



Title	Synergistic induction of HSP40 and HSC70 in the mouse hippocampal neurons after cerebral ischemia and ischemic tolerance in gerbil hippocampus
Author(s)	田中, 茂
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43680
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、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	田中 茂
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第16812号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Synergistic induction of HSP40 and HSC70 in the mouse hippocampal neurons after cerebral ischemia and ischemic tolerance in gerbil hippocampus (マウス一過性前脳虚血後海馬と砂ネズミ虚血耐性獲得海馬に、協調して発現する HSP40と HSC70の動態)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二
	(副査) 教授 吉峰 俊樹 教授 佐古田三郎

論文内容の要旨

【目的】

虚血海馬では遅発性神経細胞死に関連した遺伝子、神経細胞生存に関わる遺伝子発現など様々な遺伝子発現を伴うストレス応答が知られている。さらに、虚血耐性現象に関連し神経細胞に保護的に働く遺伝子発現も知られている。しかしながら、虚血性神経細胞死や虚血耐性現象に関わる分子メカニズムについて十分には理解されていない。これらの機構を解明する手振りとして虚血に応答する遺伝子を検索することは重要である。今回、マウス一過性前脳虚血モデルと Differential Display 法を用い、虚血に関連した遺伝子として *hsp40*を同定した。HSP40はストレス環境下で HSC70と結合することにより、HSC70の分子シャペロンとしての機能を約 7 倍にまで増強することからコ・シャペロンと呼ばれている。本研究では脳虚血病態における HSP40の遺伝子・蛋白質の発現、挙動を HSC70と共に検討し、神経細胞の選択的脆弱性、虚血耐性現象への HSP40の関与を明らかにすることを目的とした。

【方法】

- 1) 動物モデル：海馬 CA4に神経細胞死、CA1の一部に遅発性神経細胞死を再現性よく作成できるマウス両側総頸動脈一過性閉塞モデルを用いた。雄性 C57BL/6マウス (25~30g) をハロセン麻酔下に両側総頸動脈を15分間クリップした後再灌流させた。虚血負荷中、負荷後 1 時間は直腸温を37°Cに保ち、翌日まで加温箱にて37°Cで保溫した。
- 2) 差異遺伝子の検索：非虚血・15分虚血負荷後 4 時間、24時間の海馬由来の cDNA に対し non-RI Differential Display 法により差異遺伝子を検索し、虚血・再灌流により誘導される候補遺伝子断片を得た。これをプローブとしてマウス脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、全長1211bp の cDNA を単離した。この遺伝子は *mouse hsp40* であった。
- 3) マウス虚血脳における遺伝子・蛋白発現：遺伝子発現を経時的に観察するため、*hsp40*をプローブとして用いた Northern blot で検討し、組織での発現は非虚血及び虚血再灌流 4 時間後の新鮮凍結切片を用いた in situ hybridization で観察した。HSP40蛋白発現はマウス虚血海馬ホモジネートを用いた Western blot で特異抗体を用いて解析した。組織での蛋白発現は非虚血及び虚血再灌流後 2 日後の切片を用いた免疫組織化学で検討した。さらに、HSC70蛋白との共存について細胞レベルで検討するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討を加えた。
- 4) 砂ネズミ脳虚血耐性モデルでの検討：砂ネズミの両側総頸動脈を 5 分間閉塞すると海馬 CA1領域に遅発性神経

細胞死を生じるが、5分虚血の4日前にあらかじめ2分間の軽度の虚血を加えると、CA1領域の神経細胞は虚血耐性を獲得し、神経細胞死を免れる。この砂ネズミの前脳虚血モデルを用いてHSP40とHSC70の蛋白発現を虚血耐性現象との関連で検討した。

【成績】

- i) マウス虚血海馬における *hsp40* 遺伝子発現：Northern blotによる検討では、*mouse hsp40*は非虚血時では殆ど発現は見られず、虚血再灌流4時間後に強い発現のピークを観察し、以後漸減し感度以下に復した。*mouse hsp40*遺伝子をプローブとして用いた *in situ* hybridizationによる検討では、虚血再灌流4時間後の海馬において *hsp40*は海馬CA1～3、歯状回の神経細胞で発現の増強が観察された。
- ii) マウス虚血海馬における HSP40・HSC70蛋白発現：抗HSP40抗体を用いたWestern blotによる検討では、非虚血海馬においてもHSP40はわずかながら発現を認めた。しかしながら、虚血再灌流1日後よりHSP40は増加し、2日後から7日後まで非虚血群と比較し有意な発現の増加を認め、以後漸減した。また、同時相でのHSC70蛋白発現を、抗HSC70抗体を用いて検討しHSP40蛋白発現と比較した。HSC70は非虚血群と比較し、虚血負荷後1日後から4日後まで有意な増加がみられ、HSP40と同様の傾向が観察された。マウス虚血海馬切片を用いた免疫組織化学の検討では、HSP40は虚血2日後の海馬で他の部位と比較してCA3に強い発現を認め、HSC70も同様の組織分布を示した。HSP40・HSC70は共に虚血海馬の神経細胞に発現し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討においても、同一神経細胞での発現が観察された。
- iii) 砂ネズミ虚血耐性海馬における HSP40・HSC70蛋白発現：海馬の選択的脆弱性部位でのHSP40蛋白発現を検討するために、砂ネズミの5分間の両側総頸動脈閉塞による前脳虚血モデルを用いた検討を加えた。Western Blotを用いた解析では、HSP40・HSC70は共に虚血再灌流1日～2日に虚血海馬での発現誘導を認めた。免疫組織化学ではHSP40・HSC70は共に2分もしくは5分虚血負荷1日後の海馬CA3に発現し、虚血に脆弱なCA1には発現は見られなかった。さらに5分虚血負荷の4日前にあらかじめ2分間の軽度の虚血を加えた群では、虚血耐性を獲得したCA1神経細胞にHSP40・HSC70蛋白発現が認められた。

【総括】

- 1) マウス虚血海馬でHSP40の蛋白・遺伝子発現を初めて観察した。
- 2) HSP40は虚血海馬でHSC70と協調して発現し、特に虚血耐性を獲得した神経細胞での発現が明らかとなった。
- 3) HSP40は虚血ストレス下で、HSC70の分子シャペロンとしての機能を増強し、神経細胞生存に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では脳虚血病態における神経細胞の選択的脆弱性、虚血耐性現象へのストレス蛋白の関与を明らかにすることを目的とし、ストレス蛋白の中でもHSP40の遺伝子・蛋白質発現、挙動をHSC70と共に詳細に検討したものである。その結果、HSP40は虚血海馬でHSC70と協調して発現し、特に虚血耐性を獲得した神経細胞での発現が明らかとなった。すなわち、HSP40は虚血ストレス下で、HSC70の分子シャペロンとしての機能を増強し、神経細胞生存に関与する可能性が示唆された。

以上、本研究では虚血海馬組織でHSP40の蛋白・遺伝子発現をHSC70の発現と共に初めて詳細に解析した独創的かつ重要な研究で、学位の授与に値するものと考えられた。