

論文要旨等報告書

氏	中塚 伊知郎
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3367 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	鉄ニトリロ三酢酸によるラット脳における酸化ストレス反応に関する研究

論文審査委員 助教授 宮脇 卓也 教授 杉本 朋貞 教授 北山 滋雄

学位論文内容の要旨

【緒言】

酸化ストレスとは、生体内で生成する活性酸素群の酸化損傷能力と、生内の抗酸化システムの抗酸化力とのアンバランスによって酸化に傾いた状態と考えられている。また、酸化ストレスは虚血再灌流、移植、炎症、高濃度酸素の曝露などにより生じることが知られている。このことは、全身麻酔下での手術における、循環動態の変動、手術侵襲による炎症性サイトカインの放出、あるいは人工呼吸管理などと深く関連している。さらに、術後せん妄において酸化ストレス反応との関連が示唆されており、手術・麻酔においても酸化ストレスは考慮すべき重要なテーマである。

しかし、脳においては、外傷、虚血以外の酸化モデルが十分に確立されていないため、脳の酸化ストレスに対する反応に関しては、十分解明されていない。そこで、本研究は、脳の酸化モデルとなり得ることを想定して、酸化作用を有する鉄ニトリロ三酢酸(ferric nitrilotriacetate, 以下 Fe-NTA)を末梢に投与した際の、脳内の酸化ストレス反応を評価することを目的とした。また、酸化ストレス反応の指標としては、最も鋭敏な酸化ストレスマーカーとされるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)と、脂質の酸化生成物である4-hydroxynonenal (4-HNE)を測定し、Fe-NTA 投与による脳内の酸化ストレス反応を調べた。

さらに、酸化ストレス反応は、炎症によっても生じ、その反応はサイトカインを介することが知られている。そこで、LPS による酸化ストレス反応と比較することで、Fe-NTA の反応における炎症性サイトカインの関与についても検討を加えた。

【方法】

Fe-NTA もしくは LPS を 6 週齢の雄 SD ラットに腹腔内投与した後、脳から視床下部と海馬を取り出した。これらをサンプルとして HO-1 mRNA の発現をリアルタイム PCR にて比較定量評価し、IL-1 β と IL-6 についても同様に分析した。また、Fe-NTA を投与したラット脳を用い、in situ ハイブリダイゼーション法にて HO-1 mRNA の発現部位を調べた。さらに、ドットプロット法にて 4-ヒドロキシ-2-ノネナール(4-HNE)を定量評価した。

【結果】

Fe-NTA, LPS 投与のどちらも HO-1, IL-1 β および IL-6 mRNA の発現を増加させ, HO-1 mRNA の増加率は視床下部よりも海馬で高かった。Fe-NTA 投与では LPS 投与よりも HO-1 mRNA の増加率は高く, IL-1 β , IL-6 mRNA は低かった。in situ ハイブリダイゼーション法の結果, Fe-NTA 投与により, 室傍核大細胞領域, 海馬 CA1, CA3 領域で HO-1 mRNA の発現が認められ, 形態学および神経解剖学的に, ニューロンに発現していることが示唆された。Fe-NTA 投与により, 視床下部において 4-HNE の生成が有意に増加したが, 海馬では 4-HNE の増加は認められなかった。

【考察】

Fe-NTA 投与により, 視床下部と海馬において HO-1 mRNA の発現が増加し, 酸化反応が生じていることが示唆された。また, 室傍核と海馬に HO-1 遺伝子の発現が認められ, これらの部位は酸化ストレスに対して, 反応性が高い部位であると考えられる。

本研究において, LPS 投与後は過去の研究と同様に IL-1 β と IL-6 のレベルが上昇していた。IL-1 β は培養星状グリア細胞において, HO-1 遺伝子の発現を誘発する可能性から, LPS による HO-1 遺伝子発現は炎症性サイトカインを介した反応であると考えられる。一方, Fe-NTA 投与では, IL-1 β , IL-6 遺伝子の発現が, LPS 投与後に比べると小さく, HO-1 遺伝子の発現が大きかったことから, Fe-NTA による酸化ストレス反応は, LPS によるものとは異なり, 炎症性サイトカインの関与は少ないと考えられた。

また, Fe-NTA 投与後の 4-HNE 変化は HO-1 の遺伝子発現と逆のパターンであったが, 脊髄の外傷モデルでは, 4-HNE の増加が HO-1 により抑制されたという報告があり, 本研究においても海馬での高いレベルの HO-1 が 4-HNE の抑制に関連した可能性がある。

本研究の結果から, Fe-NTA の末梢投与により脳内に酸化ストレス反応が生じていると考えられ, 脳の外傷や虚血を伴わない脳の酸化モデルとして応用可能であることが示唆された。しかし, 脳での酸化ストレス反応は, 強い身体拘束によっても惹起されることが報告されていることから, Fe-NTA 投与が間接的に脳内に酸化ストレス反応を誘導した可能性も否定できない。今後, 作用機序について十分検討し, 脳室内に直接 Fe-NTA を投与するなどの投与方法について検討を加えることで, この研究の有用性が明らかになると考えられた。

論文審査の結果の要旨

手術・麻酔における酸化ストレス反応は、考慮すべき重要なテーマであるが、脳における酸化ストレスモデルが十分に確立されていないことから、手術・麻酔に伴う脳の酸化ストレス反応は十分解明されていない。そこで本研究は、脳の酸化ストレスモデルとなり得ることを想定して、酸化作用を有する鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) を末梢に投与した際の、脳の酸化ストレス反応を評価し、検討を加えたものである。

その結果、Fe-NTA 投与により視床下部と海馬で、酸化ストレスマーカーであるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 遺伝子の発現が強くみられ、Fe-NTA 投与によって、脳に酸化ストレス反応が生じることを示した。また、炎症性ストレスを惹起することが知られている LPS を投与したものと比較したところ、LPS 投与では HO-1 遺伝子の発現がみられたがその程度は弱く、Fe-NTA 投与による酸化ストレス反応とは異なることを示した。さらに、他の酸化ストレス反応の指標である、脂質酸化生成物 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4-HNE) の生成について調べた結果、Fe-NTA 投与によって視床下部でその生成が増加していることを示し、HO-1 と 4-HNE との関連について考察した。

本研究は、Fe-NTA 投与が脳内に酸化ストレス反応を生じさせることを示し、脳の外傷や虚血を伴わない、脳の酸化ストレスモデルとして有用であることを示唆するものであり、脳の酸化ストレスに関する研究の発展に資するものであると考えられる。よって、本申請論文は学位論文としての価値を有するものと認めた。