

論文要旨

Functional recovery and expression of GDNF seen in photochemically induced cerebral infarction

〔 脳血栓片麻痺ラットにおける神経栄養因子 GDNF の発現と機能回復 〕

堀ノ内 啓介

【序論】

脳梗塞における機能再構築には遺伝子発現を伴った神経細胞の変化、神経栄養因子による機能改変、神経伝達物質の増減による回路の伝達効率改変などが重要であると考えられている。近年、神経栄養因子の一つである GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor) は、中枢神経損傷において神経の生存、再生に関与していることが分かってきた。しかし GDNF と運動機能の回復についての報告は少ない。

【目的】

脳血栓片麻痺ラットを用いて GDNF の発現と片麻痺の時間的経過を検討する。

【対象】

Wistar 系ラット雄 7 週齢 59 匹 (脳血栓ラット群 35 匹、sham control 群 20 匹、intact rat 群 4 匹) を用いた。

【方法】

ペントバルビタール麻酔後に頭部を固定し、頭皮を切開して頭蓋骨を露出する。尾静脈からローズベンガル 20mg/kg を注入し、波長 560nm の光線を感覚運動野に経頭蓋的に 20 分間照射して脳梗塞を作成した。梗塞後の片麻痺の経過を 7 段階スケールである Beam-walking task を用いて、14 日後まで評価した。脳血栓ラットは、梗塞後 24 時間の麻痺が最も重度であるスケール 1 のラットのみを用いた。脳血栓ラットは、梗塞後 24 時間後、72 時間後、7 日後、14 日後に灌流固定を行なった後、脳を摘出した。摘出した脳をマイクロトームで厚さ 10 μ m の凍結切片を作成し、免疫組織化学法を用いて GDNF の発現を検討した。

【結果】

GDNF の発現は梗塞巣の周囲で多く認められ、梗塞巣の外側である temporal cortex と内側である retrosplenial granular cortex の 2 ヶ所で計測を行なった。temporal cortex において梗塞後 24 時間後から 7 日後まで intact rat 群および sham control 群と比較して有意に発現増加が認められ、14 日後には減少していた。この時期はラットの片麻痺の機能回復も顕著であった。

【結論及び考察】

脳血栓ラットを用いて片麻痺の経過と GDNF の発現を調べた。ラットにおいて一過性の脳虚血により数時間で大脳皮質に GDNF mRNA や GDNF のレセプターである c-Ret や GFR α の発現が誘導されることがわかっている。GDNF はアポトーシスの抑制や神経再生を促進することが明らかになっており、梗塞巣周囲の GDNF の発現が虚血による損傷に対して保護的に機能していると考えられる。今回の研究の結果、GDNF が梗塞巣周囲に発現している時期に片麻痺の回復も顕著であり、GDNF の発現と機能回復の関連が示唆される。

(International Journal of Neuroscience 2007 年 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	医研第 635 号	氏名	堀ノ内 啓介
審査委員	主査	有田 和徳	
	副査	納 光弘	中河 志朗

Functional recovery and expression of GDNF seen in photochemically induced cerebral infarction

脳血栓片麻痺ラットにおける神経栄養因子 GDNF の発現と機能回復

International Journal of Neuroscience 2007 年 1 月掲載予定

脳梗塞における機能再構築には、神経栄養因子による機能改変が重要であると考えられている。近年、神経栄養因子の一つである GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor) が中枢神経損傷において神経の生存や再生に関与していることが明らかにされている。しかし脳梗塞後の GDNF の変化と運動機能の回復の関連についての報告は少ない。

本研究では、脳血栓片麻痺ラットを用いて脳梗塞巣周囲における GDNF の発現と片麻痺回復の時間的経過との関連を検討した。

実験では Wistar 系ラット雄 57 匹 (脳血栓ラット群 33 匹、sham control 群 20 匹、intact 群 4 匹) を用い、脳梗塞は光感受性色素ローズベンガル投与後、経頭蓋的に波長 560nm の光線を照射して作製した。梗塞 24 時間後、72 時間後、7 日後、14 日後におけるラット脳の梗塞巣周囲の GDNF 発現を、免疫組織化学法を用いて検討した。麻痺の経過は、beam-walking task を用いて脳梗塞後 14 日まで評価した。

GDNF の発現は梗塞巣の周囲で著しく、梗塞巣の外側である temporal cortex における増加は梗塞後 24 時間後から 7 日後まで、intact 群および sham control 群より有意に強く発現した。その後、GDNF の発現が減少し、14 日後には対照群と同程度になった。GDNF 発現が強い時期にはラットの片麻痺の機能回復も顕著であった。

本研究で得られた新知見は次の 3 点である。

1. 光感受性色素を用いた脳血栓片麻痺ラットにおいて、梗塞後 7 日後までに麻痺の回復が顕著であった。
2. 脳梗塞 7 日後まで病巣周囲に神経栄養因子 GDNF 発現細胞数が有意に増加していた。
3. 脳梗塞片麻痺において GDNF 発現と運動機能回復の時期が一致しており、機能回復過程における GDNF の関与が示唆された。

以上により、神経栄養因子 GDNF の発現と脳梗塞後の機能回復の関連が示唆された。

神経細胞に対する生存や神経再生への強い活性を持つ GDNF の増加と脳損傷後の機能回復との関連が示唆され、今後、脳梗塞による神経損傷モデルに対して GDNF を用いた治療につながる基礎研究への進展が期待される。また今回用いた脳梗塞モデルは、限局した病巣を作成できるため様々な研究テーマへ応用が可能であると考えられる。

よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 635 号	氏名	堀ノ内 啓介
審査委員	主査	有田 和徳	
	副査	納 光弘	中河 志朗

主査および副査の3名は、平成18年9月11日、学位請求者 堀ノ内啓介 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) なぜ GDNF に注目したのか？

(回答) 研究開始当時は brain-derived neurotrophic factor に関する研究が多く行なわれていたが、GDNF についてはまだ論文が少なかった。脳損傷の周囲には様々な物質が発現するが、脳梗塞モデルにおいても病巣周囲に GDNF の発現があると考えられた。

質問 2) ミッドカインの発現はどうか。

(回答) ミッドカインも神経栄養因子の一つであり、梗塞後に発現が亢進することが報告されているが、今回は検討していない。

質問 3) 今回の脳梗塞作製(photochemically induced cerebral infarction)に用いた光線は頭蓋骨を透過するのか？また、この方法の特徴は何か？

(回答) この光線は、波長が 560nm と長いので頭蓋骨を透過する。これまでの動脈結紮法に比べ、経頭蓋的に光線を当てて脳梗塞を作製するので開頭の必要が無いこと、限局した梗塞巣が作成できる点が特徴である。

質問 4) このモデルでペナンブラは存在しているのか？

(回答) 光感受性色素を用いた脳梗塞モデルは、光を照射された血管が全て閉塞するため、これまでの動脈結紮ラットによるものよりペナンブラは少ないと考えられる。

質問 5) 脳梗塞モデルラットへのリハビリテーションはどのように行なうのか？

(回答) ラット用のトレッドミルなどを用いて運動負荷を加えることができる。

質問 6) 免疫染色で GDNF が発現している細胞はなにか？

(回答) アストロサイトやマクローファージ、ミクログリアが中心だと考えるが、神経細胞も含まれていると思われる。アストロサイトに特異的な GFAP 染色などを用いた二重染色での検討は行なっていないが、発現している細胞は経時的に変化すると考えられる。

質問 7) 障害された細胞のレスキューに何が働いていると考えられるか？

(回答) 最近、マクローファージや T 細胞などの免疫担当細胞が神経栄養因子を発現し、脳の損傷修復に関与することが示唆されている。

質問 8) 反応性アストロサイトの増殖を抑える方法として何が考えられるか？

(回答) 中枢神経系の再生を障害する要因の一つに反応性アストロサイトの増殖があるが、インターロイキン 1 がその増殖を促進するとされている。これらサイトカインの抗体を用いて増殖を抑制する方法が考えられる。

質問 9) 活性化酸素がアポトーシスの誘引として大きいのではないかと考えられるが、活性化酸素を抑える脳の機構としてはどういうものがあるのか？

(回答) 活性酸素を消去する酵素として、生体内にスーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどが存在する。脳梗塞巣周囲においては、虚血により発生したスーパーオキシドと一酸化窒素のラジカル基が反応し、発生した ONOO-が細胞障害を引き起こすと考えられる。GDNF は、神経障害による NO synthase の活性を抑制し、NO による毒性を減少させると考えられている。

質問 10) GDNF ノックアウトマウスはどのような症状を呈するか？

(回答) GDNF ノックアウトマウスは、腎臓の欠損や腸管神経細胞の欠失により生後早期に死亡する。

質問 11) 梗塞巣の内側と外側での GDNF の発現の違いは？

(回答) 内側では 24 時間後の発現のみ有意差を認めた。梗塞巣の広がり内側と外側では差があり、外側の皮質はより均一であったが、内側については固体によってバラつきがあり、測定部位が同一条件でなかった可能性がある。

質問 12) 麻痺の回復が 14 日間認められているが、この 14 日間の麻痺の回復に GDNF がどのように関与していると考えられるか？

(回答) GDNF の機能として、apoptosis の抑制や NO による神経毒性の減少といった保護的作用や神経細胞の sprouting の促進などが明らかになっており、これらの機能が総合的に麻痺の回復につながっているのではないかと考えられる。

質問 13) 今後 GDNF と機能回復の関連についてはどういう研究が考えられるか？

(回答) GDNF の発現を誘導する物質として、1,25 dihydroxyvitamin D3 (活性型ビタミン D3) や新規脳機能改善薬である FK960 といった物質がある。これらの物質を用いて GDNF の発現量を変化させ、機能回復との関連を検討する研究が考えられる。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。