

Title	Delayed phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in the AT1a knock-out mouse striatal neurons during middle cerebral artery occlusion and reperfusion.
Sub Title	AT 1 aノックアウトマウス線条体ニューロンにおける中大動脈閉塞再灌流時のp38MAPKリン酸化の遅延
Author	服部, 英典(Hattori, Hidenori)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.2 (2003. 6) ,p.14-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030602-0014

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Delayed phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in the AT1a knock-out mouse striatal neurons during middle cerebral artery occlusion and reperfusion.

(AT1aノックアウトマウス線条体ニューロンにおける中大脳動脈閉塞再灌流時のp38MAPKリン酸化の遅延)

服 部 英 典

内容の要旨

臨床の間では血栓溶解療法など一度閉塞した脳血管の再開通を目指す治療が広がりつつある。一方、脳虚血再灌流にみられる遅発性神経細胞死のメカニズムの解明が治療の面からも求められている。脳虚血再灌流後に活性化（リン酸化）されるmitogen activated protein kinase (MAPK) ファミリーはextracellular signal-regulated kinase (ERK) -1/2、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38MAPK (p38) の3つが知られている。特にp38のリン酸化阻害薬の投与で虚血領域の縮小したすという報告もあり、そのリン酸化の上流シグナルの解明は治療法開発に貢献すると考えられる。

従来、脳虚血再灌流時にはN-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターからSrc、proline-rich/Ca²⁺-activated tyrosine kinase (Pyk-2) を介してp38のリン酸化を来たと考えられていたが、心筋細胞・尿管細胞などではアンギオテンシンⅡのレセプターであるAT1aからSrcなどを介してp38のリン酸化を来すという報告が多数ある。そこで脳虚血再灌流時にもAT1aを介してp38のリン酸化が起こるかを検討した。

まず、AT1aノックアウトマウス (AT1aKO) とC57/B6マウス (C57/B6) を用いて中大脳動脈閉塞再灌流モデルを作成し、両群線条体におけるp38およびその上下流の経時変化をウェスタンブロット (WB) 及び免疫染色法を用いて比較検討した。

リン酸化Pyk-2は偽手術も含めて再灌流後71時間までWBにより検出されマウス間で違いはなかった。一方、リン酸化p38はAT1aKOでは再灌流後5時間、C57/B6では同2時間のみ検出された。免疫組織学的検討でもリン酸化p38はC57/B6で再灌流2時間後の虚血側線条体神経細胞で陽性となり、同時期のAT1aKOでは陽性細胞はほとんど認めなかった。一方、両マウスで再灌流71時間後をピークにリン酸化p38陽性のグリア様細胞が出現し、レクチンとの二重染色、およびBrd-U腹腔内投与マウスにおけるBrd-Uとの二重染色により、この細胞がミクログリアであり、かつ増殖していることを確認した。また、直接遅発性神経細胞死にかかわるcaspase-9の活性化の時間的経過および、再灌流23時間・71時間後のTUNEL陽性細胞数は両マウスに相違を認めなかった。

以上よりAT1aKOでは脳虚血再灌流時のp38リン酸化が遅延すること、両マウス虚血線条体に再灌流71時間後、リン酸化p38陽性の増殖中のミクログリアが出現すること、AT1aKOにおけるp38リン酸化の遅延はその下流のcaspase-9の活性化、遅発性神経細胞死の時間的進行には影響を与えないことが明らかになった。今後、AT1aKOにおけるp38リン酸化の機構の解明を更に進めることが、脳虚血再灌流時の遅発性神経細胞死の阻止にむけて重要な情報を提供すると考えられた。

論文審査の要旨

ラクナ脳梗塞の数とAT1の一遺伝子多型 (A1166C) の間には相関関係があることが知られているが、そのメカニズムについては明らかではない。本研究では虚血再灌流時の遅発性神経細胞死の上流シグナルであるp38リン酸化の経時変化を中心にAT1aノックアウトマウスとC57BL/6マウスでウェスタンブロットおよび免疫染色により比較検討した。その結果、C57BL/6マウスに比べてAT1aノックアウトマウスではp38リン酸化のピークが3時間遅延することが判明したが、遅発性神経細胞死については遅延を認めなかった。また、再灌流後71時間に出現するリン酸化p38陽性細胞がミクログリアであり、細胞分裂していることが判明した。

審査では、まずリン酸化p38陽性の神経細胞が存在する部位について質問がなされた。再灌流モデルでは虚血障害部位が小さくなるがそれでも常に虚血側線条体は傷害されリン酸化p38陽性神経細胞も線条体にあると回答された。また、リン酸化p38陽性細胞の同定には形態のみではなく他の染色などによっても確認する必要があること、免疫染色のデータについてのより定量的測定や、共焦点顕微鏡による検討の必要性が指摘された。ノックアウトマウスの系統、脳血管異常や低血圧による虚血への影響の程度の違いについて質問がなされた。AT1aノックアウトマウスではC57BL/6マウスに比較して約20mmHg血圧が低い、明らかな血管奇形は報告されていないこと、全例レーザードップラー血流計にて同程度の血流低下と再灌流後の血流の増大をある程度定量的に確認しているといえると回答された。また、虚血程度の違いはリン酸化p38の量に影響を与える可能性があるが、時間的な遅延には影響は少ないと考えられると回答された。ミクログリアに注目した理由とその意義について質問がなされた。本研究はAT1aがp38リン酸化に与える影響を調べることが目的であったが、今回得られたp38リン酸化を起こすミクログリアの知見についてもAT1aノックアウトマウスと比較する意義があると回答された。また、ミクログリアは再灌流後71時間にのみ出現しその前後には見られず、細胞分裂を起こしていることから貪食細胞としての役割が予想されると回答された。また、レクチンに染まる細胞をすべてミクログリアとすることには問題があること、抗Brd-U抗体で染色する際に塩酸で核のヒストンを処理すべきであったことが指摘された。

以上より、本研究は虚血性細胞死のメカニズムについて新しい知見を加えたものと評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 福内 靖男

外科学 河瀬 斌 生理学 岡野 栄之

解剖学 仲嶋 一範 病理学 岡田 保典

学力確認担当者：

審査委員長：河瀬 斌

試問日：平成15年2月17日