Osaka University Knowledge Archive

Title	Hypothermic treatment restores glucose regulated protein 78 (GRP78) expression in ischemic brain
Author(s)	青木, 正之
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43786
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【15】

氏　　名	青　木　正　之（あおき まさゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16633　号
学位授与年月日	平成14年1月31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	Hypothermic treatment restores glucose regulated protein 78 (GRP78) expression in ischemic brain （虚血脳に対する脳低温療法で glucose regulated protein 78（GRP78）遺伝子の発現量が回復する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　杉本　　壽 （副査） 教　授　吉澤　俊樹　　教　授　遠山　正彌

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

頭部外傷や虚血性脳疾患の患者に対する治療では、脳低温療法を施行することで生命予後のみならず機能予後が回復することが知られている。しかしながら、脳低温療法による神経細胞保護作用の詳細なメカニズムについてはいまだ不明な点が多く残されている。今回、脳低温療法によって発現量が変化する遺伝子に注目し、脳低温療法の神経細胞保護作用について検討を加えた。

【方法】

ウレタンの腹腔内投与で麻酔を施行した砂ネズミに対し、両側頸動脈遮断の前脳虚血モデルを使って15分間の脳虚血を施行した。再灌流後に体温を37±0.5度に保つ常温群と34±0.5度に保つ低温群に分け、脳虚血を行わず体温を37±0.5度に保つものを対照群とした。再灌流後6時間の海馬周囲組織を Kluver-Barrera 法で染色した。再灌流後3時間の脳を採取し、海馬とその周囲の組織から RNA を抽出し、Differential Display 法で発現量に差のある遺伝子を検索した。Differential Display 法で発現量に差のあった GRP78遺伝子をプローブに、それぞれの群の海馬組織に in situ hybridization を行った。GRP78遺伝子の発現量の変化を再灌流後3、6、9時間後で比較し、また GRP78の蛋白量の変化を再灌流後3、6、12時間後で比較した。GRP78遺伝子の全長を含む遺伝子断片をアデノウイルスに組み込んで海馬培養細胞に感染させ、H202による酸化ストレスへの耐性を検討した。酸化ストレスを与えた後、対照細胞と GRP78遺伝子を過剰発現させた細胞の細胞中のカルシウム濃度を測定した。

【成績】

再灌流後6時間の海馬周囲組織を Kluver-Barrera 法で染色したところ、常温群で海馬 CA-1 領域の錐体細胞が傷害されていた。この傷害は、低温群では抑制されていた。Differential Display 法では、特に、対照群で発現している遺伝子で、常温群で発現量が減少し低温群で回復するものを中心に検索を加えたところ、その1つがマウスやヒトの glucose regulated protein 78（GRP78）と相同性が高いのを確認した。Northern blot 法でも、GRP78遺伝子の発現量が常温群で減少し、低温群で回復しているのを確認した。In situ hybridization を行ったところ、常温群で Kluver-Barrera 染色で傷害を認めた海馬 CA-1 領域を中心に GRP78遺伝子の発現の低下を認めた。低温群の CA-1 領域では発現量は回復していた。再灌流後の時間経過でみると、常温群では、GRP78遺伝子の発現量、GRP78蛋白量ともに減少していたが、低温群ではこの減少が抑制されていた。アデノウイルスを感染させた培養細胞に酸化スト

レスを加えたところ、LacZを過剰発現させた対照細胞に対して、GRP78遺伝子を過剰発現させた細胞は明らかに酸化ストレスに対して耐性を獲得していた。酸化ストレスを加えた後に、細胞内カルシウム濃度を測定すると、LacZの対照細胞では時間とともに細胞中のカルシウム濃度が上昇したのに対して、GRP78遺伝子を過剰発現させた培養細胞では細胞中カルシウム濃度の上昇は有為に抑制されていた。

【総括】

虚血再灌流後の脳低温療法において、神経細胞保護作用にglucose regulated protein 78（GRP78）が関与している可能性が示唆された。GRP78はHeat Shock Proteinの一種で、分子シャペロンとして蛋白の合成や分泌の調整に関与している。GRP78の存在下で、酸化ストレス後も細胞内カルシウム濃度の上昇が抑制されていることから、虚血細胞の小胞体におけるカルシウム分泌調整にGRP78が関与することで神経細胞保護作用が得られると考えられた。

論文審査の結果の要旨

重傷頭部外傷患者に対する脳低温療法は、生命予後のみならず機能予後の改善に効果があることが最近報告されている。本研究は、遺伝子発現量の変化を捉えることで、脳低温療法がもつ神経細胞保護作用のメカニズムを解明することを目指したものである。

砂ネズミ前脳虚血モデルにおいて、15分間の虚血再灌流後に常温群で発現量が低下し、低温群で発現量が回復する遺伝子としてGlucose regulated protein 78（GRP78）を見いだした。GRP78は主に海馬錐体細胞に局在していた。GRP78遺伝子は、常温群で時間経過とともに発現量が減少し、タンパク量も同様に減少した。低温群では、この減少は抑制されていた。GRP78遺伝子を培養神経細胞で強制発現させると酸化ストレスに対して耐生を獲得した。このとき、細胞内カルシウム濃度の上昇は抑制されていた。

本研究によって、GRP78の局在が維持されることが脳低温療法の神経細胞保護メカニズムの一つであることが確認された。今後、脳低温療法に変わる新たな治療法の可能性を示したものであり、その臨床的意義は高く学位授与に値するものと認める。