

脳虚血再灌流モデルに於ける Heat shock protein 70 (HSP70) の誘導と細胞障害について

京都大学医学部脳神経外科 (指導: 菊池晴彦教授)

西 正 吾

〔原稿受付: 平成 4 年 12 月 22 日〕

Induction of HSP70 and Neuronal Damage Following Transient Cerebral Ischemia in Rats

SHOGO NISHI

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University,
54 Shougoin, Kawahara-chou, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

Various studies have demonstrated increased synthesis of heat shock protein 70 (HSP70) in brain following transient ischemia, and a protective role for HSP70 against ischemic insult has been hypothesized. In this study, we determined the time course of HSP70 mRNA and HSP70 induction in rat hippocampus following ischemia using Pulsinelli's four-vessel occlusion model, and suggested a protective role for HSP70 induction in limiting ischemic damage to neurons and delayed neuronal death. In Northern blotting analysis using human HSP70 DNA (pH 2.3) as a probe, the accumulation of HSP70 mRNA became evident at 4 h, and continued until 16 h, after 5 min ischemia, while it appeared at 2 h, and continued above control level until 24 h, after 30 min ischemia. In immunoblot analysis using anti-HSP70 antibody, induction of HSP70 appeared 24 h and reached a maximum level 48 h after 5 min ischemia. In immunohistochemical analysis using anti-HSP70 antibody, no staining was detected until 16 h after 5 min ischemia but staining in CA1 gradually increased from 1 day after ischemia and reached a maximum level 2 days after ischemia. Similar time profiles in staining pattern of HSP70 were observed in CA3 and CA4 neuronal cells following 30 min ischemia. Rats pretreated with 5 min ischemia (nonlethal for CA1 pyramidal neurons) were exposed to a 30 min, lethal period of ischemia, 2 days after pretreatment, at which time considerable staining of HSP70 was present. Pretreated rats had much neuronal damage in the CA1 sector less than did rats subjected to lethal, 30 min ischemia alone. These results suggest that neurons in rat hippocampus become tolerant to lethal treatment due to expression of the HSP70 gene and HSP70 protein synthesis induced by mild ischemic pretreatment.

Key words: Cerebral ischemia, Ischemic tolerance, Heat shock protein 70 (HSP70), Rat, Neuronal damage
索引語: 脳虚血, ストレス蛋白質70, ラット, 虚血耐性, 神経細胞障害

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University.

はじめに

Drosophila busckii の唾液腺を用いて温度を 25°C から 30°C に30分間保つと染色体に特異な puffing pattern が見られることが F. Ritossa によって報告されて⁴³⁾ 以来、熱ショックのみならず低酸素、エタノール、アミノ酸誘導体、様々な重金属、ヒ素、ミトコンドリア機能の抑制物質などにより誘導される蛋白質があることがわかり、熱ショック蛋白質あるいはストレス蛋白質と呼ばれるようになった³¹⁾。通常の蛋白質の合成はこの蛋白質が誘導される以前に抑制される。この誘導はこれまで細菌、大豆、とうもろこし、タバコ、酵母、又しょうじょう蝇、線虫からラット、マウス、人に至る有核細胞の多くにみられている。それらの分子量は 8, 28, 32, 47, 58, 72, 73, 75, 80, 90, 100, 110 kDa のものが知られている。これらの持つ生理学的意義は未だ充分には解明されていない。正常の成長、分化、また疾病とのかわり合いがあることが示唆されている。HSP70 関連物質は DNA 複製^{34,46)}、クラスリン小胞の被覆化の抑制³⁾、細網内皮系に於ける蛋白質の取り込み³³⁾、膜を介しての蛋白質輸送⁹⁾ などに関与している。

細胞が予め非致死的な熱にさらされることにより熱ショック蛋白質が作られ、次に与えられる致死的な熱障害に対しての抵抗性を獲得すると言われている。ラット網膜細胞に前もって軽度の熱を負荷することにより、次に与えられる高度の光刺激による障害がある程度抑制されることが報告されている³⁾。

海馬に於ける前脳虚血に対する神経細胞の選択的脆弱性いわゆる遅発性神経細胞壊死²²⁾ は未だ完全には解明されていない。再灌流を用いた脳虚血モデルに於いてストレス蛋白質の選択的遺伝子発現³⁷⁾、新たな蛋白質合成の変化が報告されている^{20,35)}。分子量70のストレス蛋白質グループ (HSP70 ファミリー) は豊富に存在しストレスにより高度に発現され、更にあらゆる種に於いて極めてよく保存されている¹⁵⁾ ため、高い関心が寄せられている。ラットの脳虚血再灌流モデルを用いて脳虚血再灌流後に於ける HSP70 mRNA, HSP70 の産生・蓄積の経時的な変化を検討し、更に予め非致死的な虚血を与えることにより次に与えられる致死的な虚血による細胞障害の程度がどの様に変化するかを検討した。

対象と方法

*動物モデル

180から250グラムのラット (Wistar rat) を用い、処置前後には飼育箱にて餌、水を自由に与えた。動物モデルは基本的に Pulsinelli の方法⁴⁰⁾ を用い、エーテル麻酔下にて両側椎骨動脈を電気凝固し一日後に両側総頸動脈閉塞を行った。頸部を正中切開し両側総頸動脈を露出し動脈瘤クリップにて閉塞を行った。総頸動脈の閉塞は一時的に5分間あるいは30分間行った。閉塞の間はラットの体温を保温板にて 36°C から 37°C に保った。

虚血後の HSP70 mRNA の発現の経時的な変化を見るために、5分間あるいは30分間の虚血後に総頸動脈からクリップをはずし 0, 2, 4, 8, 16, 24各時間、再灌流を行った (n=2)。顕微鏡下で海馬だけを取り出し、すばやく液体窒素にて凍結させた。AGPC (Acid guanidinium phenol chloroform) 法を用いて mRNA を取り出した³⁹⁾。人の HSP70 DNA (pH 2.3) のプローブを用いて Northern blot 法を行い、HSP70 mRNA の経時的変化をみた。

HSP70 の産生・蓄積を見るために5分間あるいは30分間の虚血後に 0, 8, 16, 24, 48, 72, 96各時間の再灌流を行った (n=2)。その後、灌流固定を行い抗 HSP70 抗体 (RPN 1197, Amersham, Japan) を用いて免疫組織学的に検討し、又、脳組織を取り出しホモジネート後 Western blot 法を行った。

虚血耐性を検討するために、まず非致死性の5分間虚血を負荷後、2日間再灌流を行った (n=4)。その後、致死的な30分間の虚血を行い7日間の再灌流を行った。灌流固定後、冠状断切片を作製し Cresyl violet 染色を行った。虚血時間による遅発性神経細胞壊死の効果を見るために5分間 (n=5) あるいは30分間 (n=4) の虚血を行い、再灌流を一週間行い、Cresyl violet 染色を行った。椎骨動脈凝固による血流遮断後の側副血行路からの影響を検討するため、椎骨動脈の凝固の3日後にはじめて30分間虚血を行い、神経細胞障害の程度を見た (n=4)。

*蛋白の分離と電気泳動

断頭後、顕微鏡下で両側の海馬を取り出し10倍量の lysis buffer (1% NP-40 (Nonidet P-40), 0.15 M NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8.0, 5 mM EDTA (Ethylene diamine acetic acid), 2 mM NEM (N-ethylmaleimide), 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) にて氷冷し

ながら Potter homogenizer を用いてホモジネートした。4°C で 12000 g の遠心を20分間行い、上清を回収した。蛋白質定量は Bradford 法⁹⁾にて行った。蛋白質の変性は Laemmli の SDS sample buffer²⁷⁾を用いて行った。Laemmli の方法²⁷⁾を用いて一次元電気泳動を行った。

*Western blot 法と免疫染色

前脳虚血に於ける海馬での HSP70 の蓄積量は Western blot 法で定めた。125 µg の蛋白を10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し 5 mM 四ほう酸ナトリウム緩衝液中でニトロセルロース膜に転写後5%スキムミルクにてブロッキングを行った。ブロッキング後ラット HSP70 に対するマウスモノクロナール抗体あるいは正常マウス IgG 血清とそれぞれ室温で1時間反応させた。抗体は1%血清アルブミンにて500倍に希釈して用いた。ビオチン化馬抗マウス IgG 抗体を2次抗体として用い ABC 法を行った。その後 HSP70 は IgG マウスベクタステインキットと反応後 Western blot 検出用キットを用いて発色させた。ABC 法にては5分間虚血後の HSP70 の産生・蓄積が検出できなかったため、更に2次抗体としてペルオキシダーゼを結合させた抗マウス IgG 抗体を用いて同様に検出を行った。

*免疫組織学的検討

ラットは過剰量のエーテルにて処理後、開胸しカニューレを心尖部より挿入し上行大動脈に留置した。200 ml の0.9%生食で灌流後、4%ホルマリン入り 0.1 M リン酸緩衝液を用いて灌流固定をした。更に同じ緩衝液にて24時間、後固定を行った。その後30%グリセロール、30%サッカロース入り 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.3) にて脱水を2日間行った。マイクロトームを用いて厚さ 50 µm の連続切片を切った。切片は組織構築を検討するため免疫組織染色あるいは Cresyl violet 染色を施した。10%正常山羊血清と0.3%過酸化水素水入りリン酸塩緩衝液 (pH 7.3) にてゆっくり揺らしながら、室温で30分間ブロッキングを行った。次に200倍希釈の抗 HSP70 抗体と0.3% Triton X-100 の入ったリン酸塩緩衝液で室温にて一昼夜反応させた。リン酸塩緩衝液にて洗浄後、1000倍希釈のビオチン化馬抗マウス IgG 抗体で2時間、室温にて反応させた。リン酸塩緩衝液にて洗浄後、ベクタステインキットにて ABC complex を結合させた。40 mg DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) と0.03%過酸化水素水入りのトリス緩衝液 (pH 7.6) にて発色を

行った。

*RNA の取り出し

海馬の全 RNA 量は AGPC 法³⁹⁾にて抽出した。液体窒素にて凍結していた標本を擦り鉢にて碎き、GIT buffer (4 M guanidinium isothiocyanate, 0.025 M sodium citrate (pH 7.0), 0.5% (W/V) sodium laurylsarcosine, 0.1 M 2-mercaptoethanol) と混ぜた。更に 1/10 量の 3 M sodium acetate (pH 4.0), 2/10 量の chloroform/isoamyl alcohol (CIAA) (49/1), 水飽和 phenol を加え vortex で攪拌後 4°C で 10000 g の遠心を15分間行った。遠心後 RNA を含む上清を取り出し 2 倍量の ethanol を加え -80°C で20分間保ち 12000 g で 4°C 15分間遠心を行った。沈澱物を少量の 0.3 M sodium acetate と phenol/CIAA に溶かし 2 倍量の ethanol を加え -80°C で保存した。

*Northern blot 法

10 µg の全 RNA を formaldehyde を含む 1% agarose gel にて電気泳動を行いナイロン膜 (Gene Screen Plus) に転写した。50% deionized formamide, Denhardt 液 (1X Denhardt, 0.02% polyvinyl pyrrolidone, 0.02% BSA (Bovine serum albumin), 0.02% Ficoll), 1% SDS (Sodium dodesyl sulfate), 100 µg/ml sonicated denatured salmon sperm DNA を含む SSC (sodium citrate) (1X SSC, 0.15 M NaCl, 0.15 mM sodium citrate, pH 7.0) で prehybridization を行った。HSP70 に対する人 DNA プローブ (pH 2.3) を multi-prime labelling 法によって ³²P dCTP を用いてラベルした。コントロールとしての β-actin も同様にラベルした。50% deionized formamide, 1X Denhardt, 1% SDS, 200 µg/ml sonicated denatured salmon sperm DNA を含む SSC と ³²P ラベル DNA (1.85 mBeq) を用いて 42°C で16時間 hybridization を行った。室温にて 2X SSC で3回洗浄、65°C にて0.5% SDS を含む 2X SSC で2回洗浄、室温にて 0.1X SSC で1回洗浄した。フジ RXO-H フィルムにて感光を行った。

結 果

*脳虚血再灌流モデルに於ける HSP70 mRNA の経時的变化

ラット総頸動脈に5分間あるいは30分間の閉塞を施し、各時間再灌流を行った。その後 RNA を取り出した。pH 2.3 のプローブは HSP70 に関する2種類の mRNA を認識する。ひとつは 2.3 Kb の HSC70 と呼ばれる通常でも発現される蛋白質である (Fig. 1 の小

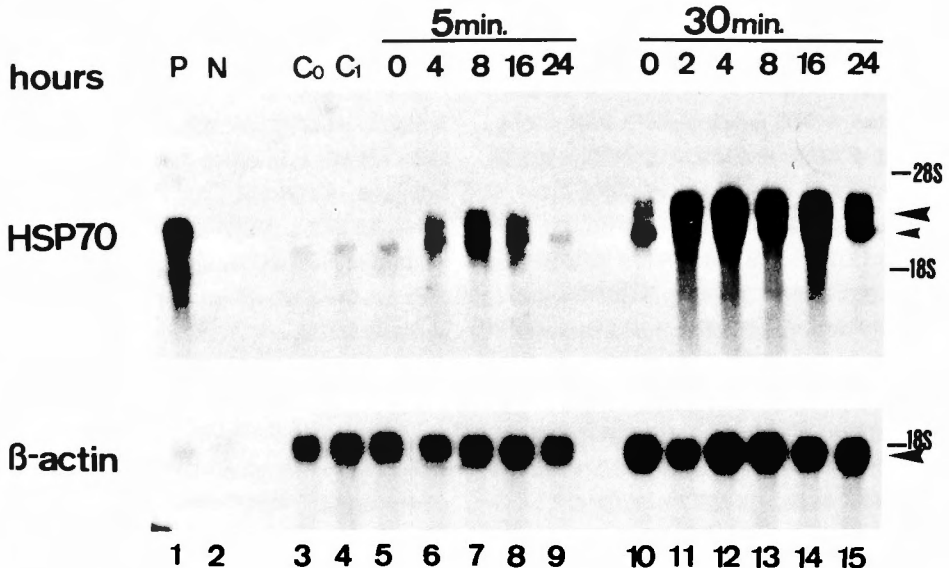


Fig. 1 Detection of HSP70 mRNA in rat hippocampus.

Total RNA was isolated using AGPC-protocol³⁹, separated on 1% agarose gel containing formaldehyde, transferred onto nylon membrane filters, and hybridized with ³²P-labeled DNAs encoding HSP70 (arrowhead in the upper panel) or B-actin (arrowhead in the lower panel) as described in Materials and Methods. Horizontal bars indicate the positions of 28S and 18S ribosomal RNAs. As controls, RNAs were prepared from COLO320 DM cells derived from human colon cancer, with (lane 1) or without (lane 2) heat shock at 42°C for 60 min. RNAs from rat hippocampus were prepared as follows: lane 3, control without any stress, lane 4, mock treatment with coagulation of VAs; lane 5, immediately after 5 min ischemia, and lane 10, immediately after 30 min ischemia. RNAs from rat hippocampus were also prepared following recirculation periods of 4 h (lane 6), 8 h (lane 7), 16 h (lane 8), or 24 h (lane 9) after 5 min ischemia, and of 2 h (lane 11), 4 h (lane 12), 8 h (lane 13), 16 h (lane 14), or 24 h (lane 15) after 30 min ischemia. Northern blot analysis reveals increase of HSP70 mRNA from 4 h until 16 h after 5 min ischemia, and from 2 h until 24 h after 30 min ischemia.

矢印の頭で示される)。もうひとつは熱誘導性の 2.9 Kb の HSP70 である (大矢印の頭で示される)。未処置のラットの海馬に於ける mRNA はほとんど検出できなかった (Fig. 1 の lane 3 で Co と示されている)。椎骨動脈の凝固血流遮断は mRNA の誘導に影響を及ぼさなかった (lane 4 で C1 と示されている)。HSC70 mRNA の発現の程度は Co, C1 に於いては非常に低い。HSP70, HSC70 の mRNA の誘導は 5 分間虚血では 4 時間から見られ、8 時間で最高値に達し 16 時間まで有意に見られた (lane 6-8)。30 分間虚血にて mRNA の発現は Fig. 1 の lane 10 で見られるように直後でもコントロールより高値を示した。30 分間虚血の HSP70 と HSC70 の各 mRNA 発現のレベルは 5 分に比べて高値であった。更にこれらの mRNA の変化は 30 分間虚血では 5 分間虚血時に比べ長く続いた。30 分間虚血後 24 時間でも双方の mRNA は高値を示した

(Fig. 1 の lane 15 で示される)。コントロールとしての β -actin の mRNA 量は 5 分間虚血でも 30 分間虚血でも変化は見られず一定であった。

*脳虚血後に於ける HSP70 の産生・蓄積の免疫生化学的検討

虚血に伴う海馬での HSP70 の蓄積は HSP70 に対するモノクローナル抗体を用いた免疫抗体法にて評価した。30 分間虚血に於いては Fig. 2, A 下段の矢印の頭で示されるように虚血後 24, 48 時間で明瞭な産生・蓄積が見られた。5 分間虚血では Fig. 2, A 上段で示されるように HSP70 の発現は全く検出できなかった。ABC 法では HSP70 の蓄積量が少ないために検出できなかったものと考えられた。5 分間虚血後に HSP70 の産生・蓄積が見られないのは Fig. 1 での 5 分間虚血後の HSP70 mRNA の発現の程度が 30 分間虚血に比してかなり低いのと一致している。ここで 2 次抗体とし

てペルオキシダーゼを結合したヤギ抗マウス IgG 抗体を用いて免疫抗体法を行うと5分間虚血では24時間後より HSP70 の産生・蓄積が見られ48時間で最高となり以降減少している (Fig. 2, B). 30分間虚血でも同様の变化を示している (データは示していない). この様にラット脳虚血再灌流モデルにおいて HSP70 mRNA, HSP70 の産生蓄積が虚血2日後に最高となる経時的変化が明瞭に示された.

*脳虚血後に於ける HSP70 の産生・蓄積の免疫組織学的検討

脳虚血後の HSP70 の産生・蓄積の経時的な変化を抗 HSP70 モノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に検討した. 5分間虚血に於いては一日後に海馬 CA1 領域に微かな染色性を認めた (Fig. 3, A). 二日後には CA1 領域の錐体細胞が高度に染色され, 四日後には染色性が低下した (Fig. 3, B, C). 一方, 30分間虚血で

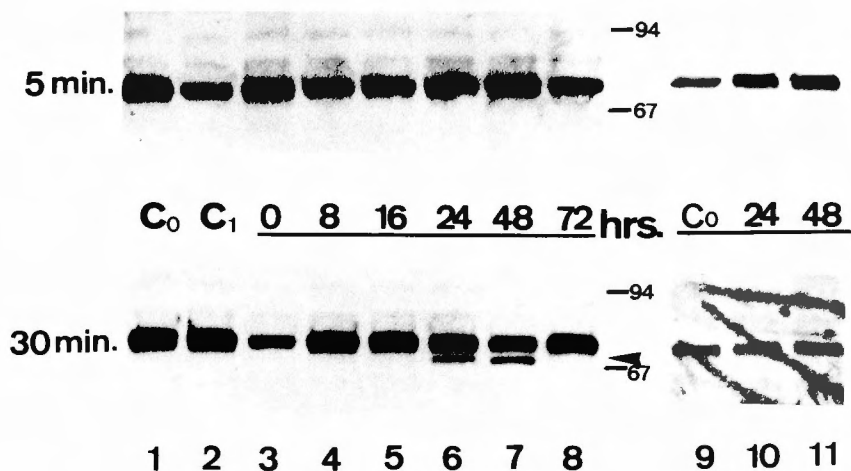


Fig. 2-A

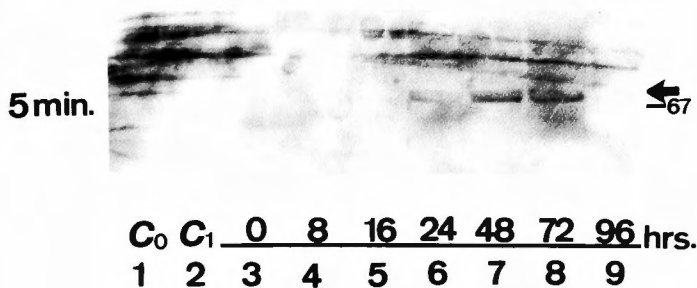


Fig. 2-B

Fig. 2 Immunoblot analysis of the induction of HSP70 following ischemia.

Cell lysates were prepared as described in Materials and Methods, electrophoresed, blotted onto a nitrocellulose membrane, and detected using monoclonal antibody against HSP70. Hippocampus was removed from rat immediately after ischemia (lane 3), or 8 h (lane 4), 16 h (lane 5), 24 h (lane 6 and 10), 48 h (lanes 7 and 11), or 72 h (lane 8) after ischemia. Western blot analysis was done using biotinylated horse anti-mouse IgG antibody (A) or peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (B) as the second antibody. Duration of ischemic treatment was 5 min (A upper panel, B) or 30 min (A lower panel). Lanes 1 and 9 (designated as Co) were controls without treatment (A), and lane 2 (designated as C1) was a mock operated control, the VAs of which were coagulated without subsequent ischemic treatment. Lanes 9 to 11 are stained with preimmune mouse serum (A). A heavy stained non-specific band was seen just above the HSP band (A). Lane 9 was 96 h after 5 min ischemia (B). Arrowhead (A) or arrow (B) indicates the HSP70 band. Molecular size markers indicated are phospholypase b (94 kDa) and bovine serum albumin (67 kDa).

は虚血後一日で既に CA1 領域でなく CA3, CA4 領域の神経細胞の染色性が認められた. CA1 領域の染色性は再灌流四日間を通じて CA3, CA4 領域と比して僅かであった (Fig. 3, D-F). CA3, CA4 領域での染色性は虚血二日後で高度になり四日後にはかなり低下した

(Fig. 3, E, F).

*予め非致死的な5分間虚血を负荷し, その後に30分間虚血を与え発変性神経細胞壊死の程度がどの様に变化するかを検討

5分間虚血を与え一週間の再灌流をした後の細胞障

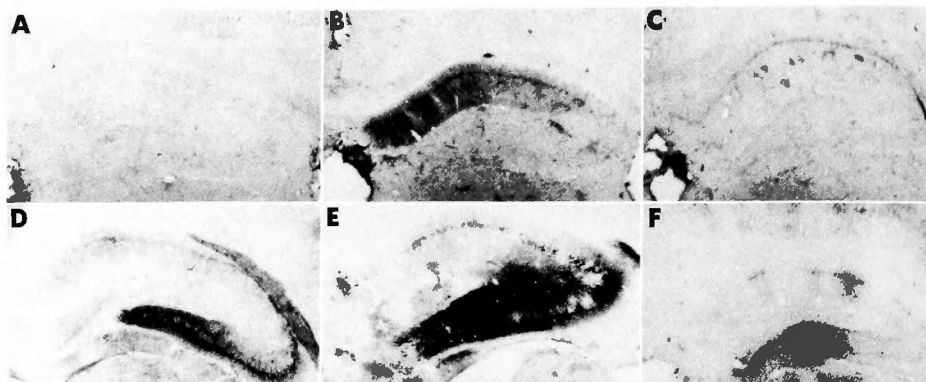


Fig. 3 Immunohistochemical staining of HSP70

Immunohistochemical staining of rat hippocampus using monoclonal antibody against rat HSP70. Sections of rat hippocampus were prepared and stained with anti-HSP70 antibody as described in Materials and Methods. Tissues were obtained and fixed and stained 1 day (A), 2 days (B) or 4 days (C) after 5 min ischemia, or 1 day (D), 2 days (E) or 4 days (F) after 30 min ischemia.

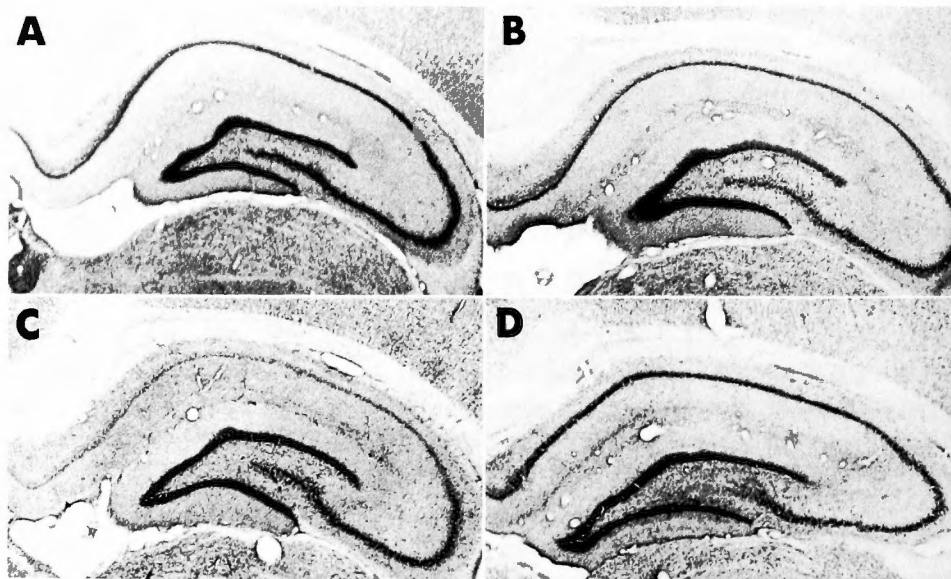


Fig. 4 Cresyl violet staining of rat hippocampus

Tissue sections were prepared from normal rat (A), rat 7 days after 5 min ischemia (B), and rat 7 days after 30 min ischemia (C). In order to test for acquisition of ischemic tolerance, rats were pretreated with 5 min ischemia, recovered for 2 days, and then subjected to 30 min ischemia. The hippocampus was fixed and stained 7 days after 30 min ischemia (D).

Table 1 Incidence of samples of various histological grade²⁴ in control and cerebral ischemia groups

histological grading&& group	0	1	2	3
	control (n=5)	5	—	—
5 min ischemia (n=5)	5	—	—	—
30 min ischemia				
1 day after VAs coagulation (n=4)	—	—	—	4
3 days after VAs coagulation (n=4)	—	—	2	2
5 min—2 days—30 min-(n=4)	—	4	—	—

&&

grade 0 (normal) : no cell necrosis

1 (mild) : scattered single cell necrosis

scattered small cell group necrosis

2 (moderate) : scattered cell group necrosis

3 (severe) : almost complete necrosis in the CA1 area

Animals were decapitated 7 days after last treatment of 5 min or 30 min ischemia and were histologically graded from 0 (no cell necrosis) to 3 (almost complete necrosis) using Kitagawa's histological grading scheme²⁴. A statistically significant difference ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test) is indicated by asterisks(*, **).

害の程度は Cresyl violet 染色で検討するとコントロール群に比してさほど変化を示さなかった (Fig. 4, A, B). しかしながら, 30分間虚血後, 一週間の再灌流をした後では CA1 領域での細胞障害は高度であった. CA1 領域の神経細胞は破壊され殆ど消失していた (Fig. 4, C). 椎骨動脈凝固による血流遮断 3 日後に, 30分間虚血を与えるも神経細胞障害は中等度であった (Table 1). 予め 5分間虚血を与えることにより30分間虚血による神経細胞障害がどのように変化するかを見るために, まず非致死的な 5分間の両側総頸動脈の閉塞を行い 2 日間置いて致死的な30分間虚血を与え一週間の再灌流を行った. Cresyl violet 染色による組織学的検討では短時間の虚血を予め与えることによって次に与えられる神経細胞障害は見られなかった (Fig. 4, D). 海馬 CA1 領域に於いて神経細胞障害は殆ど見ら

れなかった (Table 1). 5分間虚血と30分間虚血との間の 2 日間の灌流時間は HSP70 の産生・蓄積に必要な期間と考えられた.

考 察

熱や他の生理学的ストレスに対してすべての細胞や器官が非常によく保っている反応はいくつかの特徴を備えている^{8,32)}. この反応の主な特徴は熱ショック蛋白質あるいはストレス蛋白質と呼ばれるいくつかの蛋白質群の早い発現である³²⁾. これらは蛋白質を変性させる様々なストレスや障害によって発現される. 蛋白質を変性させたり異常な蛋白質構造を持つ蛋白質が産生される過程において HSP70 が発現されると考えられている^{1,38)}.

HSP70 ファミリーのように誘導されるストレス蛋

白質はストレスにより障害を受けた細胞の folding や会合を助けたり^{21,53)}, 蛋白質の膜透過を助けるという分子シャペロンの働き^{9,54)} や熱ショック、虚血、重金属等による様々な致死的なストレスから細胞を守るといった耐性を獲得させる働きがある¹³⁾ と言われている。ストレス蛋白質が変性蛋白質を再生していることは細菌の DnaK と GroEL/GroES 蛋白質を用いて実験的に示されている^{28,47)}。哺乳動物に於いて HSP70, HSP27 をコードする DNA を誘発することにより熱耐性が獲得出来ることが直接示されている。更に哺乳動物の細胞に抗 HSP70 抗体を導入したり熱ショック因子結合に関与する HSP70 プロモーターと競合する HSP70 遺伝子のプロモーターの入ったベクターをトランスフェクトすることにより HSP70 の発現を抑え、熱に対する脆弱性を誘導することが出来る。今回の実験では虚血によりラットの海馬では HSP70mRNA が虚血後2時間から4時間で発現し16時間から24時間にかけても高値を示していた。30分間虚血によって HSP70mRNA はより早期に誘導され、更に長時間高値であった。HSP70mRNA の発現の程度は5分間虚血に比べより高度であった。砂ネズミの10分間の一過性虚血に於いては HSP70mRNA は5倍から10倍に増加し再灌流6時間で最大となり24時間を過ぎても高い状態である³⁷⁾。ペルオキシダーゼを結合させたヤギ抗マウス IgG 抗体を用いた Western blot 法に於いて5分間虚血では虚血一日後より HSP70 が出現し二日後に最高となり以降減少した。30分間虚血でも同様であった。ところがビオチンを結合させた抗マウス IgG 抗体を用いると5分間虚血では検出できず、30分間虚血では虚血後一日、二日後に出現した。抗 HSP70 抗体を用いて行った免疫組織学的検討では5分間虚血後16時間までは染色性は見られず、虚血一日後より海馬 CA1 領域に次第に染色性が見られ二日後には最大となった。HSP70 の染色性に於いて30分間虚血後に海馬の CA3, CA4 領域に同様の時間的経過が見られたが、CA1 領域には殆ど見られなかった。低血圧と両側頸動脈の閉塞を行ったラットの一時的前脳虚血モデルに於いて5分間虚血では海馬 CA1 領域に、30分間虚血では CA3 領域に高い染色性が見られ虚血時間により解剖学的に異なった場所が染色されたとの報告がある¹¹⁾。蛋白質合成阻害や神経細胞障害を起こさない程度の5分間の短時間虚血に於いては脆弱な CA1 領域に選択的に HSP70 の蓄積が見られたと述べられている⁴⁶⁾。

2分間²³⁾あるいは10分間⁵²⁾ 虚血を行った砂ネズミに於いては HSP70 に対しての染色性がそれぞれ海馬 CA1 あるいは CA3 領域に虚血後48時間で最高に見られた。10分間虚血を行った砂ネズミに於いて ³⁵S methionine による HSP70 の蛋白質合成は虚血再灌流2時間後より見られ、8時間後で最高となり、24時間後でも認められる³⁵⁾。HSP70 の免疫組織学的な染色性は HSP70mRNA の発現が見られなくなってから起こると in situ, hybridization 法を用いた実験で検討されている³⁶⁾。この事から HSP70mRNA 発現と HSP70 の産生・蓄積との時期に時間的差異が生じるものと考えられた。

遅発性神経細胞壊死というのは砂ネズミ²²⁾ やラット⁴¹⁾ に於いて虚血再灌流後24時間以上経てからはじめて神経細胞障害が組織学的に見られるという現象である。非致死的な虚血によって海馬 CA1 領域に於いてポリリボゾームの離開²⁶⁾ や蛋白質合成の回復の遅れ^{2,48)}が見られると言われている。CA1 領域に於ける遅発性神経細胞壊死の進行程度は虚血の持続時間と2回に渡って行われる虚血間の時間によるところが大きい¹⁹⁾。

今回ラットの再灌流モデルに於ける遅発性神経細胞壊死の起こりかたから致死的な虚血に対する非致死的な虚血処置の及ぼす効果を検討した。5分間虚血をまず施し HSP70 の産生蓄積が最高となる二日後に30分間虚血を与えた。致死的な30分間虚血だけを与えられたラットに於いては海馬 CA1 の神経細胞は殆ど破壊された。椎骨動脈凝固遮断の3日後に30分間虚血を与えると中等度から高度の神経細胞障害が生じ側副血行路の影響はあまりないものと考えられた。前もって5分間虚血を与え二日後に30分間虚血を与えたラットに於いては CA1 領域の神経細胞の変化はあまり見られなかった。ラットに於いて、はじめの非致死的な5分間虚血による HSP70 の誘導によって虚血耐性が誘導されたものと思われた。

砂ネズミの脳虚血モデルに於いて、たとえ短時間で非致死的な2分間虚血でも一時間の間隔で3回以上繰り返し与えると高度な神経細胞障害を起こすと言われている²⁴⁾。神経細胞への保護作用を誘発するためには、はじめの非致死的な2分間虚血と後の致死的な5分間虚血との間には一日以上の時間が必要である¹⁸⁾。2分間虚血の前処置を行い1, 2, 4, 7日間の各々の期間再灌流を行った後に致死的な3分間虚血を与えても細胞障害は起こらなかった事より保護作用が誘導さ

れたものと考えられた。軽微な一過性前脳虚血の一日後あるいは二日後での HSP70 の遺伝子発現や蛋白質合成の変化により細胞保護作用が生ずるものと思われた²⁴⁾。ラットや砂ネズミの虚血モデルに於いて軽度の熱による前処置を施すことにより、その後の高度の虚血の処置によって海馬 CA1, CA2 領域に起こる神経細胞障害に対して明確な保護作用を示した^{6,25)}。この事はストレス蛋白によって虚血耐性が生じたものと考えられた。

今回、ラット脳虚血再灌流モデルの実験に於いて軽度の脳虚血を予め与えることにより次の致死的な脳虚血に対して虚血耐性を獲得し、更には HSP70 の誘発がこの耐性獲得に関与している可能性を示した。砂ネズミを使った他の報告と同様にラットの *in vivo* の実験に於いて HSP70 の誘導と虚血耐性の獲得とを関連づけるものである。厳密に HSP70 と虚血耐性獲得の関係を直接示すには更に実験が必要である。たとえば神経培養細胞にストレス蛋白の遺伝子をトランスフェクトしその細胞を虚血条件下に置いて細胞の生存がどの様に影響されるかを見るのが有用で、直接的な方法と考えられる。

References

- Ananthan J, Goldbelg AL and Voellmy R: Abnormal protein serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes, *Science*, **232** (1986): 522-524.
- Araki T, Kato H, Inoue T and Kogure K: Regional impairment of protein synthesis following brief cerebral ischemia in the gerbil, *Acta Neuropathol.*, **79** (1990): 501-505.
- Barbe MF, Tytell M, Gower DJ and Welch WJ: Hyperthermia protects against light damage in the rat retina, *Science*, **241** (1988): 1817-1820.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72** (1976): 248-254.
- Chapell TG, Welch WJ, Schlossman DM, Palter KB, Schlesinger MJ and Rothman JE: Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins, *Cell*, **45** (1986): 3-13.
- Chopp M, Chen H, Ho K-L, Dereski MO, Brown E, Hetzel FW and Welch KMA: Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat, *Neurology*, **39** (1989): 1396-1398.
- Craig EA and Jacobson K: Mutations of the heat inducible 70 kilodalton genes of Yeast confer temperature sensitive growth, *Cell*, **38** (1984): 841-844.
- Craig EA: The heat shock response, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **18** (1985): 263-280.
- Ellis RJ: Proteins as molecular chaperones, *Nature (Lond)*, **328** (1987): 378-379.
- Feinberg AP and Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal. Biochem.*, **132** (1983): 6-13.
- Gonzalez MF, Lowenstein D, Ferynyak S, Hisanaga K, Simon R, Shapp FR: Induction of heat shock protein 72-like immunoreactivity in the hippocampal formation following transient global ischemia, *Brain Research Bulletin* **26** (1991): 241-250.
- Hatakeyama T, Matsumoto M, Brengman JM and Yanagihara T: Immunohistochemical investigation of ischemic and postischemic damage after bilateral carotid occlusion in gerbils, *Stroke*, **19** (1988): 1526-1534.
- Henle KJ, Leeper DB: Interaction of hyperthermia and radiation in CHO cells: recovery kinetics, *Radiat. Res.*, **16** (1976): 505-510.
- HSU SM, Raine L and Fanger H: Use of Avidin-biotinperoxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques; A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, *J. Histochem. Cytochem.*, **29** (1981): 577-580.
- Hunt C and Morimoto RI: Conserved features of eukaryotic HSP70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human HSP70, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** (1985): 6455-6459.
- Itikawa H, Ryu JL: Isolation and characterization of a temperature sensitive DNA K mutant of *E. Coli*, *Br. J. Bacteriol.*, **138** (1979): 339-344.
- Johnston RN and Kucey BL: Competitive inhibition of HSP70 gene expression causes thermosensitivity, *Science*, **242** (1988): 1551-1554.
- Kato H and Kogure K: Neuronal damage following non-lethal but repeated cerebral ischemia in the gerbil, *Acta Neuropathol.*, **79** (1990): 494-500.
- Kato H, Liu Y, Araki T and Kogure K: Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects, *Brain Res.*, **553** (1991): 238-242.
- Kiessling M, Diemel GA, Jacewicz M and Pulsinelli WA: Protein synthesis in postischemic rat brain; a two dimensional electrophoretic analysis, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **6** (1986): 642-649.
- Kim YJ, Shuman J, Sette M and Przybyla A:

- Nuclear localization and phosphorylation of three 25-kilodalton rat stress proteins, *M.C.B.*, **4** (1984): 468-474.
- 22) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.*, **239** (1982): 57-69.
 - 23) Kirino T, Tsujita Y, Tamura A: Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **11** (2) (1991): 299-307.
 - 24) Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Ninobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K and Kamada T: 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain, *Brain Reserch*, **528** (1990): 21-24.
 - 25) Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Kuwabara K, Hata R, Handa N, Fukunaga R, Kimura K and Kamada T: Hyperthermia-induced neuronal protection against ischemic injury in gerbils, *J. Cereb., Blood Flow Metab.*, **11** (1991): 449-452.
 - 26) Kleihues P and Hossmann K-A: Protein synthesis in the cat brain after prolonged cerebral ischemia, *Brain Res.*, **35** (1971): 409-418.
 - 27) Laemmli UK: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227** (1970): 680-685.
 - 28) Laminet AA, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C, Pluckthun A: The *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and GroES modulate the finding of the b-lactamase precursor, *EMBO J.*, **9** (7) (1990): 2315-2319.
 - 29) Landry J, Chretien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA: Heat Shock Resistance Conferred by Expression of the Human HSP27 Gene in Rodent Cells, *J. Cell. Biol.*, **109** (1989): 7-15.
 - 30) Lehrach H, Diamond D, Wozney JM and Boedtker H: RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination, *Biochemistry*, **16** (1977): 4743-4751.
 - 31) Li GC, Li L, Liu RY, Rehman M and Lee WMF: Heat shock protein hsp70 protects cells from thermal stress even after deletion of its ATP-binding domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89** (1992): 2036-2040.
 - 32) Lindquist S: The heat shock response, *Ann. Rev. Biochem.*, **55** (1986): 1151-1191.
 - 33) Lindquist S and Craig EA: The heat shock proteins, *Annu. Rev. Genet.*, **22** (1989): 631-677.
 - 34) Milarski KL and Morimoto R: Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986): 9517-9521.
 - 35) Nowak TSJr: Synthesis of stress protein following transient ischemia in gerbil, *J. Neurochemistry*, **45** (1985): 1635-1641.
 - 36) Nowak TS, Ikeda J and Nakajima T: 70Kda heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia, Princeton Conference, *Stroke*, **21** (1990) (Supple 3): 3-107-3-111.
 - 37) Nowak TSJr, Bond U and Schlesinger MJ: Heat shock RNA levels in brain and other tissues after hyperthermia and transient ischemia, *J. Neurochemistry*, **54** (1990): 451-458.
 - 38) Pelham HRB: Speculations on the function of the major heat shock and glucose-regulated protein, *Cell*, **46** (1986): 959-961.
 - 39) Piotr Chomczynski and Nicoleta Sacchi: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analytical Biochemistry*, **162** (1987): 156-159.
 - 40) Pulsinelli WA and Brierley JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat, *Stroke*, **10** (1979): 267-272.
 - 41) Pulsinelli WA, Brierley JB and Plum F: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia, *Ann. Neurol.*, **11** (1982): 491-498.
 - 42) Riabowol KT, Mizzen LA and Welch WJ: Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against HSP70, *Science*, **242** (1988): 433-436.
 - 43) Ritossa F: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*, *Experientia*, **18** (1962): 571-573.
 - 44) Saito H and Uchida H: Initiation of the DNA replication of bacteriophage lambda in *Escherichia coli* K12, *J. Mol. Biol.*, **113** (1977): 1-25.
 - 45) Saoji AM, Jad CY and Kellar SS: Ramazol brilliant blue as a pre-stain for the immediate visualization of human serum proteins of polyacrylamide gel disc electrophoresis, *Clin. Chem.*, **29** (1983): 42-44.
 - 46) Simon RP and Cho H: The temporal profile of stress protein following global ischemia (Abstract), *Neurology* **40** (1990): (Suppl 1): 383.
 - 47) Skowrya D, Georgopoulos C, Zylicz M: The *E. coli* dnaK gene product, the hsp70 homology, can reactivate heat-induced RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner, *Cell* **62** (1990): 939-944.
 - 48) Thilmann R, Xie Y, Kleihues P and Kiessling M: Persistent inhibition of protein synthesis precede delayed neuronal death in postischemic gerbil hippocampus, *Acta Neuropathol. (Berl)*, **71** (1986): 88-93.
 - 49) Thomas PS: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to

nitrocellulose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77** (1980): 5201-5205.

- 50) Towbin H, Staehlin T and Gordon J: Electrophoretic transfer from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76** (1979): 4350-4354.
- 51) Uemura Y, Kowall NW and Beal MF: Global ischemia induces NMDA receptor-mediated *c-fos* expression in neurons resistant to injury in gerbil hippocampus, *Brain Res.*, **542** (1991): 343-347.
- 52) Vass K, Welch WJ and Nowak TSJr: Localization of 70-kDa stress protein induction in gerbil brain after ischemia, *Acta Neuropathol.*, **77** (1988): 128-135.
- 53) Velazquez JM and Lindquist S: *hsp70*; Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery, *Cell*, **36** (1984): 655-622.
- 54) Welch WJ and Suhan JP: Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress, *J. Cell. Biol.*, **103** (1986): 2035-2052.
- 55) Wu B, Hunt C and Morimoto RI: Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70, *Mol. Cell. Biol.*, **5** (1985): 330-341.