



新生仔ラットの低酸素虚血負荷におけるHemoxygenase-1蛋白mRNAの発現について

田口, 和裕

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 60(1):33-40

(Issue Date)

1999-06

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00042528>



新生仔ラットの低酸素虚血負荷における Heme oxygenase-1 蛋白及び mRNA の発現について

田 口 和 裕

所属：神戸大学大学院医学研究科小児科学
(担当：中村 肇教授)

連絡先：〒737-0811

呉市西中央 2 - 3 - 28

呉共済病院 小児科 田口 和裕

TEL :0823-22-2111

FAX :0823-21-1597

(平成11年1月25日受付)

要 約

Heme oxygenase (HO) はヘムを分解し、ビリベルジン、一酸化炭素、鉄を生成する反応を触媒する酵素である。その isozyme の一つである HO-1 は、通常の状態のラット脳では、限られた領域の神経細胞にわずかに存在するのみである。しかし、様々な刺激により HO-1 発現は強力に賦活される。我々は、新生仔ラットの低酸素虚血モデルの脳を用いて HO-1 の mRNA と蛋白の発現量を経時的に調べ、HO-1 蛋白が結紮側の大脳皮質、海馬、視床の一部、外包において、低酸素虚血負荷後3時間から36時間で増加していることを明らかにした。大脳では、HO-1 蛋白は結紮側の海馬を含む部分において、最も多く発現しており、低酸素虚血負荷後12時間で最高値に達した。HO-1 mRNA量は負荷終了時には、すでに増加し始めており、負荷終了後3時間で最高値に達し、以後減少した。HO-1 蛋白発現量の時間的経過は、HO-1 mRNA 発現量の時間的経過とほぼ一致し、新生仔ラットの低酸素虚血モデルは、成獣ラットの虚血モデルよりも、HO-1 発現が早期に誘導されると考えられた。これらの結果から、HO-1 による防御機構は、発達途上にある新生仔脳においても低酸素虚血負荷後の早期の段階で機能し、周産期の低酸素性虚血性脳障害の予防に寄与していると推測された。

緒 言

周産期に低酸素・虚血によって引き起こされる脳障

害は、依然として脳性麻痺、精神発達遅滞、てんかんなどの主要原因である^[1,2]。周産期の低酸素性虚血性脳障害に対する適切な治療法を考える上では、生体の防御機構の解明は不可欠である。Heme oxygenase (HO) はヘムを分解しビリベルジン、一酸化炭素、鉄を生成する反応を触媒する酵素である^[3,4]。HOには、ラットとヒトにおいて、それぞれ2つの isozyme が存在し、別々の遺伝子からつくられる^[5,6,7,8]。誘導型はHO-1、構成型はHO-2と呼ばれ、中枢神経系においては、神経細胞内にHO-2が広範に発現している。一方、HO-1は限られた神経系細胞に発現しているに過ぎない^[9]。しかし、HO-1発現は様々な刺激に反応して強力に賦活され^[10,11]、heat shock protein 32 (HSP 32) はHO-1と同一物質であることが確認されている^[12,13]。HOの触媒作用で生成されるビリルビンは、細胞内の複雑な防御機構の中で抗酸化物質として働くと考えられている^[14]。このことは、グルタチオンやアスコルビン酸などの、一般的な抗酸化物質が低いレベルにある新生児期の神経細胞にとっては重要なことかもしれない^[15]。低酸素虚血による障害発生は、活性酸素の増加と関連している^[16]。HO-1の作用により生成される抗酸化物質は、脳を酸化障害から防禦するのに寄与していると考えられる。新生児期においてHO-1 mRNAとHO-1蛋白が低酸素虚血によりどのように誘導されるかを明らかにすることは重要である。今回、我々は新生仔ラットの低酸素虚血モデル^[17,18]を用いてHO-1 mRNAとHO-1蛋白の発現量を経時的に検討した。

方 法

1 : 新生仔低酸素虚血モデルラットの作成

日齢7の Sprague-Dawleyラットをエーテルにて麻酔し, Levineの変法に基づいて, 左総頸動脈を結紮後切断した^[19]。皮膚を縫合し, 母親のもとに3時間戻し十分に回復させた後に, 8%酸素, 92%窒素を満たしたプラスチック製の密閉容器中に入れ, 2時間の低酸素負荷をかけた。ラットの体温は電熱のパットにより37.0℃から37.5℃に保たれていた。低酸素負荷終了後, ラットは再び母親のもとに戻した。頸動脈結紮, 低酸素負荷のいずれをも行っていない日齢7のラットを対照として用いた。

2 : 免疫組織化学

低酸素負荷終了後, 仔ラットをエーテルで麻酔した後に, 左心耳よりpH7.4, 0.1M/Lリン酸緩衝液(PB)で調製した4%パラホルムアルデヒド(PFA)溶液を用いて灌流固定した。脳を取り出し, PFA固定された脳を線条体, 海馬前方, 背側海馬, 小脳のレベルで冠状に切断した。パラフィン包埋後に, 6 μ mの冠状切片を作成しヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。脱パラフィン処理を行なった切片は, 1.5%のヤギ血清を含んだリン酸緩衝食塩水(PBS)に浸した後に, 200倍希釈したウサギ抗ラットHO-1ポリクローナル抗体(カナダ, Stress Gen社製)にて4℃で一晩インキュベートした。引き続き, アビジン-ビオチン化したhorseradish peroxidaseを用いて酵素組織化学法(Vector社製)を行なった。

3 : ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングの試料としては, 低酸素負荷終了後, 所定の時間に各々3匹以上の仔ラットを用いた。断頭後に, 脳を取り出して分割し, 8倍量の緩衝液(0.02% Tris-HCl, 0.04% EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF)で懸濁した後に, 12,000回転で20分間遠心した。各々の操作は4℃にて行なった。上清を12.5%SDS/ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行ない, 転写メンブレン(Immobilon-P)に電気的に転写した。メンブレンは4%スキムミルクを含むPBSに浸漬した後に, 10,000倍に希釈したウサギ抗ラットHO-1ポリクローナル抗体でインキュベートした。数回洗浄した後に, horseradish peroxidaseを結合したヤギ抗ウサギIgG抗体(5,000倍希釈)でインキュベートした。抗原抗体複合体はECL化学発光システム(アメリカ, Amersham社製)を用いて可視化し, リコンビナントラットHO-1蛋白(StressGen社製)を対照として用いた。コンピューターによる画像解析システム(NIH image 1.55 for

Macintosh)を利用してフィルム上のHO-1蛋白(32 kDa)のバンドの濃度を定量した。

4 : ノザンブロッティング

脳組織から, 全RNAを酸性グアニジン・チシアネート・フェノール・クロロホルム法(AGPC法)を用いて抽出した^[20]。全RNA(30 μ g/レーン)を, 2Mホルムアミドを含んだ1.0%アガロースゲルにて電気泳動した後にナイロンメンブレン(Hybond-N⁺)に転写した。Shibaharaらの報告^[21]をもとに, +366から+1196までのヌクレオチドからなる, ラットHO-1 cDNAをRT-PCRを用いて作製した。ラット α -チューブリンcDNAプローブを内部標準として使用した。これらのプローブを, ランダムプライミング法を用いて [α -³²P] dCTPでラベルした。メンブレンをハイブリダイゼーション溶液(ExpressHyb; アメリカ Clontech社製)とともに68℃, 30分間プレハイブリダイゼーションした後, DNAプローブとともに68℃, 1時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンは, 室温下にて2 $\times$ SSC, 0.05%SDS溶液で10分間2回, 50℃ 0.1 $\times$ SSC, 0.1%SDS溶液で20分間2回洗浄した。メンブレンから出る放射線をX線フィルム(RXU; フジフィルム社製)に感光させ現像した。現像したフィルムはウェスタンブロッティングと同じ方法で定量した。

結 果

統計で210匹の新生仔ラットの左総頸動脈を結紮し切断した。そのうち, 59匹を免疫組織化学に使用し, 51匹をウェスタンブロッティングに, 80匹をノザンブロッティングに使用した。低酸素負荷中, ラットの皮膚色は蒼白となり, ほとんどのラットがけいれんしていた。全体のうち20匹のラット(10.5%)が低酸素負荷中に死亡した。

免疫組織化学では, 低酸素虚血負荷後3時間で, HO-1陽性のneuropilが結紮側の大脳皮質, 海馬, 視床の一部に多数認められた。さらに, 外包を含む白質の一部においてもHO-1の免疫染色が結紮側で優位に認められた。海馬の各領域間においてはHO-1の免疫反応性に違いは認められなかった。大脳皮質では, HO-1免疫染色により外包に近い第V層から第VI層においてより強い免疫染色性が認められた。逆に, 非結紮側では弱いHO-1発現が顆粒状に見られたのみであった(図1)。低酸素負荷終了後36時間でも, 結紮側ではHO-1の免疫反応性が依然として優位に認められた。HE染色においても, 萎縮した核とエオジン好性の過染色性の細胞質を持つ細胞が多数見られた。HO-1の

免疫反応性は、必ずしも細胞障害の程度と相関しなかった。ウェスタンブロッティングでは、HO-1蛋白は32 kDaの一本のバンドとして認識され、低酸素虚血負荷によりHO-1蛋白の発現誘導が認められた。HO-1蛋白発現量は結紮側の海馬のほとんどを含むNo3の部分において最も多く認められた(図2A)。低酸素虚血負荷終了直後では、HO-1蛋白の発現量は対照とほぼ同じであった。負荷終了後12時間では、HO-1蛋白発現量は、最高値(対照レベルの2.8倍)に達した。その後、HO-1蛋白の発現量はしだいに減少し、負荷終了後24時間では対照とほぼ同じレベルにまで減少した(図3A, 3B)。ノザンブロッティングではHO-1 mRNAは、1.8kbのバンドとして認識された。ラット α -チューブリンcDNAプローブを内因性の定量的対照として用いた。HO-1 mRNAの発現量はHO-1蛋白と同様にNo3の部分において最も多かった(図4)。低酸素虚血負荷終了直後に、HO-1 mRNA

量は既に増加していて、負荷終了後3時間で最高値(対照の3.6倍)に達した。その後、発現量は次第に減少したが、負荷終了後24時間でも依然対照レベルの2倍を示した(図5A, 5B)。HO-1蛋白とHO-1 mRNAの発現の時間的経過は基本的に一致していた。小脳皮質では低酸素虚血負荷後だけでなく負荷前でもHO-1蛋白とHO-1 mRNAの発現量は多かった(データは示さず)。

考 察

この研究により、新生仔ラットの低酸素虚血モデルにおいて、急速にHO-1 mRNAとHO-1蛋白が誘導されることが示された。成獣ラットの虚血モデルでは、20分間の一過性前脳虚血により新皮質、海馬、視床における神経細胞とグリア様細胞内のHO-1 mRNAの発現は著明に増加すると報告されている。HO-1 m

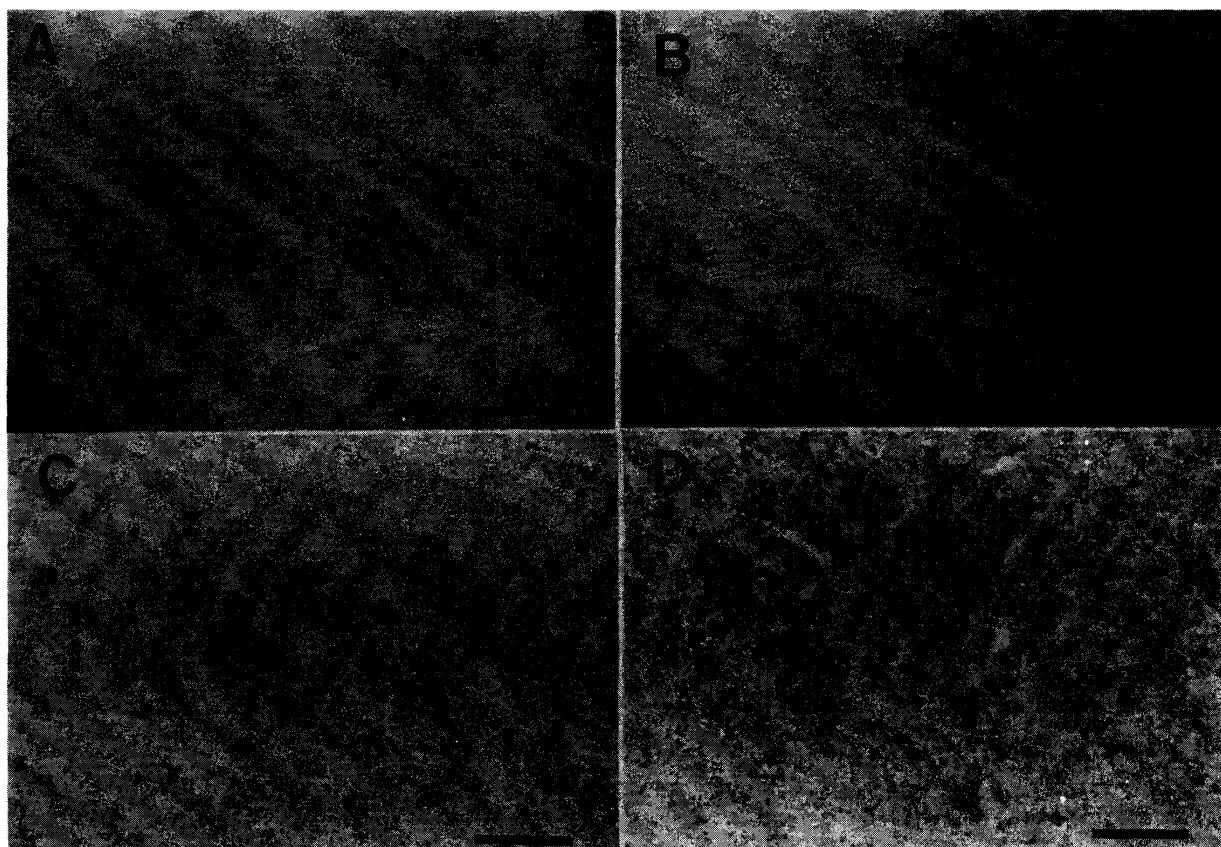


図1；低酸素負荷終了後12時間のラットの脳のHO-1蛋白の分布を示す。方法に記載した通りに海馬前方背側のレベルでの冠状断切片を作成し免疫組織化学を行なった。結紮側の大脳皮質、海馬、視床の一部において、HO-1陽性のneuropilが優位に認められる。さらに、結紮側の外包の部分においてもHO-1の免疫染色性は優位であった。非結紮側では弱いHO-1発現が顆粒状に認められた。

A. 非結紮側の大脳皮質の弱拡大像。 B. 結紮側の大脳皮質の弱拡大像。 C. 非結紮側の大脳皮質の強拡大像。 D. 結紮側の大脳皮質の強拡大像。

スケールはAとBは500 μ m, CとDは50 μ mを示す。

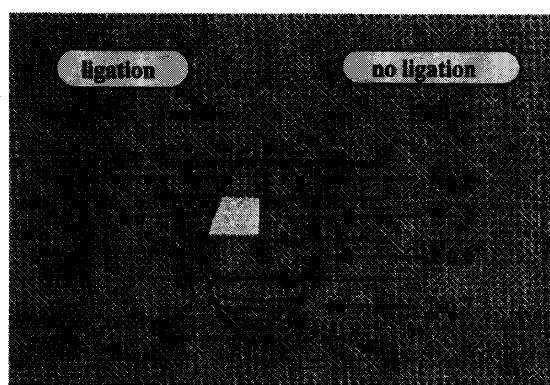
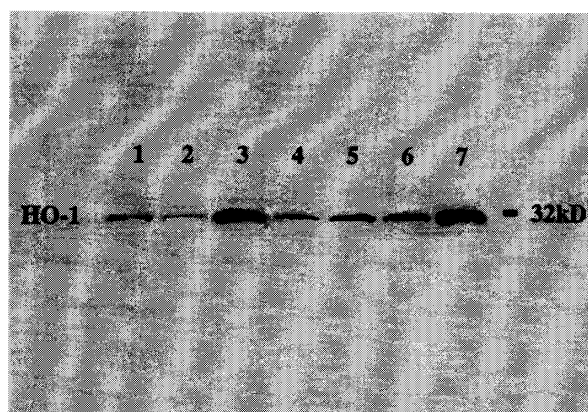


図2 A ; 日齢7のラットに低酸素虚血負荷を加え、低酸素負荷終了後12時間のラットの脳におけるHO-1蛋白の発現をウェスタンブロッティングにて検討した。大脳全体を、図2 Bのように6つの部分に切り分けた。これらの大脳組織(No1~No6)と小脳皮質(No7)を、等量の蛋白試料(80 μ g)に調製し、それをSDS-PAGEとウサギ抗ラットHO-1抗体を用いて分析した。Lane1, 3, 5; 結紮側(No1, 3, 5)。Lane2, 4, 6; 非結紮側(No2, 4, 6)。Lane7; 小脳皮質。同じ実験を3回行ない同様の結果を得た。

B ; 大脳組織全体を、図のように6つの部分に切り分けた。これらの大脳組織(No1~No6)と小脳皮質(No7)をウェスタンブロッティングとノザンブロッティングに使用した。

RNAの量は閉塞部位の再開通後12時間で最高値に達し、以後減少する^[22]。さらに、20分間の一過性前脳虚血により大脳皮質、海馬の神経細胞とアストロサイトの両方においてHO-1蛋白が著明に誘導されHO-1蛋白の量は閉塞部位の再開通後12時間で最高値に達し、以後減少する^[23]。今回の新生仔ラット低酸素虚血モデルにおいても、低酸素虚血負荷終了後3時間でHO-1 mRNA量は最高値を示し、負荷終了後12時間でHO-1蛋白量の最高値を示した。一方、Bergeron

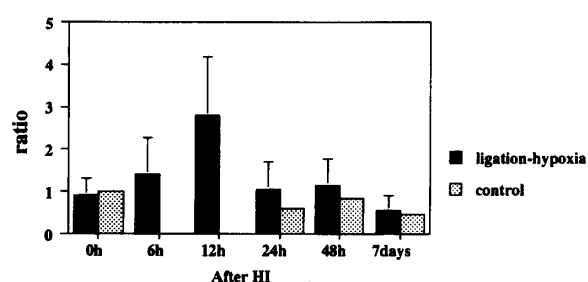
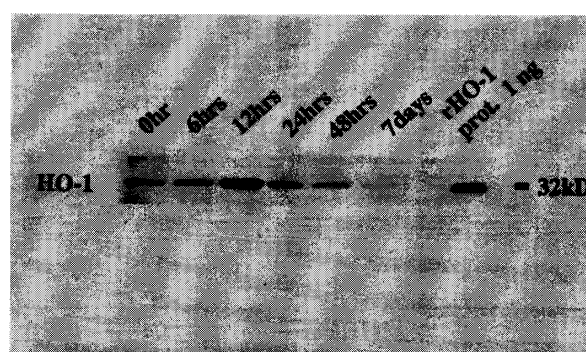


図3 A ; HO-1蛋白発現の時間的経過を示す。仔ラットの左頸動脈を結紮した後に、低酸素(8%酸素, 92%窒素)負荷をかけた。低酸素負荷終了後、0時間、6時間、12時間、24時間、48時間、7日に脳を取り出し、大脳組織全体を6つの部分に切り分けた。No3の部分、等量の蛋白試料(80 μ g)に調製し、それをSDS-PAGEとウサギ抗ラットHO-1抗体を用いて分析した。リコンビナントラットHO-1蛋白を数量的対照として用いた。低酸素虚血負荷を加えない対照仔ラットについても同様に検討した。rHO-1 prot. ; リコンビナントラットHO-1蛋白。

B ; 棒グラフは、同じ実験を3回行い、コンピューターを用いた画像解析システムにて数量化したデータを示したものである。数量化したデータを日齢7の対照との比率で示した。

HI ; 低酸素虚血負荷。

らは、我々と同じ新生仔モデルを用いた実験で、結紮側の大脳皮質、海馬、線条体において、HO-1発現は低酸素虚血負荷終了後12時間から24時間で誘導され、負荷終了後7日まで持続すると報告している^[24]。この違いは、BergeronらがHO-1蛋白の時間的経過をウェスタンブロッティングで示さずに、免疫組織化学の結果よりHO-1発現が低酸素虚血負荷終了後7日まで持続していると結論づけたためと考えられる。我々の実験では、低酸素虚血負荷終了直後でもHO-1 mRNA

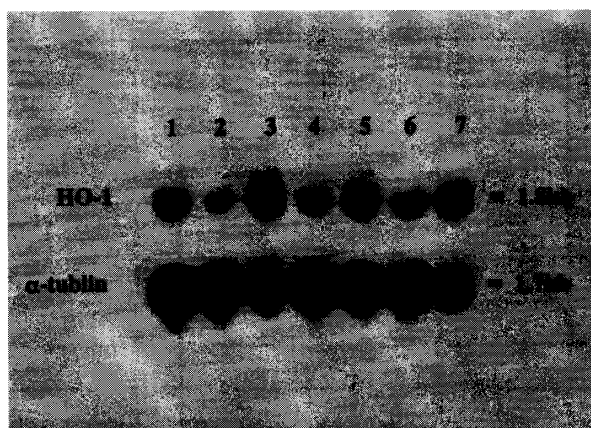


図4 ; 日齢7のラットに低酸素虚血負荷を加え、低酸素負荷終了後3時間のラットの脳におけるHO-1 mRNAの発現をノザンブロッティングにて調べた。大脳全体を、図2Bの様に6つの部分に切り分けた。これら的大脑組織 (No1~No6) と小脳皮質 (No7) を本文に記載しているように、等量の全RNA試料 (30 μ g) に調製し、それをラットHO-1 cDNAプローブを用いたノザンハイブリダイゼーションにて分析した。ラット α -チューブリンcDNAプローブを内因性対照として用いた。Lane1, 3, 5; 結紮側 (No1, 3, 5)。Lane2, 4, 6: 非結紮側 (No2, 4, 6)。Lane7; 小脳皮質。同じ実験を5回行い同様の結果を得た。

A量は増加していて、HO-1 mRNAの誘導は2時間の低酸素負荷中に既に始まっていることが示唆された。新生仔ラット低酸素虚血モデルでは、HO-1蛋白発現が転写的に調節されていて、成獣ラット虚血モデルに比して早期にHO-1蛋白が誘導されることが、今回の研究から明らかとなった。

最近の研究により、HO-1 mRNAとHO-1蛋白がAlzheimer病患者の大脳皮質、脳血管で増加していることが明らかとなった^[25, 26]。成獣ラットの一過性の全脳虚血モデルでは、閉塞側の海馬のperifocal areaのアストロサイトとミクログリアでHO-1発現が誘導される^[27]が、今回の結果ではHO-1の免疫反応性と細胞障害の間の関連は明らかとはならなかった。これまでの本モデルを使用した研究^[17, 18]でも指摘されてきたが、今回使用した新生仔ラット低酸素虚血モデルでは、神経細胞の障害の範囲に個体差が認められ、細胞障害とHO-1発現との関連性を確認することは難しいと考えられた。

小脳皮質では、低酸素虚血負荷後だけでなく負荷前でもHO-1 mRNAとHO-1蛋白の発現量は多く、Purkinje細胞においてHO-1蛋白が優位に発現しているこ

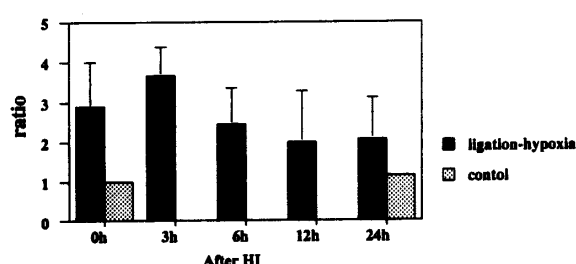
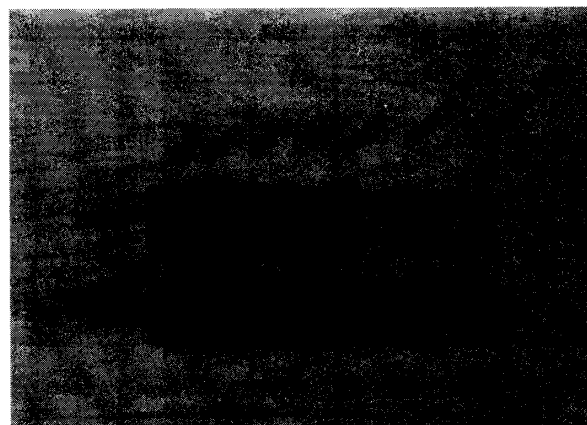


図5 A ; HO-1 mRNA発現の時間的経過を示す。仔ラットの左頸動脈を結紮した後に、低酸素 (8%酸素, 92%窒素) 負荷をかけた。低酸素負荷終了後、0時間、3時間、6時間、12時間、24時間に脳を取り出し、大脳組織全体を6つの部分に切り分けた。No3の部分等を等量の全RNA試料 (30 μ g) に調製し、それを、ラットHO-1 cDNAプローブを用いたノザンハイブリダイゼーションにて分析した。ラット α -チューブリンcDNAプローブを内因性対照として用いた。低酸素虚血負荷を加えない仔ラットについても同様に検討した。

B ; 棒グラフは、同じ実験を3回行い、コンピューターを用いた画像解析システムにて数量化したデータを示したものである。数量化したデータを日齢7の対照との比率で示した。

HI ; 低酸素虚血負荷。

とが、今回の研究により明らかとなった (データは示さず)。この免疫反応性は、結紮側と非結紮側の両方で認められた。今回使用したラットモデルでは椎骨動脈は結紮しなかったことより、小脳皮質では、HO-1発現は常に起こっていて、低酸素虚血負荷によって誘導されたものではないと推測された。

発達に伴うHO-1蛋白発現量の変化については、仔ラット脳のグリア様細胞、神経細胞、内皮細胞で、HO-1蛋白が発現し、生後7日目が発現量は最大値を

とると報告されている。一方、成獣ラット脳においては、通常の状態では非常に低いレベルでしかHO-1は発現していないことが明らかとなっている^[28]。今回の結果では、非結紮側で認められた弱いHO-1の免疫反応性は、生後7日目で構成的に発現しているHO-1によるものと考えられる。ウェスタンブロッティングで、HO-1発現量が結紮側と非結紮側で違いがあることから、低酸素虚血負荷で、結紮側にHO-1蛋白が優位に誘導されたと推測された。

HO-1誘導の生物学的意義については、依然議論される余地が残されている。これまでも述べてきたように、ビリルビンは酸化ストレスに対する防御機構として働いている可能性が強い。シナプス網が未だ完全に形成していない新生児期では、低酸素虚血負荷で誘導されたHO-1が、様々な酸化ストレスに対する防禦に貢献していると推測された。

これらの結果から、HO-1の酸化ストレスに対する防御機構は、脆弱な周産期の脳においても低酸素虚血負荷後の早期の段階から機能しており、脳障害予防に寄与している可能性が示唆された。

謝 辞

この研究は文部省科学研究助成（第09470241号）の援助を受けたものである。

文 献

- [1] Larroche, J.-C.: Development of the central nervous system, Developmental pathology of the neonate, chap. 19, Excerpta Medica, Amsterdam-London-New York, p355-445, 1977.
- [2] Volpe, J.J.: Neurology of the newborn, Sanders, Philadelphia, p209-235, 1987.
- [3] Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R.: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 61 : 748-755, 1968.
- [4] Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R.: Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. J. Biol. Chem. 244 : 6388-6394, 1969.
- [5] Cruse, I., Maines, M.D.: Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. J. Biol. Chem. 263 : 3348-3353, 1988.
- [6] McCoubrey, W. K. Jr., Ewing, J. F., Maines, M. D.: Human heme oxygenase-2 : characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. Arch. Biochem. Biophys. 295 : 13-20, 1992.
- [7] Shibahara, S., Yoshizawa, M., Suzuki, H., Takeda, K., Meguro, K., Endo, K.: Functional analysis of cDNAs for two types of human heme oxygenase and evidence for their separate regulation. J. Biochem. (Tokyo) 113 : 214-218, 1993.
- [8] Sun, Y., Rotenberg, M. O., Maines, M. D.: Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain. Two HO-2 mRNA are detected. J. Biol. Chem. 265 : 8212-8217, 1990.
- [9] Ewing, J. F., Weber, C. M., Maines, M.D.: Biliverdin reductase is heat resistant and coexpressed with constitutive and heat shock forms of heme oxygenase in brain. J. Neurochem. 61 : 1015-1023, 1993.
- [10] Maines, M. D.: New developments in the regulation of heme metabolism and their implications. Crit. Rev. Toxicol. 12 : 291-314, 1984.
- [11] Maines, M. D.: Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. FASEB J. 2 : 2557-2568, 1988.
- [12] Keyse, S., Tyrell, R.M.: Heme oxygenase is the major 32-KDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenite. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86 : 99-103, 1986.
- [13] Shibahara, S., Müller, R. H., Taguchi, H.: Transcriptional control of the rat heme oxygenase by heat shock. J. Biol. Chem. 262 : 12889-12892, 1987.
- [14] Stocker, R.: Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. Free Radic. Res. Commun. 9 : 101-112, 1990.

- [15] Rap, S. P., Lai, J. C., Herts, L., Cooper, A. J.: Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res.* 493:398-401, 1989.
- [16] Siesjö, B. K., Agardh, C. D., Bengtsson, F.: Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1 : 165-211, 1989.
- [17] Rice, J. E., Vannucci, R. C., Brierley, J. B.: The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 9 : 131-141, 1981.
- [18] Towfighi, J., Yager, J. Y., Housman, C., Vannucci, R. C.: Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta Neuropathol.* 81 : 578-587, 1991.
- [19] Levine, S.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Pathol.* 36 : 1-17, 1960.
- [20] Chomczynski, P., Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156-159, 1987.
- [21] Shibahara, S., Müller, R. M., Taguchi, H., Yoshida, T.: Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 7865-7869, 1985.
- [22] Takeda, A., Onodera, H., Sugimoto, A., Itoyama, Y., Kogure, K., Shibahara, S.: Increased expression of heme oxygenase mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 666 : 120-124, 1994.
- [23] Takeda, A., Kimpara, T., Onodera, H., Itoyama, Y., Shibahara, S., Kogure, K.: Regional difference in induction of heme oxygenase-1 protein following rat transient forebrain ischemia. *Neurosci. Lett.* 205 : 169-172, 1996.
- [24] Bergeron, M., Ferriero, D. M., Vreman, H. J., Stevenson, D. K., Sharp, F. R.: Hypoxia-ischemia, but not hypoxia alone, induces the expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in newborn rat brain. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 17 : 647-658, 1997.
- [25] Premkumar, D. R., Smith, M. A., Richey, P. L., Petersen, R. B., Castellani, R., Kutty, R. K., Wiggert, B., Perry, G., Kalaria, R.N.: Induction of heme oxygenase-1 mRNA and protein in neocortex and cerebral vessels in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 65 : 1399-1402, 1995.
- [26] Schipper, H.M., Cisse, S., Stopa, E.G.: Expression of heme oxygenase-1 in the senescent and Alzheimer-diseased brain. *Ann. Neurol.* 37 : 758-768, 1995.
- [27] Koistinaho, J., Miettinen, S., Keinänen, R., Vartiainen, N., Roivainen, R., Laitinen, J. T.: Long-term induction of haem oxygenase-1 (HSP-32) in astrocytes and microglia following transient focal brain ischaemia in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 8 : 2265-2272, 1996.
- [28] Bergeron, M., Ferriero, D. M., Sharp, F. R.: Developmental expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain : an immunocytochemical study. *Dev. Brain Res.* 105 : 181-194, 1998.

Transient induction of heme oxygenase-1 upon hypoxic-ischemic brain damage in the newborn rat

Kazuhiro Taguchi

Department of Pediatrics, Kobe University School of Medicine.

ABSTRACT

Heme oxygenase (HO) is a rate-limiting enzyme in heme catabolism that cleaves heme to form biliverdin, carbon monoxide and iron. Though the HO-1 isozyme is localized in selected neuron populations and expressed at a basal level in the normal rodent brain, the expression of HO-1 is strongly activated response to various stimuli. We investigated the quantitative changes in HO-1 mRNA and protein over time in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic (HI) brain damage and found increased HO-1 protein levels in the ipsilateral side of the cerebral cortex, the hippocampus, a part of the thalamus and the external capsule from 3-36 hrs after HI insult. In the cerebrum, the amount of HO-1 protein was the highest on the ligated side in the part that contained most of the hippocampus. The amount of HO-1 protein increased to a maximum at 12 hrs following HI insult. The level of HO-1 mRNA was increased by the end of HI, reached a maximum at 3 hrs following HI insult and then decreased. The time course of the HO-1 protein induction was essentially consistent with that of HO-1 mRNA. In the newborn hypoxic-ischemic rat model, HO-1 expression is induced at an earlier stage compared to that in the adult ischemic rat model. These data suggest that the HO-1 defense mechanism against oxidative stress begins to work at the early stages of HI insult in the vulnerable perinatal brain, and this mechanism may contribute to protect against brain damage resulting from a combination of hypoxia and ischemia during the perinatal period.