

氏名	にしむらまさき 西村真樹
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2824号
学位授与の日付	平成17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	虚血耐性獲得における砂ねずみ海馬神経細胞での p38 の活性化に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 下遠野邦忠 教授 淀井淳司 教授 影山龍一郎

### 論文内容の要旨

虚血耐性とは事前になんらかのストレスがかかることによって、本来致死性であるはずの虚血負荷に耐性を持つ現象であるが、脳虚血耐性現象の細胞内機構は、未だ解明されていない。そこで細胞内シグナル伝達から神経細胞死をもたらすカスケードの解析を中心にこの虚血耐性現象のメカニズムを解析する研究をすすめた。この研究は、虚血耐性現象において MAPK カスケード、そのなかでも p38 に注目し、その機構の解析を試みたものである。MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase; MAPK) カスケードは真核生物に共通して保存されている細胞内シグナル伝達経路の一つで、神経細胞のストレスならびにアポトーシスのシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきている。MAPK カスケードは、MAPK、MAPK キナーゼ (MAPKK)、MAPKK キナーゼ (MAPKKK) の3つのキナーゼより構成され、外界からのシグナルにより活性化された MAPKKK は、MAPKK をリン酸化することによりこれを活性化し、活性化された MAPKK は、MAPK をリン酸化してこれを活性化する。活性化された MAPK は転写因子などをリン酸化することにより下流へとシグナルを伝達し、結果としてさまざまな生命現象を制御する。MAPK には大きく3つのサブタイプが存在し、それぞれ ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 とよばれている。一般的に、ERK は細胞増殖や分化、JNK および p38 はストレス応答やアポトーシスに関与することが知られている。砂ねずみ海馬遅発性神経細胞死モデルにおいては、5分間の両側内頸動脈閉塞をおこなうと、ほとんどの海馬 CA1 神経細胞の細胞死が見られる。しかし、虚血負荷48時間前に通常致死性とはならない2分程度の虚血をかけると、次にやってくる5分の虚血による神経細胞死は抑制され虚血耐性を獲得する。そこで海馬神経細胞における2分虚血後の p38 の発現を調べると、2分虚血によって海馬神経細胞に虚血6時間後から持続的にリン酸化 p38 の発現が認められた。耐性モデルでは、致死性となる5分虚血を負荷しても海馬 CA1 領域において72時間後の TUNEL 染色陽性細胞が減少し、一週間後の残存細胞数も増加した。ところが活性化 p38 の阻害剤である SB203580 を2分虚血30分前に脳室内投与すると、5分虚血72時間後の TUNEL 染色陽性細胞は増加し、残存細胞数も濃度依存的に減少し、耐性現象の減弱を認めた。SB203580 の効果については p38 の下流である ATF-2 の活性化が押さえられることにより確認し、また他の MAPK である ERK, JNK の発現についても SB203580 のよる変化を認めず、耐性獲得において2分虚血後のリン酸化 p38 の発現が必要であると考えられた。また、耐性獲得モデルについては5分虚血30分後のリン酸化 p38 の発現が耐性を獲得していないものと比べて減少しており、5分虚血後の神経細胞死についてリン酸化 p38 の発現が関与しているという以前の報告に矛盾しないものであった。以上により虚血耐性の獲得において、リン酸化 p38 の発現が関与している可能性が示唆された。神経細胞の生死や耐性の獲得が、細胞内シグナルの発現の程度によりコントロールされており、これらの細胞内シグナルは神経細胞の生死を制御する target になりうると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

虚血耐性とは、事前にストレスがかかることによって本来致死的是であるはずの虚血負荷に耐性を持つ現象である。しかしその細胞内機構は未だ解明されていない。細胞内シグナル伝達を担う mitogen-activated protein kinase の一つである p38 について、そのリン酸化が脳虚血耐性獲得にどのような役割を果たしているのかを本研究で解析した。

砂ねずみ海馬遅発性神経細胞死モデルにおいては、5分間の両側内頸動脈閉塞で、海馬 CA1 神経細胞の細胞死が見られる。しかし、虚血負荷48時間前に2分の軽い虚血をかけると、次の5分虚血による神経細胞死が抑制され虚血耐性を獲得する。海馬神経細胞における2分虚血後のリン酸化 p38 の発現を調べたところ、2分虚血によって海馬神経細胞に虚血6時間後から持続的にリン酸化 p38 の発現が認められた。耐性モデルでは、致死となる5分虚血を負荷しても海馬 CA1 領域において神経細胞死が抑制され、一週間後の残存細胞数も増加した。一方、リン酸化 p38 の阻害剤である SB203580 を2分虚血30分前に脳室内投与すると、耐性現象の減弱を認めた。以上により虚血耐性の獲得において、リン酸化 p38 の発現が関与している可能性が示唆された。

以上の研究は虚血耐性の獲得における分子生物学的機構の解明に貢献し新たな脳梗塞治療の開発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のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年1月4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。