

## 学位論文題名

神経細胞における細胞特異的な低酸素感受性と  
PI3K/Akt 経路活性化

## 学位論文内容の要旨

## 目的

動物細胞は、正常機能と細胞生存を維持するため酸素の安定した供給を必要とする。細胞は、酸素分圧の変化を感知し、適応のために特異的なあるいはより広範囲な分子機構の活性化を開始する。最近の研究では、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ/Akt キナーゼ (PI3K/Akt) 経路が低酸素条件下で、細胞の低酸素適応とアポトーシス防止において重要な役割を演じていることが注目されている。神経細胞と心筋細胞は低酸素に感受性であり、容易にアポトーシスおよびネクローシスに陥る。本研究においては、3つの神経細胞株を使用して、低酸素下で神経細胞の Akt 活性と細胞生存との関係を検討した。

## 材料と方法

## 1. 培養細胞と処理方法

使用した細胞は PC12 (ラット褐色細胞種細胞株), B103 (ラット神経芽細胞種), TR (Ras/Large T 形質転換マウス神経芽細胞株) の3種である。これら細胞株は 10% 牛胎仔血清を添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) と Ham's F12 の 1:1 混合液にて培養・継代した。細胞は各種実験の前に 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> にて 10%~20% の confluence となるように調整した。血清中の増殖因子の影響を除くためには、細胞を低酸素負荷前の 24 時間、無血清培地中に置いた。低酸素負荷は Low Temperature O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Incubator を用い、窒素で置換された 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub> の分圧下にて行った。PI3K 抑制剤の LY294002 は 10, 20, 40 μM, Wortmannin は 100, 200, 400 nM の最終濃度になるように DMSO に溶解し、低酸素負荷の 1 時間前に培地中に添加した。

## 2. Western blot 解析

低酸素あるいは常酸素条件下に置かれた細胞をそれぞれの時間で回収し、細胞溶解液を調整した。細胞溶解液は 1×cell lysis buffer にて採取した。蛋白量にして 10 または 15 μg/lane の SDS-PAGE にて電気泳動後、ナイロン膜に転写し、抗 Akt 抗体、抗 phospho-Ser<sup>473</sup> Akt 抗体、抗 β-actin 抗体をそれぞれ、1:1000 の希釈倍率で用い、抗体反応を行った。PDGF (100 μg/ml) 処理 NIH3T3 細胞の細胞溶解液を Akt およびリン酸化 Akt の陽性コントロールとして用いた。HIF1α については、核抽出液を Buffer A と Buffer C によって抽出した。抗 HIF-1α 抗体は 1:500 の希釈率で用い、100 μM COCl<sub>2</sub> 処理 Hela 細胞の核抽出液を陽性コ

ントロールとして用いた。抗体反応の検出は ECL system による蛍光発色を用いて行った。各検出バンドの濃度はバンドの外周を多角形で囲みスプライン曲線にて曲線回帰を行った後、グレースケールピクセル値を領域内で面積分するプログラムを MATLAB 言語下で作成し、行った。

### 3. 細胞増殖曲線 (生細胞数)

細胞の各種実験条件下での増殖をみるため、細胞を 12 または 24 時間前から 10-20% の confluence となるように調整した。続いて、新しい無血清または 10% 血清添加培養液に培地を交換し、さらに 12 または 24 時間置いた後、低酸素 (1%  $O_2$ ) 下または常酸素 (21%  $O_2$ ) 下で培養を続け、細胞数を継時的にカウントした。カウントは trypan blue 色素排除テストにて生細胞数のみをノイバウエル血球計算盤で数えた。

### 4. Flow cytometry

細胞周期分画および apoptosis 細胞数の測定のためフローサイトメトリーを行った。各条件下で  $1 \times 10^6$  個の細胞を propidium iodide により核 DNA 染色し、細胞画分を FACS にて測定した。Apoptosis に陥った細胞数は濃縮または断片化した核として、sub- $G_1$  画分の細胞数を測定することにより行った。

### 結果

3 つの神経細胞株について、低酸素下での神経細胞の Akt 活性と細胞生存との関係を検討し、3 種の神経系細胞が低酸素に細胞周期停止、アポトーシス誘導において異なる反応を示すことを見出した。Akt のリン酸化は「低酸素感受性」細胞により強く、「低酸素耐性」細胞に弱いことを示した。これは、Akt の活性化が神経細胞をアポトーシスから保護するという以前からの説に反するよう見える。しかし、低酸素下の PI3K による Akt リン酸化が少なくとも一部神経細胞をアポトーシスから保護していることを示した。HIF1 $\alpha$  の発現は 3 つの細胞株で Akt のリン酸化のそれと類似した低酸素応答を示した。

### 考察

PI3K/Akt 経路は低酸素での神経細胞の応答を支配する唯一の経路ではないという結論が導きだされる。むしろ、多くの他の未知の因子が、複雑な制御機構において関与しているものと考えられる。低酸素症に暴露された神経細胞は、PI3K/Akt シグナル経路の活性化において細胞種により異なる応答を示し、低酸素刺激に異なる感受性を示した。低酸素下では、活性化 Akt は細胞増殖や生存を制御する唯一の因子ではないこと、Akt による細胞保護の効果には限界があることを本研究では示した。B103 と TR のような神経系細胞において、より重要な役割を演ずる他の未知の経路が、細胞生存において重要な役割を担っていることが予測される。

### 結語

低酸素症に暴露された神経細胞は、PI3K/Akt シグナル経路の活性化において細胞種により異なる応答を示し、低酸素刺激に異なる感受性を示した。PI3K/Akt 経路が低酸素に対する神経細胞の耐性の主要決定因子ではなく、他に未知のメカニズムが存在することを示唆している。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 崎 喜 信  
副 査 教 授 守 内 哲 也  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

## 神経細胞における細胞特異的な低酸素感受性と PI3K/Akt 経路活性化

動物細胞は、正常機能と細胞生存を維持するため酸素の安定した供給を必要とする。細胞は、酸素分圧の変化を感知し、適応のために特異的なあるいはより広範囲な分子機構の活性化を開始する。最近の研究では、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ/Akt キナーゼ (PI3K/Akt) 経路が低酸素条件下で、細胞の低酸素適応とアポトーシス防止において重要な役割を演じていることが注目されている。神経細胞と心筋細胞は低酸素に感受性であり、容易にアポトーシスおよびネクローシスに陥る。本研究においては、3つの神経細胞株を使用して、低酸素下で神経細胞の Akt 活性と細胞生存との関係を検討した。

使用した細胞は PC12 (ラット褐色細胞種細胞株), B103 (ラット神経芽細胞種), TR (Ras/Large T 形質転換マウス神経芽細胞株) の3種である。これら細胞株は 10% 牛胎仔血清を添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) と Ham's F12 の 1:1 混合液にて培養・継代した。細胞は各種実験の前に 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> にて 10%~20% の confluence となるように調整した。血清中の増殖因子の影響を除くためには、細胞を低酸素負荷前の 24 時間、無血清培地中に置いた。低酸素負荷は Low Temperature O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Incubator を用い、窒素で置換された 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub> の分圧下にて行った。PI3K 抑制剤の LY294002 は 10, 20, 40 μM, Wortmannin は 100, 200, 400 nM の最終濃度になるように DMSO に溶解し、低酸素負荷の 1 時間前に培地中に添加した。低酸素あるいは常酸素条件下に置かれた細胞をそれぞれの時間で回収し、細胞溶解液を調整して Western Blot analysis を行った。細胞の各種実験条件下での増殖をみるため、細胞を 12 または 24 時間前から 10-20% の confluence となるように調整した。続いて、新しい無血清または 10% 血清添加培養液に培地を交換し、さらに 12 または 24 時間置いた後、低酸素 (1% O<sub>2</sub>) 下または常酸素 (21% O<sub>2</sub>) 下で培養を続け、細胞数を継時的にカウントした。カウントは trypan blue 色素排除テストにて生細胞数のみをノイバウエル血球計算盤で数えた。細胞周期分画および apoptosis 細胞数の測定のためフローサイトメトリーを行った。各条件下で 1×10<sup>6</sup> 個の細胞を propidium iodide により核 DNA 染色し、細胞分画を FACS にて測定した。Apoptosis に陥った細胞数は濃縮または断片化し

た核として、sub-G<sub>1</sub>画分の細胞数を測定することにより行った。

結果は3つの神経細胞株について、低酸素下での神経細胞のAkt活性と細胞生存との関係を検討し、3種の神経系細胞が低酸素に細胞周期停止、アポトーシス誘導において異なる反応を示すことを見出した。Aktのリン酸化は「低酸素感受性」細胞により強く、「低酸素耐性」細胞に弱いことを示した。これは、Aktの活性化が神経細胞をアポトーシスから保護するという以前からの説に反するよう見える。しかし、低酸素下のPI3KによるAktリン酸化が少なくとも一部神経細胞をアポトーシスから保護していることを示した。

HIF1 $\alpha$ の発現は3つの細胞株でAktのリン酸化のそれと類似した低酸素応答を示した。

以上のように、低酸素症に暴露された神経細胞は、PI3K/Aktシグナル経路の活性化において細胞種により異なる応答を示し、低酸素刺激に異なる感受性を示した。低酸素下では、活性化Aktは細胞増殖や生存を制御する唯一の因子ではないこと、Aktによる細胞保護の効果には限界があることを本研究では示した。

公開発表において後守内哲也教授からこの研究に用いた細胞株は、正常の神経細胞における低酸素への反応のモデルとして相応しいかどうかについての質問があった。次いで長嶋和郎教授から低酸素と血清は、Aktの活性化への機序がどの違うかどうかについての質問があった。さらに岩崎喜信教授から今までの報告によって通常の神経細胞は低酸素とAktのリン酸化の関係についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究に基づく経験や以前の論文の結果を引用し明確に解答した。

本研究は、低酸素症に暴露された神経細胞は、低酸素刺激に異なる感受性を示し、PI3K-Akt経路が低酸素に対する神経細胞の耐性の主要決定因子ではなく、他に未知のメカニズムが存在することを示唆した点で高く評価され、今後Aktの活性化と他の低酸素刺激による活性化される経路の関係を調べることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(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。