように, MEB5 細胞の EGF 枯渇によるアポトーシス誘導条件において, GM3 および GD1a の発現増加および  $\beta$ 1-インテグリンの発現低下が低温条件(32°C)でのみ, それぞれ抑制されていることから, ガングリオシドを含む膜環境変化および  $\beta$ 1-インテグリン発現変化が脳低温療法によるアポトーシス抑制機構において重要であることが示唆された. 今後はより詳細なメカニズム解明を進めて行く予定である.

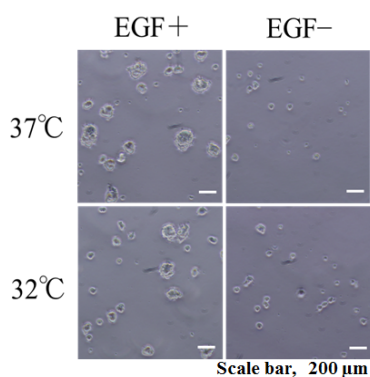


Fig.1 Phase views of MEB5 under various culture conditions for 48 hrs.

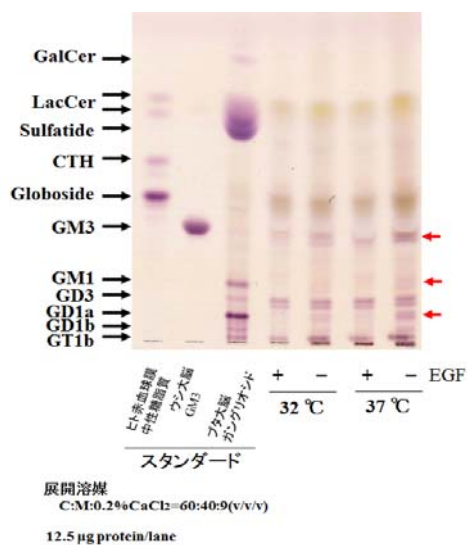


Fig.2 HPTLC analysis of glycolipids isolated from MEB5 under various culture conditions for 48 hrs.

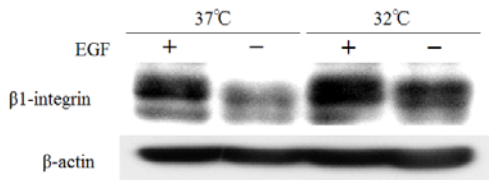


Fig.3 Total cell lysates from MEB5 cultured in the various condition were analyzed by western-blot with the anti- $\beta$ 1-integrin antibody and anti- $\beta$ -actin antibody.  $\beta$ -Actin was detected as a loading control.