

## 神経系細胞におけるアポトーシスにおよぼす低体温の影響

### 学位論文内容の要旨

#### 背景と目的：

近年、脳血管障害や頭部外傷に対する軽度脳低体温療法の脳保護効果が報告されてきている。頭部外傷患者に対する軽度脳低体温療法の効果を検証した研究においても、頭蓋内圧を制御し、死亡率と重症度を改善したと報告されている。しかし、その脳保護効果の機序について代謝の抑制だけでは説明できず、依然確定を見ない。

これまで脳虚血による神経細胞死はネクローシスと考えられていた。一方、一過性脳虚血後 2~3 日に見られる遅発性神経細胞死や、局所脳虚血における penumbra 領域で、アポトーシスが関与していることが 1990 年代前半から次第に明らかにされてきた。すなわち、虚血によって神経細胞はネクローシスあるいはアポトーシスのいずれかの形態をとり死に至ると推測される。ネクローシスは主に細胞内エネルギー欠乏により起こるため、代謝の抑制がネクローシス抑制につながる。しかし、アポトーシスは細胞内カルシウム濃度の増加、遺伝子の発現、ある種の蛋白分解酵素（カスパー）の活性化など、細胞内カスケードの活性化によって起こる。すなわち、代謝抑制ではなく、これらカスケード抑制がアポトーシス抑制につながる可能性がある。

そこで、軽度低体温の脳保護効果の機序として、上記カスケードを抑制する結果としてアポトーシスを抑制するためという仮説をたてた。本研究では、神経系モデルとしてラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞株を選択し、血清を除去することによりアポトーシスを誘導し、軽度および中等度低体温の影響を検討した。また、抑制効果があった場合には、PC12 細胞のアポトーシスの作用機序に深く関与している活性酸素の産生と、カスパー 3 およびカスパー 2 の活性におよぼす低体温の影響についても検討を加えた。

#### 方法：

実験 1：アポトーシスの誘導は、PC12 細胞のアポトーシス誘導法として最も代表的な方法の一つである培養液からの血清除去により行った。また、PC12 細胞は培養液から血清を除去すると選択的にアポトーシスを引き起こすことが知られている。37℃、5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気下に 2 日間通常培養した後に血清除去によりアポトーシスを誘導し、37℃、35℃、33℃、31℃、または 29℃ 下で培養した。血清除去 4 日後に細胞障害度 (LDH activity) とアポトーシス誘導率 (flow cytometry) を測定した。また、対照群は、2 日間通常培養した後に、血清を含んだ DMEM で培養し、それぞれの温度で培養の 4 日後にアポトーシス群と同様に測定した。

実験 2：細胞内の ROS レベルを検出するため、ROS と反応して蛍光を発する色素の

6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein, diacetate (aceto-xymetyl ester) (C-DCDHF-DA)を用いた。PC12細胞を2日間37℃で通常培養した後、C-DCDHF-DA (10 μM) で30分間染色して、アポトーシス群と対照群をそれぞれの温度 (37℃, 35℃, 33℃, 31℃, 29℃) で培養し、アポトーシス誘導の3, 6時間後のROSレベルをフローサイトメトリで解析した。

実験3: アポトーシスを誘導後に、37℃, 33℃, 29℃のそれぞれの温度で培養の15時間後に、カスパー3またはカスパー2の Assay Kit を用いて分光光度計によりそれぞれの活性を測定した。

#### 結果:

実験1: 細胞障害度とアポトーシス誘導率は、アポトーシス群では37℃と比較して35℃以下で有意に細胞障害度とアポトーシス誘導率が抑制された。対照群では37℃と比較して29℃で有意に細胞障害度とアポトーシス誘導率が増加した。その他の温度では37℃と比較して有意差がなかった。

実験2: ROS産生は、アポトーシス群においてアポトーシス誘導の6時間後に37℃と比較して33℃では有意に抑制されたが、その抑制の程度は約15%にとどまった。

実験3: アポトーシス群においてアポトーシス誘導の15時間後のカスパー3とカスパー2の活性を測定したが、37℃, 33℃, 29℃の3群間で統計学的有意差を認めなかった。

#### 結語:

1. 体温の脳保護効果の機序について、アポトーシス抑制という仮説をたてた。
2. ラット副腎髄質褐色細胞腫由来のPC12細胞の培養液からの血清除去によりアポトーシス単独モデルを作成し、29-37℃までの影響を検討した。
3. 29-35℃は37℃と比較して、細胞障害度とアポトーシス誘導率を有意に抑制した。すなわち、軽度低体温の脳保護効果にはアポトーシス抑制の関与が示唆された。
4. アポトーシス抑制の機序について、活性酸素産生抑制とカスパー活性抑制の2点に注目して検討したが、有意な結果は得られなかった。
5. 29℃では、アポトーシスを誘導しなかった対照群の細胞障害度とアポトーシス誘導率を増加させた。したがって、33℃前後の軽度低体温が神経細胞保護として最も有効な温度帯であると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 劔 物 修  
副 査 教 授 本 間 研 一  
副 査 教 授 田 代 邦 雄

学 位 論 文 題 名

## 神経系細胞におけるアポトーシスにおよぼす低体温の影響

1950年代から動物実験を用いた低体温による脳保護効果の研究が行われていたが、それは主に体温が30℃以下のいわゆる conventional hypothermiaでの脳保護効果についてであったが、体温が30℃以下の非生理的な低体温自体が生体にとって過大な侵襲であり臨床応用されるまでには至らなかった。しかし、1987年に前脳虚血モデルで虚血中の脳温を36℃から34℃に下げただけで海馬CA1錐体細胞や線条体背外側細胞の虚血性障害が劇的に減少することが報告され、現在の臨床における軽度脳低体温療法にまで発展する契機となった。一方、以前から、低体温による脳保護効果の機序を代謝の抑制だけでは説明できないという事実があり、また、最近では脳虚血による神経細胞死にはネクローシスのみならずアポトーシスも関与しているという報告がみられる。したがって、本論文は、近年注目されている軽度脳低体温療法の脳保護効果の機序としてアポトーシスの抑制という仮説を立て、神経系細胞の実験モデルとしてラット副腎髄質褐色細胞腫由来のPC12細胞株を用いてその低体温の影響を検討したものである。

実験では、PC12細胞の培養液からの血清除去によりアポトーシス単独モデルを作成し、37、35、33、31、29℃の影響を検討した。その結果、アポトーシス誘導群において、35、33、31、29℃は37℃と比較して細胞障害度とアポトーシス誘導率を抑制し、軽度低体温の脳保護効果にはアポトーシス抑制の関与が示唆された。また、このアポトーシス抑制の機序について活性酸素産生とカスパーゼ活性に対する低体温の影響の検討を加えたが、有意な結果は得られなかった。一方、アポトーシスを誘導しない対照群では、29℃において細胞障害度とアポトーシス誘導率を増加させた。以上より、33℃前後の軽度低体温が神経細胞保護として最も安全かつ有効な温度帯であると考えられ、臨床の軽度低体温療法の治療温度が33-34℃であることを支持する結果となった。

公開発表の質疑応答では、副査の本間研一教授から、主に基礎の視点で1) PC12細胞の血清除去によるアポトーシスのメカニズムがどこまで解明され、低体温がどの過程に作用

しているのか、2) 神経系細胞である PC12 細胞の活動電位を研究した文献や、その活動電位に対する低体温の影響を研究した報告があるかどうか、3) PC12 細胞を無酸素状態で培養した場合、アポトーシスが生じるかどうかの3点について質問があった。次いで、副査の田代邦雄教授からは、主として臨床の立場から1) 脳低体温療法に関連し、全身の体温と頭蓋内の脳温度あるいは脳細胞温度が同じ温度かどうかの報告があるのか、2) 29℃という低体温が正常部位に対して障害を引き起こす可能性を指摘しているが、その機序をどう考察するのか、3) 頭部外傷や脳虚血においてアポトーシスあるいはネクローシスが起きて細胞死に至る場合、頭部外傷と脳虚血ではアポトーシスやネクローシスの生じ方に違いはあるのかの3点について質問があった。最後に、主査の劔物 修教授から、この研究において33℃前後の軽度低体温が神経細胞保護として最も有効かつ安全な温度帯であることを支持する結果を得ているが、最新の臨床における軽度脳低体温療法に用いられる効果的な治療温度についてどう考えられているかについて質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は基礎的研究論文や申請者の研究グループの研究成果、最近の臨床報告などを引用して説明し、また、解明されていない論点については申請者の考察を述べて解答した。さらに、副査の本間研一教授は、軽度脳低体温療法による脳保護のメカニズムを解明するという大変意欲的な研究であるとの評価をした。副査の田代邦雄教授は、軽度脳低体温療法の効果が注目されている現在、in vitroの研究ではあるが神経系の培養細胞を用いてその機序について検討したことの重要性を評価した。

この研究内容は1998年のSCCM(Society of Critical Care Medicine)、ASA(American Society of Anesthesiologists)および2000年のESA(European Society of Anaesthesiologists)における発表において高く評価された。その後、さらに研究を進め、その成果は2001年7月に北海道医学雑誌に掲載される予定である。本研究は今後の侵襲制御医学における軽度脳低体温療法の機序の解明に寄与することが期待される。

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取得単位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。