

# 筋ジストロフィーモデル動物 (mdxマウス) の 脳梗塞修復機転におけるアストロサイトの役割について

若居佐恵子<sup>1)</sup>, 原 温子<sup>1)</sup>, 森永 慎也<sup>1)</sup>, 山田 崇史<sup>1)</sup>, 堤 恵理子<sup>2)</sup>  
弓削 類<sup>2)</sup>, 梶原 博毅<sup>2)</sup>

キーワード (Key words) : 1. ジストロフィン (dystrophin)  
2. グリア線維性酸性たんぱく (glial fibrillary acidic protein : GFAP)  
3. 実験的脳梗塞 (cerebral infarction model)

様々な大きさのジストロフィンアイソフォーム (427kDa, 260kDa, 140kDa, 116kDa, 71-75kDa) が広く体内に存在していることはよく知られている。中枢神経系においては71-75kDaのDp71が著明に多く、毛細血管の内皮の基底膜に接しているアストロサイトの細胞質に局在することが報告されている。しかしながらDp71の機能についてはよくわかっていないことが多い。そこで今回、脳組織におけるDp71の役割を調べるために、コントロールマウス (wild-typeマウス) およびデュシャンヌ型筋ジストロフィーモデル動物であるmdxマウスを用いて実験的脳梗塞を作成し、その治癒過程を形態学的に観察した。また、GFAPおよびDp71に関して生化学的に分析をおこなった。

HE染色およびGFAP免疫組織学的染色の結果から、形態学的にはmdxマウスとコントロールマウスの脳に違いは認められなかった。しかしながら、mdxマウスの脳において、Dp71の発現量がコントロールマウスよりも少ないことがわかった。またmdxマウスにおいて、脳梗塞の修復過程におけるアストロサイトの反応がコントロールマウスよりも弱いことがわかった。これらの結果から、mdxマウスの脳において、アストロサイトの機能、アストロサイトの血管新生に関わる機能の障害されていることが示唆された。

## 緒 言

ジストロフィンとは、筋ジストロフィーの原因たんぱくとしてよく知られているが、近年、筋細胞のみでなく広く体内に分布していることが明らかにされてきた。またジストロフィン遺伝子中には複数の独立したプロモーターが存在しており、full-lengthジストロフィン (427kDa) に加えて様々な大きさのジストロフィンアイソフォーム (260kDa, 140kDa, 116kDa, 71-75kDa) が発現してくることが知られており、分子量によってそれぞれDp260, Dp140, Dp116, Dp71とよばれる。ジストロフィンアイソフォームは筋細胞には発現せず、主に中枢神経系や末梢神経、腎臓、肝臓などで発現している。また中枢神経においては、ジストロフィンアイソフォームのなかでも71-75kDaのDp71が著明に多いことが示されている<sup>1)</sup>。

筋ジストロフィーモデル動物であるmdxマウスはC57BL/10系統のマウスの突然変異によって生じたもので、1984年にBulfieldらによって発見された。mdxマウ

スのジストロフィン遺伝子ではexon23の3185番目のCがTに置き換わったためにCAA (Gln) であるべきコドンがTAA (終止コドン) になっている<sup>2)</sup>。つまりmdxマウスではNH<sub>2</sub>-terminalからロッドの1/3のところまで合成がストップしてしまうために、full-lengthジストロフィンが欠損するとされている<sup>3)</sup>。Dp260, Dp140, Dp116, Dp71ジストロフィンアイソフォームの各プロモーターは、ポイントミューテーションを起こしている部位より下流に存在する<sup>5, 17)</sup> ため、mdxマウスではfull-lengthを除いたジストロフィンアイソフォームが産生されるが、同一遺伝子内の異常が下流のプロモーターに全く影響を与えないかどうかは不明である。つまりmdxマウスにおいて、ジストロフィンアイソフォームのたんぱく産生がwild-typeマウスと同様に行われるかどうかは不明である。

骨格筋細胞におけるジストロフィンの機能に関しては多くの研究がなされており、ジストロフィンは棒状のたんぱくで細胞膜下に位置し、細胞骨格のアクチンと膜貫通たんぱくのジストログリカンをつなぐことで細胞膜の

• The role of astrocytes during repair of cerebral infarction in mdx mice  
• 所属 : 1) 広島大学大学院医学系研究科保健学専攻 2) 広島大学医学部保健学科理学療法学専攻  
• 広島大学保健学ジャーナル Vol. 2(1) : 26~33, 2002

強化や、細胞を細胞外マトリックスに固定する役割を果たしているといわれている<sup>9)</sup>。一方筋ジストロフィー患者は知的障害を合併しやすいことが知られており<sup>4, 7, 13, 18)</sup>、1998年に脳におけるfull-lengthジストロフィンの発現が報告されてから (Chamberlain JS et al.), 中枢神経系におけるジストロフィンの役割についての研究が報告され始めているが、脳におけるジストロフィンファミリーがどのような構造をとり、どのような働きをしているのか、ほとんどわかっていない。full-lengthジストロフィンの局在に関しては、免疫電顕<sup>9)</sup>や、in situ hybridizationの研究<sup>14)</sup>で、小脳のプルキンエ細胞や、大脳皮質および海馬の錐体細胞の細胞体と樹状突起に発現していることが示されている。また近年、血管内皮細胞における発現が報告<sup>16)</sup>されている。in vivoでは、アストロサイトにおけるfull-lengthジストロフィンの発現は認められていない<sup>15)</sup>。

発育途上にある脳において、血液脳関門の発達とともにジストロフィンアイソフォーム発現が増加するという報告がある<sup>11)</sup>。これはin vitroの研究<sup>10)</sup>から、アストロサイトに発現するDp71であると推察される。アストロサイトは毛細血管とニューロンとの間に介在するような位置をとっている。血液脳関門は血管内皮細胞、周皮細胞およびアストロサイトによって構成されている機構であるが、近年、血液脳関門の機能構築を促すのはアストロサイトであるとの報告が多く<sup>1, 21, 23, 26)</sup>、またGhazanfari<sup>8)</sup>は、血液脳関門の本体はアストロサイトであると述べている。

今回は脳梗塞後の治癒過程におけるアストロサイトの動態に注目し、筋ジストロフィーモデル動物であるmdxマウスとwild-typeマウスを比較することで脳におけるジストロフィンの役割を検索することとした。

## 対象と方法

C57BL/10SnSlcマウス(以下wild-typeマウスとする)(5~9週齢)39匹、C57BL/10-ScSn-mdxマウス(以下mdxマウスとする)(5~7週齢)31匹を用いた。なお、実験に使用した動物は、広島大学動物実験施設の動物飼育ガイドラインに沿って飼育された。また実験は広島大学医学部における倫理委員会の承認を得て行われた。

麻酔下(抱水クローラール400mg/kg腹腔内投与)にて頸部を正中切開し、右総頸動脈を二重結紮した。その後、右側頭部を切開して右中大脳動脈末梢を焼灼し、右半球に脳梗塞を作成した。

脳梗塞を作成しないnon-op群としてwild-typeマウス11匹、mdxマウス9匹を使用した。Op群は手術後1日(wild-typeマウス5匹、mdxマウス4匹)、3日(5匹、3匹)、5日(4匹、3匹)、1週(5匹、6匹)、2週(3匹、4匹)、3週(2匹、2匹)とした。

## 組織学的・免疫組織学的検索

麻酔下にて生理食塩水25mlと固定液50mlで経心灌流固定し、脳および前脛骨筋を摘出した。その後パラフィン切片を作成しヘマトキシリン-エオジン染色(以下HE染色とする)およびアストロサイトに特異的な細胞骨格であるglial fibrillary acidic protein(以下GFAPとする)を認識するGFAP抗体を用いてABC法で免疫組織学的染色を行った。また凍結切片を作成しfull-lengthジストロフィン(427kDa)のみを認識するNCL-DYS 1抗体、ジストロフィン全てのC端を認識するNCL-DYS 2抗体を用い、ABC法で免疫組織学的染色を行った。

## 生化学的検索(western blotting法)

麻酔下にて、25ml生理食塩水で経心灌流し脳および前脛骨筋を摘出した。脳は摘出後、小脳・嗅脳を取り去り、左右半球に切り分けさらに前額断に4等分した。4等分したうち腹側から2番目の左右切片を今回の解析に使用した。たんぱく質の抽出はLouiseら(1999)の方法に従って行った。組織湿重量(g)×19,000μlのサンプルバッファ中でポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。得られた抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離しPVDFメンブレン(DYS 1抗体使用時)、ニトロセルロースメンブレン(GFAP抗体・DYS 2抗体使用時)へトランスファーした。次にGFAP抗体、DYS 1抗体およびDYS 2抗体でメンブレンの免疫染色を行い化学発光によりX線フィルム上に記録した。フィルム上の写されたバンドをデジタルカメラでコンピューターに取りこみ、NIH-Image1.62で解析した。

## 結 果

### 1. non-op群におけるwild-typeマウスとmdxマウスの比較

HE染色およびGFAP免疫染色において、組織学的・免疫組織学的にwild-typeマウスとmdxマウスに差異は認められなかった。

ウェスタンブロットングによりwild-typeマウスの脳および前脛骨筋において427kDaジストロフィンが検出されたのに対して、mdxマウスでは427kDaは検出されなかった。

また、wild-typeマウスおよびmdxマウスの両方の脳で71kDaジストロフィンアイソフォームが検出されたが正常な状態での発現量は有意にwild-typeマウスの方が多かった(p<0.01)(Fig.1)(以下全てグラフの値はwild-typeマウスのnon-op群のうちの特定のサンプルを100として算出した)。脳のDYS 2免疫染色ではwild-typeマウス、mdxマウス共に毛細血管に沿って陽性反応がみられた

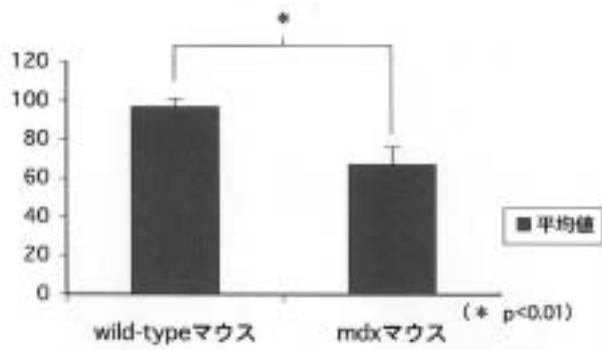


Fig.1 non-ope群におけるDp71発現量の比較．wild-typeマウスおよびmdxマウスの両方の脳で71kDaジストロフィンアイソフォームが検出されたが，正常な状態での発現量は有意にwild-typeマウスの方が多かった ( $p < 0.01$ )．

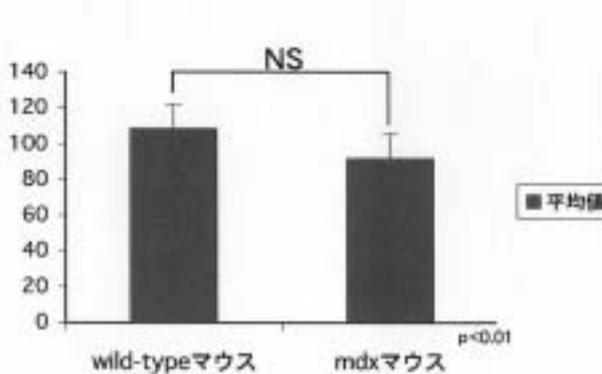


Fig.2 non-ope群におけるGFAP発現量の比較．アストロサイトの細胞骨格であるGFAPの発現量は，wild-typeマウスおよびmdxマウスで有意差が認められなかった ( $p < 0.01$ )．

が，wild-typeマウスの方が染色性が強かった．前脛骨筋において，Dp71ジストロフィンアイソフォームはいずれのマウスでも検出されなかった．

アストロサイトの中間径フィラメントであるGFAPの発現量はwild-typeマウスおよびmdxマウスで有意差が認められなかった ( $p < 0.05$ ) (Fig.2)．

## 2. 術後の経過について

### HE染色

術後1日ではwild-typeマウス・mdxマウス共に，ほぼ右半球全体に及ぶ広い範囲に浮腫がおこっていたが，術後3日になるとwild-typeマウス・mdxマウス共に，浮腫は軽減した．それと同時に右大脳皮質の3分の1から2分の1に限局して凝固壊死に陥った部分(梗塞巣)が見られた (Fig.3)．

術後5日で，梗塞巣の内部に向かって毛細血管が新生しマクロファージの浸潤が見られるようになった

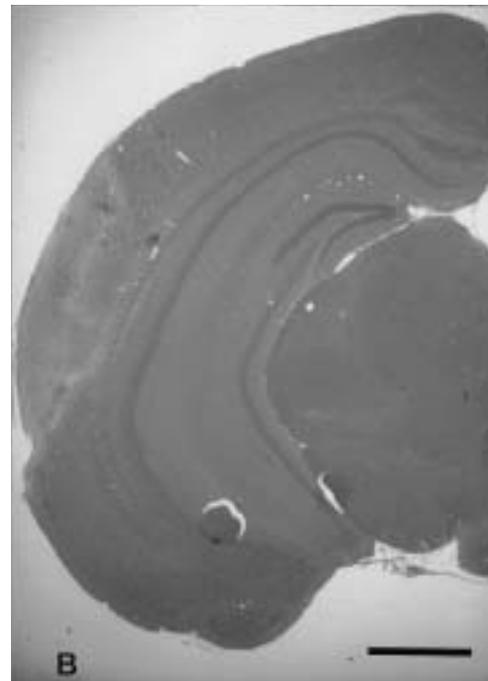
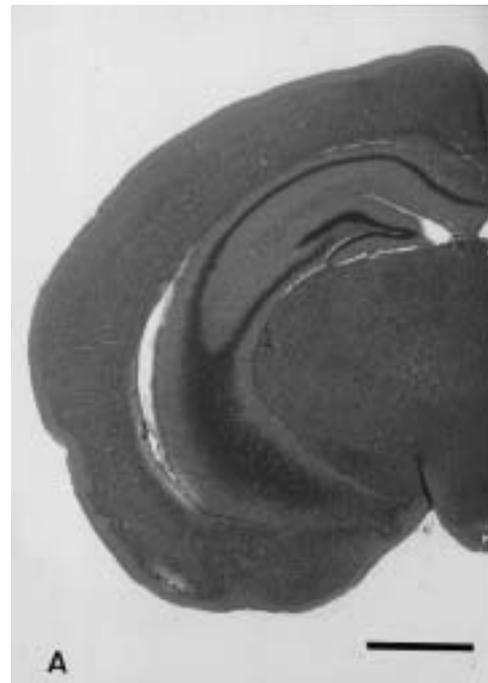


Fig.3 脳の前額断(右半球)．

A) wild-typeマウスnon-ope群．

B) wild-typeマウス術後3日． Scale Bar, 1 mm

が，mdxマウスではwild-typeマウスと比較して新生毛細血管やマクロファージの数が少なかった．術後1週になると梗塞部位の毛細血管がさらに増加し，wild-typeマウスでは壊死組織を貪食して肥大したマクロファージが毛細血管周囲に多数見られた．mdxマウスでもマクロファージが現れていたが，貪食肥大したものは少なかった (Fig.4)．術後2週になるとwild-typeマウスでは，壊死組織は減少し，梗塞周辺部にグリア細胞が多数観察された．毛細血管・マクロファージは減

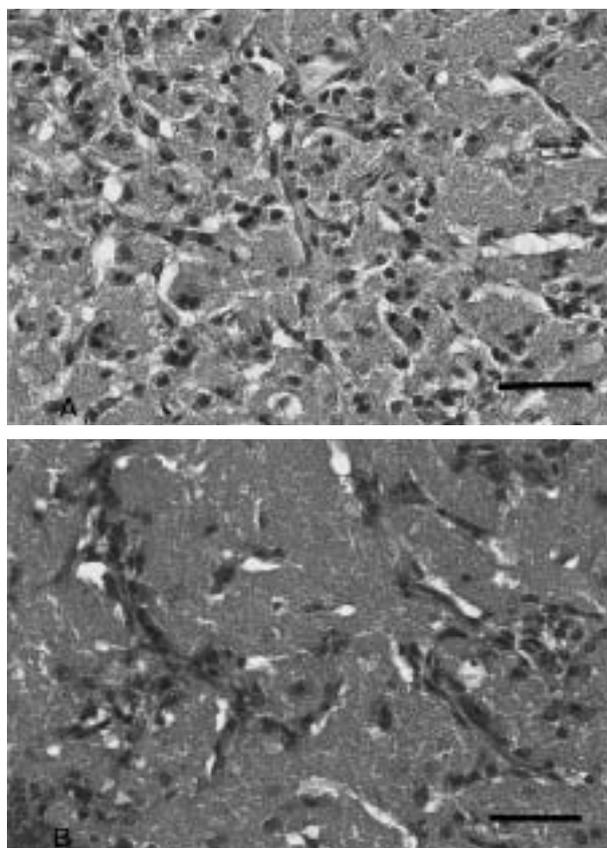


Fig.4 梗塞巣における毛細血管新生およびマクロファージの出現．HE染色．A) wild-typeマウス術後1週．B) mdxマウス術後1週．Scale bars, 50 μm.

少傾向にあった．mdxマウスでは，肥大したマクロファージが増加したが，壊死組織はまだ残っていた．毛細血管は減少していた．術後3週，wild-typeマウスでは新生した毛細血管・マクロファージはほとんど見られなくなった．梗塞巣周辺部にグリア細胞が集まり，梗塞巣の周辺部で限界膜を形作っていた．mdxマウスでは毛細血管が減少し，壊死組織も見られなくなったが限界膜形成には至らなかった．Wild-typeマウスの術後5週では梗塞巣の毛細血管・マクロファージはほぼ消失し，限界膜のグリア細胞が増加していた．術後12週（wild-typeマウス），壊死組織は見られなくなり，皮質の表面では線維化が起こっていた．

#### GFAP免疫染色 (Fig.5)

Non-op群では海馬や外包・内包といった白質・脳室周囲に線維性アストロサイトが観察されたが，皮質にはGFAP陽性の細胞はほとんど認められなかった．wild-typeマウスとmdxマウスに差異は認められなかった．

Op群の術後1日では，右半球において活性化されたendfeetのはっきりと染色されたアストロサイトが散見された．対側でもやや活性化されたアストロサイトが観察された．術後1日ではwild-typeマウスもmdxマウスも同じような反応であったが，mdxマウスの方が

活性化の度合いが低かった．術後3日になると梗塞巣の周辺部に限局してGFAP陽性細胞が肥大・増加しているのが観察された．対側半球でも活性化されたアストロサイトが観察された．mdxマウスではwild-typeマウスと比較してGFAP陽性細胞の肥大・増加の程度が左右半球ともに少なかった．術後5日から5週にかけて，wild-typeマウスでは梗塞巣の周辺部のみならず脳全体で活性化したアストロサイトが観察されるようになった．wild-typeマウスでは術後5日から梗塞巣に向かって突起をのぼすアストロサイトが観察され，術後1週から限界膜の形成が始まるが，mdxマウスでは術後1週から梗塞巣に向かって突起をのぼすアストロサイトが観察され限界膜の形成は術後2週でようやく観察された．mdxマウスの術後3週の様子は術後2週とあまり変化せず反応性アストロサイトの大きさもwild-typeマウスと比較して小さく突起が短かった．wild-typeマウスは12週たつと活性化したアストロサイトが見られなくなった．

#### ウェスタンブロッティングによるGFAPの定量化

右半球において，wild-typeマウスにおける発現量は，術後1週でプラトーに達し術後5週まで高いレベルを維持するが，mdxマウスは術後2週をピークに術後3週では減少していた．発現量は全体的にmdxマウスの方が低レベルで推移し，免疫組織学的検索の結果を裏付けるものとなった (Fig.6, 7)

## 考 察

### 1. mdxマウスの脳組織では，脳梗塞後の治癒が遅延する

今回，non-op群の脳および筋を免疫組織化学的・生化学的に比較検討したところ，mdxマウスの脳および筋にはfull-lengthジストロフィンの発現が認められず，今回使用したmdxマウスのジストロフィン遺伝子の機能不全が確認された．

組織学的検索としてHE染色によるwild-typeマウスとmdxマウスの脳の比較検討を行ったところ，non-op群の脳組織の形態に違いは認められなかった．しかし脳梗塞後の修復過程を比較すると，術後5日からmdxマウスの最終タイムポイントである3週まで，梗塞巣における毛細血管の新生，マクロファージの出現・貪食，アストロサイトによる限界膜の形成などでmdxマウスの反応はwild-typeマウスよりも遅れる傾向にあった．このことからmdxマウスの脳には何からの機能障害が存在することが示唆された．

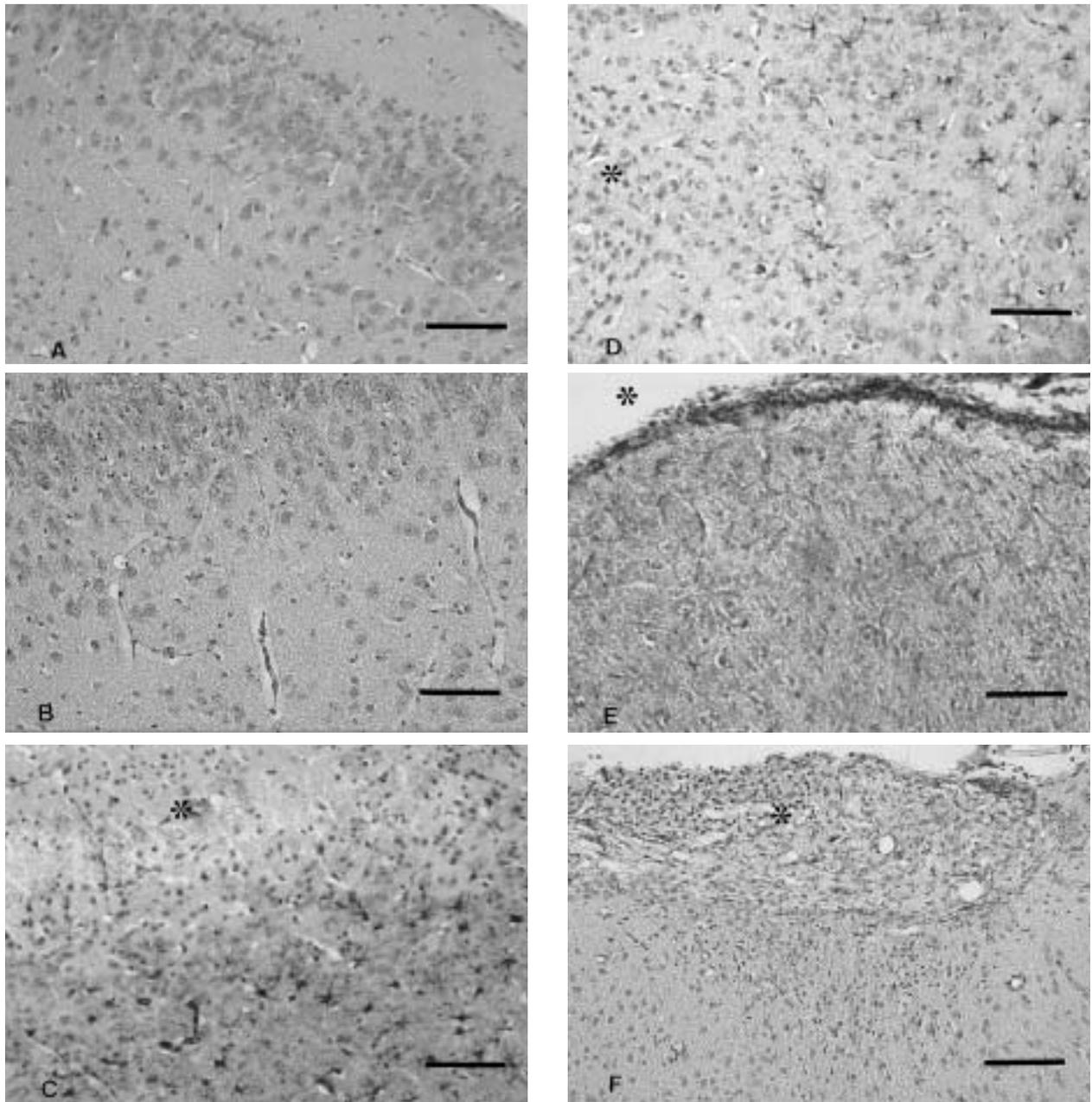


Fig.5 梗塞巣境界面 .

A ) wild-typeマウスnon-ope群 . B ) mdxマウスnon-ope群 . C ) wild-typeマウス術3日 . D ) mdxマウス術後3日 . E ) wild-typeマウス術後3週 . F ) mdxマウス術後3週 . \* は梗塞巣を示す . Scale bars, 100 μm .

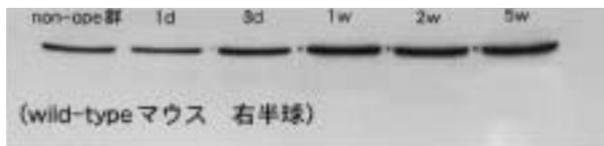
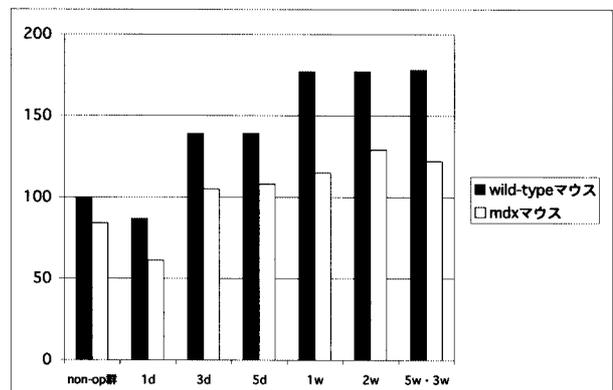


Fig.6 GFAP陽性を示したバンドの一例 .  
各レーン 2 μ 1 アプライ .

Fig.7 脳梗塞作成後におけるGFAP発現量の経時的変化 . 右半球において , wild-typeマウスは術後1週でプラトーに達し術後5週まで高いレベルを維持するが , mdxマウスは術後2週をピークに術後3週では減少していた . 発現量は全体的にmdxマウスの方が低レベルで推移し , 免疫組織学的検索の結果を裏付けるものとなった .



## 2. 脳梗塞後におけるアストロサイトの反応について

成体の脳においてアストロサイトは、ニューロンの支持・栄養、イオン環境の整備を行うと考えられているが、病態時には様々な神経保護の機能を果たすことが知られている。なかでも、シナプス間隙から興奮性神経伝達物質である細胞外グルタミン酸を積極的に取り除くことによって神経細胞を興奮毒性から守る役割は重要であると言われている<sup>20, 25</sup>。その他にもアストロサイトは、ニューロンが興奮するとニューロン内から流出する細胞外カリウムイオン濃度上昇の緩和や、各種のサイトカイン放出によりニューロンを保護するとも言われている<sup>2, 3, 6</sup>。また、梗塞直後からその周囲のアストロサイトは肥大、増殖し、梗塞巣周辺に集積し壊死部を境界、分離する<sup>12</sup>など、アストロサイトは脳損傷後の修復過程で重要な役割を果たしていると考えられている。

今回、full-lengthジストロフィンの欠損した脳において、GFAPの発現量は少ない傾向があるもののwild-typeマウスと有意差が認められなかった。免疫組織学的にもGFAPの局在、染色態度に差異は認められなかった。術後1日の浮腫の程度もwild-typeマウスとmdxマウスで組織学的に同程度であったが、術後1日からmdxマウスのアストロサイトには形態学的変化の遅れが観察された。右半球におけるGFAP発現量増加の程度もwild-typeマウスと比較すると少なく、wild-typeマウスは術後1週からほぼプラトーに達し術後5週でも発現量のピーク値を保ったまま推移しているのに対してmdxマウスでは術後2週にwild-typeマウスのピーク値の約7割の発現量でピークを迎え、術後3週ですでに減少傾向にある。GFAP発現量が少ないのは免疫組織学的染色の観察と照らし合わせてみてGFAP陽性細胞（つまりアストロサイト）の数が少ないこと、および各アストロサイトの突起が短く大きさが小さいためひとつの細胞に含まれるGFAPが少ないことが影響していると考えられる。アストロサイトの細胞数が少ないということは、細胞外のグルタミン酸やカリウムイオンの処理が進みにくいことを意味する。また修復を促すアストロサイト由来のNerve Growth Factorをはじめとする様々なサイトカイン<sup>24</sup>の発現も十分でないことも考えられ、梗塞巣の修復が遅れる原因となりうる。

## 3. 脳梗塞後のアストロサイトの反応が弱いのはなぜか

mdxマウスはfull-lengthジストロフィンの欠損が特徴とされているが、アストロサイトにはfull-lengthジストロフィンが発現しないといわれており<sup>15</sup>、full-lengthジストロフィンの欠損が直接アストロサイトに影響するとは考えにくい。アストロサイトは血管とニューロンを介する位置にあり、三者が相互に関連しあって脳内環境を保ち、脳梗塞後には障害を受けたニューロンや血管内皮細胞がサイトカインを放出してアストロサイトを活性

化させることが報告されている<sup>24, 27</sup>。ニューロンや血管内皮細胞にはもともとfull-lengthジストロフィンが発現しているといわれており、ジストロフィンが欠損することでこれらの細胞が何らかの機能障害を来し、アストロサイトの活性化がおこりにくいことが考えられる。また、アストロサイトに発現するといわれるDp71の発現量はnon-op群のmdxマウスで有意に少なく、一方でGFAPの有意差は認められなかったことおよび免疫組織学的検査の結果から、mdxマウスのnon-op群ではアストロサイトの数には違いがなく、個々のアストロサイトに発現するDp71が少ないと推察される。そのためアストロサイト自体にも障害がある可能性が考えられる。Dp71の発現量が少ないことについては、ジストロフィン遺伝子のポイントミューテーションがDp71のプロモーターに何らかの影響を与えている可能性も否定できない。

## 結 語

本研究では脳梗塞後の治癒過程におけるアストロサイトの動態に注目し、筋ジストロフィーモデル動物であるmdxマウスとwild-typeマウスを比較することで脳におけるジストロフィンの役割に関する知見を得ることを目的とした。今回の実験の結果から、mdxマウスの脳組織では損傷部の修復が遅く、何らかの機能障害があることが示唆された。そのひとつとして、損傷部修復にはたらくべきアストロサイトの反応が弱いことがわかった。この原因については、アストロサイトに影響を及ぼすニューロンおよび血管内皮細胞の機能障害、あるいはジストロフィン遺伝子内のポイントミューテーションがDp71のプロモーターに影響しDp71産生減少の可能性が考えられた。

## 文 献

1. Braet, K., Paemeleire, K., D'Herde, K., Sanderson, M.J. and Leybaert, L.: Astrocyte-endothelial cell calcium signals conveyed by two signalling pathways. *Eur. J. Neurosci.*, 13: 79-91, 2001
2. Brenner, M., Kisseberth, WC., Su, Y., Besnard, F., Messing, A.: GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J. Neurosci.*, 14: 1030-1037, 1994a
3. Brenner, M.: Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol.*, 4: 245-257, 1994b
4. Bresolin, N., Castelli, E., Comi, GP., Felisari, G., Bardoni, A., Perani, D., Grassi, F., Turconi, A., Mazzucchelli, F., Gallotti, D.: Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.*, 4: 359-69, 1994
5. D'Souza, VN., Nguyen, TM., Morris, GE., Karges, W., Pillers, DA., Ray, PN.: A novel dystrophin isoform is

- required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.*, 4: 837-842, 1995
- 6 . Eddleston, M., Mucke, L.:Molecular profile of reactive astrocytes-implications for thier role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54: 15-36, 1993
  - 7 . Fitzpatrick, C., Barry, C., Garvey C.: Psyshiatric disorder among boys with Duchenne muscular dystrophy. *Dev. Med. Child Neurol.*, 28: 589-595, 1986
  - 8 . Ghazanfani, FA., Stewart, RR.:Characteristics of endothelial cells derived from the blood-brain barrier and of astrocytes in culture. *Brain Res.*, 26: 49-65, 2001
  - 9 . Greenberg, DS., Sunada, Y., Campbell, KP., Yaffe, D., Nudel, U.: Exogenous Dp71 restores the levels of associated proteins but does not alleviate muscle damage in mdx mice. *Nature Genetics*, 8:340-344, 1994
  - 10 . Imamura, M., Ozawa, E.: Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutylryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 6139-6144, 1998
  - 11 . Jancsik, V., Hajos, F.:The demonstration of immunoreactive dystrophin and its developmental expression in perivascular astrocytes. *Brain Res.*, 831: 200-205, 1999
  - 12 . Kajihara, H., Tsutsumi, E., Kinoshita, A., Nakano, J.,Takagi, K., Takeo, S.: Activatied astrocytes with glycogen accumulation in ischemic penumbra during the early stage of bran infarction:immunohistochemical and electron microscopic studies. *Brain Res.*, 909: 92-101, 2001
  - 13 . Karagan, NJ.:Intellectual functioning in Duchenne muscular dystrophy:a review. *Psychol. bull.*, 86: 250-259, 1979
  - 14 . Knuesel, I., Bornhauser, BC., Zuellig, RA., Heller, F., Schaub, MC., Fritschy, JM.:Differential expression of utrophin and dystrophin in CNS neurons:an in situ hybridization and immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.*, 422: 594-611, 2000
  - 15 . Lidov, HGW.: Dystrophin in the nervous system.*Brain Pathology*, 6: 63-77, 1996
  - 16 . Loufrani, L., Matrougui, K., Gorny, D., Duriez, M., Blanc, I., Levy, BI., Henrion, D.: Flow (shearstress )-induced endothelium-dependent dilation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circulation*, 103 : 864-870, 2001
  - 17 . Mehler, MF.:Brain dystrophin,neurogenetics and mental retardation. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 32: 277-307, 2000
  - 18 . Moizard, MP., Toutain, A., Fournier, D., Berret, F., Raynaud, M., Billard, C., Andres, C., Moraine C.: Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform pointmutatiao screening. *Eur. J. Hum. Genet.*, 8: 552-556, 2000
  - 19 . Mussini, I., Sogos, V., Della, BM., Ennas, MG., Gremo F.:Immunolocalisation of dystrophin in the immature human neurons and muscles. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 100: 155-156, 1995
  - 20 . Rothstein, JD., Dykes-Hoberg, M., Prdo, CA., Bristol, LA., Jin, L., Kuncl, RW., Kanai, Y., Hediger, MA., Wang, Y., Schielke, JP.,Welty, DF.:Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16: 675-686, 1996
  - 21 . Shroeter, ML., Mertsch, K., Giese, H., Muller, S., Sporbert, A., Hickel, B., Blasig, IE.:Astrocytes enhance radial defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier. *FEBS Letters*, 449: 241-244, 1999
  - 22 . Sicinski, P.,Geng, Y.,Ryder-Cook, AS.,Barnard, EA.,Darlison, MG.,Barnard PJ.:The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: A point mutation. *Science*, 244: 1578-1580, 1989
  - 23 . Sportbert, A., Mertsch, K., Smolenski, A., Haseloff, RF., Schonfelder, G., Paul, M., Ruth, P., Walter, U., Blasig, IE.:Phosphorylation of wasodilator-stimulated phosphoprotein:a consequence of nitric oxide-and cGMP-mediated signal transduction in brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 67: 258-266, 1999
  - 24 . Stover, JF., Schoning, B., Beyer, TF., Woiciechowsky, C., Unterberg, AW.:Temporal profile of cerebrospinal fluid glutamate,interleukin-6,and tumor necrosis factor- in relation to brain edema and contusion following controlled cortical impact injury in rats. *Neuroscience Letters*, 288: 25-28, 2000
  - 25 . Tanaka, K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikikawa T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K.:Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*, 276:1699-1702, 1997
  - 26 . Tao-Cheng, JH., Brightman, MW.:Development of membran interactions between brain endothelial cells and astrocytes in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 6: 25-37, 1988
  - 27 . Uno, H., Matsuyama, T., Akita, H., Nishimura, H., Sugita, M...:Induction of tumor necrosis factor-alpha in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 17: 491-499, 1997
  - 28 . Vaillend, C., Rendon, A., Misslin, R., Ungerer, A.:Influence of Dystrophin-Gene Mutation on mdx Mouse Behavior.I.Retention Deficits at Long Delays in Spontaneous Alternation and Bar-Pressing Tasks. *Behavior Genetics*, 25: 569-579, 1995

## The role of astrocytes during repair of cerebral infarction in mdx mice

Saeko Wakai<sup>1)</sup>, Atsuko Hara<sup>1)</sup>, Shinya Morinaga<sup>1)</sup>, Takashi Yamada<sup>1)</sup>,  
Eriko Tsutsumi<sup>2)</sup>, Rui Yuge<sup>2)</sup> and Hiroki Kajihara<sup>2)</sup>

1 ) Health Sciences, Graduate School of Medical Sciences, Hiroshima University

2 ) Division of Physical Therapy, Institute of Health Sciences, Faculty of Medicine, Hiroshima University

Key words : 1 . dystrophin 2 . glial fibrillary acidic protein : GFAP 3 . cerebral infarction model

It is now well known that dystrophin isoforms (427kDa, 260kDa, 140kDa, 116kDa, 71-75kDa) are widely distributed throughout our body. In the central nervous system a considerable amount of Dp71 (71-75kDa) is found in the perivascular cytoplasm of the astrocytes. However, the function of this dystrophin is still unknown. To investigate the role of Dp71 in the brain tissue, cerebral infarction was induced in the control (wild-type) mouse and mdx mouse which is known as an animal model of human muscle dystrophy (Duchenne type), and morphological changes of the infarcted area were observed during repair of the infarction. In addition, biochemical analysis of GFAP and Dp71 was carried out in the brain of the control and mdx mouse.

In our present study, there were no differences in brain morphology between mdx and control mouse as revealed in H-E stain and GFAP immunohistochemistry. However, the Dp71 were smaller in quantity in the brain of the mdx mouse than that of the control mouse. The reaction of astrocytes during repair of cerebral infarction was distinctly delayed in the mdx mouse compared with that of the control mouse. These findings suggest that the astrocytes in the brain of the mdx mouse are functionally impaired including perivascular cytoplasmic processes with relation to neo-vascularization.