

論文の内容の要旨

論文題目

マウス全脳虚血モデルの確立および同モデルを利用した
海馬 CA1 領域の虚血性神経細胞死における p53 の役割の評価

指導教官 桐野 高明 教授

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

米倉 一郎

内容

本論文は Part1 マウス全脳虚血モデルの確立及び Part2 海馬 CA1 領域の虚血性神経細胞死における p53 の役割の評価の 2 部構成になっており要旨もこれに準じるものである。

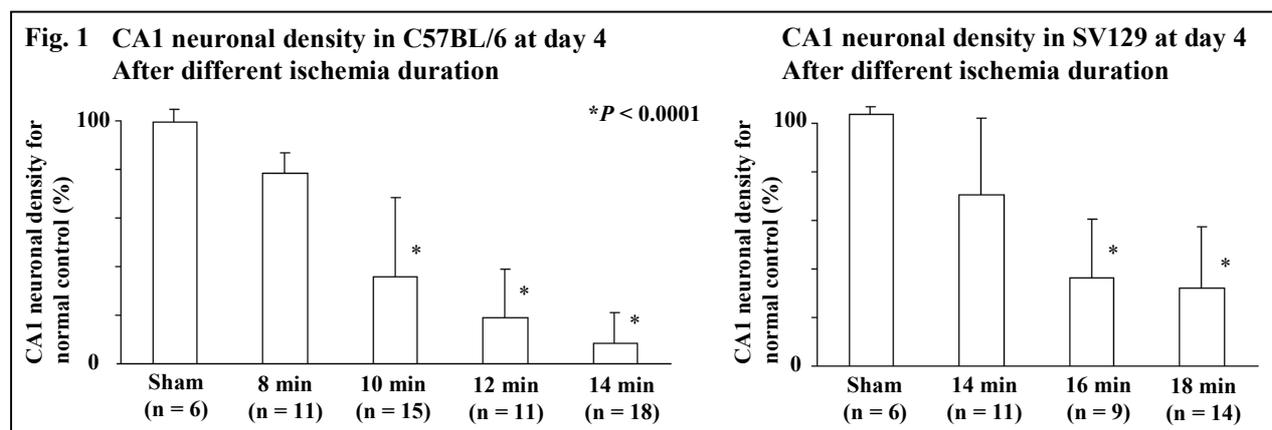
Part 1

【背景】 脳虚血はわが国において非常に多くの背景人口を有する病態である。しかし、臨床の現場において虚血に対し脳を保護する治療は未だ不十分な状態にあり、新たな治療法の開発が求められている。開発に先立ち、脳虚血損傷の機序を理解するために、ラットや砂ねずみを用いて海馬 CA1 領域に選択的に神経細胞死を生じる全脳虚血モデルが利用されてきたが、未だにこの機序は十分に把握されていない。

本研究では、多くの遺伝子変異動物が利用可能になった時代背景を受け、メカニズムを解明するための新たな手段としてマウスの全脳虚血モデルの作成を試みた。これまでも、マウスにおける脳虚血モデルの報告はあるものの、均一で再現性のある脳損傷あるいは神経損傷をもたらすモデルは報告されていないのが現状である。

【方法】 遺伝子変異動物作成にしばしば用いられる系統である C57BL/6 マウス及び SV129 マウスを用いた。麻酔下に両側総頸動脈と脳底動脈を同時に 8-18 分間遮断した。脳底動脈を遮断したクリップは今回新たに開発したもので、直径 0.2 mm のステンレススチール製で先端を細く加工した。すべての動物で虚血後 30 分まで直腸温、側頭筋温を 37 °C で維持した。虚血 4 日後に海馬 CA1 領域における生存細胞数を定量化した。また虚血侵襲を評価するために皮質脳血流と海馬 CA1 における直流電位を測定した。

【結果】 C57BL/6 マウス、SV129 マウス両群において平均脳血流は虚血前に比べ 10 % 以下で虚血後の脱分極は 1 分以内に生じた。これほどの虚血侵襲にもかかわらず、手術成功率は 94.0 % であり、C57BL/6 マウスにおいて 4 日間の生存率 85.9 % を維持した。SV129 マウスの生存率は 14 分虚血では 100 % だが 18 分虚血は 51.9 % と低下した。C57BL/6 マウスでは虚血後 4 日目に海馬 CA1 領域の神経細胞の変性を認め、神経損傷は虚血時間に依存した。8 分間の虚血では $78.5 \pm 8.5\%$ の神経細胞が確認されたが、14 分間の虚血では $8.4 \pm 12.7\%$ しか認められなかった。SV129 マウスでは、脳血流と虚血から脱分極までの時間は C57BL/6 と差が無く、同等の虚血侵襲を与えたにもかかわらず、14 分間の虚血で同様の変化を認めなかった。



【考察】 C57BL/6 マウスにおいては CA1 領域に均一な神経損傷を生じ再現性のあるモデルが確立できた。この結果は遺伝子背景が C57BL/6 である遺伝子変異動物ならば、その野生型と変異型の虚血に対する反応を比較することで、変異させた遺伝子の機能を解析できる可能性を示唆するものである。また本実験における系統の間での虚血脆弱性における差は、マウスにおける虚血実験においてその遺伝子背景を十分考慮する必要があることを示している。

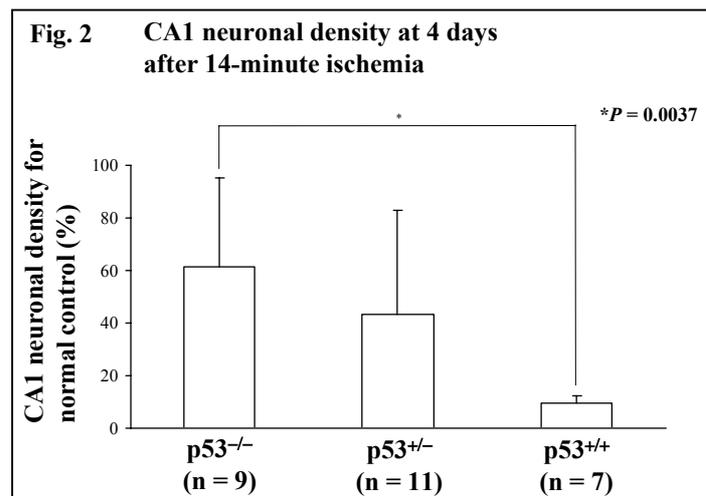
Part 2

【背景】 転写因子 p53 は神経のみならず細胞の生死を支配する蛋白であることはすでに知られている。しかし脳虚血後の神経細胞死と p53 の因果関係は十分に理解されていない。本研究では、p53 欠損 (p53^{-/-}) マウスと野生型 C57BL/6 (p53^{+/+}) マウスにおける全脳虚血後の海馬 CA1 領域での神経細胞死を比較し、全脳虚血後の神経細胞死に対する p53 の影響を検討した。

【方法】 p53 以外の背景遺伝子の影響を除くため C57BL/6 へ 12 回戻し交配された p53^{-/-} マウスと p53^{+/+} マウスを使用した。そして全脳虚血は 3 血管閉塞モデルを使用した。虚血後 4 日目すべての動物を灌流固定し、海馬 CA1 の神

神経細胞数を計測した。別の動物群で海馬 CA1 領域における直流電位を計測した。また海馬 CA1 領域における p53 蛋白の変化を評価するため免疫組織化学を施行し、さらに全海馬にて p53 及びその下流分子である Bax の mRNA を RT-PCR にて解析した。

【結果】 p53^{+/+} マウスと p53^{-/-} マウスにおいて海馬の直流電位と皮質脳血流に統計学的有意差は認められず、遺伝子型によらず同等の虚血侵襲を負荷していることを確認した。しかし虚血後の神経細胞数は p53^{+/+} マウスでは 9.3 ± 3.0 %、p53^{-/-} マウスでは 61.3 ± 34.0 %と遺伝子型により有意差を認めた (Fig. 2)。また免疫組織化学において、p53^{+/+} マウスでは虚血 12 時間後後海馬 CA1 の神経細胞において p53 と考えられる蛋白の発現の増加を認めた。さらに p53 により転写制御を受ける Bax の mRNA は虚血 12-24 時間後に増加することを確認した。



【考察】本実験で得られた神経損傷の差は p53 以外の背景遺伝子や脳血流の差によるものではなく、p53 遺伝子が存在したか否かにより生じたと考えられる。また p53^{+/+} マウスでは虚血後 p53 蛋白に何らかの変化を生じていると考えられ、この p53 が Bax を介し神経細胞死を誘導している可能性が示唆された。これらの結果は全脳虚血後の神経損傷において p53 が重要な役割を果たしており、p53 は虚血治療のターゲットになりうることを示唆している。