



Title	An immunohistochemical study of MAP2 and clathrin in gerbil hippocampus after cerebral ischemia
Author(s)	吉見, 建二
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39485
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	吉 見 建 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 0 1 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 5 月 1 6 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	An immunohistochemical study of MAP2 and clathrin in gerbil hippocampus after cerebral ischemia (脳虚血後のスナネズミ海馬における MAP2 およびクラスリンの免疫組織化学的検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠 山 正 彌 (副査) 教 授 柳 原 武 彦 教 授 祖 父 江 賢 治

【目 的】

脳組織は虚血に弱く、海馬は特に脆弱である事が知られている。スナネズミを用いた一過性前脳虚血モデルにおいて、海馬CA2 ニューロンは reactive change と呼ばれる変性を虚血・再開通後数時間で示すのに対し、CA1 ニューロンは約3-4日後に変性し、遅延細胞死と呼ばれている。CA1においては、虚血・再開通時のグルタミン酸の過剰放出が遅延細胞死のトリガーである事がほぼ明らかにされているが、それ以後2-3日かけて徐々に進行するカスケードは充分明らかにされていない。そこで、脳虚血後のスナネズミ海馬における蛋白質の変化を免疫組織化学により経時的に観察した。本研究ではMAP2 (Microtubule Associated Protein 2) およびクラスリンに注目した。MAP2は神経特異的な微小管付随蛋白であり、樹状突起の細胞骨格の一部をなす。一方、クラスリンはコート小胞の殻となる蛋白で、受容体エンドサイトーシスやゴルジ体トランス膜からの小胞形成において主要な役割をもつ。

【方法ならびに成績】

1: 脳虚血

スナネズミを常法に従い、ハロセン麻酔下に総頸動脈を露出、動脈瘤クリップにて5分間閉塞後、開放した。一定期間の後、中性緩衝パラホルムアルデヒド液にて心室より灌流固定した。

2: 免疫組織化学染色の特異性

厚さ40 μ m の凍結切片をPBS中に浮遊させた状態で、一次抗体にてインキュベートの後、ABC法により染色した。抗MAP2モノクローナルマウスIgG抗体(5F9)の免疫組織化学においては脳の神経細胞および樹状突起が明瞭に染色され、過去の報告と良く一致した。

抗クラスリンモノクローナルマウスIgM抗体(chc5.9)はウエスタンブロットにおいてスナネズミ脳ホモジネート中クラスリンと思われる170 kDのバンドと特異的に反応し、またウシ精製クラスリンと反応した。免疫組織化学において脳組織が全体的に染色されたが、白質は染色されなかった。また、染色はウシ精製クラスリンにより吸収された。

3: 脳虚血後の変化

CA1においてMAP2染色は脳虚血2日後まで明らかな低下を示さず、4日後、細胞死と共に染色が消失した。CA2においては虚血1時間後に既に染色性の減弱がみられ、reactive change に対応した変化を示した。

クラスリン免疫染色は、CA1において錐体細胞層の染色が虚血3-6時間後から増強し始め、12-24時間後に最

も明瞭になった。虚血後のクラスリン免疫反応性の増強は脳皮質や海馬CA3, 歯状回では観察されず, 遅延細胞死を示すCA1に特異的であった。

【総括】

当初我々は, グルタミン酸過剰放出に伴うカルシウム流入によりカルパインが活性化するという Lynchらの仮説に
もとずき, 虚血後早期にMAP2等の構造蛋白が破壊される事が細胞死のメカニズムであり, 構造蛋白を欠いたニューロ
ンが生存できる日数が遅延時間を決めていると予想していた。予測に反し, MAP2の消失はCA1神経細胞死とほぼ同
時であり, MAP2は遅延細胞死のカスケード進行に関わるというより細胞死の結果として消失すると考えられる。虚血
直後のMAP2の変化を記述した北川らの報告(1989)においても, 直接細胞死を引き起す30分虚血ではCA1のMAP2
染色は消失するが, 遅延細胞死を引き起す5分虚血直後では消失していない。5分間の一過性虚血直後においてカルパ
イン活性は細胞骨格を破壊するほどではなく, より遅い時間経過で遅延細胞死に寄与する事が示唆された。

クラスリンの変化は遅延細胞死に至るカスケードの中期の現象としてとらえることができ, 虚血再開通時の早期の現
象と, MAP2消失のような最終的な変性を引き起こすメカニズムとの橋渡しと考えると興味深い。クラスリンは小胞
形成を担うので, その異常は膜の循環を停滞させる事が考えられる。5分間脳血1-2日後のCA1において小胞体の異
常な重層が報告されているが, このような細胞内膜系の変化にクラスリンがかかわっている可能性がある。

論文審査の結果の要旨

実験的脳虚血において見られる海馬CA1ニューロンの細胞死について, 遅延時間後に細胞死に至る過程は未だ充分
明らかにされていない。本研究では, 5分間両側総頸動脈を閉塞することにより負荷した一過性脳虚血後のスナネズミ
脳組織における, 細胞死に先行した構造蛋白の変化の局在を免疫組織化学法により明らかにしようとしたものである。

一過性脳虚血後, 早期に変性を示す subiculum - CA1ニューロンのMAP2免疫染色は直ちに消失したが, 遅延細胞
死を示すCA1では2日経過しても減弱がみられず, 細胞死を示した4日後になって初めて著しい消失を示した。遅延
細胞死が生じる条件においてもCA1では虚血後早期にはMAP2は残存しており, 虚血直後の一時的なカルシウム流入
とカルパイン活性化だけではCA1における遅延細胞死は説明できない事が示された。

また, クラスリンの免疫染色性の漸増がCA1ニューロンに特異的に見られ, これは5分虚血に耐性の他のニューロン
ではみられなかった。CA1遅延細胞死をペントバルビタール処理により抑制した条件下では, クラスリンの変化は見
られず, この変化が細胞死の機序と結び付いている可能性が示唆された。以上の所見は遅延細胞死のメカニズムを研究
するうえで新たな手掛かりとなる知見として意義があり, 学位に値すると考える。