

氏 名	薛 菁 暉
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2203 号
学位授与の日付	平 成 12 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 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	温度ストレス蛋白質の脳虚血による発現変化に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 永 田 和 宏 教 授 橋 本 信 夫 教 授 藤 田 潤

論 文 内 容 の 要 旨

生物が生命活動を続ける過程で外界からのさまざまなストレスに適切に応答していくことは、絶えず変化する環境の中で自己を守り、生存していくために必須の反応である。虚血は熱負荷、ウイルス感染などと並んで生体のもっともこうむりやすいストレスの一種であり、虚血ストレスに対する分子シャペロンの誘導は虚血耐性現象の分子メカニズムの解明とも絡んだ興味深い研究領域となってきた。

Apg-1 と Apg-2 は Hsp 110 ファミリーに属する熱ショック蛋白質である。マウス細胞では、Apg-1 と Hsp 105/110 の発現は摂氏 32°C から 39°C への熱ストレスで誘導されるが、Apg-2 は誘導されない。一方、CIRP (cold-inducible RNA-binding protein) は、軽い低温 (32°C) で誘導される哺乳類で初めての低温ショック蛋白質で、培養線維芽細胞に 32°C で発現が誘導される。CIRP は体細胞では増殖抑制効果を示す。一過性前脳虚血では熱ショック蛋白質 Hsp 70 ファミリーの発現亢進がよく知られている。そこで、一過性前脳虚血のラット脳での Hsp 110 ファミリーと CIRP の発現変化について研究した。

Pulsinelli 等の方法によりラット前脳を 20 分虚血させ、再灌流開始後時間を追って、Northern blotting (場合により in situ hybridization) を用いて Apg-1, Apg-2, Hsp 110 及び Hsp 70 の mRNA レベルを解析した結果、Apg-1 mRNA は、大脳皮質の神経細胞において虚血 3 時間後から発現亢進し、12 時間をピークとして減少した。海馬では、3 時間後から亢進し、高値は 24 時間持続した。Hsp 110 の mRNA レベルは Apg-1 と同様の変動をした。Apg-2 の mRNA も発現が亢進したが、そのキネティクスは Apg-1, Hsp 110 と Hsp 70 と異なった。以上の結果から、脳虚血一再灌流後に、Hsp 110 ファミリーのメンバーが異なるメカニズムで脳内に発現していたことがわかり、Apg-1 は虚血、熱ショック及び正常神経細胞に重要な役割を果たしていることが示唆された。

同じモデルで、低温で誘導されるストレス蛋白 CIRP mRNA のレベルを Northern blotting で調べた結果、CIRP の発現は多数の組織で認められ、大脳海馬の神経細胞において虚血終了 3 時間から 6 時間後に減少した。大脳皮質における発現の変化は著明でなかった。なお、in situ hybridization 組織化学法によって、正常ラット脳のいろいろな部位における神経細胞で CIRP の恒常的発現を認めた。一方、32°C での培養により PC 12 pheochromocytoma 細胞の CIRP mRNA レベルは増加したが、培養液に H₂O₂ を加えると CIRP の誘導、発現は濃度依存的に抑制され、脳虚血による CIRP 発現の変化は活性酸素の産生による可能性が示唆された。今後脳障害に対する低体温療法における熱ショック蛋白と低温ショック蛋白の役割の究明が必要である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ストレスへの曝露は、細胞を保護し恒常性を再構築するように機能する種々のストレス応答性遺伝子の発現を変化させる。本論文では Pulsinelli 等の方法によりラット前脳を 20 分間虚血させ、再灌流開始後の時間を追って、Northern blotting (場合により in situ hybridization) を用いて Hsp 110 ファミリーのメンバーである Apg-1, Apg-2, Hsp 110 及び

Hsp 70 の mRNA レベルを解析した。脳虚血-再灌流後に、脳内でこれらの遺伝子が異なる動態で発現誘導されることがわかった。

同じモデルで、低温で誘導されるストレス蛋白 CIRP の mRNA レベルを Northern blotting で調べたところ、大脳海馬の神経細胞において虚血終了 3 時間から 6 時間後に減少した。なお、in situ hybridization 法によって、正常ラット脳のいろいろな部位における神経細胞で CIRP の恒常的な発現を認めた。一方、ラット神経系細胞 PC 12 で CIRP mRNA のレベルは、32℃での培養により増加した。この CIRP の発現は H_2O_2 により濃度依存的に抑制され、脳虚血による CIRP 発現の変化は活性酸素の産生による可能性が考えられた。すなわち、これらの温度ストレス蛋白質は虚血及び正常神経細胞に重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上の研究は虚血ストレスによる脳神経障害機序の解明に貢献し、ストレス応答の制御による新たな治療、予防法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あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 12 年 1 月 25 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。