

氏名(本籍)	山田 潤 (岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 521 号
学位授与日付	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Cell permeable ROS scavengers, Tiron and Tempol, rescue PC12 cell death caused by pyrogallol or hypoxia/reoxygenation
審査委員	(主査) 教授 坂井 昇 (副査) 教授 中島 茂 教授 藤原久義

論文内容の要旨

脳の虚血・再灌流時に発生した活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) が、神経細胞障害の誘因・増悪因子になることが推測されている。ROSは、転写因子の活性化、遺伝子発現、細胞分化といった様々な細胞現象の調節に関与するが、一方、過剰なROSは過酸化反応を惹起し生体にとって有害であり、細胞死を引き起こす。したがって、神経細胞に対するROSの細胞障害メカニズムを明らかにし、これらに対する対処法を検討することは、脳の虚血・再灌流により生じる神経細胞障害に対する新しい治療法開発の端緒となる可能性がある。申請者は、神経細胞に対するROSの細胞障害を軽減しうるradical scavengerの効果に着目し、脳の虚血・再灌流時を想定した際の神経細胞保護効果を検討した。すなわち、生体内で最初に産生されるROSであるsuper oxide radical (O_2^-) による神経細胞死の機序と、これに対するradical scavengerの効果について、神経細胞のモデルとして使用されているラット褐色細胞種PC12細胞を用いて検討を行った。

方法

- 1) PC12細胞に O_2^- 産生物質であるpyrogallol (1,2,3-benzenetriol)を投与した際の O_2^- 産生をhydroethidineの蛍光測定を用いて確認した。また、細胞死については、細胞外へのLDH遊離とTrypan Blue染色を用いて解析した。
- 2) 細胞死の形態学的評価のために、Hoechst33258染色による核の形態変化、透過型電子顕微鏡を用いた観察を行った。また、アポトーシスの主たる実行因子の一つと考えられているカスパーゼについては、特にカスパーゼ-3および9についてウエスタンブロットによりプロセッシングを、人工基質を用いた活性測定により活性化を評価した。さらにカスパーゼ阻害剤の細胞死への効果についても検討を加えた。
- 3) Pyrogallol 投与によるPC12細胞死に対するsuperoxide scavengerであるTiron (4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid)とTempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)の効果をも、LDHアッセイを用いて評価した。
- 4) 低酸素・再酸素化刺激モデルとしてPC12細胞を1% O_2 環境で12時間培養した後、21% O_2 &5% CO_2 の条件に戻した。その際の細胞障害に対するTironとTempolの効果をもLDHアッセイを用いて検討した。

結果

- 1) PC12細胞にpyrogallolを投与することにより、濃度依存的に、投与3時間後をピークとする一過性の O_2^- の産生が認められた。この時、pyrogallolの濃度に依存して細胞死が誘起された。
- 2) Pyrogallol投与によるPC12細胞死では、apoptosisの指標とされる核の断片化やクロマチンの凝集は認められなかった。一方、カスパーゼ活性化を示す所見も得られなかった。また、カスパーゼ阻害剤Z-VAD-FMKとZ-Asp- CH_2 -DCBの投与による細胞死抑制効果は認められなかった。

- 3) TironあるいはTempolは、pyrogallolによるPC12細胞の O_2^- の産生と細胞死を濃度依存的に抑制した。
- 4) 低酸素・再酸素化刺激を加えると、3時間後に約15%のPC12細胞死を認めた。TironあるいはTempolの投与により、低酸素・再酸素化による細胞死は濃度依存的に減少した。

考察

脳虚血・再灌流時のROSでは、まず O_2^- の産生が想定されるため、PC12細胞に O_2^- donorであるpyrogallolを投与し細胞障害を観察した。投与したpyrogallolの濃度依存的に細胞内に O_2^- が産生され、これに伴って細胞死が認められた。この細胞死は、カスパーゼ活性を伴わず、形態学的にもアポトーシスを積極的に示唆する所見を認めなかった。電顕下で観察されたミトコンドリアの膨化、クリステの消失といった所見から、主としてnecrosisの形態をとる細胞死と考えられた。pyrogallol投与時に O_2^- scavengerであるTironを加えることにより、PC12における O_2^- の産生とこれに伴う細胞死が抑制された。同様の結果は別の O_2^- scavengerであるTempolでも認められ、この系での細胞死に対する O_2^- の関与とscavengerの効果が確認された。低酸素・再酸素化の系においても、TironとTempolは濃度依存的に有意に細胞死を減少し、この系における細胞死に対する O_2^- の関与とscavengerの効果が確認された。生体内における O_2^- scavengerであるsuperoxide dismutaseが、一過性脳虚血に対して細胞保護作用を示すという報告もあり、ROS産生経路の上流で産生される O_2^- の除去系を活性化することが脳の虚血（再灌流）時の神経細胞保護にきわめて重要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者 山田 潤は、superoxide radicalの産生により誘導される神経細胞死が主としてカスパーゼを介さないネクロシスであること、superoxide scavengerによってこれらの細胞死が抑制されること、さらには、superoxide scavengerが低酸素・再酸素化刺激における神経細胞死に対しても保護作用を示すことを明らかにした。本研究は、脳虚血時の再還流による細胞障害に新しい知見をもたらし、脳神経外科学、脳卒中学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Cell permeable ROS scavengers, Tiron and Tempol, rescue PC12 cell death caused by pyrogallol or hypoxia/reoxygenation

Neuroscience Research 2003 (in press)