

# Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 遠藤, 光俊 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1480">http://hdl.handle.net/10271/1480</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 203号	学位授与年月日	平成 7年 3月 8日
氏名	遠藤光俊		
論文題目	<p>Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia                      (一過性全脳虚血後の反応性アストロサイトによる一酸化窒素合成酵素の発現について)</p>		

博士(医学) 遠藤光俊

## 論文題目

Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia

(一過性全脳虚血後の反応性アストロサイトによる一酸化窒素合成酵素の発現について)

## 論文の内容の要旨

(目的) 一過性脳虚血による海馬の選択的神経細胞死は、一過性脳虚血症例のみならず、痴呆とも関連があり、重要な臨床上の問題である。一方、一酸化窒素 (nitric oxide:NO) は、神経伝達物質としての機能、神経毒性、脳虚血損傷における関与などが注目されている。NO の合成酵素 (nitric oxide synthase:NOS) は、constitutive form (cNOS) と inducible form (iNOS) がクローニングされているが、生理的反応時や虚血脳における NOS の変化はほとんど調べられていない。アストロサイトは脳損傷時に反応して神経損傷を最小限にしたり損傷の修復に関与するとされている。われわれは、副論文において、一過性全脳虚無ラットモデルを用いて、海馬 CA1 の遅発性神経細胞死に伴い、反応性アストロサイトが NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form) diaphorase を発現することを報告した。酸化還元酵素の一種である NADPH diaphorase の本体が何であるのか長年不明であったが、他の研究者によって NOS がクローニングされて研究された結果、NOS は、NADPH diaphorase と同一であるか、少なくともそのひとつであることが示唆された。従って、副論文の結果は、一過性虚血脳において反応性アストロサイトが NOS を産出していることを強く示唆するが、直接的な証明ではなかった。また、アストロサイトは定常状態では NOS を発現していないが、反応性に NOS を発現するのかどうか明かになっていなかった。そこで、本研究において、一過性全脳虚血において反応性アストロサイトが iNOS を産出していることを、より確実にするために、免疫組織化学的に検討した。

(方法) 4 vessel-occlusion 法によってラットの一過性全脳虚血モデルを作り、組織学的に海馬における iNOS の発現を調べた。この実験モデルにおいては、両側頸動脈、椎骨動脈、頸部筋からの側副血行を10分間一時的に遮断することによって、一過性全脳虚血をおこす。数日後に海馬 CA1 錐体細胞だけが選択的かつ遅発性に細胞死に陥り、CA1 領域にグリオーシスをきたす。一過性全脳虚血後3日目、7日目、30日目に脳を灌流固定して取り出し、NADPH diaphorase 染色、抗 iNOS 抗体、抗 GFAP (glial fibrillary acidic protein) 抗体、抗 microglia 抗体による免疫組織化学標本を作成した。

(結果) 正常およびコントロールでは、ミクログリアはほとんど認められず、定常状態のアストロサイトは散在していたが、iNOS 陽性細胞およびアストロサイトによる NADPH diaphorase の発現は認められなかった。虚血後、NADPH diaphorase 陽性細胞、iNOS 陽性細胞、反応性アストロサイト、ミクログリアの出現が、CA1 錐体神経細胞層と周辺に認められた。NADPH diaphorase、iNOS、GFAP 各々に陽性の細胞群は、その出現の時間経過、空間分布、細胞形態ともに互いに類似していた。これらの変化は、CA1 錐体神経細胞の遅発性死が起きる虚血再灌流後3日目には明らかになり、グリオーシスが增強する7日目頃から強くなって30日目でも認められた。この組織学的パターンは、ミクログリアのそれとは異なっており、アストロサイトが iNOS を発現していることが示唆された。さらに、これを確認するために、抗 iNOS 抗体と抗 GFAP 抗体による蛍光抗体二重染色を行った

ところ、両者の抗体に同時に陽性な細胞が多数認められた。すなわち反応性アストロサイトが iNOS を発現し得ることが確認された。

(考察及び結論) 本研究によって、アストロサイトが一過性全脳虚血において iNOS を発現していることがほぼ証明された。アストロサイトが iNOS を発現する意義や、脳虚血における iNOS の役割は、今後解明されるべき重要な問題である。反応性アストロサイトが脳損傷の修復に重要な役割を果たしていることは疑う余地がない。アストロサイトによる iNOS の発現は当然 NO の産生を意味し、その NO は、autocrine あるいは paracrine 的に、アストロサイト自身、あるいは近接する神経細胞に作用して、神経損傷を最小限に止めたり、脳損傷を修復したり、シナプス回路の再形成に役だっているのではないかと考えられる。また、一方で、このような合目的な働きだけでなく、遅発性神経細胞死が起こる少し前から iNOS が発現することから考察すると、NO の過剰産生が、逆に、遅発性神経細胞死の発生に何らかの関与をしていることが示唆された。海馬 CA1 錐体細胞の選択的遅発性細胞死の発生機序とそれに伴う組織の反応を研究していくことは、海馬の萎縮が関係する痴呆、神経細胞死やシナプス回路の再形成が起こるメカニズム、神経細胞の脆弱性を解明することにつながることであり、組織化学的方法だけでなく分子生物学的方法などを取り入れて研究を進展させる必要がある。

### 論文審査の結果の要旨

一過性全脳虚血のラットのモデル実験においては、海馬の CA1 錐体細胞の遅発性神経細胞死と著明な反応性アストロサイトの増加が引き起こされる。申請者らは、虚血に伴う神経細胞死における関与や神経伝達調節因子としての役割が最近注目されている、一酸化窒素 (nitric oxide:NO) を合成する酵素 (NO synthase:NOS) の一過性虚血後の発現に着目して解析した。

申請者らは副論文において、一過性虚血後 CA1 領域に反応性アストロサイトが NADPH diaphorase (NOS の局在を間接的に示す) を発現することを示した。しかし、in vivo 系でのアストロサイトの NOS 発現は明らかでない。NOS は主として神経細胞で発現されている非誘導型 (cNOS) と、主としてマクロファージで発現されている誘導型 (iNOS) に分けられる。申請者らは、主論文において一過性虚血後の NADPH diaphorase の発現は NOS と本当に局在が一致するか、NOS の発現であれば、cNOS か iNOS か、さらに NO が虚血性障害に働くのか、その修復に働くのかなどの点について検討した。

その結果、虚血後、iNOS、NADPH diaphorase の発現、活性化アストロサイトの海馬 CA1 領域における時間的、空間的発現パターンは類似していた。このことは反応性アストロサイトは iNOS を発現することを示している。一方、ミクログリアの反応分布は NADPH diaphorase や iNOS の分布と異なっていた。iNOS の反応性アストロサイトの発現は、CA1 錐体細胞の遅発性細胞死がおきる一過性虚血後 3 日目で認められ、グリオーシスの増強する 7 日目頃から強くなり 30 日でも認められるという結果を明らかにした。

審査委員会は、本研究が、反応性アストロサイトが in vivo 系において iNOS を発現することを初めて明らかにした点、さらに、一過性虚血後 CA1 錐体細胞が細胞死を起こした後で強く発現してくることから、障害を修復する機構に NO が働く可能性を強く示唆し、また、iNOS が遅発性神経細胞死の少し前から発現することから、NO が遅発性細胞死の発生機序に何らかの関与をしている可能性を示唆した点を高く評価し、今後の研究の発展が期待されると判断した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質疑が行われた。

- 1) 未処置（対照）の状態におけるCA1領域のアストロサイトの分布はどのようなものか
- 2) 虚血によってアストロサイトは虚血局所で増えるのか、他の部位から遊走してくるのか
- 3) GFAP陽性細胞のすべてがNADPH diaphorase陽性か、またNADPH diaphorase陽性細胞の全てがGFAP陽性かどうか
- 4) 用いた抗体の特異性について、特に抗iNOS抗体はラットのマクロファージ、ミクログリアとも反応するか
- 5) CA1の細胞死に陥った神経細胞を除くのにミクログリアが働き、そのあとの修復機構として反応性アストロサイトが増殖する可能性はないか、またミクログリアとアストロサイトとどちらが先に増加するか
- 6) 反応性アストロサイトのiNOS産生の役割として考えられる可能性について
- 7) 単離したアストロサイトでin vitroでNOの産生をみた仕事があるか
- 8) delayed neuronal deathの生ずる時NOは関与するか
- 9) なぜCA1領域に一致してiNOSとNADPH diaphoraseが誘導されると考えるか
- 10) この研究の臨床的意義は何か

これらの質問に対して申請者の解答はほぼ適切であり、本論文は博士（医学）の学位授与に値する内容を備えているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	筒井祥博		
	副査	教授	植村研一	副査	教授 寺川進
	副査	教授	山下昭	副査	客員助教授 西本雅彦