

論文内容の要旨

The effects of xanthine oxidoreductase inhibitors on oxidative stress markers following
global brain ischemia reperfusion injury in C57BL/6 mice

(訳) 全脳虚血再灌流モデルマウスにおけるキサンチン還元酵素による
脳保護効果に対する検討

日本医科大学大学院医学研究科 侵襲生体管理学分野
大学院生 山口 昌紘

PLOS ONE (2015) 掲載

【背景】

プリン代謝の最後の 2 ステップを触媒するキサンチン酸化還元酵素(XOR)は通常はキサンチンデヒドロゲナーゼ型(XDH)で存在し、 NAD^+ へ電子を供給するが、傷害された組織などでキサンチンオキシダーゼ型(XO)へ形態変化をおこし、活性酸素を産生する。この活性変換現象は種々の病態に関与し、XOR 阻害薬は活性酸素産生を抑えることで組織保護効果を示すと多くの報告がある。本研究に先立つ研究において、我々はマウスの 3-vessel occlusion モデルにて 2 種の XOR 阻害剤を用い脳組織の海馬領域の神経細胞の保護効果を病理組織学的に検討したが、保護効果は認めなかった。今回の検討ではこの研究をさらに推し進め、マウスの 3-vessel occlusion モデルにて虚血再灌流組織での種々の酸化ストレスマーカーの検出と経時的変化の観察、XOR 阻害剤投与による抑制効果の検討を行った。

【方法】

マウスを吸入麻酔にて全身麻酔をおこない、両側総頸動脈、脳底動脈を 14 分間クリップにて遮断を行った。

(検討 1)

再灌流後 1,2,4,6,8,96 時間後に還流を行い Western blot により 3-Nitrotyrosine, 4-HNE, 2 物質の時系列での検討を行った。

(検討 2)

3-Nitrotyrosine, 4-HNE, NF κ B の免疫染色を行い control と再灌流後 8 時間後での染色の程度、染色細胞の局在の比較を行った。

(検討 3)

虚血処置 30 分前にプラセボ(0.5% methylcellulose)、アロプリノール(Allopurinol 50 mg/kg)、フェブキシostat(Febuxostat 50 mg/kg)の投与を行い、再灌流 24 時間後に還流を行った。Western blot により 3-Nitrotyrosine, 4-HNE の半定量、RT-PCR による NF κ B 系の IL-1 β , TNF- α , ICAM-1, MMP-9 と XDH の mRNA の半定量による解析を行った。

【結果】

(検討 1)

control と比較したところ、再灌流後徐々に 3-Nitrotyrosine (45 kDa), 4-HNE (43 kDa)において有意差を持ってシグナルの増強を認めた。また事後比較検定において再灌流 8 時間後、96 時間後では control と比較して有意にシグナルの増強を認めた。

(検討 2)

control と比較したところ、再灌流 8 時間後での CA1, CA2, 運動野の皮質の神経細胞におい

て 3-Nitrotyrosine, 4-HNE, NFκB の染色を強く認めた。また血管内皮細胞にも染色を示した物質を認めた。再灌流 24 時間後 96 時間後においても同様な結果であった。

(検討 3)

(検討 1)の結果を踏まえ、再灌流 24 時間後における同様の検討を行った。

Western blot の検討では control 群に比しプラセボ群において有意にシグナルの増強を認めた。薬剤 3 群間においては有意差を認めなかった。

RT-PCR の検討では、control と比較してプラセボ群において酸化ストレス応答遺伝子 mRNA 量の増加を有意に認めた。またプラセボ群と比較してアロプリノール群において mRNA 量を有意に抑制した。フェブキシostat群においてはプラセボ群と比較して有意差を認めなかった。また XDH の mRNA の誘導は薬剤 3 群間で差を認めなかった。

【考察】

今回の検討では全脳虚血再灌流により組織が活性酸素ストレスにさらされているかを検討した。全脳虚血再灌流モデルにおいて Western blot, 免疫染色を用い酸化ストレスマーカーの検出を行い、マーカーとなる分子が産生されていることが示すとともに、時間経過とともに上昇しつづけ、再灌流 8 時間以降でプラトーとなることも示した。

続いて2種のXOR阻害剤による組織保護効果を検討した。Western blotの検討では両群ともにプラセボ群に比較し有意差を認めなかった。脳組織においてXORが活性酸素生成源であるかは未だ議論されているところがある。我々の過去の報告では脳組織中のもともとのXORの活性は非常に低く、虚血再灌流で誘導される割合は無視できる量であった。我々の今回の検討でも脳組織でのXOR活性酸素生成は軽微であると考えた。フェブキシostatはアロプリノールに比べ、薬理的に優れたXO阻害作用を持つにもかかわらず、我々のRT-PCRの検討では神経保護効果はアロプリノールによるものより限定的であった。理由としてフェブキシostatは血液脳関門を通過することができないが、アロプリノールは通過が可能であること、アロプリノールはXORを介さないラジカルスカベンジャー効果を有することが考えられる。今回の結果からもアロプリノールの神経保護作用は、XOR阻害によるものではなく、直接のスカベンジャー作用によるものと考えた。