

氏名	高木康志
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2075号
学位授与の日付	平成11年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科脳統御医科学系専攻
学位論文題目	Redox control of neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat: immunohistochemical and hybridization studies of thioredoxin (局所脳虚血による神経細胞障害の REDOX 制御機構—THIOREDOXIN のラット中大脳動脈モデルにおける発現—に関する研究) (主査)
論文調査委員	教授 清水 章 教授 福田和彦 教授 橋本信夫

### 論文内容の要旨

Thioredoxin (TRX) は分子量13kDaのREDOX機能をもつチオール基を活性部位に持つ蛋白である。TRXは活性酸素消去能、転写因子制御能、細胞増殖制御能など様々な機能を細胞内外で果たしている。TRXの脳虚血における役割を明らかにするためにラット中大脳動脈閉塞モデルを作成し、TRXの発現をimmunohistochemistry, in situ hybridization, northern blot analysisにて検討した。300g—400gの雄ウイスターラットを用い、2%ハロセンによる吸入麻酔の後、Thread法により4-0ナイロン糸を内頸動脈内に挿入し、中大脳動脈を閉塞することにより、局所脳虚血モデルを作成した。虚血後、2時間(n=4)、4時間(n=4)8時間(n=4)16時間(n=4)24時間(n=4)において、脳を4%ホルマリンにて灌流固定の後、摘出し20 $\mu$ mの厚さで切片を作成し、immunohistochemistry及びin situ hybridizationを行った。immunohistochemistryは抗mouse TRX抗体を用いてABC法にて、in situ hybridizationはmouse TRX cDNAよりdigoxigeninにてラベルされたRNAprobeを作成し抗digoxigenin抗体で検出した。northern blotは虚血後、1時間、2時間、4時間、8時間、16時間、24時間(n=each 3)において、脳を摘出しRNAを抽出後、泳動及びnylon membraneへの転写を行い、<sup>32</sup>Pでラベルしたmouse TRX cDNAによりhybridizationを行い、radioactivityをNIH image analyzerにて検討した。immunohistochemistryにおいてはlateral striatumにおいてTRX immunoreactivityの低下が虚血後4時間で観察され、16時間後には完全に消失した。frontoparietal cortexにおいては、neuronにおけるTRX immunoreactivityの低下が虚血後4時間で観察され、24時間後にはほぼ消失した。ischemic penumbraの領域ではTRX immunoreactivityの増加が虚血後4時間から観察され、虚血後24時間後までその誘導は持続した。in situ hybridizationにおいても、lateral striatumとfrontoparietal cortexにおいては、TRX mRNAは減少し、penumbraの領域では、TRX mRNAは虚血後誘導された。northern blotにおいては、ischemic hemisphereより抽出されたTRX mRNAは虚血後、8時間より増加を始め、24時間後に有意な上昇を示した。以上のことより、虚血脳のTRXの発現とneuronの障害は相関すること、すなわち、TRXの高発現した領域の細胞は生き残り、TRXの減少した領域の細胞は死に至る傾向があることが示された。TRXの発現による細胞内REDOX状態の変化が脳虚血における、neuronの生死に重要な役割を果たしていることが示唆される。

### 論文審査の結果の要旨

Thioredoxin (TRX) は分子量13kDaのREDOX機能をもつチオール基を活性部位に持つ蛋白である。TRXの脳虚血における役割を明らかにするためにラット中大脳動脈閉塞モデルを作成し、TRXの発現をimmunohistochemistry, in situ hybridization, northern blot analysisにて検討した。immunohistochemistryにおいてはlateral striatumにおいてTRX

immunoreactivityの低下が虚血後観察され、16時間後には完全に消失した。frontoparietal cortexにおいては、24時間後にはほぼ消失した。ischemic penumbraの領域ではTRX immunoreactivityの増加が虚血後観察され、虚血後24時間後までその誘導は持続した。in situ hybridizationにおいても、同様の結果が得られた。northern blotにおいては、ischemic hemisphereより抽出されたTRX mRNAは虚血後、8時間より増加を始め、24時間後に有意な上昇を示した。以上のことより、虚血脳でのTRXの発現とneuronの障害は相関することが示された。TRXの発現による細胞内REDOX状態の変化が脳虚血における、neuronの生死に重要な役割を果たしていることが示唆される。

以上の研究は、虚血性神経細胞死の分子機構の解明に貢献し、神経科学に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成11年1月11日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。