

学位論文題名

FK506 Reduces Infarct Volume Due to Permanent Focal Cerebral Ischemia by Maintaining BAD Turnover and Inhibiting Cytochrome c Release

(FK506 は BAD turnover、ミトコンドリア機能を維持して脳梗塞の進展を抑制する。)

学位論文内容の要旨

【目的】一過性前脳虚血モデル、あるいは一過性局所脳虚血モデルでは、免疫抑制剤 FK506 が虚血性神経細胞障害を抑制することが報告されている。しかし、日常診療で多く経験する永久局所脳虚血モデルにおける FK506 の効果については明確ではない。

FK506 (tacrolimus: Prograf)は、calcineurin のもつ様々な器質に対する脱リン酸化酵素活性を阻害する作用を有する免疫抑制剤である。同様に脳保護効果を報告されている免疫抑制剤 cyclosporin A では、cyclophilin D に選択的に結合することによる MPT 抑制効果が要因とされる一方、FK506 ではその機序が何に由来するかが研究の焦点となっている。近年、低酸素負荷を加えられた神経細胞や、脊髄損傷モデル等で calcineurin による BAD (apoptosis 関連タンパク質である Bcl-2 family に属するタンパク質。BH3-only subfamily に属し、apoptosis 促進に働くとされている。)の脱リン酸化を阻害することにより apoptosis を抑制し、脳保護作用を得ているという説が報告されているが、異論もあり評価は定まっていない。我々はマウス MCA 永久閉塞モデルにおいて、FK506 が脳梗塞を縮小させる効果を有するか、また有効である場合に FK506 が、どのような機序を介して脳虚血における脳保護作用を発揮しているのかを検討した。

【方法】マウス(Balb/c、24-28g、雄)を FK506 投与群(1.0 or 3.0 mg/kg、虚血 30 分前 i.p.)と Vehicle 群に分け、それぞれ吸入麻酔下で右 MCA を凝固閉塞した。脳梗塞体積の測定は、各群とも虚血 24 時間後に TTC 染色を行い(n=25)、脳梗塞体積の評価は、対側の大脳半球に対する比で表した。また虚血 1、3、6 時間後、および偽手術後に大脳皮質より得られた細胞質分画サンプルを用いて、ウェスタンブロッティングを行いミトコンドリアから細胞質分画への cytochrome c 漏出を検討した(n=24)。さらに虚血 1、3 時間後に永久標本を作成し、cytochrome c、total BAD、リン酸化 BAD (p-BAD)の免疫染色を実施した

(n=16)。以上すべての動物実験は、当学の動物実験に関する指針に則り行われた。

#### 【結果】 脳梗塞体積の TTC 染色による測定結果

今回使用したマウス MCA 永久閉塞モデルでは、脳梗塞巣は大脳皮質に局在していた。FK506 投与群では、虚血辺縁部の梗塞巣が抑制される傾向がみられた。Vehicle 群では  $22.9 \pm 4.1\%$ 、FK506 投与群では、1.0mg 投与群で  $21.5 \pm 5.7\%$ 、3.0mg 投与群で  $17.3 \pm 5.1\%$ であった（平均値±標準偏差）。FK506 は 3.0mg/kg 投与群で、梗塞体積を 75.5%に有意に縮小した( $p=0.0146$ )。

#### 細胞質分画中の cytochrome c に関するウェスタンブロッティングの結果

ミトコンドリアからの cytochrome c の漏出は、Vehicle 群と FK506 投与群ともに、虚血開始時から経時的に増加する傾向がみられた。Vehicle 群と FK506 投与群で比較すると、Vehicle 群は虚血開始後 6 時間の時点で、cytochrome c の細胞質への漏出が有意に増加していたが、FK506 投与群ではこの漏出が抑制されていた( $p=0.0453$ )。

#### cytochrome c、total BAD、p-BAD における免疫染色の結果

虚血中心部では、cytochrome c、total BAD、p-BAD のいずれも、Vehicle 群と FK506 投与群の間で免疫反応に差がみとめられなかった。一方、梗塞辺縁部では、神経細胞の胞体での cytochrome c の免疫反応が、vehicle 群で虚血 1、3 時間後ともに増加が認められたが、FK506 投与群では増加が抑制されていた。これらの所見から、FK506 投与により cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への漏出が抑制されていると考えられた。total BAD に関しては、梗塞辺縁部において神経細胞の胞体での免疫反応が、vehicle 群で虚血開始 1、3 時間後ともに増加していたが、FK506 投与によって、虚血開始後の total BAD の免疫反応の増加が抑制された。しかし p-BAD は、梗塞辺縁部にて vehicle 群、FK506 投与群ともに、虚血開始後に明らかな変化が認められなかった。

【考察】FK506はマウスMCA永久閉塞モデルにおいても、有意な脳梗塞縮小効果を示した。また免疫染色にて示された、FK506投与による神経細胞でのBAD発現の変化は、脳保護作用の機序を考察する上で重要な所見と考えられた。すなわちBADはturnoverが非常に短い蛋白質として知られており、定常時には細胞内で量的制御をうけているが、これらの所見から脳虚血急性期にはこれらのメカニズムが破綻し、total BADが神経細胞内で増加を示すことが示唆された。また詳細な機序は不明であるが、FK506はBADのturnoverを維持することで、虚血辺縁部におけるtotal BADの増加を抑制し、p-BAD、非リン酸化BADのバランスを維持することで、mitochondrial permeability transition、およびcytochrome cの細胞質への漏出から開始する細胞死のプロセスを抑制している可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 岩 崎 喜 信

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

## FK506 Reduces Infarct Volume Due to Permanent Focal Cerebral Ischemia by Maintaining BAD Turnover and Inhibiting Cytochrome c Release

(FK506 は BAD turnover、ミトコンドリア機能を維持して  
脳梗塞の進展を抑制する。)

一過性前脳虚血モデル、あるいは一過性局所脳虚血モデルでは、免疫抑制剤 FK506 が虚血性神経細胞障害を抑制することが報告されている。しかし、日常診療で多く経験する永久局所脳虚血モデルにおける FK506 の効果については明確ではない。また FK506 のもつ神経細胞障害を抑制する機序が何に由来するかが研究の焦点となっている。近年、低酸素負荷を加えられた神経細胞や、脊髄損傷モデル等で calcineurin による BAD (apoptosis 関連タンパク質である Bcl-2 family に属するタンパク質。BH3-only subfamily に属し、apoptosis 促進に働くとされている。)の脱リン酸化を阻害することにより apoptosis を抑制し、脳保護作用を得ているという説が報告されているが、異論もあり評価は定まっていない。我々はマウス MCA 永久閉塞モデルにおいて、FK506 が脳梗塞を縮小させる効果を有するか、またどのような機序を介して脳虚血における脳保護作用を発揮しているのかを検討した。

方法としてマウスを FK506 投与群 (1.0 or 3.0 mg/kg、虚血 30 分前 i.p.) と vehicle 群に分け、それぞれ吸入麻酔下で右 MCA を凝固閉塞した。脳梗塞体積の測定は、各群とも虚血 24 時間後に TTC 染色を行った (n=25)。また虚血後、大脳皮質より得られた細胞質分画サンプルを用いて、ウェスタンブロッティングを行いミトコンドリアから細胞質分画への cytochrome c 漏出を検討した (n=24)。さらに cytochrome c、total BAD、リン酸化 BAD (p-BAD) の免疫染色を実施した (n=16)。

脳梗塞体積の TTC 染色による測定では、FK506 投与群では、虚血辺縁部の梗塞巣が抑制される傾向がみられた。Vehicle 群では  $22.9 \pm 4.1\%$ 、FK506 投与群では、1.0mg 投与群で  $21.5 \pm 5.7\%$ 、3.0mg 投与群で  $17.3 \pm 5.1\%$  であった (平均値  $\pm$  標準偏差)。FK506 は 3.0mg/kg 投与群で、梗塞体積を 75.5% に有意に縮小した ( $p=0.0146$ )。

Cytochrome c に関するウェスタンブロッティングの結果では、ミトコンドリアからの cytochrome c の漏出が、両群ともに、虚血開始時から経時的に増加する傾向がみられた。Vehicle

群は虚血開始後 6 時間の時点で cytochrome c の細胞質への漏出が有意に増加していたが、FK506 投与群ではこの漏出が抑制されていた ( $p=0.0453$ )。

Cytochrome c、total BAD、p-BAD における免疫染色の結果は、梗塞辺縁部では、神経細胞の胞体での cytochrome c の免疫反応が、vehicle 群で虚血後に増加が認められたが、FK506 投与群では増加が抑制されていた。これらの所見から、FK506 投与により cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への漏出が抑制されていると考えられた。Total BAD に関しては、梗塞辺縁部において神経細胞の胞体での免疫反応が、vehicle 群で虚血開始後に増加していたが、FK506 投与によって、免疫反応の増加が抑制された。しかし p-BAD は、梗塞辺縁部にて両群ともに、虚血開始後に明らかな変化が認められなかった。

結語として、FK506 はマウス MCA 永久閉塞モデルにおいても、有意な脳梗塞縮小効果を示した。また免疫染色にて示された、FK506 投与による神経細胞での BAD 発現の変化は、脳保護作用の機序を考察する上で重要な所見と考えられた。すなわち BAD は turnover が非常に短い蛋白質として知られており、定常時には細胞内で量的制御をうけているが、これらの所見から脳虚血急性期にはこれらのメカニズムが破綻し、total BAD が神経細胞内で増加を示すことが示唆された。また詳細な機序は不明であるが、FK506 は BAD の turnover を維持することで、虚血辺縁部における total BAD の増加を抑制し、p-BAD、非リン酸化 BAD のバランスを維持することで、cytochrome c の細胞質への漏出から開始する細胞死のプロセスを抑制している可能性が示唆された。

口頭発表に当たり、副査の吉岡教授から FK506 の BBB 通過、投与量について、apoptosis の関与、虚血急性期の BAD リン酸化に関して質問があった。同じく副査の岩崎教授から、脳虚血辺縁部における効果、cyclosporin A との比較、穿通枝梗塞での効果、他の脳保護薬との併用に関する質問があった。また主査の長嶋教授より calcineurin の誘導、TUNEL の検討、虚血再灌流モデルとの違い、KO マウスを用いた検討等に関する質問があった。最後にフロアから、将来的に虚血中心部を救う手段、また研究の背景について質問があった。これらの質問に対して申請者はおおむね適切な回答を行った。

この論文は FK506 の脳保護作用の機序を明らかにした点で優れていると判断され、今後の脳虚血の治療に貴重な示唆を与えたものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。