

日本財団補助金による

1999 年度日中医学協力事業報告書

— 中国人研究者・医療技術者招聘助成 —

財団法人 日 中 医 学 協 会

理 事 長 中 島 章 殿

2000 年 3 月 13 日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招 へ い 責 任 者 桐野 高明



所属機関 東京大学医学部脳神経外科

職名 教授

所 在 地 〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1

電話 03-5800-8848

招へい研究者氏名 王 岩

所属機関 東京大学医学部脳神経外科

職名 大学院生

研 究 テ ー マ 虚血性神経細胞死の機構解明と脳細胞保護療法の開発に関する研究

2. 日 本 滞 在 日 程

1999年4月 来日
東京大学大学院博士課程に入学

2003年3月 東京大学大学院博士課程卒業予定

2003年5月 帰国予定

3. 研 究 報 告

別紙書式を参考に、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、日中医学協会助成事業—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ

虚血性神経細胞死の機構解明と脳細胞保護療法の開発に関する研究

来日研究者氏名：王 岩

中国での所属・役職：中国北京日中友好病院脳神経外科・医員

招聘者氏名・所属・役職：桐野高明・東京大学医学部脳神経外科・教授

要旨

一過性前脳虚血後に生じる海馬 CA1 領域の神経細胞死をモデルとし、その細胞死の機構として MAP kinase を介する情報伝達機構が関与しているか否か、及び mitochondrial permeability transition 抑制作用を介してアポトーシスに対する保護効果を有するとされる trifluoroperazine がこれらの神経細胞死保護効果を有するか否かを検討することを目的とした。モデルはラットの6分間の頸動脈閉塞モデルを用いた。MAP kinase は ERK、p38、JNK について Western blotting 法にて検討した結果、ERK では虚血後に海馬 CA1、その他の海馬、皮質の3領域全てでリン酸化の亢進を認めたが、その他の kinase ではこれらの変化は乏しかった。Trifluoroperazine 投与実験では、虚血前15分に15 mg/kg を腹腔内投与したが、control 群に比較して有意な保護効果がみられた。海馬 CA1 の虚血性神経細胞死の機序として、アポトーシスの経路のひとつとして知られる MAP kinase のリン酸化が関与している証拠は得られなかったが、trifluoroperazine の保護効果が見られたことは、ミトコンドリアを介する他のアポトーシスの系が関与している可能性が示唆された。

KEY WORDS: delayed neuronal death, ischemic injury, MAP kinase, mitochondrial permeability transition, trifluoroperazine, apoptosis

研究報告

脳の神経細胞は非常に脆弱で、短時間の一過性虚血後でも神経細胞死が生ずることが広く知られている (Kirino 1982)。特に、海馬 CA1 領域にて生ずる神経細胞死は、3-4日の後に細胞死に陥る特殊なものとして注目されてきたが、その分子機構については、未だ解明されていない。

一方、成長段階で不要になった細胞や、障害を受けた細胞が生体から排除される時のひとつの細胞死の機序としてアポトーシスが近年注目されて来ている。アポトーシスでは特にミトコンドリアの機能障害(膜電位の消失)が特に注目されており、その調節には bcl-2 family に属する分子が重要な役割を担っていることも示されてきている。in vivo に於ける遅発性神経細胞死もアポトーシスであると示唆する結果も報告されており、その治療法に向けて様々な取り組みが成されてきているが、未だに臨床応用可能な治療法は確立されていないの実情である。

本研究では、アポトーシスにて重要な役割を果たす機構を中心に神経細胞死の機構解明とその予防法を開発する事を目的とする。具体的には1) アポトーシス時の重要な情報伝達機構とされる mitogen activated protein kinase (MAP kinase) の蛋白リン酸化がどのように虚血性神経細胞死に関与しているか、2) ミトコンドリアの機能障害(膜電位消失)に対して保護効果を有するとされる trifluoroperazine の薬理効果(治療効果)を検討する。

対象及び方法

1) 実験モデル

本実験では、ラットの一過性前脳虚血モデルを用いた。体重約300gの雄性 Wistar ラットを用い、麻酔下に両側椎骨動脈を頸椎C1部にて凝固切断。翌日に1% halothane 下に脱血により血圧を60 mmHg に低下させ両側頸動脈を6分間クリップにて閉塞。再灌流と同時に血液を注入した。虚血の間、全例にて脳波の平坦化を確認した。

2) MAP kinase リン酸化動態実験

虚血再灌流後5分、30分、1時間、3時間、6時間、24時間にて脳を in situ freezing 法にて急速凍結した。具体的には、麻酔下に動物を定位固定装置に固定し、頭蓋冠に plastic tube を装着し、同部に液体窒素を注入して頭部～脳を凍結した。凍結後に断頭し、-20℃にて脳を取りだし、2 mm slice にした後に顕微鏡を用いて海馬 CA1 領域(CA1 sample)、その他の領域(dentate gyrus(DG) sample)、皮質 (cortical sample) に分離した。これらの sample を、phosphatase inhibitor を含んだ buffer にてホモジュネートとし、蛋白濃度を測定した。

以上の sample を SDS-Polyacrylamide gel (10-15%)にて分離し (各 well 蛋白 20 ug)、Immobilon-P membrane に semi-dry electroblotting 法にて transfer した。充分なる blocking の後に、以下の1次抗体を用いて免疫複合体を形成させ、HRP-conjugated の2次抗体、さらに蛍光基質にて可視化した。用いた1次抗体は、抗 ERK 抗体、抗 phospho-ERK 抗体、抗 p38 抗体、抗 phospho-p38 抗体、抗 JNK 抗体、抗 phospho-JNK 抗体の6種である (New England Biolab)。

3) trifluoroperazine 薬理効果判定実験

trifluoroperazine を生理食塩水にて溶解し、15 mg/kg を虚血15分前に腹腔内投与した。Control に対しては、同量の生理食塩水を虚血15分前に腹腔内投与した。再灌流後7日目に、4% paraformaldehyde/ phosphate buffer にて灌流固定し、paraffin 包埋の後に4μm の切片とし、hematoxylin and eosin 染色を行った。海馬 CA1 領域の錐体細胞を顕微鏡下にカウントし、生存細胞数/mm を左右の平均値として算出した。

薬剤による低体温の効果を判定するため、これらの動物には虚血10日前に脳温測定センサー (Minimitter system) を右線条体に挿入固定し、24時間連続的に脳温の変化を追跡した。

結果

1) MAP kinase リン酸化動態実験

ERK, p38, JNK の3種の MAP kinase についてリン酸化状態と無関係に反応する抗体 (リン酸化型、非リン酸化型両者を認識) を用いた結果では、虚血後の各部位にてこれらの蛋白量に変化を認めなかった。

一方、それぞれのリン酸化特異的抗体を用いた結果では、虚血後に変化を認めた。特に ERK にその傾向が著しく、CA1 sample, DG sample, cortical sample の全てにおいて虚血後5分をピークに著明なリン酸化の亢進をみとめた。これらのリン酸化は30分後でもわずかに残っていたが、1時間後には control 値に復した。一方、p38, JNK に付いては、CA1 sample にて30分後に若干上昇傾向を示すものもあったが、有意な変化とは考えられなかった。また、部位特異的な変化も見られなかった。

2) trifluoroperazine 薬理効果判定実験

海馬 CA1 錐体細胞の平均細胞密度は、naive control 群にて 102.6 ± 5.7 cells/mm (n=7) であった。生理食塩水を投与した虚血 control 群では、 25.4 ± 13.1 cells/mm (n=5) と正常の25%の細胞しか生存していなかった。一方、trifluoroperazine 投与群では 53.0 ± 9.7 cells/mm (n=5) と正常の52%の神経細胞が生存しており、これら2群間で統計的な有意差が得られた (t-test, $p < 0.01$)。

また、脳温の測定も持続的に行ったが、虚血 control 群、trifluoroperazine 投与群間で有意な差はなかった。

考察

脳虚血による神経細胞障害は、動物実験モデルが確立されてから精力的にその機序解明の努力が続けられているが、いまだ詳細な病態については不明である。近年、神経細胞の生存、分化、アポトーシスに mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) が関与していることが示されて、注目されている(Lange, 1993)。特に、神経栄養因子はその受容体からのリン酸化伝達機構を介して MAP kinase family の内の ERK を活性化し、細胞を分化、生存の方向へ維持する。一方、同一 family に属する JNK(c-Jun N-terminal kinase)は各種ストレス、熱ショック、cytokine によって誘導され、神経細胞死との関係が特に注目されている。実際に、神経成長因子(NGF)除去による神経細胞のアポトーシスの時に、ERK の活性が低下し、JNK の活性が上昇することが示されている。これらの MAP kinase と虚血性神経細胞死との関係についての報告は未だに少なく一定の見解が得られていない。しかし、神経栄養因子の虚血に対する保護作用は種々報告されており、神経栄養因子はその受容体から MAP kinase シグナル伝達機構を介して作用発現していると考えられていることから(Segal 1996)、MAP kinase 系が虚血後の神経細胞死に深く関与していることも予想される。

本研究では、ERK のリン酸化、すなわち活性化の所見が得られたが、部位別の変化は得られなかった。本モデルでは、海馬 CA1 領域にて神経細胞死が生じるが他の部位にてはこれらの障害を殆ど認めない。これらの事より、ERK の活性化が得られても神経細胞死に対する保護効果は十分ではないことが判明した。また、p38、JNK のリン酸化(活性化)の所見に関しては細胞死の生じる海馬 CA1 にても一定の傾向が見られなかった。以上の結果から、虚血後の海馬 CA1 領域に於ける虚血性神経細胞死の機序として、MAP kinase を介する情報伝達機構が関与している可能性は高くないと予想される。近年の報告では、虚血耐性と ERK の活性化の関連が *in vitro study* にて報告されており(Gonzalez-Zulueta 2000)、今後は *in vivo* の系にて虚血耐性における役割の検証などが課題として残されている。

一方、アポトーシスの過程でミトコンドリアの膜電位の消失が重要な役割を担っていることが判明してきている。特にミトコンドリア膜上に存在する megachannel を介してサイトクロームCなどが漏出すると同時にイオン濃度勾配も消失し、膜電位が消失してゆくと考えられている(mitochondrial permeability transition) (Lemasters 1997)。リンパ球などを用いた系では、この channel の blocker として trifluoroperazine が有効であることが示され、Bcl-2、Bcl-X_L などと同等の保護効果を有するとされる。また、海馬 CA1 領域における虚血性の遅発性神経細胞死がアポトーシスであると示唆する報告も散見されるようになってきている。実際、trifluoroperazine が局所性脳虚血に対して脳梗塞巣縮小効果があることも示された(Kuroda 1997)。本研究で虚血性遅発性神経細胞死が、trifluoroperazine にて統計的に有意に細胞死抑制効果を有していることが示されたことは、虚血性神経細胞死全般に、アポトーシスを介する機序が関与していることをさらに示唆するものと考えられる。

しかし trifluoroperazine は MPT 抑制作用だけでなく、calmodulin や phospholipase 2 の抑制剤としても知られている(Broekemeier, 1995)。これらの系を介する情報伝達系が虚血性神経細胞死と深く関与しているとの報告もあり、trifluoroperazine の効果が mitochondrial permeability transition (MPT)の抑制のみに基づいているか否かの検証は今後の課題と考えられる。

参考文献

- Broekemeier KM, et al (1995) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases. *Biochemistry*. 34:16440-16449.
- Gonzalez-Zulueta M, et al. (2000) Requirement of nitric oxide activation of p21 ras/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci* 97:436-441
- Kirino T (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239:57-69
- Kuroda S., et al. (1997) The calmodulin antagonist trifluoperazine in transient focal brain ischemia in rats. Anti-ischemic effect and therapeutic window. *Stroke* 28: 2539-2544
- Lange, C C ,et al. (1993) A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260:315-319
- Lemasters JJ, et al. (1997) The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 174: 159-165
- Segal, R. A., et al. (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Ann Rev Neurosci* 19: 463-489