

にし の かず ひこ

氏 名	西 野 和 彦
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大博(医)第1658号
学位授与の日付	平成16年10月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博 士 論 文 名	Time Course and Cellular Distribution of Hsp27 and Hsp72 Stress Protein Expression in a Quantitative Gerbil Model of Ischemic Injury and Tolerance: Thresholds for Hsp72 Induction and Hilus Lesioning in the Context of Ischemic Preconditioning (虚血障害および虚血耐性の定量的砂ネズミモデルにおける Hsp27 と Hsp72 ストレス蛋白発現の細胞分布と時間経過:虚血前負荷による Hsp72 発現の閾値の変化と Hilus の損傷の研究)

論文審査委員	主査 教授 田 中 隆 一
	副査 教授 西 澤 正 豊
	副査 教授 高 橋 均

#### 博士論文の要旨

一過性脳虚血後には、heat shock protein (hsp)を含む様々な遺伝子発現に変化が生じる。中でも虚血耐性獲得のための前負荷により神経細胞内に hsp72 が発現することが注目されてきた。しかし、最近の報告では前負荷により hsp72 mRNA が誘導されなくても耐性が獲得されることが示唆された。一方、非神経細胞における虚血後の蛋白発現も報告され、hsp27 は虚血後に主に astrocyte に発現する。また、虚血耐性獲得のための前負荷により dentate hilus に限局した astrocyte が賦活化される事実より、この種の細胞が神経保護に関与している可能性が示唆された。これに反し極めて脆弱な神経細胞の障害に続発した賦活化に過ぎないとする報告も見られる。申請者らはこれらの未解明事象を解くために、虚血耐性獲得の過程における2種の hsp の時間的空間的発現を調べた。

【方法】砂ネズミの両側総頸動脈の一時的閉塞により全脳虚血モデルを作成した。この際に、両側の海馬に挿入した電極から虚血中の脱分極時間を計測し負荷の強さを定量した。前負荷なしの場合は6~8.5分の脱分極ではほぼ全てのCA1神経細胞は7日目までに死滅した(致死的負荷)。一方2~3.5分の脱分極を起こす前負荷を加えておくと適正な虚血耐性が得られ、前負荷から7日後に致死的負荷を与えてもほぼ全てのCA1神経細胞は生存した。そこで砂ネズミを前負荷のみ、致死的負荷のみ、前負荷+致死的負荷の3群に分け、最終負荷後6時間、1、2、4、7日で脳を還流固定した。前負荷+致死的負荷群では両負荷の間隔は7日とした。これらの脳組織で免疫組織染色を行い、海馬におけるhsp72とhsp27の発現を見ると共に、神経細胞障害の指標としてMAP2を、gliaの賦活化の指標としてGFAPの発現も合わせて検討した。【結果】1)hsp72発現:前負荷のみでは2~4日後には約半数の切片でCA1

錐体細胞に発現したが一過性であり、7日後には消失した。致死的負荷群では、CA1で2日後から散在性に極めて少量の発現が見られた。前負荷+致死的負荷群では hsp72 は1日後に CA1 錐体細胞に発現し、4日後まで増加した。2)hsp27 発現：前負荷のみでは1日後に dentate hilus に発現し、7日後まで残存した。この発現は MAP2 が低下している部分に一致したが、二重染色法で hsp27 は GFAP 陽性 astrocyte に発現していた。CA1 には hsp27 陽性 glia は見られなかった。致死的負荷群では、1日後より dentate hilus に hsp27 が発現し、7日後まで増加した。CA1 では4日目以降に glia にのみ発現した。前負荷+致死的負荷群では、前負荷により誘導された hsp27 が dentate hilus に残存した。1日後以降には CA1 に hsp27 発現がみられたが、当初は stratum oriens に発現し、7日後に錐体細胞層の astrocyte で発現した。3)hsp27, hsp72 発現のための脱分極の閾値；dentate hilus における hsp27 の発現は脱分極時間の長さに依存し、4分を超えると発現が増加した。また前負荷となる脱分極時間では hsp27 は hilus の尾側に有意に強く発現していた。CA1 における hsp72 発現も脱分極時間の長さに依存した。前負荷となる脱分極時間内(2~3.5分)でも3分に及ぶと発現が増加したが、それより短時間の時には微量であった。またあらかじめ前負荷を与えた場合には6分を超える脱分極により CA1 に hsp72 が強く発現されたが、前負荷なしでは脱分極負荷が6分を超えると hsp72 発現が低下を示した。

【考察と結論】我々の実験系で前負荷後に起こる特異的な現象は、dentate hilus の尾側に限局した部分の神経細胞障害を伴う reactive astrocyte による hsp27 の発現であり、前負荷によって惹起される反応が dentate hilus と CA1 錐体細胞とのネットワークに変化を来し、虚血耐性が獲得される可能性が示唆された。前負荷により CA1 神経細胞には hsp27 は発現されず、hsp27 の直接的神経保護効果は存在しないと考えられた。2~3.5分の脱分極による前負荷で耐性が獲得されるが、この範囲でも3分以下の場合には CA1 に hsp72 はほとんど検出されなかった。更に、前負荷から7日目には CA1 から hsp72 は消失するにもかかわらず耐性能力は保持されことより、hsp72 の存在は虚血耐性には必要がないと考えられた。しかし、前負荷を受けた CA1 はその後の虚血負荷による hsp72 の発現閾値を上昇させた。したがって前負荷を受けた神経細胞は虚血後の反応連鎖の中の hsp72 が誘導される前の段階において侵襲の強さを軽減する能力を獲得するのかもしれない。

## 審査結果の要旨

一過性脳虚血後には、heat shock protein (hsp)を含む様々な遺伝子発現に変化が生じる。中でも虚血耐性獲得のための前負荷により神経細胞内に hsp72 が発現することが注目されてきた。しかし、最近の報告では前負荷により hsp72 mRNA が誘導されなくても耐性が獲得されることが示唆された。一方、非神経細胞における虚血後の蛋白発現も報告され、hsp27 は虚血後に主に astrocyte に発現する。また、虚血耐性獲得のための前負荷により dentate hilus に限局した astrocyte が賦活化される事実より、この種の細胞が神経保護に関与している可能性が示唆された。これに反し極めて脆弱な神経細胞の障害に続発した賦活化に過ぎないとする報告も見られる。申請者らはこれらの未解明事象を解くために、虚血耐性獲得の過程における2種の hsp の時間的発現を調べた。

【方法】砂ネズミの両側総頸動脈の一時的閉塞により全脳虚血モデルを作成した。この際に、両側の海馬に挿入した電極から虚血中の脱分極時間を計測し負荷の強さを定量した。前負荷なしの場合は6~8.5分の脱分極でほぼ全ての CA1 神経細胞は7日目までに死滅した(致死的負荷)。一方2~3.5分の脱分極を起こす前負荷を加えておくと適正な虚血耐性が得られ、前負荷から7日後に致死的負荷を与えてもほぼ全ての CA1 神経細胞は生存した。そこで砂ネズミを前負荷のみ、致死的負荷のみ、前負荷+致死的負荷の3群に分け、最終負荷後6時間、1、2、4、7日で脳を還流固定した。前負荷+致死的負荷群では両負荷の間隔は7日とした。これらの脳組織で免疫組織染色を

行い、海馬における hsp72 と hsp27 の発現を見ると共に、神経細胞障害の指標として MAP2 を、glia の賦活化の指標として GFAP の発現も合わせて検討した。【結果】1)hsp72 発現：前負荷のみでは 2~4 日後には約半数の切片で CA1 錐体細胞に発現したが一過性であり、7 日後には消失した。致死的負荷群では、CA1 で 2 日後から散在性に極めて少量の発現が見られた。前負荷+致死的負荷群では hsp72 は 1 日後に CA1 錐体細胞に発現し、4 日後まで増加した。2)hsp27 発現：前負荷のみでは 1 日後に dentate hilus に発現し、7 日後まで残存した。この発現は MAP2 が低下している部分に一致したが、二重染色法で hsp27 は GFAP 陽性 astrocyte に発現していた。CA1 には hsp27 陽性 glia は見られなかった。致死的負荷群では、1 日後より dentate hilus に hsp27 が発現し、7 日後まで増加した。CA1 では 4 日目以降に glia にのみ発現した。前負荷+致死的負荷群では、前負荷により誘導された hsp27 が dentate hilus に残存した。1 日後以降には CA1 に hsp27 発現がみられたが、当初は stratum oriens に発現し、7 日後に錐体細胞層の astrocyte で発現した。3)hsp27, hsp72 発現のための脱分極の閾値；dentate hilus における hsp27 の発現は脱分極時間の長さに依存し、4 分を超えると発現が増加した。また前負荷となる脱分極時間では hsp27 は hilus の尾側で有意に強く発現していた。CA1 における hsp72 発現も脱分極時間の長さに依存した。前負荷となる脱分極時間内(2~3.5 分)でも 3 分に及ぶと発現が増加したが、それより短時間の時には微量であった。またあらかじめ前負荷を与えた場合には 6 分を超える脱分極により CA1 に hsp72 が強く発現されたが、前負荷なしでは脱分極負荷が 6 分を超えると hsp72 発現が低下を示した。

【考察と結論】申請者らの実験系で前負荷後に起こる特異的な現象は、dentate hilus の尾側に限局した部分の神経細胞障害を伴う reactive astrocyte による hsp27 の発現であり、前負荷によって惹起される反応が dentate hilus と CA1 錐体細胞とのネットワークに変化を来し、虚血耐性が獲得される可能性が示唆された。前負荷により CA1 神経細胞には hsp27 は発現されず、hsp27 の直接的神経保護効果は存在しないと考えられた。2~3.5 分の脱分極による前負荷で耐性が獲得されるが、この範囲でも 3 分以下の場合には CA1 に hsp72 はほとんど検出されなかった。更に、前負荷から 7 日目には CA1 から hsp72 は消失するにもかかわらず耐性能力は保持されことより、hsp72 の存在は虚血耐性には必要がないと考えられた。しかし、前負荷を受けた CA1 はその後の虚血負荷による hsp72 の発現閾値を上昇させた。したがって前負荷を受けた神経細胞は虚血後の反応連鎖の中の hsp72 が誘導される前の段階において侵襲の強さを軽減する能力を獲得するのかもしれない。

以上本研究は、hsp72 が虚血耐性獲得条件下においても CA1 神経細胞内に殆ど発現しないことから、hsp72 の存在は虚血耐性獲得には直接関与しないこと、また、虚血耐性獲得条件下で dentate hilus の傷害された神経細胞近傍の reactive astrocyte に hsp27 が特異的に発現することから、hsp27 が神経細胞保護作用あるいは虚血耐性獲得の機序に関与していることを初めて明らかにした点に学位論文としての価値を認める。