



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | DNA Scission After Focal Brain Ischemia.<br>Temporal Differences in Two Species.  |
| Author(s)    | 多賀谷, 昌史   |
| Citation     | 大阪大学, 2000, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/42944">https://hdl.handle.net/11094/42944</a>   |
| 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           | 多賀谷 昌史  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)   |
| 学 位 記 番 号     | 第 15092 号   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 12 年 2 月 29 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     | DNA Scission After Focal Brain Ischemia. Temporal Differences in Two Species<br>(局所脳虚血後の DNA 切断。サルおよびラットを用いたその詳細な経時変化の検討) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 堀 正二<br>(副査)<br>教 授 吉峰 俊樹 教 授 武田 雅俊   |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目的〕

脳虚血病態の解析のため、ラット・砂ネズミ・マウスなどのげっ歯類を対象とした実験的脳虚血モデルが、その取り扱いやすさや経済性などの観点から広く用いられ、多くの知見が積み重ねられてきた。一方、数年前よりヒト虚血性脳血管障害の超急性期治療が注目されるようになり（ブレインアタックの時代）、げっ歯類脳虚血モデルだけでなく、脳の形態や血管構築がヒトに近似するサルなどの霊長類を対象とした脳虚血モデルを用いた研究の重要性が、臨床近似性という観点から再認識されるようになった。近年、脳虚血後の神経細胞死との関連で DNA 切断が注目され、動物モデルではげっ歯類を対象とした研究により種々の報告がみられる。本研究では、ラット局所脳虚血再灌流において報告されている DNA 切断が霊長類(サル)を対象とした局所脳虚血再灌流モデルでもみられるかどうかを確認した。さらに、局所脳虚血再灌流における DNA 切断の程度と分布の詳細な経時変化を同様の時間経過プロトコールに従い、3 種類の異なる DNA 切断検出法を用いてサルおよびラットの異なる 2 種で比較検討した。

### 〔対象と方法〕

成熟雄性サル (Papio anubis/cynocephalus、体重 9-11 Kg) ならびに成熟雄性ウィスターラット (体重 270-310 g) を実験に使用し、局所脳虚血再灌流を作成した。

サル局所虚血再灌流 (n=16) は、del Zoppo らの方法に従い、バルーンを inflation あるいは deflation することにより、右中大脳動脈血流を穿通枝を分岐する直前で遮断再開させ作成した。正常コントロール、偽手術、2 時間虚血、3 時間虚血 + 1 時間再灌流、3 時間虚血 + 4 時間再灌流、3 時間虚血 + 24 時間再灌流の 6 群に分け、冷却した生理食塩水にて脳を経心的に灌流後、凍結切片を作成し、組織学的検討を行った。ラット局所脳虚血再灌流 (n=19) は、Zea-Longa らの方法に従い右外頸動脈より右内頸動脈に沿ってナイロン糸を挿入し、中大脳動脈血流を遮断再開させ作成した。サル脳虚血と同様の時間プロトコールに従い 6 群に分け、同様の検討を行った。

DNA 切断の検出には、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) または DNA polymerase I またはその Klenow fragment の 3 つの異なる酵素により digoxigenin で標識した dUTP を凍結切片上で反応させ、HRP 標識マ

たは FITC 標識した抗 digoxigenin 抗体を用い免疫組織化学的手法により可視化した。画像解析システムにより、DNA 切断のみられた細胞 (dUTP<sup>+</sup> 細胞) の数・密度・分布を経時的に求めた。また、dUTP<sup>+</sup> 細胞の種類を同定するため、神経細胞のマーカーとして microtubule-associated protein 2 (MAP2)、アストログリアのマーカーとして glial fibrillary acidic protein (GFAP)、微小血管のマーカーとして type IV collagen、顆粒球のマーカーとして myeloperoxidase (MPO) を用い、dUTP との 2 重染色を行った。

#### 〔成績〕

##### 1) サルおよびラット局所脳虚血再灌流における DNA 切断の程度と分布の経時変化

正常コントロールや偽手術ではサルならびにラットとも、dUTP<sup>+</sup> 細胞はほとんどみられなかった。サル局所脳虚血において、2 時間虚血後には虚血側基底核にすでに dUTP<sup>+</sup> 細胞がみられ、その密度は  $48.8 \pm 10.3/\text{mm}^2$  であった。再灌流とともに、基底核にみられる dUTP<sup>+</sup> 細胞の密度は増し、3 時間虚血 24 時間再灌流では  $98.2 \pm 12.6/\text{mm}^2$  であった。一方ラット局所脳虚血 2 時間後では、線条体にわずかに dUTP<sup>+</sup> 細胞がみられるのみであった ( $2.4 \pm 0.8/\text{mm}^2$ ) が、3 時間虚血 24 時間再灌流では、dUTP<sup>+</sup> 細胞の密度は  $136.8 \pm 69.0/\text{mm}^2$  と顕著に増加していた。以上より、ラット局所脳虚血だけでなくサル局所脳虚血再灌流モデルにおいても、ラットと比べその分布や経時変化に差がみられるものの、DNA 切断が観察されることが明らかとなった。すなわち、サル局所脳虚血モデルではラットモデルに比べ、虚血早期より DNA 切断がみられ、その密度ならびに領域が再灌流の時間経過とともに一層進展することが示された。

##### 2) DNA 切断のみられる細胞の同定

各種細胞マーカーを利用して同定された dUTP<sup>+</sup> 細胞は、80% 以上が神経細胞であった。虚血早期 (2h) より dUTP<sup>+</sup> 細胞がみられるサル虚血側基底核の一部において、MAP2 陽性かつ dUTP<sup>+</sup> の生存神経細胞と MAP2 陽性かつ dUTP<sup>+</sup> (虚血に対する DNA 損傷が明らかにみられる) 神経細胞の共存する領域が観察され、可逆性のある軽微な変化のみが起きている領域である可能性が示唆された。さらに虚血再灌流 24 時間では虚血早期と異なり、一部の type IV collagen 陽性の微小血管において dUTP<sup>+</sup> 細胞がみられるとともに、dUTP<sup>+</sup> 細胞の近傍には GFAP 陽性の反応性アストログリアや MPO 陽性の顆粒球がみられるようになった。

##### 3) 3 つの酵素による DNA 切断検出の比較

サルおよびラット局所脳虚血再灌流のいずれにおいても、TdT、DNA polymerase I および Klenow fragment の 3 つの酵素を用いて DNA 切断 (dUTP<sup>+</sup> 細胞) が検出された。いずれの脳虚血動物でも、DNA polymerase I ならびに Klenow fragment で検出される領域は、TdT により検出される領域より広いことが示された。すなわち、方法を組み合わせることにより single nick などの軽微な DNA 損傷から複数の断片に切断された重度のものまでとらえることが可能であると考えられた。

#### 〔総括〕

1. サル局所脳虚血再灌流における DNA 切断 (dUTP<sup>+</sup> 細胞) の分布と経時変化をはじめて明らかにした。
2. サル局所脳虚血再灌流では、ラットに比べ虚血早期からすでに DNA 切断のある細胞 (神経細胞) がみられる一方で、可逆性のある軽微な DNA 損傷のみが起きている領域が存在することが示唆された。
3. TdT・DNA polymerase I・Klenow fragment の酵素を用いた 3 種類の 방법으로検討することにより、サルおよびラット局所脳虚血再灌流モデルにおいて経時変化は異なるものの、DNA 損傷の軽微なものから重度のものまでが存在することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

脳虚血後の神経細胞死との関連で注目され、ラットなどのげっ歯類での報告が多数みられる DNA 切断について、霊長類での報告はない。本研究では、ヒト脳梗塞に近似したサル局所脳虚血再灌流において、DNA 切断がみられるかどうか検討した。さらに、サルとラットの 2 種間には、脳形態などの解剖学的な差があり、DNA 切断の分布や経時変化

が異なることが想定される。そこで、サルおよびラットの局所脳虚血再灌流モデルを対象とし、DNA 切断の進展を詳細に比較解析した。

その結果、ヒト脳梗塞に近似するサル局所脳虚血モデルにおいても、DNA 切断がみられることが明らかとなった。2 種間の比較では、ラットに比べサルにおいて DNA 切断が虚血早期より観察された。

以上、本研究は霊長類の局所脳虚血において DNA 切断がみられることをはじめて確認し、脳虚血再灌流後の神経細胞死に関わる DNA 切断の進展がサルおよびラットの 2 種間で異なることを明らかにした。げっ歯類脳虚血モデルから得られた研究成果を、ヒト脳梗塞の治療開発に応用する際にみられる種差の問題を明確にした重要な研究と位置づけられ、学位の授与に値するものと考えられた。