

審査の結果の要旨

氏名 石井康博

本研究は頭部外傷後の2次性神経細胞死発生過程において、重要な役割をしていると考えられるアストロサイトのコネキシンヘミチャンネル (CxHC) の関与を明らかにするため、ラットの頭部外傷モデルを用いて、神経細胞とアストロサイトのコネキシン (Cx) isoformの変化による各細胞間あるいは両細胞間に存在するギャップジャンクション (GJ) 及びCxHCを介した2次性神経細胞死の拡大とCa²⁺ waveに伴う細胞内Ca²⁺濃度上昇による神経細胞内μ-calpainの活性化とそれによる2次性神経細胞死発生の有無について検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 細胞膜破綻細胞に取り込まれる propidium iodide (PI)を損傷部に投与し、PI 陽性細胞を死細胞として1時間後と6時間後の2回に分け時間的な死細胞の広がりを経微鏡で解析した結果、1時間後ではPI 陽性細胞は少数であったが、損傷6時間後では皮質第5・6層を中心にPI 陽性細胞が広がる傾向を認めた。PI 陽性細胞の細胞種を同定するためCx36 (神経細胞に発現している主要Cx) とNSE (neuron specific enolase: 神経細胞マーカー) で免疫染色を行ったところPI 陽性細胞では多くがCx36 陽性及びNSE 陽性であった。これらの所見より、皮質第5・6層においてPI 陽性細胞は神経細胞であることが示唆された。さらに、PI 陽性細胞内に活性型μ-calpain 抗体陽性を認めたとことより、2次性神経細胞死ではμ-calpain の活性化が強く関連し、このμ-calpain

の活性化には細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が必要であることを考えると、2次性神経細胞死と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に重要な関連性があることが示唆された。

2. GJとCxHC両者を阻害するCBX、非特異的HC阻害剤 La^{3+} 及びCx43特異的阻害ペプチドGap26を投与したところ、大脳損傷隣接領域の皮質第4～6層 $1.2\text{ mm} \times 1.2\text{ mm}$ の範囲のPI陽性細胞数はCBXによって70%の減少を認めた。また、 La^{3+} 及びCx43特異的阻害ペプチドGap26投与群においては各々71%、58%の減少を認めた。以上の結果より、Cx43から構成されるCxHCを阻害することによって細胞死の伝播が抑制されることが示唆された。同様にATPが結合するP2受容体阻害剤suraminではPI陽性細胞数の61%の減少を認めた。

3. CxHC開口の指標として用いられるetidium bromide (EtBr) を用いて、損傷部から隣接領域にかけて細胞のCxHCの開口の有無を検討したところ、隣接領域の細胞内にEtBrの強い取り込みを認め、損傷によるCxHC活性の亢進が示唆された。さらに、Gap26投与群ではEtBrの取り込み抑制を有意に認めた。

Cx43及びCx36との免疫染色を用いて検討した結果、Cx43陽性アストロサイト及びCx36陽性神経細胞ともに細胞内への強いEtBr取り込みの増加を認めた。これは損傷後アストロサイトのCx43HCだけでなく、神経細胞のCx36HCも開口していることが示唆された。次にCx43の特異的阻害ペプチドGap26を損傷部に投与した群では、アストロサイト及び神経細胞のEtBr染色の抑制を認めた。これはアストロサイト上のCx43HC

の開口が神経細胞上のCx36HCの開口を制御していることが示唆された。さらに、suraminが明確にEtBr取り込みを抑制したことから、細胞死の伝播において開口したCx43HCから放出されるATPが隣接する細胞のP2受容体に作用し、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる結果、CxHCを開口させるサイクルを繰り返し、隣接する細胞にCa²⁺ waveが伝播することが推定された。

4. 損傷及び隣接領域での western blotting による活性化型 μ -calpain 及び fodrin 分解産物の経時変化を検討した結果、損傷及び隣接領域ともに μ -calpain は損傷 1 時間後より活性化を認め、6 時間後も活性化持続を認めた。fodrin の分解も同様の傾向を認めた。また、CBX、La³⁺及び Gap26 投与により隣接領域の μ -calpain 活性化と fodrin の分解が抑制された。以上の結果より、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇が隣接領域の細胞内で起こり、その結果 μ -calpain 活性化によって細胞死が誘発されていることが推定された。

以上、本論文は 2 次性神経細胞死の過程 において、アストロサイトと神経細胞の CxHC の解析から、アストロサイトの活性化と Cx43HC 開口及びそれに伴う ATP 濃度上昇による神経細胞の Cx36HC 開口の関与と Cx36HC 開口に伴う細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇による活性化型 μ -calpain の増加とそれに伴う fodrin 分解機序の存在を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、頭部外傷後に起こると考えられる 2 次性神経細胞死の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。