

氏名(本籍)	辻真理子(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2667号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Heme oxygenase expression in rat spinal cord after formalin injection in the hind paw (ラット足底へのホルマリン注射後、脊髄神経におけるヘム・オキシゲナーゼの発現)
主査	筑波大学教授 医学博士 吉田 薫
副査	筑波大学助教授 博士(医学) 寺田 康
副査	筑波大学講師 博士(医学) 植野 映
副査	筑波大学講師 薬学博士 田中 榮之介

論文の内容の要旨

(目的)

ヘムオキシゲナーゼ(HO)はヘムから一酸化炭素(CO)、ビリベルジン、遊離鉄を産生する反応を触媒し、3種類のアイソフォームが存在する。HO-1は誘導型でヘム、ヘモグロビン、金属、活性酸素などにより著しく活性が誘導され、この誘導は酸化ストレスに対する細胞の防御反応の一つと考えられている。一方、HO-2は構成発現型で中枢神経系を含む殆どの組織に一定レベル発現している。近年、HO-1あるいはHO-2によりヘムから産生されるCOが血管平滑筋弛緩作用や血小板凝集抑制作用の他に、一酸化窒素(NO)同様、侵害刺激時に神経伝達物質として働く可能性が報告され注目を集めている。脊髄も膜下腔内にHO阻害剤を投与したラットやHO-2遺伝子欠損マウスでは、足底へのホルマリン注射(ホルマリンテスト)時の疼痛反応の低下が報告されている。また、血液脳関門通過型、非通過型のHO阻害剤の皮下注射の効果から、中枢内のHOが関与することが示唆されている。本研究では、ホルマリンテストによる侵害刺激が脊髄内HOの発現に及ぼす影響を調べた。免疫染色法とウエスタンブロッティング法を用い、1)誘導型酵素であるHO-1の発現が誘導されるか、2)また構成型のHO-2の発現量が変化するかを経時的に比較した。

(対象と方法)

6-8週令、250-300gのオスS-Dラットを用いた。コントロール群とホルマリン処置群に分け、コントロール群には何も処置を行わなかった。ホルマリン処置群では足底の皮下組織内に5%ホルマリン0.2mlを注射した。注射から30分、2時間、1日、4日後に脊髄を剔出し、免疫染色法とウエスタンブロッティング法によりHO-1の発現の有無とHO-2の発現の変化を調べた。1)免疫染色法ではラットを4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定したのち脊髄を剔出し、固定液に2時間、その後10%しょ糖液に一晩浸した。腰髄の上部、中部、下部の3カ所からマイクロトームを用いて厚さ40 μ m連続切片を作成した。切片は染色までPBS液中で冷蔵保存し、免疫染色法はABC法を用いた。2)ウエスタンブロッティング法では脊髄をSDSサンプルバッファーで溶解し、100度で5分間加熱後冷凍保存した。その後脊髄溶解中の蛋白濃度を測定し、20 μ gと40 μ g蛋白量中のHO-1の発現を調べた。また、HO-2の発現量の経時変化をデンストメトリ法により調べた。

(結果)

免疫染色法の結果、HO-1の脊髄内での発現はコントロールおよびホルマリン処置群いずれにおいても認められなかった。ウエスタンブロッティングの結果もこれと一致し、HO-1は検出されなかった。一方、HO-2は正常脊髄では前角の大型細胞に発現していたが、後角のⅠ－Ⅲ層の細胞には発現が認められなかった。ホルマリン処置後もその発現部位は同様であった。HO-2の発現はウエスタンブロッティング法でも確認されたが、ホルマリン処置後も発現量に有意な変化は認められなかった。

(考察)

これまで中枢神経系のHO-1に関しては、脳ではくも膜下出血、脳内出血、刺傷等の状況下で、脊髄では胸髄の挫傷後に発現が誘導されることが報告されている。本研究で用いたホルマリンテストは炎症性疼痛のモデルとして知られるが、この末梢性の侵害刺激ではHO-1の誘導は検出されなかった。おそらく、脊髄や脳でのHO-1の発現を誘導する因子としては、神経活動変化よりも、出血部位での赤血球崩壊によるヘモグロビンの暴露が重要と考えられる。一方、HO-2の発現はコントロール、ホルマリン処置両群で認められた。HO-2遺伝子欠損マウスではホルマリンテスト時の疼痛反応が正常マウスに比し低下すること、また、同程度の疼痛反応低下が正常マウスへのHO阻害剤投与によって起こることが報告されている。これらの報告は、疼痛反応を起こす中枢神経機構におけるHOの関与、特にHO-2の重要性を示唆している。本研究の結果では、HO-2の発現量はホルマリン処置後も変化が認められなかったことから、通常状態において疼痛反応形成に必要な十分なHO-2が構成発現していることが示唆される。また、一酸化窒素合成酵素の場合と異なり、後角Ⅰ－Ⅲ層にHO-2の発現は認められなかった。両者から産生されるNOとCOは類似の機能的性質を持つが、脊髄における侵害刺激の伝達における役割は異なることが示唆される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

ヘムオキシゲナーゼ (HO) によりヘムから産生される一酸化炭素 (CO) は、一酸化窒素 (NO) 同様、神経伝達物質様の機能を有し、侵害刺激による疼痛反応の発現に関与することが示唆されている。本研究は、ラット足底へのホルマリン注射による侵害刺激が脊髄内HOの発現に及ぼす影響を、免疫染色法とウエスタンブロッティング法を用いて経時的に調べたものである。誘導型アイソフォームHO-1の発現は認められず、疼痛反応に関与するのは主に構成発現型のHO-2であることを示唆した。またHO-2の発現部位は一酸化窒素合成酵素とは明らかに異なることを示し、侵害刺激伝達におけるNOとCOの役割が異なることを示唆した。HO-2の発現部位と発現量に経時的な変化は認められなかったが、得られた結果は侵害刺激伝達の機序解明に必要な基礎データとして評価できる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。