

学位論文題名

Functional significance of changes in the spontaneous calcium oscillations for the development of ischemic tolerance of neurons in neuron/astrocyte co-cultures

(ニューロン・グリア共培養系を用いた脳虚血耐性の発現におけるカルシウムオシレーションの機能的意義に関する研究)

学位論文内容の要旨

細胞内カルシウム濃度の自発的な振動 (Ca^{2+} オシレーション) は、神経細胞、グリア細胞両方にみられる細胞内情報伝達系として、神経細胞の軸索や樹状突起の伸長など脳における神経回路形成に重要な役割を担っていることが報告されている。さらに近年、この Ca^{2+} オシレーションは遺伝子発現の効率を調節しているとの報告がなされている。一方、脳の代表的な病態のひとつである脳梗塞などによって脳が虚血状態に陥ると、大規模な神経細胞死が誘発される。しかし、事前に非致死的な虚血を行うとその後の致死的な虚血に対して耐性が生じることが知られている。これを虚血耐性と呼ぶが、その発現機序の詳細については未だ明らかではない。そこで本研究では、ニューロン・グリア共培養系を用いて様々な遺伝子発現の調節を介して誘発されていると考えられている脳虚血耐性における Ca^{2+} オシレーションの機能的役割を明らかにすることを目的とした。本研究の成果は、脳虚血耐性の発現における Ca^{2+} オシレーションの機能的役割の解明ばかりでなく、細胞の適応現象における Ca^{2+} オシレーションの意義について重要な示唆を与えると考えられる。

脳虚血は培養系から酸素とグルコースを除去する oxygen/glucose deprivation (OGD) によって模擬した。本培養系において PC 処置終了 20~24 時間後に虚血耐性が発現することを確認し、 Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fluo4-AM により PC 処置終了から 20 時間後までの細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を観察した。その結果、PC 処置終了 4 時間後において Ca^{2+} オシレーションの振動数が、神経細胞、アストロサイトともに未処置に比べて有意に減少し、8 時間後においても減少する傾向がみられた。虚血耐性が発現している PC 処置終了 20 時間後では、その振動数は未処置と同程度に回復した。そして致死的な OGD 負荷前に、 IP_3 受容体の阻害薬である 2APB により Ca^{2+} オシレーションの振動数を減少させると虚血耐性が誘発された。逆に、PC 処置後にアデニル酸シクラーゼの活性化剤である forskolin を付加し、 Ca^{2+} オシレーションの振動数を増加させると虚血耐性の誘発が阻害された。また 2APB の前付加は、虚血時における神経細胞死誘発の要因のひとつである OGD 中の細胞外グルタミン酸上昇を抑制し、その上昇の原因と考えられているグルタミン酸トランスポーター GLT-1 の発現を減少させた。この GLT-1 の発現は神経ペプチドである PACAP によって調節されていることが先行研究より報告されている。そこで、本培養系に PACAP 受容体の阻害薬である PACAP6-38 を付加した結果、 Ca^{2+} オシレーションの振動数は減少し、GLT-1 の発現も減少した。さらに PACAP6-38 の前付加は、その後の致死的な OGD に対し神経細胞に耐性をもたせた。逆に

PC 処置後の PACAP38 の付加は Ca^{2+} オシレーションの振動数を増加させ、PC 処置による GLT-1 のダウンレギュレーションと虚血耐性の誘発を阻害した。

以上、本研究の結果は、PC 処置後の神経細胞およびアストロサイトの Ca^{2+} オシレーション・ダイナミクスの変化が、その後のタンパク発現(とくにアストロサイト・グルタミン酸トランスポータ GLT-1)を調節し、虚血耐性発現に寄与していることを示唆した。また、この Ca^{2+} オシレーション・ダイナミクスの調節に PACAP が関与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 河 原 剛 一

副 査 教 授 遠 藤 俊 徳

副 査 教 授 栗 城 眞 也

学 位 論 文 題 名

Functional significance of changes in the spontaneous calcium oscillations for the development of ischemic tolerance of neurons in neuron/astrocyte co-cultures

(ニューロン・グリア共培養系を用いた脳虚血耐性の発現における
カルシウムオシレーションの機能的意義に関する研究)

細胞内カルシウム濃度の自発的な振動 (Ca^{2+} オシレーション) は、神経細胞、グリア細胞両方にみられる細胞内情報伝達系として、神経細胞の軸索や樹状突起の伸長など脳における神経回路形成に重要な役割を担っていることが報告されている。さらに近年、この Ca^{2+} オシレーションは遺伝子発現の効率を調節しているとの報告がなされている。一方、脳の代表的な病態のひとつである脳梗塞などによって脳が虚血状態に陥ると、大規模な神経細胞死が誘発される。しかし、事前に非致死的な虚血を行うとその後の致死的な虚血に対して耐性が生じることが知られている。これを虚血耐性と呼ぶが、その発現機序の詳細については未だ明らかではない。そこで本研究では、ニューロン・グリア共培養系を用いて様々な遺伝子発現の調節を介して誘発されていると考えられている脳虚血耐性における Ca^{2+} オシレーションの機能的役割を明らかにすることを目的とした。本研究の成果は、脳虚血耐性の発現における Ca^{2+} オシレーションの機能的役割の解明ばかりでなく、細胞の適応現象における Ca^{2+} オシレーションの意義について重要な示唆を与えると考える。

脳虚血は培養系から酸素とグルコースを除去する oxygen/glucose deprivation (OGD) によって模擬した。本培養系において PC 処置終了 20~24 時間後に虚血耐性が発現することを確認し、 Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fluo4-AM により PC 処置終了から 20 時間後までの細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を観察した。その結果、PC 処置終了 4 時間後において Ca^{2+} オシレーションの振動数が、神経細胞、アストロサイトともに未処置に比べて有意に減少し、8 時間後においても減少する傾向がみられた。虚血耐性が発現している PC 処置終了 20 時間後では、その振動数は未処置と同程度に回復した。そして致死的な OGD 負荷前に、 IP_3 受容体の阻害薬である 2APB により Ca^{2+} オシレーションの振動数を減少させると虚血耐性が誘発された。逆に、PC 処置後にアデニル酸シクラーゼの活性化剤である forskolin を付加し、 Ca^{2+} オシレーションの振動数を増加させると虚血耐性の誘発が阻害された。また 2APB の前付加は、虚血時における神経細胞死誘発の要因のひとつである OGD 中の細胞外グルタミン酸上昇を抑制し、その上昇の原因と考えられているグルタミン酸トランスポー

タ GLT-1 の発現を減少させた。この GLT-1 の発現は神経ペプチドである PACAP によって調節されていることが先行研究より報告されている。そこで、本培養系に PACAP 受容体の阻害薬である PACAP6-38 を付加した結果、Ca²⁺ オシレーションの振動数は減少し、GLT-1 の発現も減少した。さらに PACAP6-38 の前付加は、その後の致死的な OGD に対し神経細胞に耐性をもたせた。逆に PC 処置後の PACAP38 の付加は Ca²⁺ オシレーションの振動数を増加させ、PC 処置による GLT-1 のダウンレギュレーションと虚血耐性の誘発を阻害した。

以上、本研究の結果は、PC 処置後の神経細胞およびアストロサイトの Ca²⁺ オシレーション・ダイナミクスの変化が、その後のタンパク発現(とくにアストロサイト・グルタミン酸トランスポータ GLT-1)を調節し、虚血耐性発現に寄与していることを示唆した。また、この Ca²⁺ オシレーション・ダイナミクスの調節に PACAP が関与していることが示唆された。

これを要するに著者は、Preconditioning 処置による脳虚血耐性発現の機序において、Ca²⁺ オシレーションが果たしている機能的役割について新知見を得たものであり、細胞の適応現象・自己調節機能における Ca²⁺ オシレーションの意義を見出したことは、今後の生体工学の発展に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。