

学 位 論 文 題 名

Extracellular acidosis decreases cell death against glucose-oxygen deprivation in neuroblastoma x glioma hybrid cells

(細胞外アシドーシスが、ニューロブラストーマとグリオーマとの融合細胞において、ブドウ糖・酸素除去侵襲による細胞死を抑制する)

学位論文内容の要旨

背景：脳虚血にアシドーシスを合併すると、神経学的予後がより不良となることが、臨床的および *In vivo* における実験で報告されている。一方、*In vitro* ではアシドーシスが虚血による神経系細胞および組織の障害を軽減することが報告されている。その機序として、虚血時の細胞内へのカルシウムイオン流入を細胞外アシドーシス環境が抑制することが最も有力とされてきた。

目的：細胞外アシドーシスが、*In vitro* での虚血性侵襲であるブドウ糖および酸素除去による細胞死を抑制するかどうか、また抑制効果があった場合には、これが、カルシウムイオン細胞内流入阻止と、細胞エネルギー状態の保持のどちらを主たる機序としているかを、マウス由来ニューロブラストーマとラット由来グリオーマの融合細胞である NG108-15 を用いて、研究した。実験に使用した NG108-15 には、 PGE_1 とテオフィリン添加により分化誘導処置を施した。

方法：

実験 1：pH7.4、6.8、6.5、6.2、5.6、5.0 に調整した、ブドウ糖を等モルのマンニトールに置換した HEPES 緩衝液に培地を置き換え、100% 窒素で充填したチャンバーの中で 8 時間 37° C にてインキュベートし、細胞の生存率を測定した。対照として、同じ pH に調整したブドウ糖含有 HEPES 緩衝液に、大気下で 8 時間 37° C にてインキュベートして生存率を測定した。

実験 2：pH を 7.4 と 6.2 に調整した、非ブドウ糖含有 HEPES 緩衝液からさらにカルシウムイオンを除去したものを用意し、実験 1 と同様に 8 時間のブドウ糖および酸素除去侵襲を加え、細胞生存率を測定した。

実験 3：pH7.4 と 6.2 のそれぞれで、ブドウ糖および酸素除去侵襲を加えて 2 時間後、4 時間後、6 時間後および 8 時間後の細胞の生存率と高エネルギーリン酸結合 (ATP、ADP および AMP) を測定した。

細胞生存率は、fluorescein diacetateとpropidium iodideによる二重染色後にフローサイトメトリーを用いて測定した。高エネルギーリン酸結合は、高速液体クロマトグラフィーにより定量した。

結果：

実験1：ブドウ糖および酸素除去侵襲8時間後の細胞生存率は、pH6.2においてpH7.4より有意に高かった。対照群では、細胞生存率はpH6.2の方がpH7.4よりむしろ低値を示すので、アシドーシス自体に生存率を上げる効果があるのではなく、pH6.2といったアシドーシス下ではpH7.4の時と比較してブドウ糖および酸素除去侵襲による細胞障害が軽減されていると考えられた。

実験2：細胞外カルシウムイオンを除去しても、pH6.2下ではpH7.4と比較して生存率は有意に高かった。

実験3：pH7.4とpH6.2の間に有意な生存率の差の発生より早い時間に、pH6.2で有意に高いエネルギーチャージ($[ATP+1/2ADP] / [ATP+ADP+AMP]$)とATP値を認めた。

結語：細胞外pH 6.2程度のアシドーシスは、ブドウ糖および酸素除去侵襲による細胞死を抑制した。この、細胞保護効果は、NG108-15細胞では細胞のエネルギー状態の保持がその機序にかかわっていると考えられる。以上より、この研究は、NG108-15といったある種の細胞系では、エネルギー保持が細胞外アシドーシスによる虚血侵襲時の細胞保護効果の機序である事を示唆した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 齋 藤 秀 哉
副 査 教 授 劔 物 修

学 位 論 文 題 名

Extracellular acidosis decreases cell death against glucose-oxygen deprivation in neuroblastoma x glioma hybrid cells

(細胞外アシドーシスが、ニューロブラストーマとグリオーマとの融合細胞において、ブドウ糖・酸素除去侵襲による細胞死を抑制する)

脳虚血にアシドーシスを合併すると、神経学的予後がより不良となることが、臨床的および*in vivo*における実験で報告されている。一方、*in vitro*ではアシドーシスが虚血による神経系細胞および組織の障害を軽減することが報告されている。その機序として、虚血時の細胞内へのカルシウムイオン流入をNMDAレセプタを介して細胞外アシドーシスが抑制することが最も有力とされてきた。このような状況を背景に学位申請者は本研究において、細胞外acidosisが、*in vitro*での虚血性侵襲のモデルであるブドウ糖・酸素除去による細胞死を抑制するかどうか、また抑制効果があった場合には、これが、カルシウムイオン細胞内流入阻止と、細胞エネルギー状態の保持のどちらを主たる機序としているかを、マウス由来neuroblastomaとラット由来gliomaの融合細胞であるNG108-15を用いて検討した。細胞生存率はフローサイトメトリを用いて測定し、高エネルギーリン酸結合は高速液体クロマトグラフィにより定量した。その結果、学位申請者は、pH6.2程度の細胞外アシドーシスは、ブドウ糖・酸素除去侵襲による細胞死を抑制し、この細胞保護効果は、NG108-15細胞では細胞のエネルギー状態の保持がその機序に関与している可能性を示した。以上より、アシドーシスの虚血に対する保護効果が、NMDAレセプタを有する特別な細胞においてのみ見られる現象ではなく、エネルギー保存という一般的な機序を介して様々な細胞に見られる可能性を示唆した。

公開発表は、平成9年1月31日午前10時50分より、医学部臨床大講堂において約20名の聴衆の前で行われた。申請者はスライドを使用しながら約20分間にわたって論文発表を行い、その後質疑応答に入った。副査の齋藤教授より、アシドーシスでのATP保存の機序、NG108-15細胞の機能的特質、*in vitro*と*in vivo*でアシドーシスの影響が異なる理由について、劔物教授から、脳虚血の組織が臨床的に示すアシドーシスの程度とpH6.2との関係、継代培養細胞を用いることの利点、*in vitro*での保護効果を臨床応用するに向けての将来的研究の展望などについて質問があった。学位申請者は概ね妥当な回答を行った。

本研究は、虚血性神経細胞障害に対する細胞外アシドーシスの細胞保護作用について、従来より報告されているカルシウムイオン流入抑制とは異なる機序として、細胞内エネルギー状態の保持を、高エネルギーリン酸結合を定量することにより初めて示したものである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、さらに大学院課程における研鑽や取得単位などを併せ考え、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。