

江崎 泰之 論文内容の要旨

主 論 文

Vitamin E prevents the neuronal cell death by
repressing cyclooxygenase-2 activity

(シクロオキシゲナーゼ 2 活性阻害の機序を介したビタミン E の神経保護効果)

江崎泰之、西原永潤、柴田義貞、松尾孝之、北川直毅、永田 泉、篠原一之

Neuroreport. 2005 Aug 1;16(11):1163-7

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：永田 泉教授)

緒 言

脳虚血が発症して脳血流が遮断されると脳組織は数時間で不可逆性の変化をきたし壊死に陥って梗塞となる。近年、脳梗塞の治療では早期診断・早期治療を行い、後遺症を最小限にいくとめることの重要性が認識されつつある。しかし現在行われている血栓溶解、抗凝固、抗血小板療法はいずれもいかに早期に閉塞血管を再開通させるかを目的に使用され、脳保護の観点から使用できるのはフリーラジカルスカベンジャーのエダラボンのみである。

ビタミン E は以前より抗酸化物質として注目されており、脳虚血に対する神経保護効果が報告されている。しかしこの神経保護効果の機序は依然として十分に解明されていない。また、シクロオキシゲナーゼ (Cox) は、アラキドン酸からプロスタグランジン合成する酵素であり、恒常的に発現している Cox-1、Cox-3 と誘導型の Cox-2 の主に 3 種類がある。一般的には、Cox-2 は定常状態にある細胞では発現が弱く、脳虚血などの病態では各種の増殖因子の刺激により、一過性に誘導される。様々な実験モデルでビタミン E が Cox-2 活性を抑制する効果が報告されているが、まだ神経細胞を用いたモデルでの報告がない。

今回我々は脳梗塞の病態の 1 つであるグルタミン酸で誘導される神経細胞傷害に対するビタミン E の神経保護効果は Cox-2 の発現を抑制することで作用しているという仮説をたて、in vitro モデルを用い検討した。

対象と方法

マウス海馬由来の神経細胞株 (HT-22) を用い実験を行った。生細胞の数は WST-8 assay で、Cox-2 の発現の変化は RT-PCR 法、蛍光免疫染色法を用いて検討した。また Cox-2 inhibitor である NS-398 を用いてビタミン E の効果と比較した。

結 果

1) ビタミン E の神経保護効果の検討

24 時間のグルタミン酸処理により HT-22 の生細胞数は濃度依存的に減少し、5mM の濃度では非処理群と比較して処理後 24 時間に約 60%まで生存率が低下し、10mM であれば 10%にまで低下した。しかし 10mM のグルタミン酸処理 12 時間前にビタミン E を併用すると、神経細胞傷害は濃度依存的に抑制され、10 μ M ビタミン E 併用により 90%以上の生存率が認められた。さらにビタミン E の投与時期を検討すると、グルタミン酸処理前だけでなく、処理 3 時間後に投与しても保護効果は認められた。

2) RT-PCR および蛍光免疫染色による Cox-2 発現変化の検討

次に、グルタミン酸処理時において Cox-2 発現変化を RT-PCR を用いて解析した。その結果、Cox-2 はグルタミン酸処理により 1 2 時間後に約 4 倍の発現上昇が認められた。しかし、ビタミン E (10 μ M) 併用によりグルタミン酸による Cox-2 の発現上昇は著明に抑制された。また蛍光免疫染色法を用いた検討でも、グルタミン酸処理 12 時間後では Cox-2 陽性細胞が増加し、ビタミン E を併用するとその増加は抑制された。

3) NS-398 による神経保護効果の検討

5mM のグルタミン酸処理に NS-398 (10 μ M) を併用することで神経細胞傷害は有意に抑制された。しかし 10mM のグルタミン酸では NS-398 の保護効果は認められなかった。

考 察

今回の検討により、ビタミン E によってグルタミン酸処理による神経細胞傷害は抑制され、その効果はグルタミン酸処理 3 時間後に投与しても認められた。また、このビタミン E の神経保護効果の機序に 1 つとして、Cox-2 発現を抑制することが示唆された。ビタミン E が Cox-2 発現を調節するという報告は今までにされているが、神経細胞株を用いた報告は今回が初めてである。しかし NS-398 を用いた検討では、10mM グルタミン酸処理時には NS-398 を併用してもビタミン E と同等の保護効果が認められなかったことから、ビタミン E の保護効果は Cox-2 以外のターゲットを介した機序も考えられた。他に言われている機序として、NF κ B 活性の抑制、SOD などの抗酸化物質の活性化、直接活性酸素に対する作用などが言われている。

HT-22 を用いた *in vitro* の検討で、グルタミン酸処理後 2 ~ 4 時間は RNA・蛋白合成は保たれるが、6 時間以降になると活性酸素の著明な蓄積、細胞内 Ca²⁺濃度上昇が認められ傷害は不可逆的となる。ビタミン E の神経保護効果についての報告は今までにもあるが、ビタミン E の投与時期に関する報告はない。グルタミン酸処理後であっても、まだ RNA・蛋白合成が保たれている時期にビタミン E を併用すれば保護効果が得られたことは、臨床的側面からみても意義が大きいと思われる。