

②

主論文

1. 題目 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

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

西 正 吾

西 正 吾

主論文 I

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

西 正 吾、

京都大学脳神経外科

〒606 京都市左京区聖護院川原町54

Key words:

脳虚血

ストレス蛋白質70

ラット

虚血耐性

神経細胞障害

(はじめに)

*Drosophila busckii*の唾液腺を用いて温度を25℃から30℃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、又しょうじょう蠅、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、また疾病とのかかわり合いがあることが示唆されている。HSP7

0 関 連 物 質 は D N A 複 製^{3, 4, 46}、 ク ラ ス リ ン 小 胞 の 被 覆 化 の 抑 制⁵、 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 つ 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 經 細 胞 の 選 択 的 脆 弱 性 い わ ゆ る 遅 発 性 神 經 細 胞 壊 死^{2, 2} 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 (H S P 70 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^{1, 5} 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 H S P 70 m R N A, H S P 70 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 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℃から37℃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(pH2.3)のプロープを用いて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), 0.15M NaCl, 50mM Tris HCl pH8.0, 5mM EDTA(Ethylene diamine acetic acid), 2mM NEM(N-ethylmaleimide), 2mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)にて氷冷しながらPot

ter homogenizerを用いてホモジネートした。

4℃で12000gの遠心を20分間行い上清を回収した。蛋白質定量はBradford法⁴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法で決めた。125μgの蛋白を10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し5mM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ッキングを行った。ブロッッキング後ラットHSP70に対するマウスモノクローナ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、開胸しカニキュレを心尖部より挿入し上行大動脈に留置した。200mlの0.9%生食で灌流後、4%ホルマリン入り0.1M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0.1Mリン酸塩緩衝液(pH7.3)にて脱水を2日間行った。マイクロトームを用いて50μm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反応あるいは

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、ペクタステインキットにてABC complexを結合させた。40mg 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すり鉢にて碎き、GIT buffer(4M guanidinium isothiocyanate, 0.025M sodium citrate(pH 7.0), 0.5%(

W/V) sodium laurylsarcosine, 0.1M 2-mercaptoethanol)と混ぜた。更に1/10量の3M sodium acetate(pH 4.0)、2/10量のchloroform/isooamyl alcohol(CIAA)(49/1)、水飽和phenolを加えvortexで攪拌後4℃で10000g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℃で20分間保ち12000gで4℃15分間遠心を行った。沈澱物を少量の0.3M sodium acetateとphenol/CIAAに溶かし2倍量のethanolを加え-80℃で保存した。

* Northern blot 法

10 μ g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 dodecyl sulfate)、100 μ g/ml sonicate

ed denatured salmon sperm DNAを含む SSC (sodium citrate) (1X SSC, 0.15M NaCl, 0.15M 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 ^3P 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 $\mu\text{g/ml}$ sonicated denatured salmon sperm DNA を含む SSC と ^3P 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 RX0-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 の経時的変化

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 の小矢印の頭で示される)。もうひとは熱誘導性の 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

であつた。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
あつた。

* 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 2
4, 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 HSP
70 の発現は全く検出できなかつた。ABC 法では
HSP70 の蓄積量が少ないために検出できなかつ
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
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変化
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分間虚血を負荷し、その後30分間虚血を与え遅発性神経細胞壊死の程度がどのように変化するかを検討。

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う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、熱に対する脆弱化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HSP70 mRNA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HSP70 mRNAはより早期に誘導され、更に長時間高値であった。HSP70 mRNA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HSP70 mRNA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³⁵⁾ S 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HSP70 mRNA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HSP70 mRNA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ことが有用で、直接的な方法と考えられる。

References

- 1)Ananthan J., Goldbelg A.L. and Voellmy R.:Abnormal protein serve as eukaryotic steress signals and trigger the activation of heat shock genes, Sciece, 232 (1986): 522-524
- 2)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
- 3)Barbe M.F., Tytell M., GowerD.J. and Welch W.J.:Hyperthermia protects against light damage in the rat retina, Science, 241 (1988):1817-1820
- 4)Bradford M.M.: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
- 5)Chapell T. G., Welch W.J., Schlossman D.M., Palter K.B., Schlesinger M.J. and Rothman J.E.:Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins, Cell, 45 (1986): 3-13
- 6)Chopp M., Chen H., Ho K-L., Dereski M.O., Brown E., Hetzel F.W. and Welch K.M.A.:Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat, Neurology, 39 (1989): 1396-1398
- 7)Craig E.A. and Jacobson K.:Mutations of the heat inducible 70 kilodalton genes of Yeast confer temperature sensitive growth, Cell, 38 (1984): 841-844
- 8)Craig E.A.:The heat shock response, CRC Crit.Rev.Biochem., 18 (1985): 263-280
- 9)Ellis R.J.:Proteins as molecular chaperones, Nature (Lond),

328 (1987): 378-379

10)Feinberg A.P. and Vogelstein B.:A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, Anal. Biochem., 132 (1983): 6-13

11)Gonzalez M:F., Lowenstein D., Ferynyak S., Hisanaga K., Simon R., Shapp F.R.:Induction of heat shock protein 72-like immunoreactivity in the hippocampal formation following transient global ischemia, Brain Research Bulletin 26 (1991): 241-250

12)Hatakeyama T., Matsumoto M., Brengman J.M., and Yanagihara T.:Immunohistochemical investigation of ischemic and postischemic damage after bilateral carotid occlusion in gerbils, Stroke, 19 (1988): 1526-1534

13)Henle K.J., Leeper D.B.:Interaction of hyperthermia and radiation in CHO cells:recovery kinetics, Radiat. Res., 16 (1976): 505-510

14)HSU S.M., Raine L. and Fanger H.:Use of Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques;A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, J. Histochem. Cytochem., 29 (1981): 577-580

15)Hunt C. and Morimoto R.I.: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

16)Itikawa H., Ryu J.L.:Isolation and characterization of a temperature sensitive DNA K mutant of E.Coli, Br. J. Bacteriol., 138 (1979): 339-344

17)Johnston R.N. and Kucey B.L.:Competitive inhibition of HSP70 gene expression causes thermosensitivity, Science, 242 (1988): 1551-1554

18)Kato H. and Kogure K.:Neuronal damage following non-lethal but repeated cerebral ischemia in the gerbil, Acta Neuropathol., 79 (1990): 494-500

19)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

20)Kiessling M., Dienel G.A., Jacewicz M. and Pulsinelli W.A.:Protein synthesis in postischemic rat brain;a two dimensional electrophoretic analysis, J. Cereb. Blood Flow Metab., 6 (1986): 642-649

21)Kim Y.J., 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 U.K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970): 680-685
- 28) Laminet A.A., Ziegelhoffer T., Georgopoulos C., Pluckthun A.: The Escherichia coli heat shock proteins GroEL and GroES modulate the finding of the β -lactamase precursor, *EMBO J.*, 9 (7) (1990): 2315-2319
- 29) Landry J., Chretien P., Lambert H., Hickey E., Weber L.A.: 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 J.M. and Boedtker H.: RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination, *Biochemistry*, 16 (1977): 4743-4751
- 31) Li G.C., Li L., Liu R.Y., Rehman M. and Lee W.M.F.: 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 E.A.: The heat shock proteins, *Annu. Rev. Genet.*, 22 (1989): 631-677
- 34) Milarski K.L. 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 T.S.Jr.: Synthesis of stress protein following transient ischemia in gerbil, *J. Neurochemistry*, 45 (1985): 1635-1641
- 36) Nowak T.S., 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 T.S.Jr., Bond U. and Schlesinger M.J.: Heat shock RNA levels in brain and other tissues after hyperthermia and transient ischemia, *J. Neurochemistry*, 54 (1990): 451-458
- 38) Pelham H.R.B.: 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 W.A. and Brierley J.B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat, *Stroke*, 10 (1979): 267-272
- 41) Pulsinelli W.A., Brierley J.B. and Plum F.: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia, *Ann. Neurol.*, 11 (1982): 491-498
- 42) Riabowol K.T., Mizzen L.A. and Welch W.J.: 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 A.M., Jad C.Y. and Kellar S.S.: 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 R.P. 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-indicated 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 P.S.: 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 N.W. and Beal M.F.: 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 W.J. and Nowak T.S. Jr.: Localization of 70-kDa stress protein induction in gerbil brain after ischemia, Acta Neuropathol., 77 (1988): 128-135

53) Velazquez J.M. and Lindquist S.: hsp70; Nuclear concentration

during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery, Cell, 36 (1984): 655-662

54) Welch W.J. and Suhan J.P.: 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 R.I.: Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70, Mol. Cell. Biol., 5 (1985): 330-341

(Legend to Figures)

Figure 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.

Figure 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).

Figure 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.

Figure 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 I
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--30min-(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-Whittney U test) is indicated by asterisks(*, **).

Induction of HSP70 and neuronal damage following transient cerebral ischemia in rats

SHOGO NISHI,

DEP. OF NEUROSURGERY, FACULTY OF MEDICINE, KYOTO UNIVERSITY, 54
SHOUGOIN, KAWAHARA-CHOU, SAKYO-KU, KYOTO 606, JAPAN

Key words

Cerebral ischemia
Ischemic tolerance
Heat shock protein 70 (HSP70)
Rat
Neuronal damage

Abstract

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 (pH2.3) 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.

Fig 2-A

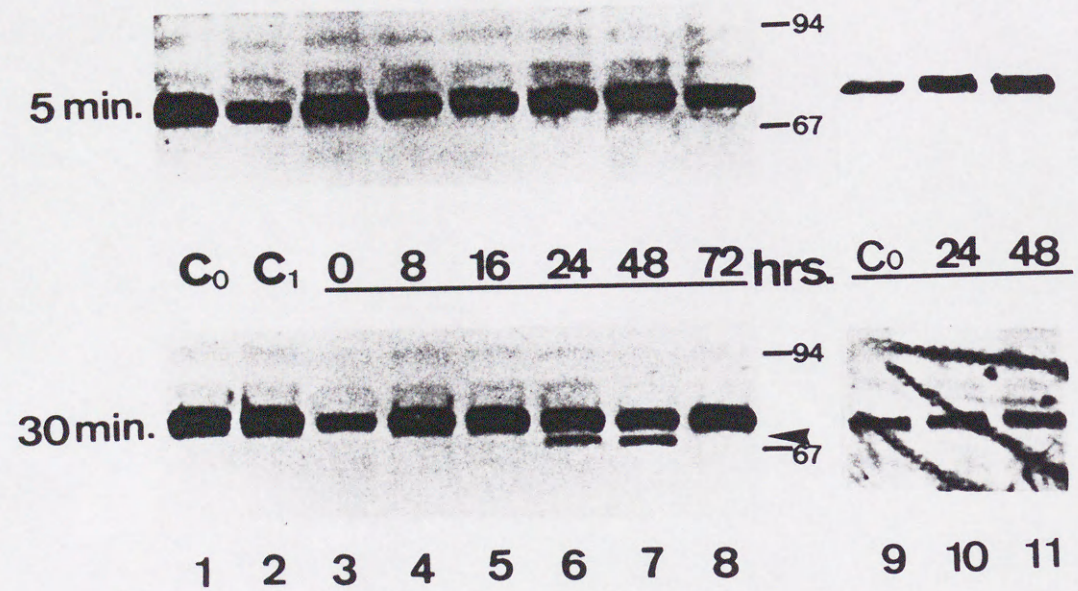


Fig 2-B

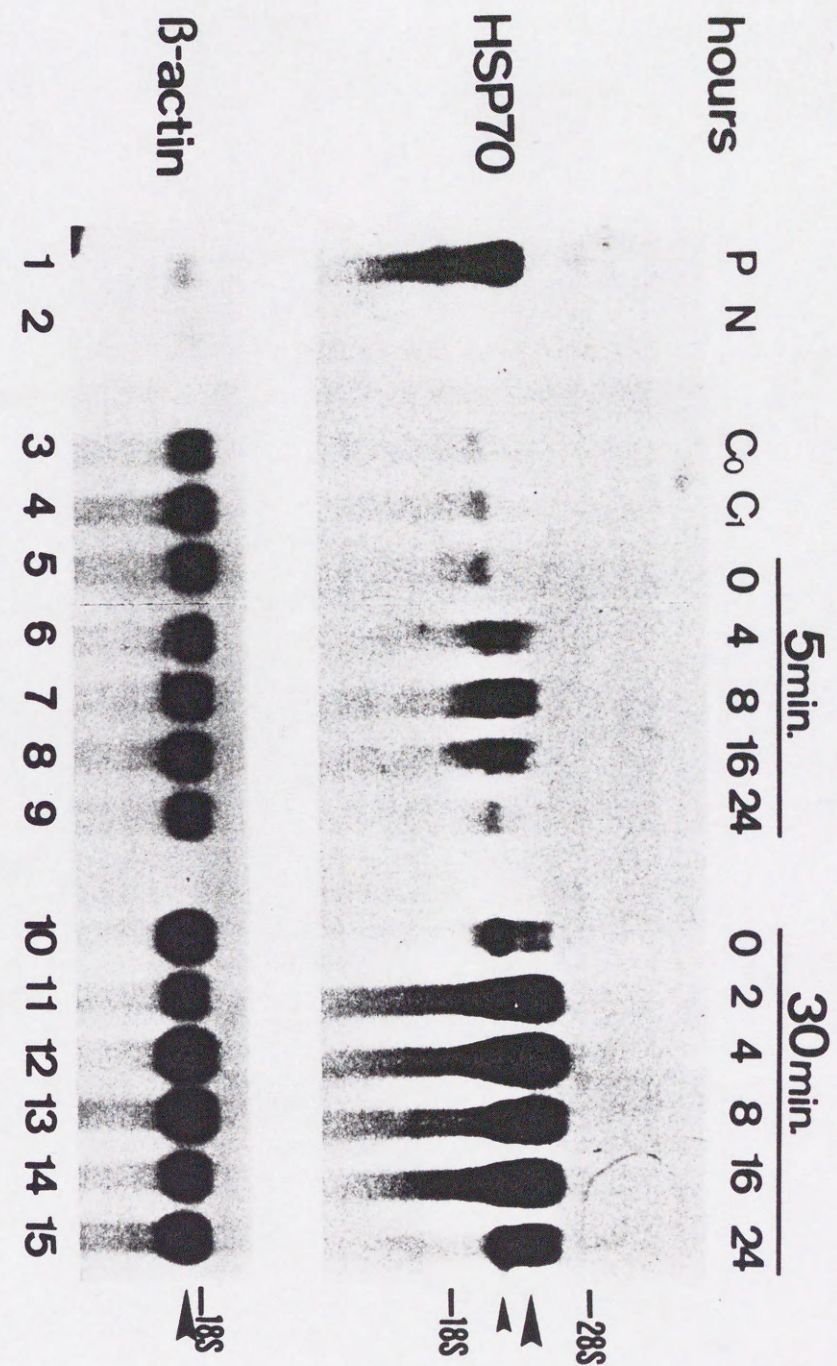
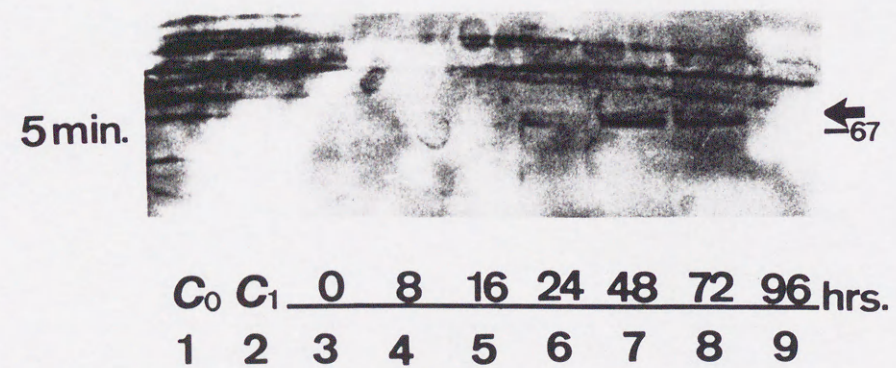


Fig 3

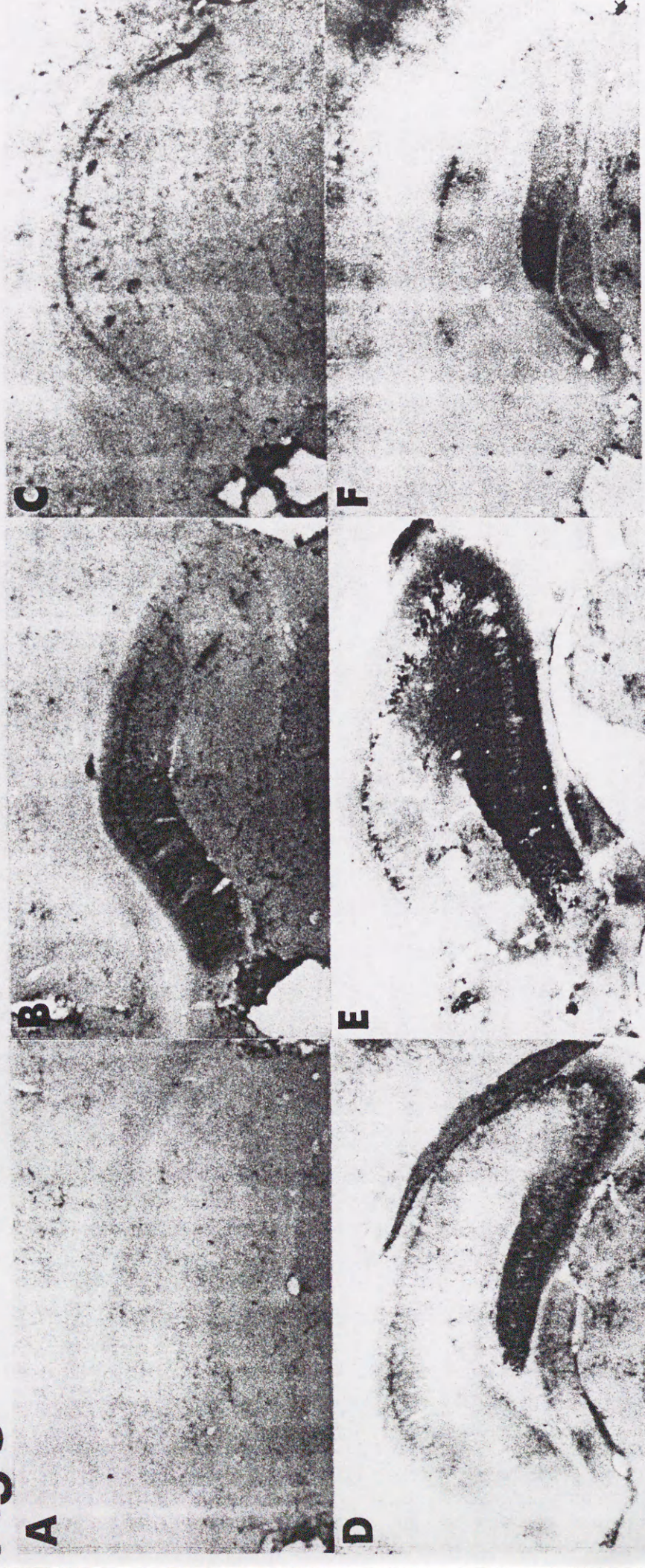


Fig4

