

日本財団補助金による
1999年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

12年3月11日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 彭輝
研究機関 安徽大学医学部附設第2講座 研究指導者 阪中雅弘 職名 教授
所在地 〒1791-0295 自衛隊武蔵野総合研究所 電話 081-960-5236 内線 直通
志津川
研究テーマ インナーロイキン3の脳虚血保護作用

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ (無) (学会名・内容)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ (無) (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

今回の我々の検討ではインターロイキン3 (IL-3)は一過性前脳虚血モデルでは明らかに神経保護作用を示したが、脳中大脳動脈永久閉塞モデルでは明らかな保護作用を示さなかった。従ってIL-3の神経保護作用は主として虚血・再灌流障害を軽減するためと考えられた。今後我々は中大脳動脈一過性閉塞モデルでの検討を予定している。虚血再灌流時に発生するフリーラジカルや一酸化窒素は神経細胞に障害を与えアポトーシスによる神経細胞死を誘発する事が知られている。IL-3がアポトーシス抑制遺伝子である**bcl-x_L**の発現増強作用がある事より、中大脳動脈一過性閉塞モデルでは虚血・再灌流障害を軽減し、神経保護作用を示す事が予想される。

4. 研究指導者の意見

彭輝女史は当教室で熱心に研究を続けられ、既に幾つかの論文を発表されている。今回彼女の努力にも関わらず、negative dataであったため残念ながら学会発表等は出来なかった。しかしながら、そのnegative dataをそのまま終わらせず詳細に検討し、次の実験計画を構築する彼女の能力は一流の研究者としての素質が十分であると考えられる。少なくとも今回の検討でIL-3の神経保護効果は虚血・再灌流障害の軽減である事が示唆されたので、今後の彼女の研究成果に期待したい。

研究指導者氏名 阪中 稚広



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ：インターロイキン3の脳虚血保護作用

研究者氏名：彭輝

中国での所属・役職：
泰山医学院附属病院病理科・医師

日本での指導者氏名・所属・役職：
阪中雅広・愛媛大学医学部解剖学第二講座・教授

要旨

インターロイキン3 (IL-3) の脳虚血保護作用を調べる為に、5分間の砂ネズミ前脳虚血モデルと、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルで検討した。砂ネズミ前脳虚血モデルでは虚血2時間前に側脳室より一日量 0 ng, 64 ng, 又は 320 ng (各群N = 8) のIL-3を持続注入した。虚血後7日目に受動的回避学習試験を行いその後海馬CA1錐体細胞での神経密度を測定した。その結果受動的回避学習試験では用量依存性に反応潜時の増大が有意に見られ、記憶保持能力の改善がみられた。またCA1錐体細胞密度も用量依存性に改善された。一方ラット中大脳動脈永久閉塞モデルでは中大脳動脈閉塞後一日量 0 ng 又は320 ng (各群N = 6) のIL-3を持続注入した。中大脳動脈閉塞後2週間・4週間目にモリス水迷路試験を施行し、空間認知の獲得障害の程度を検討した。その後梗塞面積を測定し、視床後腹側核の大きさを計測した。その結果IL-3投与群はvehicle投与群に比して空間認知障害の有意な改善効果を認めなかった。また梗塞面積比や視床後腹側核面積比も両者にも有意な差は見られなかった。以上の結果よりIL-3は一過性脳虚血モデルでは神経保護効果を示すが、永久閉塞モデルでは神経保護効果が見られない事が明らかとなった。この事は、IL-3の神経保護作用の機構を考える上で極めて重要と考えられる。

key words

IL-3, cerebral ischemia, gerbil, SHR-SP

研究報告

目的：

IL-3は活性化T細胞が産性するサイトカインの1つであり、赤血球・顆粒球・単球・血小板などの全ての非リンパ系細胞の前駆細胞に作用してその増殖分化を促すサイトカインとして知られている。近年このIL-3が中枢神経系でも重要な作用をしている事が報告されてきた。例えばFrei等はIL-3がマイクログリアの増殖と分化を促進する事を報告しており

(1, 2)、Moroni等はIL-3がsensory neuronの突起伸張を促しその生存率を高める事を(3)、またKamegi等はaxonotomyを行ったcholinergic neuronで突起伸張をIL-3が促進し、神経保護効果がある事を報告している(4)。しかしながらこれらの系は全てIn vitro(培養系)のモデルでの報告であり、in vivo(動物モデル)での報告はなかった。最近我々は砂ネズミ前脳虚血モデルで3分間という短期間虚血でIL-3が遅発性神経細胞死を有意に抑制する事、さらに受動的回避学習試験で学習障害の改善が見られる事、更にアポトーシスによる細胞死を抑制する作用のあるbcl-x_Lの遺伝子発現の亢進が見られる事を報告した

(5)。そこで今回我々は、更に強い虚血負荷である5分間の砂ネズミ前脳虚血モデルと、よりヒトの病態に近い疾患モデルであるラット中大脳動脈永久閉塞モデルで、IL-3に神経細胞保護効果があるかどうかを検討した。

方法：

対象として雄性砂ネズミ(体重70-80g)24匹および脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHR-SP、体重250-300g)12匹を用いた。全ての動物実験は愛媛大学医学部実験動物取り扱い規定に従って行い、虚血中は直腸温を $37.0^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ に保った。

1. 砂ネズミ一過性前脳虚血モデルでの検討

砂ネズミに浸透圧ミニポンプを左側脳室にIL-3を持続注入できる様に固定して背部皮下に植え込んだ。IL-3はRecombinant murine IL-3を0.05 M PBS + 0.1%BSAに溶かし一日量64 ng,又は320 ng(各群N = 8)を持続注入できる様に調整した。またvehicle投与群として0.05 M PBS + 0.1%BSAのみを持続注入した(N = 8)。2時間後、1.5%ハロセン(70%笑気・30%酸素)麻酔下で両側総頸動脈を露出し、動脈瘤クリップを用い5分間血流遮断した。血流再開後7日目にstep-down型受動的回避学習箱を用いて、300秒間の一回の獲得試行を行なった。24時間後に再生試行を行いその反応潜時を検討した。受動的回避学習

試験終了後、ペントバルビタール過剰量投与し、4%パラフォルムアルデヒドにて経心臓的に灌流固定後脳を摘出し、パラフィン包埋後5 μ mの厚さで薄切切片を作成した。得られた切片にcresyl-violetで染色し海馬神経細胞密度を計測した。

2. ラット中大脳閉塞モデルでの検討

脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット側頭筋を切断し、左側頭骨にドリルで小孔を開け、中大脳動脈を露出して焼灼凝固した。中大脳動脈閉塞直後から浸透圧ミニポンプを左側脳室にIL-3を持続注入できる様に固定して、背部皮下に植え込んだ。IL-3はRecombinant murine IL-3を0.05 M PBS + 0.1%BSAに溶かし一日量320 ng (N = 6) を持続注入できる様に調整した。またvehicle投与群として0.05 M PBS + 0.1%BSAのみを持続注入した (N = 6)。中大脳動脈閉塞後2週間・4週間にモリス水迷路試験を施行し、空間認知の獲得障害の程度を検討した。モリス水迷路試験終了後、ペントバルビタール過剰量投与し、4%パラフォルムアルデヒドにて経心臓的に灌流固定後脳を摘出し、パラフィン包埋後5 μ mの厚さで薄切切片を作成した。得られた切片にcresyl-violetで染色し梗塞サイズの定量した。更に視床後腹側核の大きさを計測し視床の脳虚血による2次変性の程度を定量した。

結果：

1. 砂ネズミー過性前脳虚血モデル

受動的回避学習試験では用量依存性に反応潜時の増大が有意に見られ、記憶保持能力の改善がみられた (図1A)。更に遅発性神経細胞死の程度を検討するために、海馬CA1錐体細胞における神経細胞密度を検討した。その結果CA1錐体細胞密度も用量依存性に改善された (図1B, 図2)。

2. ラット中大脳閉塞モデル

モリス水迷路試験を2週目と4週目に施行した。その結果IL-3投与群ではvehicle投与群に比して空間認知障害の有意な改善効果を認めなかった (図3)。また梗塞側とその反対側での正常大脳皮質面積比を計測した所、IL-3投与群とvehicle投与群では有意な差は見られなかった (図4A)。更に脳梗塞に伴う2次変性の程度を検討するために梗塞側とその反対側の視床後腹側核面積を計測したが、両者にも有意な差は見られなかった (図4B)。

考察：

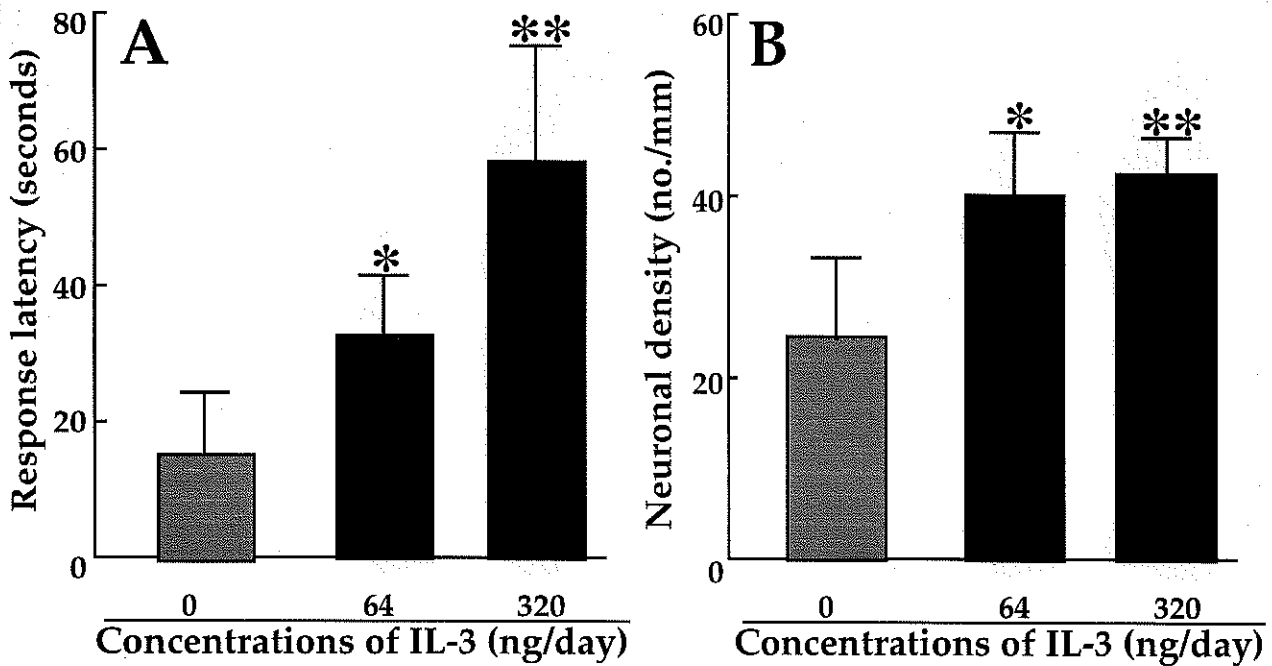
今回我々は、IL-3が5分間の一過性前脳虚血モデルでは神経細胞保護効果が見られたが、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルでは明らかな改善効果が見られない事を示した。前回及び今回の我々の検討で、IL-3は一過性脳虚血モデルでは神経保護効果を示すが、永久閉塞モデルでは神経保護効果が見られない事が明らかとなった。即ちIL-3の神経保護作用は主として虚血再灌流障害の抑制による可能性が示唆された。前回我々はIL-3がBcl-x_Lの発現増強を介して神経保護作用を示す事を明らかとした。Bcl-x_Lはミトコンドリアの外膜に豊富に存在し、ミトコンドリアからのチトクロームcの放出を抑制する事が知られている。ミトコンドリアからのチトクロームcの放出がアポトーシスによる細胞死の最初の段階である事は良く知られた事実であるが、最近ミトコンドリア外膜にあるチトクロームcチャンネル(VDAC: voltage-dependent anion channel)をBcl-x_Lが直接制御している事が報告されている(6)。即ちチトクロームcチャンネルとBcl-x_L又はBcl-2が結合するとミトコンドリアからのチトクロームcの放出が抑制され、チトクロームcチャンネルとBaxとが結合するとチトクロームcがミトコンドリアから放出される事が明らかとなった。実際一過性脳虚血に際してチトクロームcの放出が見られる事は既に幾つかの報告がなされている(7-9)。従ってIL-3の神経保護効果は、IL-3によるBcl-x_Lの発現増強によりミトコンドリアからのチトクロームc放出が抑制され、虚血性神経細胞死が抑制されると考えられる。この仮説を確かめるには中大脳動脈一過性閉塞モデルでの検討を含め、更なる検討が必要と考えられた。

参考文献：

- 1 Frei, K., Bodmer S., Schwerdel C. and Fontana A., Astrocytes of the brain synthesize interleukin 3-like factors, *J Immunol*, 135 (1985) 4044-7.
- 2 Frei, K., Bodmer S., Schwerdel C. and Fontana A., Astrocyte-derived interleukin 3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages, *J Immunol*, 137 (1986) 3521-7.
- 3 Moroni, S. C. and Rossi A., Enhanced survival and differentiation in vitro of different neuronal populations by some interleukins, *Int J Dev Neurosci*, 13 (1995) 41-9.
- 4 Kamegai, M., Nijima K., Kunishita T., Nishizawa M., Ogawa M., Araki M., Ueki A., Konishi Y. and Tabira T., Interleukin 3 as a trophic factor for central cholinergic neurons in vitro and in vivo, *Neuron*, 4 (1990) 429-36.
- 5 Wen, T. C., Tanaka J., Peng H., Desaki J., Matsuda S., Maeda N., Fujita H., Sato K. and Sakanaka M., Interleukin 3 prevents delayed neuronal death in the hippocampal CA1 field, *J Exp Med*, 188 (1998) 635-49.

- 6 Shimizu, S., Narita M. and Tsujimoto Y., Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC , *Nature*, 399 (1999) 483-7.
- 7 Antonawich, F. J., Translocation of cytochrome c following transient global ischemia in the gerbil, *Neurosci Lett*, 274 (1999) 123-6.
- 8 Sugawara t, T., Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Kawase M. and Chan P. H., T mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia [In Process Citation], *J Neurosci*, 19 (1999) RC39.
- 9 Nakatsuka, H., Ohta S., Tanaka J., Toku K., Kumon Y., Maeda N., Sakanaka M. and Sakaki S., Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia, *Brain Res*, 849 (1999) 216-9.

图 1



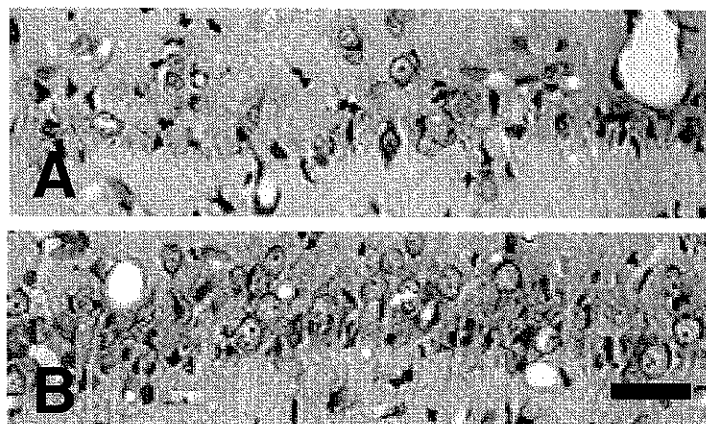
(A) Effects of intracerebroventricular IL-3 infusion on response latency in the passive avoidance task.

The infusion of IL-3 significantly prolonged the response latency in a dose-dependent manner in ischemic gerbils compared with vehicle infusion.

(B) Effects of intracerebroventricular IL-3 infusion on CA1 neuronal density in ischemic gerbils. Significant dose-dependent increase in CA1 neuronal density were noted in IL-3 infused ischemic gerbils compared with vehicle-infused ischemic animals.

**p < 0.01 and *p < 0.05, significantly different from the value of the vehicle-infused animals

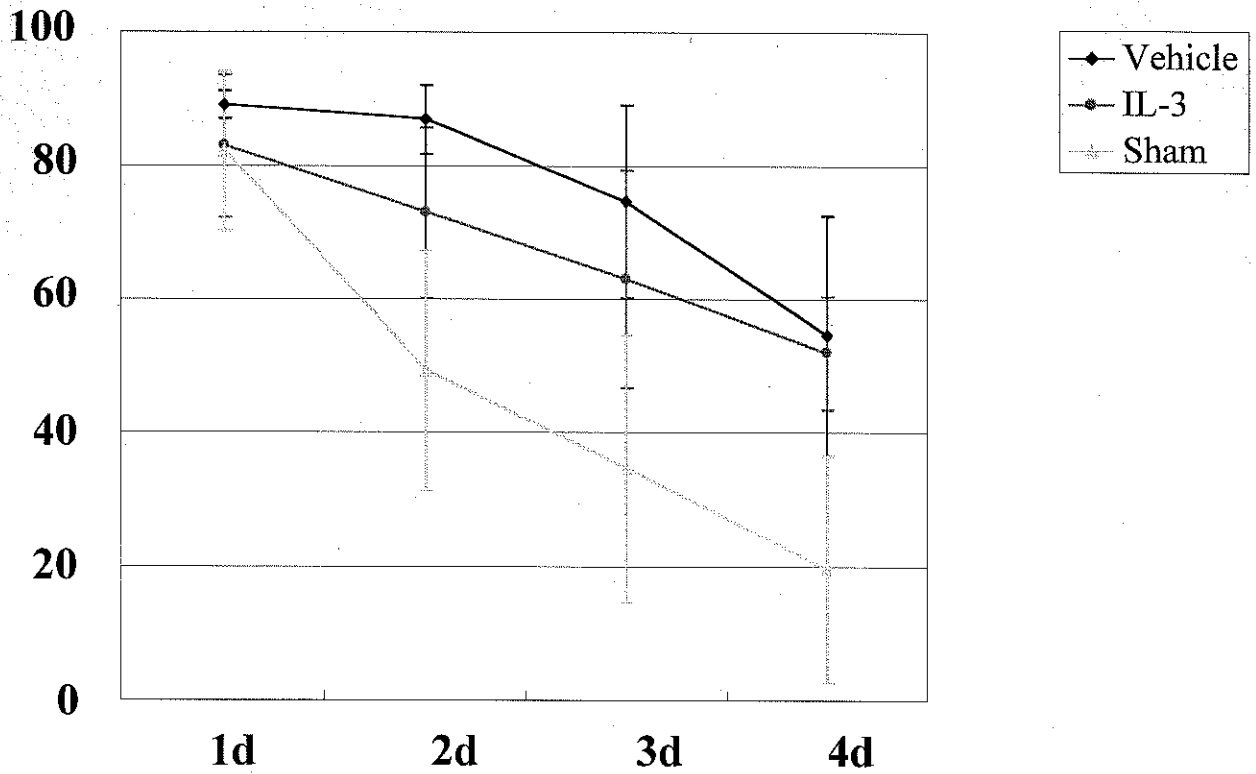
图 2



Photographs of the hippocampal CA1 field: sham-operated animal infused with vehicle (A); ischemic animal infused with IL-3 (B). Note that the infusion of IL-3 rescued a significant number of hippocampal CA1 pyramidal neurons. Sections were stained with 0.1% cresyl violet. Bar = 100 μ m.

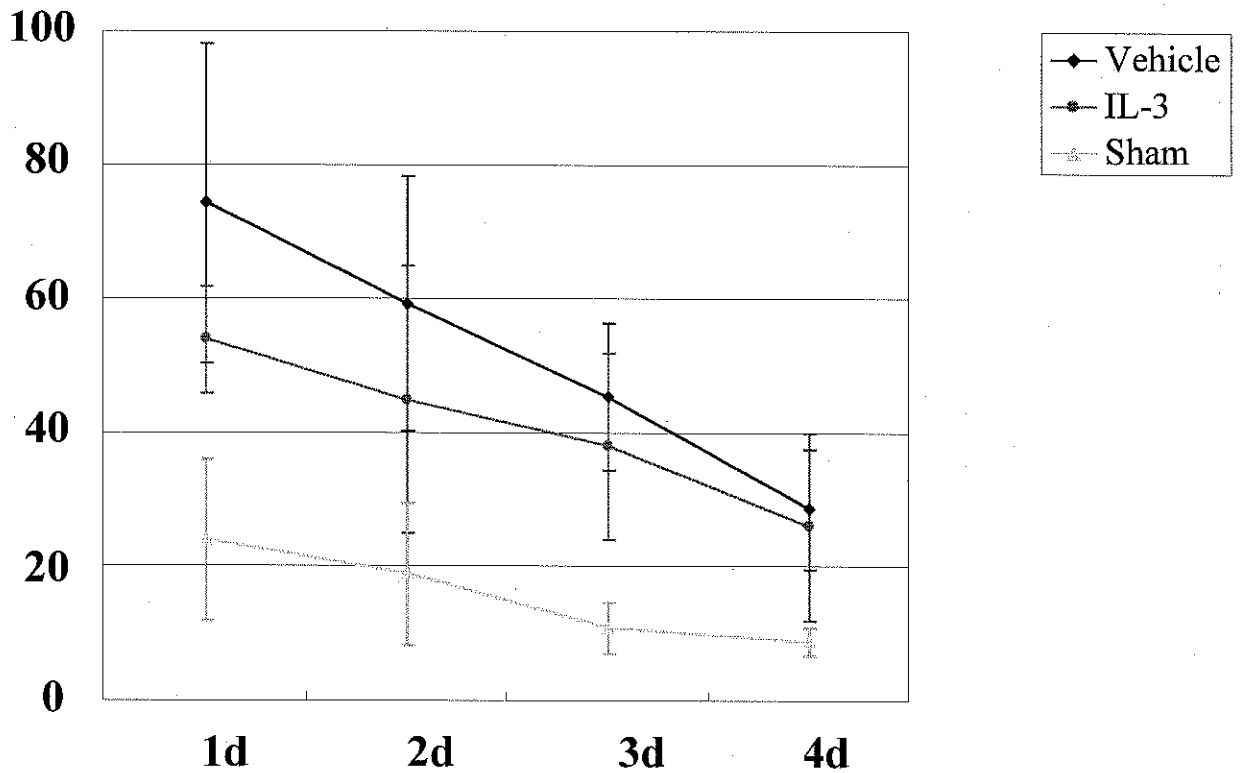
图 3A

Water Maze test



B

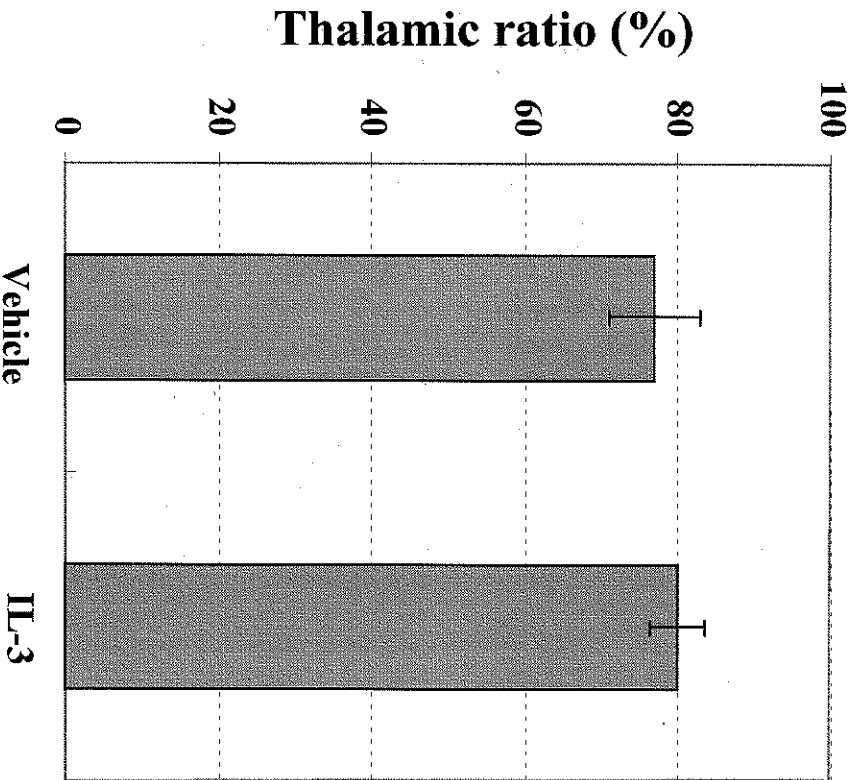
Water Maze test (4w)



(A) Escape latency in Morris water-maze task at the 2nd week after MCA occlusion. (B) Escape latency in Morris water-maze task at the 4th week after MCA occlusion. Note that there were not significant differences between the vehicle group and the IL-3 treated group.

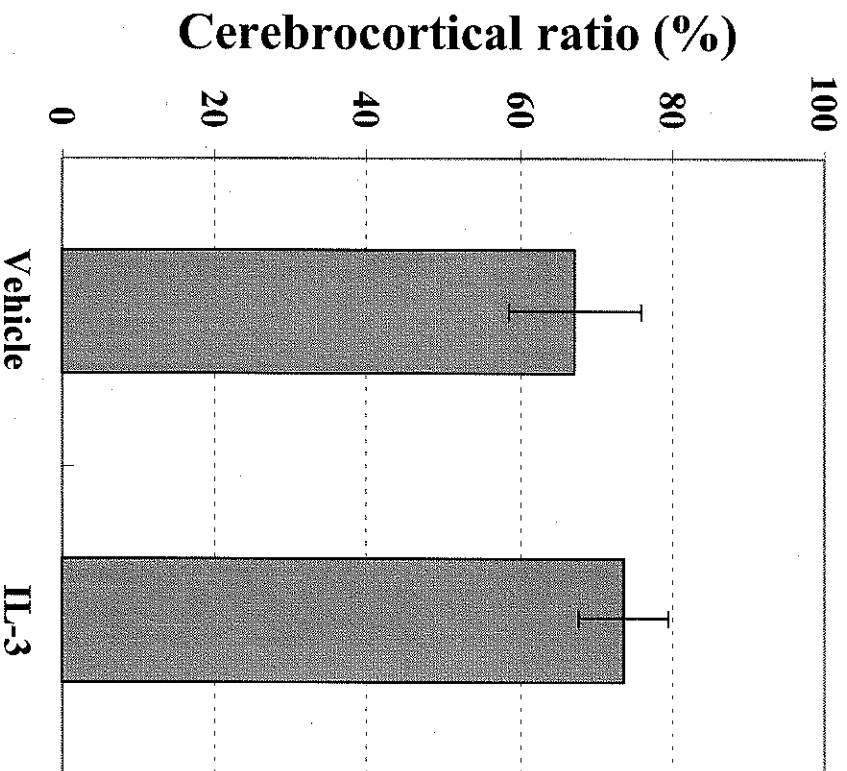
A

Thalamic ratio



B

Cerebrocortical ratio



(A) The left-to-right ratio of cerebrocortical area in left MCA occluded rats with or without IL-3 treatment. (B) The left-to-right ratio of thalamic area in left MCA occluded rats with or without IL-3 treatment. Note that there were not significant differences between the vehicle group and the IL-3 treated group.