

氏名	かんべあつし 神戸敦司
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第528号
学位授与年月日	平成17年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Spatial resolution of calpain-catalyzed proteolysis in focal cerebral ischemia (局所脳虚血におけるカルパインによる神経細胞骨格蛋白分解の解剖学的分析)
学位論文審査委員	(主査) 大浜 栄作 (副査) 渡邊 達生 渡辺 高志

学位論文の内容の要旨

脳神経細胞は血流障害に対して極めて脆弱で、短時間の虚血により脳のエネルギー代謝が障害され、その結果神経細胞死に陥ることが知られている。全脳虚血における神経細胞死には、カルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインの活性化が関与しており、カルパイン阻害剤の使用により虚血性神経損傷が改善することが報告されている。局所脳虚血における神経損傷でもカルパインの関与が注目されているが、その詳細な組織学的検討はなされていない。今回我々はスナネズミ一過性局所脳虚血モデルを用いて、カルパインにより分解された神経細胞骨格蛋白 α -fodrinの解剖学的分布を経時的に検討した。同時に、局所脳虚血におけるカルパイン阻害剤の効果についても検討した。

方法

一過性局所脳虚血モデルには、成熟雌スナネズミ(体重60-70g、45匹)を使用した。全身麻酔下に手術顕微鏡を用いて左中大脳動脈を露出した。脳外科動静脈奇形用ミニクリップを使用して、露出した中大脳動脈の血流を遮断した。3時間の虚血負荷後、ミニクリップを外して血流の再開を確認した(非治療虚血群)。カルパイン阻害剤治療群及び賦形剤処置群では、虚血負荷30分前に右大腿静脈よりそれぞれ60mg/kgの阻害剤または賦形剤を投与した。Sham-operation群では血管を露出した後、創を縫合閉鎖した。最初に、カルパイン阻害剤の効果を調べるため、梗塞体積を測定し4群間(n=9)で比較検討した。次に、カルパインにより分解された α -fodrin(分子量150kDa;以下 α -fodrin分解産物と略記)に特異的な抗体を用いた免疫組織化学染色及びヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色により、再灌流後15分、4時間、24時間における α -fodrin分

解と虚血性神経細胞変化の解剖学的分布を虚血中心領域、傍虚血領域との間で比較検討した。最後に、Western blot 法により α -fodrin 分解産物の半定量を行い免疫組織化学的評価を確認した。

結 果

カルパイン阻害剤治療群の梗塞体積は、非治療虚血群及び賦形剤処置群に比し有意に減少した。Sham-operation 群では梗塞巣を認めなかった。免疫組織化学染色では、再灌流後 15 分で虚血中心領域に α -fodrin 分解産物で濃染された細胞体を多数認めたが、傍虚血領域では神経細胞体に α -fodrin 分解産物は認められず、神経網、先端樹状突起にのみ α -fodrin 分解産物がみられた。再灌流後 4 時間で、虚血中心領域では神経細胞体と核、傍虚血領域では神経細胞体まで α -fodrin 分解産物が認められるようになった。再灌流後 24 時間で、傍虚血領域では細胞体と核まで α -fodrin 分解産物が検出され、虚血中心領域では、多数の収縮した神経細胞全体に濃染された α -fodrin 分解産物を認めた。H-E 染色を行うと虚血中心領域では再灌流後 15 分でわずか 13%の神経細胞にネクロシスを、傍虚血領域では再灌流後 24 時間ごく少数の神経細胞にネクロシスを認めた。Western blot 解析では、カルパイン阻害剤治療群における α -fodrin 分解産物が、再灌流後 15 分、24 時間ともに、賦形剤処置群に比し有意に減少していた。

考 察

カルパインはグルタミン酸レセプターを介した細胞内カルシウム濃度上昇により活性化されるシステインプロテアーゼの一つで、全脳虚血において、神経細胞骨格蛋白の α -fodrin を分解することにより神経細胞死を引き起こすことが示されている。今回の免疫組織化学的検討により、局所脳虚血におけるカルパインによる α -fodrin 分解は、虚血中心領域では虚血負荷直後より急速に進行して神経細胞死を引き起こすが、傍虚血領域では緩徐に進行することが明らかにされた。このカルパインによる α -fodrin 分解は H-E 染色で組織学的に認められる神経細胞のネクロシスに先行することが証明された。また、カルパイン阻害剤投与により、傍虚血領域の脳梗塞への進行を防止できることが示された。本研究の結果から、局所脳虚血においてもカルパインは神経細胞障害の発生に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。また、カルパイン阻害剤は、緩徐に進行する傍虚血領域での α -fodrin 分解を防ぐことから、脳梗塞に対する今後の治療戦略の重要な糸口になると思われる。

結 論

カルパイン活性化は、局所脳虚血においても神経細胞障害に大きな役割を果たしていることが証明された。カルパイン阻害剤は脳梗塞の有効な治療法となる可能性がある。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、スナネズミ一過性局所脳虚血モデルを用いて、カルパインにより分解された神経細

胞骨格蛋白、 α -fodrinの解剖学的分布を経時的に解析し、同時に局所脳虚血におけるカルパイン阻害剤の効果について検討したものである。その結果、局所脳虚血におけるカルパインの α -fodrin分解は、虚血中心領域では、虚血負荷直後より急速に進行し神経細胞形態の崩壊を引き起こすが、それに比し傍虚血領域では緩徐に進行することが明らかにされた。また、カルパイン阻害剤投与により、傍虚血領域の脳梗塞への進行を防止できることが示された。本論文の内容は、局所脳虚血においてカルパインは神経細胞障害の発生に重要な役割を果たしていること、およびカルパイン阻害剤は脳梗塞の有効な治療法となりうることを示唆するものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認める。