

氏名 (本籍)	山下 健太郎 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 745 号
学位授与日付	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directory neurons
審査委員	(主査) 教授 岩間 亨 (副査) 教授 中島 茂 教授 中川 敏幸

論文内容の要旨

Rho kinase (ROCK) は、これまで主に血管平滑筋収縮過程などに関与する細胞骨格関連タンパク質として研究が盛んに行われてきたが、近年、脳虚血時に ROCK が脳微小血管の平滑筋や内皮細胞で活性化して微小循環障害をおこすとともに、炎症担当細胞の遊走にも関与して脳梗塞の進展を助長する事が明らかとなってきた。

ROCK 阻害薬 Fasudil は従来から血管拡張薬としてクモ膜下出血後の脳血管攣縮予防に使用されてきたが、前述した脳虚血時における ROCK の作用を阻害することによって局所脳血流増加作用や抗炎症作用を発揮し、脳梗塞に対する有効な治療薬になりうると注目されるようになった。

しかし、脳虚血時の神経細胞に対する ROCK の直接的な作用は明らかとなっていない。そこで、これまでに報告されている循環障害や炎症反応といった間接的な作用ではなく、神経細胞の虚血性障害における ROCK の直接的な作用、さらには ROCK 阻害薬 Fasudil の直接的な神経保護効果について検討すべく本研究を行った。

【対象と方法】

In vivo

- 1) ddY 雄性マウスを生理食塩水投与群と Fasudil 投与群の 2 群に分け、生理食塩水および Fasudil (10 mg/kg) を腹腔内に 0.1 ml/10 g 投与し、30 分後に中大脳動脈永久閉塞モデルを作成した。
- 2) 両群間の局所脳血流量、血圧、脈拍、動脈血 pH、動脈血 CO₂ 分圧、動脈血 O₂ 分圧を測定した。
- 3) 両群の脳組織を ROCK (ROCK I, ROCK II) 抗体、及びその基質である Adducin のリン酸化抗体を用いて免疫染色した。
- 4) また、ROCK 活性を定量するため Adducin のリン酸化レベルをウエスタンブロッティングにて解析した。
- 5) 中大脳動脈閉塞 24 時間後の脳梗塞巣を 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色にて計測し、神経症状の程度とともに両群を比較した。

In vitro

- 1) PC12 細胞の Oxygen-Glucose Deprivation (OGD) 誘発細胞死に対して、Fasudil の生体内代謝物である Hydroxyfasudil の効果を Hoechst 33342 と YO-PRO-1 の蛍光染色、MTT assay によって検討した。

2) さらにマウス胎仔初代培養大脳皮質神経細胞の glutamate 誘発神経細胞死に対する Fasudil と Hydroxyfasudil の効果を MTT assay で検討した。

【結果】

In vivo

- 1) Fasudil は局所脳血流量, 血圧, 脈拍, 動脈血 pH, 動脈血 CO₂ 分圧, 動脈血 O₂ 分圧に影響を与えないことを確認した。
- 2) 免疫染色とウエスタンブロッティングの結果, 中大脳動脈閉塞後早期に線条体, 特に神経軸索での ROCK II とリン酸化 Adducin の発現増加を認めた。
- 3) Adducin のリン酸化は Fasudil 投与により著明に抑制された。
- 4) Fasudil 投与により虚血 24 時間後の神経症状は改善し, 脳梗塞領域も有意に減少した。脳梗塞巣の減少は線条体で著明であった。

In vitro

- 1) PC12 細胞の OGD 誘発細胞死を Hydroxyfasudil は有意に抑制した。
- 2) glutamate 誘発神経細胞死を Fasudil, Hydroxyfasudil は有意に抑制した。

【考察】

脳梗塞において白質では軸索損傷が起こるとされている。一方, 脊髄損傷では Fasudil が損傷脊髄白質で ROCK の活性化を抑制して保護効果を有すると考えられている。本研究結果から脳虚血早期に軸索障害が起こる際に ROCK が活性化すること, Fasudil がこれを抑制する事が明らかとなった。In vitro での実験結果からも Fasudil の直接的神経保護効果が示された。

虚血性神経障害では Glutamate-Calcium 経路を介して軸索障害が生じるが, Fasudil は ROCK 活性を抑制することで Glutamate-Calcium 経路を抑制するか, あるいは虚血による軸索内カルシウム濃度上昇に対する感受性を低下させることにより直接的な神経軸索保護効果を示すと考えられた。

【結論】

虚血条件下において神経細胞では, 特に軸索において ROCK 経路が活性化されており, 脳梗塞に対する Fasudil の新たな作用機序として直接的な神経軸索保護効果の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 山下 健太郎は, マウス中大脳動脈閉塞モデルを用いて, 脳虚血時に微少血管や炎症細胞で活性化される ROCK が, 神経細胞, 特に神経軸索でも活性化されることを新たに見いだした。また, ROCK 阻害薬である Fasudil が神経細胞における ROCK 活性化を抑制することで直接的な神経保護効果を有することを in vitro と in vivo で明らかにした。これらの知見は脳神経外科学, 脳卒中学ならびに分子生物学の研究の進歩に少なからず寄与するものと認められる。

[主論文公表誌]

Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons

BRAIN RESEARCH 1154, 215-224 (2007).