

27V-am01

ラット脳アストログリア細胞を用いた脳卒中発症因子の探索—硫化水素の関与—
○十萬 佐知子¹, 奈良 安雄¹, 安井 菜穂美¹, 高道 二千香¹, 奥田 浩人¹, 三木 知博¹ (武庫川女大 薬)

[目的] 硫化水素(H_2S)は近年、新しい神経伝達物質として、また強力な還元性物質であるとして注目されており、血管拡張作用も持つことも明らかになってきている。このことが脳卒中発症に関連する因子として働く可能性があると考え、高血圧自然発症ラット(SHR)と高血圧自然発症脳卒中易発症ラット(SHRSP)の胎児脳由来アストログリア細胞を用いて、低酸素条件下または過酸化水素(H_2O_2)を添加し、細胞内還元状態をグルタチオンやタンパク質のSH基の染色、 H_2S の定量、またその産生酵素遺伝子、タンパク質発現の相違について調べた。

[方法] SHR、SHRSP 胎児脳由来アストログリア細胞を播種し、 H_2O_2 100 μ M を添加し、20% O_2 と 0.1% O_2 条件下でそれぞれ培養した。24 時間後にグルタチオンとタンパク質 SH 基検出蛍光物質(ThiolTracker™Violet)を結合させて染色し、プレートリーダーにて蛍光強度の測定を行った。また H_2S 検出蛍光物質(SF4)にて染色し、蛍光顕微鏡下(キーエンス社)にて撮影した画像より定量を行った。さらに培養後得られた totalRNA と細胞溶解液を用いて PCR および Western blotting を行い、 H_2S 産生酵素である Cystathionine β -synthase や Cystathionine γ -lyase の発現を解析した。

[結果・考察] SHR に比較し、SHRSP の脳アストログリア細胞では H_2S の有意な低下が見られた。またグルタチオンとタンパク質 SH 基についても SHRSP で有意に低かった。各細胞の蛍光強度は H_2O_2 添加により有意に減少したが、SHRSP は SHR よりも減少が有意に大きく、このことは H_2O_2 に対して SHRSP の細胞が SHR よりも脆弱であることの理由となる可能性がある。さらに H_2S 産生酵素の遺伝子発現およびタンパク質発現についても合わせて発表する。