

Title	Nuclear Factor-Kappa B Decoy Attenuates Neuronal Damage after Global Brain Ischemia : A Future Strategy for Brain Protection during Circulatory Arrest
Author(s)	上野, 高義
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43685
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	うえの たかよし 上野 高 義
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16510 号
学位授与年月日	平成13年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Nuclear Factor-Kappa B Decoy Attenuates Neuronal Damage after Global Brain Ischemia: A Future Strategy for Brain Protection during Circulatory Arrest (Nuclear Factor Kappa B Decoy による虚血後神経細胞障害の抑制—循環停止中の新しい脳保護法開発に関する基礎的研究—)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 暉 (副査) 教授 吉峰 俊樹 教授 金田 安史

論文内容の要旨

【背景・目的】

心臓血管外科領域では、低体温循環停止法は大動脈弓部手術や新生児開心術などの補助手段として有用であるが、循環停止後の脳障害の問題は、重要な術後合併症として未だ充分解決されていない。そのうえ、超低体温により出血や免疫能低下などの危険性が増加することが知られており、低温の効果だけに頼らない、循環停止中の新しい脳保護法の開発が望まれる。最近、脳虚血後に nuclear factor kappa B (NF- κ B) が神経細胞障害のシグナルとして活性化されることが報告された。我々は、心臓において NF- κ B の虚血再灌流障害への関与と NF- κ B decoy による NF- κ B シグナルの抑制について実験的に証明した。そこで、NF- κ B decoy 投与により NF- κ B が関与する虚血後神経細胞障害が抑制されると仮定し、全脳虚血中に核酸医薬として NF- κ B decoy を経頸動脈的に脳導入し、その神経細胞保護効果を検討した。

【方法】

350gの雄ラットを用い、全脳虚血モデル(4 vessel occlusion model)を作成した。開胸後大動脈弓部を露出し、腕頭動脈、左総頸動脈、左鎖骨下動脈を剥離し、右総頸動脈に cannulation を行なった。動脈をクランプし全脳の血流を遮断後、すぐに右総頸動脈から薬液を注入、20分の全脳虚血後に脳を再灌流した。NF- κ B decoy の導入効率を高めるため、HVJ-liposome 法を用いた。[実験1: decoy の脳実質内への導入の確認] FITC にてラベルした NF- κ B decoy を注入し、再灌流1時間後に犠牲死させ凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡にて脳を観察した。[実験2: decoy による NF- κ B シグナル抑制に関する検討] 虚血中、NF- κ B decoy を注入した群(NF decoy 群: n=5)と、control 群として scrambled decoy を注入した群(S decoy 群: n=5)とを作成し、全脳虚血再灌流から1時間後に脳を摘出、海馬組織20mgを採取しRNAを抽出した。

RT-PCR を施行後 real time PCR 法にて TNF- α 、IL1 β 、ICAM1 の mRNA 量を定量し比較検討した。[実験3: decoy による神経細胞障害抑制に関する組織学的検討] 両群(n=10)において、全脳虚血再灌流から1週間後に脳を摘出、凍結切片を作成し、TUNEL 染色および microtubule associated protein2 に対する免疫染色を行ない、海馬 CA1 領域の神経細胞の DNA damage と細胞骨格の障害を組織学的に観察し比較検討した。

【結果】

実験1にて、FITC の蛍光が、動脈内皮細胞のみならず海馬神経細胞、大脳皮質神経細胞の核に主に観察され、経

総頸動脈的に NF- κ B decoy が脳実質内に導入されたことが確認された。実験 2 において、TNF- α mRNA 発現量は、S decoy 群では正常ラットに比べ 12.5 ± 2.2 倍が検出されたのに対し、NF decoy 群では正常ラットに比べ 2.8 ± 1.1 倍の mRNA が検出され、有意に NF decoy 群で抑制された ($P=0.01$)。IL-1 β および ICAM-1 mRNA 発現量は、NF decoy 群ではそれぞれ 4.7 ± 1.7 倍、 3.5 ± 0.5 倍、S decoy 群ではそれぞれ 14.0 ± 7.5 倍、 25.7 ± 12.0 倍であり、有意に NF decoy 群で低値であった ($P=0.01$ 、 $P=0.01$)。従って、NF- κ B decoy は、全脳虚血後の海馬領域において NF- κ B シグナルを抑制したことが考えられた。実験 3 において、NF decoy 群では、TUNEL-positive neuron は $11.3 \pm 13.1\%$ と S decoy 群 ($40.3 \pm 18.0\%$) に比べ有意に少なかった ($P=0.003$)。MAP2-positive neuron は、NF decoy 群では 96.4 ± 33.0 cells/500 μ m length と S decoy group (50.6 ± 23.8 cells/500 μ m length) に比べ有意に高値であった ($P=0.005$)。

【総括】

- 1) ラット全脳虚血モデルにおいて、虚血中に NF- κ B decoy を経動脈的に投与し脳実質内に導入可能であった。
- 2) 全脳虚血後 1 時間において、NF- κ B decoy 投与群では scrambled decoy 投与群に比べ有意に海馬 CA1 領域の TNF- α 、IL1 β 、ICAM1 の mRNA 発現量が低下した。
- 3) 全脳虚血後一週間において、NF- κ B decoy 投与群では、scrambled decoy 投与群に比べ有意に海馬 CA1 領域の TUNEL 陽性細胞は減少し、MAP2 陽性細胞は増加し、神経細胞障害は抑制されたと考えられた。
- 4) 以上より、NF- κ B の虚血後神経細胞障害への関与とそれに対する decoy の保護効果が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、in vivo のモデルにおいて、経動脈的投与により NF- κ B decoy を脳実質内に導入可能であることを証明し、導入された NF- κ B decoy が虚血障害関連遺伝子の発現量を抑制することを real time-PCR 法を用いて定量的に評価し、脳神経細胞においても NF- κ B decoy が NF- κ B のシグナルを抑制することを示した。さらに、NF- κ B decoy を投与することで、海馬 CA1 領域の神経細胞障害が抑制されることを示し、NF- κ B decoy の虚血後神経細胞障害抑制効果を示した。

これまで、血液脳関門の存在から、経動脈的に虚血後脳神経細胞障害を抑制すると考えられる薬物を脳実質に導入することは困難であるとされており、本論文において、効率的に薬物が神経細胞へ導入可能であることを証明できたことは、非常に意義深いと考えられる。また、脳神経細胞において、NF- κ B のシグナルを decoy strategy により調節可能であり、虚血後神経細胞障害が NF- κ B decoy により抑制可能であることを証明することで、核酸医薬としての NF- κ B decoy の臨床応用に関し非常に重要な基礎を築いた論文であると考えられ、さらに、循環停止中の脳保護だけでなく他の分野においても応用可能な資料を提供していると考えられ、学位論文に値すると考えられる。