

学 位 論 文 題 名

The Role of Mitochondrial Permeability Transition
in brain ischemia
脳虚血における Mitochondrial permeability transition
の役割に関する研究

学位論文内容の要旨

mitochondrial permeability transition(MPT) は細胞侵襲に伴う mitochondria 内のカルシウムイオンの増加や、酸化ストレスにより引き起こされる現象である。MPT により mitochondria に存在する megapore が開放されると膜電位の低下や mitochondria の呼吸の脱共役が引き起こされ、細胞のエネルギー供給が滞る。最近の研究では、MPT により mitochondria から cytochrome c, apoptosis inducing factor(AIF)が放出される。これらの物質が caspase family に属する protease を順次活性化し、最終的に細胞死を引き起こすことがわかってきた。このように MPT は細胞死を担うひとつの経路を形成しており、脳虚血における一部の細胞死においても MPT の関与が明らかになりつつある。

これらのことから本研究では MPT の種々の条件下すなわちカルシウムイオン、pH、温度、free radical による動態を吸光光度計を用いて検討した。また肝臓、心臓の実験において MPT の抑制効果が明らかとなっている cyclosporin A と、同じく免疫抑制効果を持つ FK506 の MPT に及ぼす効果を検討した。さらに cyclosporin A に関しては腹腔内大量投与による海馬 CA1 領域の遅発性神経細胞死の抑制効果について gerbil forebrain ischemia model を用いて検討した。

MPT を観察するためラット前脳から free mitochondria を単離した。単離した mitochondria の quality を検討するため、透過型電子顕微鏡による観察と呼吸活性の測定を行った。電子顕微鏡による観察では一部シナプトゾームに含まれた mitochondria が存在したものの、ほとんどが free mitochondria だった。呼吸活性は respiratory control ratio(RCR)を計算し RCR が 10 以上のものを実験に用いた。カルシウム負荷による MPT の誘導実験ではカルシウムの最終濃度が 10 μ M 以上で MPT が観察された。10-100 μ M まではカルシウム濃度依存性の変化を示した。100 μ M 以上では濃度依存性の変化は認められなかった。このため100 μ M カルシウムによる MPT の誘導能を pH, 反応温度を変えて検討した。カルシウムによる MPT は pH7.4-6.2 では pH が低いほど抑制され、pH7.4-8.2 では pH が高いほど抑制された。温度による検討では 20℃における MPT の誘導は 28℃に比べて抑制され、37℃においては 28℃よりも促進された。Free radical の MPT 誘導能の検討では、肝臓、心臓で認められるような誘導効果は *t*-butyl hydroperoxide, xanthine/xanthine oxidase のいずれの free radical 産生系に

においても認められなかった。また本実験では肝臓、心臓由来の mitochondria とことなり、mitochondria を reaction buffer 内にいれた直後から吸光度の緩やかな減少が認められ、mitochondria の緩徐な膨化が MPT の inducer を加える以前からすでに始まっていることがわかった。これらのことから脳由来の mitochondria は肝臓、心臓由来のものと MPT の誘導機序に違いがあることが示唆された。Cyclosporin A に関しては100 μ Mカルシウムの負荷による MPT の誘導を 0.1-10 μ Mの濃度で抑制した。Cyclosporin A により MPT が抑制されるのを確認した後、mitochondria 膜に pore を形成する alamethicin を添加すると mitochondria の膨張が確認されたことから、cyclosporin A は MPT により開放される megapore を特異的に阻害することが確認された。FK506 では MPT の抑制は認められなかった。

Cyclosporin A の細胞保護効果は rat focal ischemia model, insulin-induced hypoglycemic coma model 等で検討されているが、効果に関しては各モデル間にばらつきがある。このモデル間のばらつきについては、投与方法、投与量のほか細胞障害機序の違いのためと考えられた。Cyclosporin A 10mg/kg を腹腔内投与する場合、あらかじめ注射針により脳を穿刺し、blood brain barrier を障害しておいたほうが効果的であるという報告や、insulin-induced hypoglycemic coma model では 20 mg/kg よりも 50 mg/kg の投与量のほうが強い細胞保護効果を示したとする報告があり、今回の実験では gerbil transient forebrain ischemia model を用い、cyclosporin A 50 mg/kg を虚血前 1 回、再灌流後 1 回の計 2 回投与することにより検討した。体重 60-70g の雄性 gerbil を 4 群に分けそれぞれ control 群(n=6)、CsA 群(cyclosporin A 50 mg/kg を虚血前 30 分及び虚血再灌流後 24 時間の計 2 回腹腔内に投与)、Vehicle 群(CsA の基質である polyoxy ethylene castor oil を虚血前 30 分及び虚血再灌流後 24 時間の計 2 回腹腔内に投与)、non-treated 群に分けた。虚血再灌流 7 日後に灌流固定し、海馬 CA1 の神経細胞数をカウントした。Control 群では 229.7 ± 19.9 個/mm(mean $\pm$ SD)、CsA 群では 109.9 ± 72.4 個/mm vehicle 群では 4.8 ± 4 個/mm、non-treated 群では 7.0 ± 5.9 個/mm であり CsA 群と vehicle、non-treated 群では有意に細胞保護効果が認められた。この結果から、一過性前脳虚血では、cyclosporin A の腹腔内への大量投与のみで遅発性神経細胞死を抑制できることが確認された。また遅発性神経細胞死に MPT が深く関与していることが示唆された。

FK506 との比較においては focal ischemia model では cyclosporin A の効果は FK506 と同等以下の効果しか示さないものの、transient forebrain ischemia model、insulin-induced hypoglycemic coma model では強い細胞保護効果が認められることが報告されている。FK506 が MPT 抑制効果を示さないことを考慮すると、MPT と細胞障害の程度が必ずしも相関しないと考えられ、MPT の細胞障害における重要性が細胞侵襲違いにより異なることが示唆される。

これらのことから MPT を抑制することにより、脳虚血における神経細胞死を防止できることが推測され、脳虚血性疾患の治療への応用が可能であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 劔 物 修

学 位 論 文 題 名

The Role of Mitochondrial Permeability Transition in brain ischemia 脳虚血における Mitochondrial permeability transition の役割に関する研究

近年脳虚血においても一部の神経細胞死にアポトーシスの関与が指摘されており、この機序にmitochondrial permeability transition(MPT)の関与が示唆されている。MPTは侵襲刺激により、ミトコンドリア膜の透過性が亢進し、ミトコンドリアの膨化が生じる現象であり、この現象によりミトコンドリアからcytochrome c, apoptosis inducing factorが放出される。この結果caspase familyの活性化が引き起こされ、細胞死に至るとされている。本研究では脳由来のミトコンドリアにおけるMPTの種々の条件下における動態の検討を行った。またcyclosporin AはMPTの抑制効果をもつとされるが、この効果を脳由来のミトコンドリアで検討し、さらに一過性前脳虚血モデルを用いて海馬CA1領域に局限した遅発性神経細胞死に対する効果を検討した。

Mitochondrial permeability transitionの検討はラット前脳から遠心分離法にてミトコンドリアを単離し、カルシウムイオン、フリーラジカルを加えた場合の吸光度変化を経時的に測定した。またcyclosporin Aの一過性前脳虚血モデルにおける効果の検討はcontrol群、cyclosporin A投与群、vehicle群、non-treated群の4群において虚血作成30分前と再灌流24時間後にcyclosporin Aもしくはvehicleを投与し、虚血再灌流7日後の海馬CA1領域の残存神経細胞数を計測した。その後統計処理を行い各群間での比較を行った。

脳由来のミトコンドリアはアシドーシス、アルカローシス、低温によりカルシウムイオン負荷によるMPTは抑制された。またcyclosporin Aによりカルシウムイオンにより誘導されるMPTが強く抑制された。

xanthine/xanthineoxidase及び*t*-butyl hydroperoxideのフリーラジカル産生系を添加しても脳由来のミトコンドリアではMPTは誘導できなかった。さらに吸光度計測時、基線の吸光度が持続的に減少する現象が認められた。これらのことは肝臓、心臓由来のミトコンドリアの挙動とは異なっており、脳由来のミトコンドリアの特異性が示唆された。また、一過

性前脳虚血モデルにおける検討では、cyclosporin A群はvehicle群、non-treated群と比較して統計学的に有意な神経細胞保護効果を示した($p<0.1$)。このことから一過性前脳虚血における海馬CA1領域の遅発性神経細胞死にMPTが深く関与していることが示唆された。

今回の結果から脳虚血における神経細胞死の機序のひとつとしてMPTが関与しており、これを抑制することで神経細胞死の制御が可能になると考えられた。

公開発表において長嶋和郎教授よりミトコンドリアの臓器特異性について、遅発性神経細胞死の機序についてなどの質問があった、次いで剣物修教授よりmitochondrial permeability transition とapoptosis の関係について、cyclosporin Aはどのようなタイプの脳虚血に有効かなどの質問があった。次に阿部弘教授より軽度低体温でmitochondrial permeability transition の抑制は期待できるのかという質問があった。最後に、菅野盛夫教授より前脳虚血モデルにおける海馬の血流について、cyclosporin AとFK506の効果の違いについての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者らは自らの研究に基づく経験や過去の論文の内容を引用し、豊富な知識に基づいて明解に解答した。

この論文は脳由来のミトコンドリアにおけるmitochondrial permeability transition の動態を明らかにし、脳虚血におけるmitochondrial permeability transition の重要性を明らかにした点が高く評価され、今後の脳虚血による細胞死の制御に応用できるものと期待される。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。