

実験的脳梗塞における脳蛋白質の変化とプロテアーゼ インヒビターの効果に関する研究

新潟大学脳研究所神経内科部門（主任：宮武 正教授）

犬塚 貴

Degradation of Cerebral Proteins and Effects of Protease
Inhibitor in Experimental Cerebral Infarction

Takashi INUZUKA

Department of Neurology, Brain Research Institute,

Niigata University, Niigata

(Director: Prof. Tadashi MIYATAKE)

Using an immunoblotting technique, I investigated changes in the concentrations of microtubule-associated protein 2 (MAP 2), 200kD neurofilament, tubulin, myelin-associated glycoprotein (MAG) and 2':3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the rats brains following occlusion of the left middle cerebral artery or sham operation. Compared with those 4 hours after surgery, concentrations of all proteins decreased significantly in the left hemisphere 3 days after surgery ($p < 0.01$). Microtubule-associated protein 2 was the most susceptible to ischemia. Degradation products of MAP 2 and MAG were detected on the blots. Furthermore, in the contralateral hemisphere, concentrations of these two proteins decreased comparing with those in concurrent sham-operated controls 3 days after surgery. Changes in the concentrations of cerebral proteins in the contralateral hemisphere are important for understanding clinical symptoms not attributable solely to the ipsilateral lesion following a focal cerebral stroke. Since MAP 2 is one of the substrate of calpain, E-64c, a synthetic calpain inhibitor, was administered at a dose of 400 mg/kg twice a day for 3 days, with the first dose being given before the production of ischemia. The depletion of MAP 2 was significantly inhibited in vivo by E-64c ($p < 0.05$). The results suggest that calpain is partially involved in the degradation of MAP 2, and that the use of calpain inhibitors can be a useful clinical approach to cerebral ischemia.

Key words: focal cerebral ischemia, protein, calpain E-64c, microtubule-associated protein 2

局所脳虚血, 蛋白, カルシウム依存性中性プロテアーゼ, E-64, 微小管関連蛋白

Reprint requests to: Takashi INUZUKA,
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University, Asahimachi-
dori 1, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通 1 番町
新潟大学脳研究所神経内科部門

犬塚 貴

1. はじめに

局所的持続性脳虚血は、臨床的には脳梗塞でよくみられる病態であり、再発等により脳血管障害性痴呆に陥ることもある。脳梗塞の組織障害において、どのような構造蛋白がプロテアーゼの標的基質となるのか、またプロテアーゼ阻害剤の生体内投与によって構造蛋白の分解にどのような効果を与えるかについてはまだ明かではない。本研究では記憶学習障害を呈する左中大脳動脈 (MCA) 閉塞ラットを作製し¹⁾、局所的持続性脳虚血による組織障害で虚血の中心のみならず左右各半球全般における構造蛋白の変化を免疫ブロット法をもちいて経時的に観察した。またカルシウム依存性中性プロテアーゼ (calpain) 阻害剤の生体内投与による構造蛋白の分解制御の可能性について検討した。

2. 実験方法

1) 実験動物

Sprague-Dawley rat (male 340~440 g) を 2% ハロセン麻酔下で手術用顕微鏡を用いて田村らの方法¹⁾により、側頭骨底部を電気ドリルで穿孔後、硬膜を切開して左 MCA 本幹を電気凝固した後切断した。対照動物は側頭骨を穿孔後、硬膜切開し MCA の露出のみを行った。ラットは外頸動脈系との吻合が少なくヒトの血管構築と類似性が高く、またこのモデルではそしゃく機能が保たれることから長期の経過を観察できる利点がある。

2) MCA 閉塞後の脳構造蛋白の半定量

術後 4 時間、1 日、3 日、7 日の各時点毎に閉塞動物と対照動物を各々 5 匹ずつ断頭して左右各半球を摘出し計量後直ちに -70℃ に凍結保存した。蛋白分解酵素阻害剤を含む氷冷 Tris-buffer で半球をホモジネートにして凍結乾燥した。5% または 11% SDS ポリアクリルアミ

ドゲル上を電気泳動した後、ニトロセルロース膜に電気的にブロットした²⁾。ゲルの一部はクマシーブルーで蛋白染色した。泳動した総蛋白量は予め検量線をひき、各々の蛋白の変化について適正な免疫染色が得られるように設定した。免疫染色のムラやブロット間の較差を少なくするために閉塞動物と対照動物の同一量の総蛋白を隣接レーンにペアとして泳動し、ABC 法にて免疫染色後デンストメトリーを行なった。各時点群で隣接レーンに泳動した 5 ペアの閉塞動物/対照動物の百分率を得て、各群間の有意差検定を Wilcoxon-Utest によって求めた。検索した蛋白の抗体は、microtubule-associated protein 2 (MAP2) <秋田大学豊島至先生より恵与されたモノクロナール抗体>、200 kD neurofilament (NF) <Enzo biochemical 社製モノクロナール抗体> myelin-associated glycoprotein (MAG) <当研究室が作製したポリクロナール抗体>、tubulin (tub) <Advance Co. 社製ポリクロナール抗体>、2', 3'-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase (CNP) <創価大学栗原正先生より恵与されたポリクロナール抗体> である。ビオチン化抗ウサギまたはマウス IgG 抗体とアビジン-ビオチン法標準キットは Vector Lab. 社よりもとめた。

3) Calpain 阻害剤 (E-64c)³⁾ の MAP2 分解抑制効果の検討

前述のように Sprague-Dawley rat の左 MCA を閉塞した動物を生食投与群 (5 匹) と E-64c 投与群 (5 匹) にわけた。E-64c は 400 mg/kg を閉塞直前から 12 時間毎に腹腔内投与した。対照動物 (5 匹) は前述の偽手術を行ない生食を投与した。術後 3 日目に断頭し左大脳半球を摘出し前述の方法によって抗 MAP2 抗体を用いて免疫ブロットを各群 5 検体についてデンストメトリーを行った。対照群に対する百分率を求めて、各群間の有意差検定を student-t test によって求めた。

表 1 術後の各時点、各群における半球湿重量

Time	Hemisphere			
	Left		Right	
	Occlusion	Sham operation	Occlusion	Sham operation
4 hours	797 ± 10	754 ± 12	718 ± 7	728 ± 12
1 day	817 ± 14*	742 ± 16	734 ± 12	725 ± 27
3 days	779 ± 27	748 ± 30	731 ± 28	736 ± 7
7 days	646 ± 16*	712 ± 10	713 ± 21	710 ± 8

Values are mean ± SEM in mg for five rats in each group. Left hemisphere was operated side.

*p < 0.05 different from sham-operated by Wilcoxon's nonparametric U test.

3. 結 果

1) MCA 閉塞後の脳構造蛋白の半定量

(A) 半球湿重量は右半球（非手術側）では各時点で対照動物との間に有意差はなかったが、左半球（手術側）では術後1日目で対照動物に比して閉塞動物の方が有意に重く ($p < 0.05$) 術後7日目では逆に軽かった ($p < 0.05$) (表 1).

(B) 術後4時間では左、右半球での各蛋白の変化は、閉塞動物と対照動物との間で殆ど差はみられなかった.

(C) 左半球（手術側）では術後4時間と比較すると3日目で、いずれの蛋白でも単位総蛋白量当たり、対照動物に比して閉塞動物で有意に減少した。(全て $p < 0.01$) 7日目でも CNP を除き有意に減少した。(MAP2, tubulin, 200kd NF で $p < 0.01$, MAG で $p < 0.05$) 調べた蛋白のなかでは MAP2 の減少が著明であった(図 1). プロット上で MAP2 と MAG の分解産物が検出された(図 2).

(D) 右半球（非手術側）では術後4時間と比較すると、3日目は MAP2, MAG が対照動物に比して閉塞動物で有意に減少した (MAP2 $p < 0.01$, MAG $p <$

0.05) (図 3).

(E) 左半球では MCA 閉塞動物において術後3日目、7日目に蛋白染色ゲル上にアルブミンのバンドの増強がみとめられたが総蛋白の8%以下であった. 対照動物では常に4%以下であった(図 4).

2) E-64c の MAP2 分解抑制効果の検討

MAP2 は生食投与群では $29 \pm 16.3\%$ (mean \pm SEM), E-64c 投与群では $55 \pm 25.7\%$ と E-64c による有意な ($p < 0.05$) 分解抑制効果を認めた(図 5, 図 6).

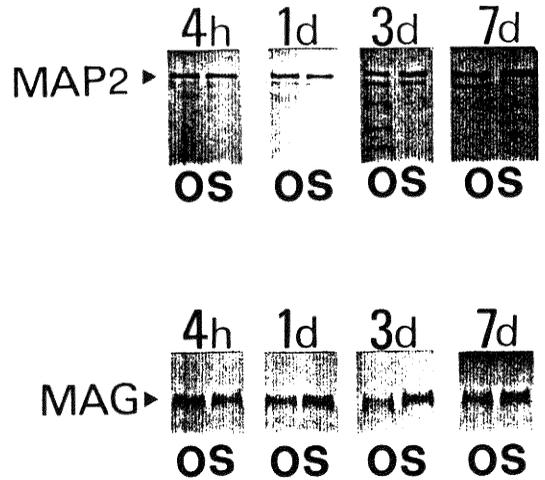


図 2 左半球の MAP2 と MAG の各時点における代表的免疫プロット
 レーンO：閉塞動物，レーンS：対照動物

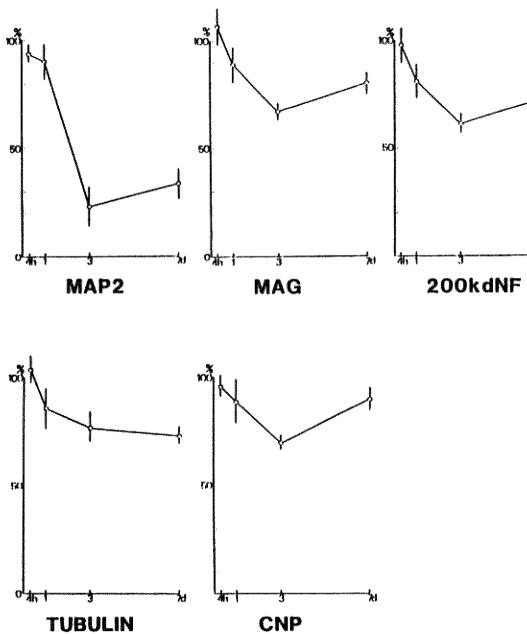


図 1 左半球における各蛋白質の経時的変化
 閉塞動物/対照動物 $\times 100(\%) \pm$ S.E.M.

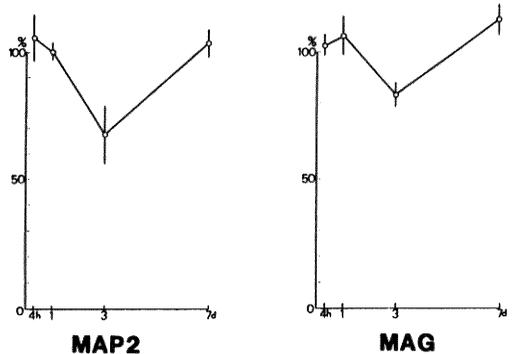


図 3 右半球における MAP 2 と MAG の経時的変化
 閉塞動物/対照動物 $\times 100(\%) \pm$ S.E.M.

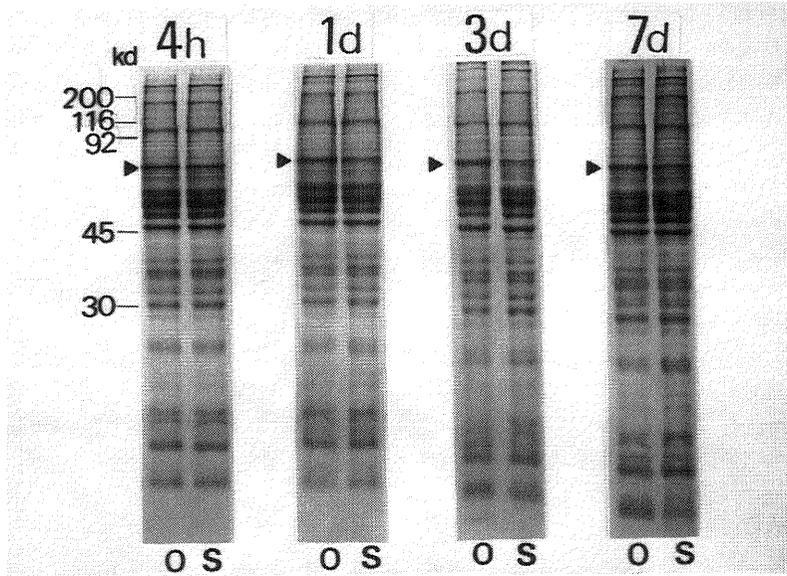


図 4 左半球における総蛋白ゲル電気泳動パターン
各時点の代表泳動，矢印はアルブミン
レーンO：閉塞動物，レーンS：対照動物。

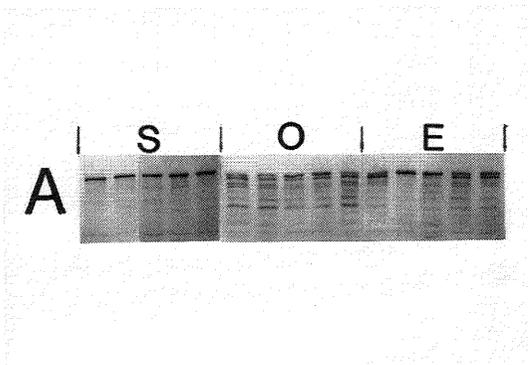


図 5 左半球 MAP 2 の免疫ブロット
S：対照動物生食投与群
O：閉塞動物生食投与群
E：閉塞動物 E-64c 投与群

4. 考 察

これまで一過性脳虚血モデルで MAP2, tubulin など神経細胞の構造蛋白の減少が生化学的，組織化学的に示されてきたが⁴⁾⁵⁾⁶⁾，この局所的持続性脳虚血モデルでも術後3日目には同様に MAP2, tub, 200 kD NF

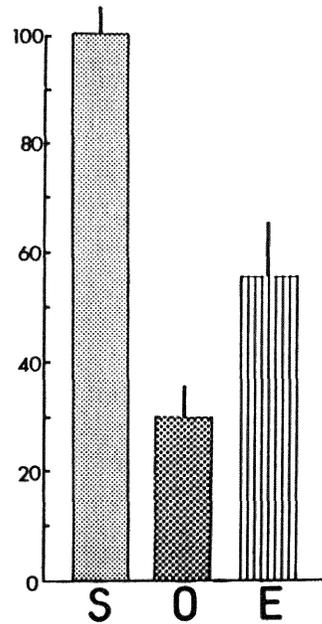


図 6 左半球正常 MAP 2 残存率
S：対照動物生食投与群
O：閉塞動物生食投与群
E：閉塞動物 E-64c 投与群
Sを100として+S.E.M.

が有意に減少していた。MAG や CNP などの白質蛋白の有意な減少も観察され、神経細胞だけでなく白質の障害も反映されたものと考えられた。とくに MAP2 の変化は著明で虚血に対する感受性が高いといえる。MCA 閉塞動物の術後1日目の左半球湿重量の有意な増加は脳浮腫のためと思われる。ゲルの蛋白染色でもアルブミンのバンドの増強が認められ、血液脳関門の障害がおっていると考えられる。アルブミンの増加は他のすべての蛋白の相対的低下を生じるが、対象とした構造蛋白の変化はアルブミンの変化をこえるものであった。またプロット上に MAP2 と MAG の分解産物が認められ、これらの減少が主に分解によるものであると考えられた。

術後4時間ではいずれの蛋白も偽手術対照群に比して有意な減少はみられていない。これは半球全体をサンプルとしているため、すぐには障害を受けにくい MCA 領域以外の部分を含むためと思われる。逆に術後3日目の MAP2 の減少は MCA 領域のみの障害では考えられないほど大きな変化であると思われる。半球全体をサンプルにする方法では早期の MCA 領域の小さな変化を観察するには限界があると思われるが、いわゆる penumbra を含む全体の変化を捉えるには良いと思われる。

7日目の変化が3日目と同程度又は軽度であるが、その理由の一つは障害組織が既に分解されて失われたためと思われる。7日目の左半球湿重量が減少していることから窺われる。しかし右半球では有意な湿重量が認められないにもかかわらず、後に述べるように MAP2 と MAG の減少が7日目に回復しており再生の可能性も検討する必要がある。

MCA を閉塞するとその領域のカルシウム濃度が上昇することが報告されていることから⁷⁾ calpain が活性化され MAP2, MAG, 200 kD NF, tub のような基質が分解されたものと思われる。E-64c は in vivo で術後3日目の左半球での MAP2 の減少を有意に抑制しており、少なくとも部分的には calpain が作用していることが示された。しかしカルシウムの流入や pH の低下ともなって活性化されるプロテアーゼや虚血病巣に浸潤する細胞から分泌されるプロテアーゼの影響も考慮されるべきである。

本研究で用いた実験的脳梗塞ラットでは非閉塞半球に光顕上組織学的に有意な変化は報告されていない⁸⁾⁹⁾。しかし本研究では術後3日目に MAP2 と MAG の有意な減少がみられた。非閉塞半球ではアルブミンの増加はなく、何らかの機序によって calpain の活性化がお

こり遠隔病変がおこった可能性が示唆される。このモデルでは閉塞した MCA の反対側大脳の血流量が低下することが報告されている¹⁰⁾。また浮腫液は半球間連絡線維に沿って反対側に広がることが知られている。直接障害された細胞を起源とする半球間連絡線維末端からのトランスミッターの異常放出がおこるかもしれない。例えばグルタメートは受容体依存性カルシウムイオンチャンネルをひらくといわれている¹¹⁾。こうしたいくつかのことが反対側半球での calpain の活性化に関係しているかもしれない。

局所的な虚血で生ずる臨床症候には、時に局所機能解剖学的に説明できないこともあり反対側半球での変化を捉えることは臨床症候や病態の理解の助けとなる可能性がある。また脳梗塞の急性期に calpain 阻害剤を応用することによって組織障害を減少させ、脳虚血による血管性痴呆の軽減と予防への可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました宮武正教授に心から感謝いたします。また直接御指導いただいた佐藤修三講師、帝京大学脳神経外科田村 晃教授、桐野高明助教授に深く御礼申し上げます。また研究を進めるにあたり御助言、御協力いただきました柳沢勝彦先生、長沢達子嬢、八木由起子嬢、諸橋イネ子嬢、貴重な抗体を提供して下さいました秋田大学 豊島 至講師、創価大学 栗原 正教授、E-64c を提供して下さいました大正製薬に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Yamamoto, M., Tamura, A., Kirino, T., Shimizu, M. and Sano, K.: Behavioral changes after focal cerebral ischemia by left middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.*, **452**: 323~328, 1988.
- 2) Toebin, H., Steahelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and applications *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**: 4350~4354, 1979.
- 3) Hanada, K., Tamai, M., Tamagishi, M., Sawada, J. and Tanaka, I.: Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.*, **42**: 523~528, 1978.

- 4) **Yamashita, T., Tada, K., Sobue, K., Niigawa, H., Suzuki, H., Hariguchi, S. and Nishimura, T.:** Effect of transient ischemia on brain protein in Mongolian gerbil. *Neurochem. Res.*, **11**: 1728~1729, 1986.
- 5) **Kuwaki, T., Satoh, H., Ono, T., Shibayama, F., Yamashita, T. and Nishimura, T.:** Nilvadipine attenuates ischemic degradation of gerbil brain cytoskeletal proteins. *Stroke*, **20**: 78~83, 1989.
- 6) **Yoshimine, T. and Yanaihara, T.:** Regional cerebral ischemia by occlusion of the posterior communicating artery and the middle cerebral artery in gerbils. *J. Neurosurg.*, **58**: 362~367, 1983.
- 7) **Rappaport, Z.H., Young, W. and Flamm, E.S.:** Regional brain calcium changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia. *Stroke*, **18**: 760~764, 1987.
- 8) **Tamura, A., Graham, D.I., McCulloch, J. and Teasdale, G.M.:** Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1**: 53~60, 1981.
- 9) **Tamura, A., Nakayama, H., Kirino, T., Tomukai, N., Sano, K. and Kanazawa, I.:** Remote disinhibition hyperemia after focal cerebral ischemia, in Tomita, M., Sawada, T., Naritomi, H., Heiss, W-D (eds): *Cerebral Hyperemia and Ischemia: from the standpoint of cerebral blood volume*. New York, Elsevier Science publishing Co. Inc., pp 195~206, 1988.
- 10) **Tamura, A., Graham, D.I., McCulloch, J. and Teasdale, G.M.:** Focal cerebral ischemia in rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by ¹⁴C iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1**: 61~69, 1981.
- 11) **Lynch, F., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G. and Schottler, F.:** Intracellular injection of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*, **305**: 719~721, 1983.

(平成3年4月15日受付)