



Title	Delayed neuronal death in ischemic hippocampus involves stimulation of protein tyrosine phosphorylation
Author(s)	大槻, 俊輔
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40961
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"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉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	大槻俊輔
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 13370 号
学位授与年月日	平成 9 年 8 月 4 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	Delayed neuronal death in ischemic hippocampus involves stimulation of protein tyrosine phosphorylation (虚血性海馬神経細胞死に蛋白質チロシン残基リン酸化が関与する)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 谷口 直之 教授 柳原 武彦

論文内容の要旨

【目的】 脳は虚血に対して極めて脆弱であるが、神経細胞、特に海馬 CA1細胞は最も脆弱で、短時間の虚血侵襲によって数日後に死に至る。虚血再灌流早期にグルタミン酸がシナプス間隙に過剰分泌され、受容体の過興奮に伴い細胞内カルシウム濃度の異常上昇をきたし、何らかの細胞内情報伝達機構を介して再灌流後晩発性に細胞死に至ると言われている。蛋白質チロシン残基リン酸化は、一般には細胞の増殖分化に関与し、外界刺激情報を細胞内へ伝達する役割を担っている。本研究では、逆に虚血による遅発性神経細胞死へのシグナル伝達系として蛋白質のチロシンリン酸化が関与しているか否か検討した。

【方法ならびに成績】 1. 虚血性神経細胞死 (1)成熟雄性砂ネズミを対象とした。虚血は両側総頸動脈を一過性に動脈瘤クリップで2分または5分間閉塞して作成した。再灌流後脳を摘出、アルコール酢酸固定、ニッスル染色に供した。5分虚血後2日までは海馬、大脳皮質とも神経細胞死を認めなかったが、3から4日後には海馬 CA1-2領域に限局して神経細胞が死滅していた。2分虚血後、神経細胞死は海馬、大脳皮質とも認めなかった。(2)虚血/再灌流後、海馬及び大脳皮質を摘出、蛋白電気泳動後、抗リン酸化チロシン抗体を用い immunoblot に供した。(2-i)虚血時間に関わらず再灌流後3から15分にかけて、一過性に分子量42kDaの蛋白質のチロシンリン酸化の亢進が海馬および大脳皮質とも普遍的に観察された。(2-ii) 5分虚血3から24時間後に5種類の特定蛋白質(分子量各々160, 115, 102, 92, 85kDa)のチロシン残基リン酸化が海馬においてのみ亢進した。大脳皮質ではこの変化を認めなかった。またこの遅発性のリン酸化亢進は2分虚血後にはどの部位にも観察されなかった。(3)5分虚血6時間後に、脳をZamboni液で灌流固定、免疫組織化学法にてリン酸化チロシンの局在を検討した。リン酸化チロシンは全ての神経細胞に存在した。虚血後海馬 CA1 と CA3 細胞に著明な染色性の増加を認めたが、他の細胞には染色性の変化を認めなかった。(4)5分虚血/再灌流6時間後、海馬および大脳皮質の tyrosine kinase 活性を poly (GluNa, Tyr) (4 : 1) のリン酸化能によって、tyrosine phosphatase 活性を *o*-phospho-L-tyrosine の脱リン酸化能によって測定した。虚血後 phosphatase 活性は海馬、大脳皮質ともに増減を認めなかったが、kinase 活性は海馬においてのみ有意に増加した。(5)脳の主要 tyrosine kinase の一つ pp60c-src を免疫沈降し、外因性に添加した Enolase のリン酸化力価を用いて pp60c-src の

kinase 活性を検討した。虚血前後で pp60c-src 抗原量は変化しなかったが、虚血後海馬での kinase 活性は有意に増加した。(6) pp60c-src を含めた tyrosine kinase 活性を特異的に阻害する radicicol は全身投与後 3 から 8 時間にかけて可逆的に脳蛋白質のチロシンリン酸化および pp60c-src の tyrosine kinase 活性を有意に抑制できた。5 分虚血再灌流 15 分後に radicicol を 0, 2, 5, 10 mg/kg 全身投与した。radicicol は容量依存性に 5 分虚血後の遅発性チロシンリン酸化増加を抑制し、かつ海馬 CA1 領域の虚血性細胞死 (生存神経細胞密度: radicicol 10 mg/kg 投与群 143 ± 20 /mm; 対照無投与群 8 ± 3 /mm) を有意に ($p < 0.05$) 抑制した。II. カイニン酸誘導性神経細胞死 (1) 成熟雄性 Sprague-Dawley ラットに対し、グルタミン酸 analog のカイニン酸を全身投与 (12 mg/kg, i.p.) した。ニッスル染色上、投与後 16 から 24 時間後に海馬 CA1 および CA3 領域の細胞死が認められた。カイニン酸投与後 4 から 8 時間に海馬において、虚血時に増加するリン酸化蛋白質と同じ分子量の 5 種類の蛋白質群 (160, 115, 102, 92, 85kDa) のチロシン残基リン酸化が亢進した。大脳皮質ではこの変化を認めなかった。(2) カイニン酸投与 45 分後に radicicol (10 mg/kg) を投与すると海馬のチロシンリン酸化亢進およびカイニン酸誘導性神経細胞死 (海馬 CA1 細胞死亡率: radicicol 投与時 50%; 対照非投与時 90%) を有意に ($p < 0.05$) 抑制した。

【総括】 (1) 砂ネズミー過性前脳虚血およびグルタミン酸 analog のカイニン酸投与により海馬に選択的にかつ遅発的に神経細胞死が誘導された。(2) 海馬においてのみ特定蛋白質のチロシン残基リン酸化の亢進が、虚血性およびカイニン酸性細胞死に先立って観察された。(3) 虚血後海馬において pp60c-src を含めた tyrosine kinase の活性化が認められた。(4) リン酸化チロシンは神経細胞に局在し、虚血後海馬 CA1 および CA3 細胞にのみ増加を認めた。(5) 侵襲負荷後遅発性に活性化された pp60c-src を含めた tyrosine kinase 群を阻害することにより、虚血性およびカイニン酸性海馬神経細胞死が抑制された。(6) 以上、海馬における虚血性神経細胞死において、グルタミン酸受容体の過興奮を介した tyrosine kinase 系活性化が“死へのシグナル伝達系”として働いていることが初めて示された。

論文審査の結果の要旨

ねたきりや老年期の痴呆の最も大きな原因疾患である脳卒中、その脳梗塞に代表される虚血性脳血管障害の本体は脳血管の閉塞による脳虚血である。神経細胞は活発なエネルギー代謝を営むが、少ない予備エネルギー源しか有さないため、虚血に対して脆弱である。とりわけ海馬の CA1 神経細胞が最も脆弱な神経細胞であり、虚血侵襲後数日後に細胞死に至る。この遅発性神経細胞死は、単にエネルギー不全による壊死とその後の修復応答で説明できるものではなく、虚血ストレスの多寡に応じた、神経細胞のダイナミックな応答現象が発現していると考えられている。本研究はこの細胞応答としての細胞内情報伝達機構を検討し、その意義を解明せんとした。

本論文では、脳虚血/再灌流及びグルタミン酸アナログ負荷による海馬神経細胞死に、pp60c-src を含むチロシンキナーゼ系の活性化が伴い、特定蛋白質のチロシン残基リン酸化の亢進が海馬に選択的な遅発性神経細胞死を誘導することを報告している。

但し、虚血後活性化されるチロシンキナーゼ群、虚血後亢進するチロシン残基リン酸化蛋白質群の精製同定を施行していない。また今回観察された複数個のチロシン残基リン酸化蛋白質すべてが細胞死を誘導するとは考えにくく、どのリン酸化蛋白質が細胞死に直接関与しているかは明確にはしていない。

しかしながら、本論文は海馬における虚血性神経細胞死において、チロシンキナーゼが“死へのシグナル伝達系”として働いていることを成熟脳、in vivo 神経細胞で初めて示した。また、一般的には脳虚血超急性期に生じる病態を阻止しうるグルタミン酸拮抗剤やカルシウム拮抗剤は、虚血‘前’投与では脳組織障害に対して有効であっても、虚血‘後’投与では時既に遅く無効であり、実地臨床への適用は極めて困難である。しかし、虚血侵襲発症後であっても遅発的に活性化される“死に至る情報伝達系”をチロシンキナーゼ阻害剤治療により中断することができれば、細胞死を阻止できることを示した点で、脳卒中治療学上新たなる治療戦略の出現の可能性を強く示唆させる論文でもある。以上、本論文は博士 (医学) の学位授与に値するものと考えられる。