

脳低温療法における神経幹細胞の糖脂質組成変化解析

Analysis of glycolipid composition in neural stem cell under cerebral hypothermia condition

○吉田恵里子¹⁾、鈴木佑典²⁾、小島俊一¹⁾、勝田沙織³⁾、上宮悠⁴⁾、Anila Mathew⁵⁾、櫛泰典²⁾
 ○Eriko Yoshida¹⁾、Yusuke Suzuki²⁾、Shunichi Kojima¹⁾、Saori Katsuda³⁾、Hisashi Kamimiya⁴⁾、
 Anila Mathew⁵⁾、and Yasunori Kushi²⁾

Abstract: Cerebral hypothermia is one of the current therapies for protection from nerve damage on hypoxic-ischemic encephalopathy, cerebral edema or cerebral infarction due to inflammation after head injury. Apoptosis induced by depletion of epidermal growth factor (EGF) has been suppressed by expression increment of cold-inducible RNA binding protein under same condition to cerebral hypothermia (32°C) in neural stem cell line (MEB5). However, the suppression mechanism of the apoptosis has not been fully elucidated. It is well known that apoptosis has been regulated by the location of many kinds of receptors via changing lipid composition on cell membrane including lipid microdomain. In this study, we analyzed the glycolipid composition in neural stem cell line (NE-4C) under cerebral hypothermia condition by thin-layer chromatography.

1. 目的

近年、新生児の低酸素性虚血性脳症及び交通事故等で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、脳低温療法が有効であることが明らかになっており、臨床でも応用されている。また、脳低温療法(32 °C)と同じ温度条件下で培養した神経幹細胞株(MEB5)において、Cold-inducible RNA 結合性タンパク質発現が増加し、上皮成長因子(EGF)枯渇によるアポトーシスを抑制するという報告がされている^[1]。しかしながら、上記アポトーシス抑制機構は完全には解明されていない。

本研究では、各種受容体の局在及び情報伝達制御を介し、アポトーシスを制御している可能性が示唆されている膜マイクロドメイン上の脂質組成^[2]を解析し、脳低温療法における神経幹細胞のアポトーシス抑制機構解明を目的とする。

2. 方法

NE-4C 神経幹細胞培養条件

NE-4C 神経幹細胞は、ディッシュを poly-L-lysine コートした後、5% FBS、4 mM L-glutamine、及び 40 µg/mL gentamicin を添加した MEM 培養液中、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血清枯渇下、24 時間培養により誘起した。

アポトーシス解析

NE-4C の培溶液中に CellEvent Caspase3/7 Green Detection Reagent を添加し、アポトーシス誘導細胞を蛍光顕微鏡下で計測した。

1: 日大理工・学部・応化 2: 日大理工・教員・応化 3: 日大理工・院(前)・応化 4: 日大理工・院(後)・応化 5: 日大理工・博士研究員・応化

高速薄層クロマトグラフィーによる糖脂質解析

通常及び脳低温条件にて培養した NE-4C 細胞から糖脂質を抽出後、SepPakC18 にて脱塩し、最終的に高速薄層クロマトグラフィー(HPTLC)にて糖脂質の解析を行った。

3. 結果・考察

まず、通常または低温条件下、血清含有または無血清条件下で 24 時間培養後の NE-4C 細胞を解析した結果、血清含有条件では、通常条件で 12.3%、低温条件で 14.6% のアポトーシス誘導細胞が観察された(Fig.1)。一方、無血清条件では、通常条件で 69.7%、低温条件で 47.2% のアポトーシス誘導細胞が観察された(Fig.1)。この結果から、これまでの報告同様に、脳低温療法と同じ培養条件(32°C)で血清枯渇によるアポトーシス誘導が抑制されることが確認された。

次に、通常条件または低温条件下で 48 時間培養した NE-4C 由来糖脂質を HPTLC で解析した結果、通常条件と比べて、低温条件下では LacCer の発現に変化が見られないのに対し、GalCer(または GlcCer)及び GM3 の発現減少が確認された(Fig.2)。現在、各培養条件における糖脂質発現変化の再現性の確認と並行し、アポトーシス抑制機構解明を進めている。

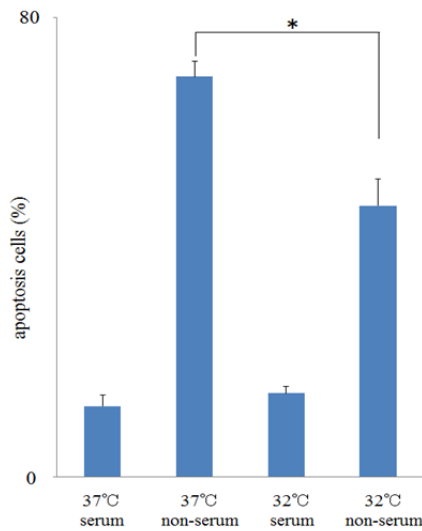


Fig.1 The percentage of apoptosis cells in different culture conditions.

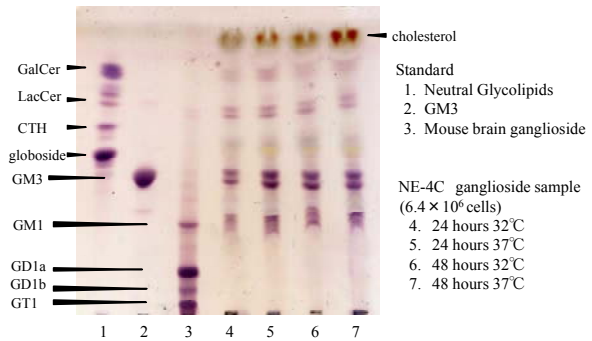


Fig.2 High performance thin-layer chromatographic (HPTLC) analyses of glycolipids isolated from NE-4C.

[1] Saito, K., *et al.*, *Brain Res.*, 1358, 20-29, 2010
 [2] Suzuki, T., *et al.*, *J. Immunol.*, 166, 5567-5577, 2001