

氏名 (本籍)	佐藤 国夫 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 910 号
学位授与日付	平成 25 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	低体温および高体温が一過性前脳虚血後の遅発性神経細胞死およびミクログリア活性に及ぼす影響の研究
審査委員	(主査) 教授 中川 敏幸 (副査) 教授 山口 瞬 教授 中島 茂

論文内容の要旨

海馬CA1領域の錐体神経細胞は一過性虚血、脳梗塞等の虚血性疾患によって傷害されやすいことが知られている。スナネズミの海馬CA1領域の錐体神経細胞は5分程度の虚血が加わると、殆どが死滅するがその進行は極めて緩やか（遅発性神経細胞死, Delayed Neuronal Death: DND）で、形態学的にアポトーシスの特徴を呈する。近年、炎症や細胞分化の際に、 β -ガラクトシダーゼ結合レクチンの一種であるGalectin-3が樹状細胞、マクロファージ、ミクログリア等種々の炎症細胞に発現することがわかってきた。Galectin-3は細胞増殖やアポトーシス調節に関与しており、サイトカイン様調節作用を発揮するとの報告もある。しかしながら一過性脳虚血後の海馬CA1領域におけるGalectin-3のDNDへの関与を研究した報告は無い。本研究では、遅発性神経細胞死への関与が示唆されているマクロファージ/ミクログリア (Lees GJ, J Neurol Sci, 114, 119-122, 1993) の役割を明らかにする目的で、体温調節に基づく一過性脳虚血後のアポトーシスとGalectin-3発現の変化を詳細に検討した。

【対象と方法】

雄性スナネズミ (体重 65~75 g) を用い、体温を 37 ± 0.3 °C (低体温処理群は 31 °C, 高体温処理群は 37.5 °C, 38 °C, 39 °C) で維持し、麻酔導入後、頸部正中切開し両側総頸動脈を 5 分間マイクロクリップで閉塞させ前脳虚血を実施した。陰性コントロールとしては両側総頸動脈の閉塞は行なわずに手術操作のみを行なった (Sham-ope 群)。Galectin-3 の経時的発現の検討においては虚血後 24, 48, 72, 96 時間および 2 週間において、低体温処理群および高体温処理群では虚血後 96 時間において、麻酔後、生理食塩水、10 %リン酸緩衝ホルマリンを経心臓的に全身灌流させ脳を採取した。その後 $3 \mu\text{m}$ の組織切片を作製し HE 染色、免疫組織化学染色 (Galectin-3, Iba-1), 免疫蛍光染色 (Galectin-3, Iba-1), TUNEL 染色を行なった。

【結果】

【経時的变化】 CA1 錐体神経細胞の形態学的傷害度 (HE 染色による評価) の時間推移は、虚血後 48 時間から明らかとなり、虚血後 96 時間で max となった。DNA 傷害を検出する TUNEL 染色も虚血後 72 時間から検出され、虚血後 96 時間で max となった。免疫組織化学染色による Galectin-3 (活性型ミクログリアに発現) は虚血後 24 時間、48 時間および Sham-ope 群には観察されず、虚血後 72 時間にて発現が確認され 96 時間で max となった。Iba-1 (活性型, 休止型の両ミクログリアに発現) は虚血後 48, 72, 96 時間において強陽性となり虚血後 96 時間では肥大した細胞突起が顕著であった。

【低体温処理】 低体温処理群において形態学的な錐体神経細胞傷害は観察されなかった。Galectin-3, Iba-1 および TUNEL は虚血対照群では発現を認めたが低体温処理群においては発現を認めなかった。

【高体温処理】 虚血処理群において錐体神経細胞の核は正常体温 (37 °C) と高体温 (37.5 °C, 38 °C, 39 °C) いずれにおいても濃縮し DND を示した。TUNEL 染色は Sham-ope 群を除く全ての体温群で認められ、特に 37.5 °C および 38 °C では強陽性となった。Galectin-3 は Sham-ope 群では正常体温、高体温ともに発現はなかったが、虚血群では 38 °C と 39 °C において強陽性となった。細い細胞突起に Iba-1 陽性を示す休止型ミクログリアは Sham-ope 群でみられた。正常体温 (37 °C) と高体温 (37.5 °C, 38 °C) では肥大した細胞突起を持つ活性化型ミクログリアにおいて陽性像が観察され、39 °C では強陽性であった。

【考察】

本研究では、スナネズミの一過性前脳虚血により海馬 CA1 領域の錐体神経細胞に DND が発生し、それに併行して活性化型ミクログリアにおいて形態変化とともに Galectin-3 の発現が認められた。一方、虚血中の低体温処理はこの現象に対して抑制作用を示し、逆に虚血中の高体温処理は DND に対して促進的な作用を示し、Galectin-3 の発現も増強した。錐体神経細胞 DND とその周囲に存在するミクログリアの Galectin-3 発現を伴う活性化には密接な関係が示唆され、この関係に着目した神経保護効果が期待される。

【結論】

錐体神経細胞 DND とその周囲に存在するミクログリアの Galectin-3 発現を伴う活性化には、体温を介した Galectin-3 発現調節とともに密接な関係が示唆される。Galectin-3 は細胞増殖やアポトーシス調節に関与し、サイトカイン様調節作用の報告もあり、Galectin-3 発現抑制による神経細胞保護効果が期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者 佐藤 国夫は、一過性前脳虚血後の海馬 CA1 領域錐体神経細胞における遅発性神経細胞死機構について、神経細胞周囲に存在するミクログリアの活性化の指標である Galectin-3 発現を詳細に検討し、脳虚血時の体温調節による Galectin-3 発現制御と神経細胞死との関連性を明らかにした。本研究は、Galectin-3 の発現抑制に基づく神経細胞保護の可能性を示すものであり、脳血管障害研究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】

Kunio Satoh, Masayuki Niwa, Wael Goda, Nguyen Huy Binh, Masaya Nakashima, Manabu Takamatsu, Akira Hara: Galectin-3 expression in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia, and its inhibition by hypothermia. *Brain Research* 1382, 266-274 (2011)

Kunio Satoh, Masayuki Niwa, Nguyen Huy Binh, Masaya Nakashima, Kazuhiro Kobayashi, Manabu Takamatsu, Akira Hara: Increase of galectin-3 expression in microglia by hyperthermia in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia. *Neuroscience Letters* 504, 199-203 (2011)