

| | |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title | Modification of Anoxic Neuronal Injury by Human Recombinant Epidermal Growth Factor and Its Possible Mechanism |
| Author(s) | 木下, 章 |
| Citation | |
| Issue Date | |
| oaire:version | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/38009 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

| | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名 | 木下章 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学） |
| 学位記番号 | 第 10203 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 4 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 外科系専攻 |
| 学位論文名 | Modification of Anoxic Neuronal Injury by Human Recombinant Epidermal Growth Factor and Its Possible Mechanism (無酸素性神経細胞傷害に対する上皮性成長因子の改善効果) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 早川 徹 (副査) 教授 西村 健 教授 遠山 正彌 |

論文内容の要旨

(目 的)

上皮性成長因子 (EGF) は雄マウスの顎下腺より単離されたポリペプチドの mitogen であり, 種々の作用を持つ細胞成長因子の一つである。しかも, EGF は中枢性ニューロンに対して神経栄養因子として働くことが示唆されている。本研究では遺伝子組換え技術により合成されたヒトリコンビナント EGF (rEGF) が低酸素による神経細胞傷害を改善し得るかどうかを検討するとともに, その作用機作についても考察したものである。

(方 法)

[初代培養ニューロンの作成]

胎生17日のラット胎仔より無菌的に大脳皮質を摘出し, 十分に髄膜を分離した後10% FCS加MEMに浮遊させ, 2.1×10^2 cells/mm²の細胞密度で multi-well culture dish に撒き, 37°C, 5% CO₂の条件下で培養した。

[rEGFの神経栄養効果の検討]

培養開始24時間を Day 0 とし, この時培養液を DMEM/F-12 (1:1) を交換し, rEGF を添加することにより, 各種条件下での rEGF の神経栄養効果を検討した。低酸素負荷は Vibulsreth らの方法に準じた。培養条件は以下の2つのグループに分けた。group 1 では培養液中に rEGF を 1, 10, 100 ng/ml の濃度で添加し, 5日間培養した。group 2 では同様に rEGF を添加して3日間培養した後に上記の低酸素負荷をかけ, さらに2日間培養した。各実験終了後に細胞を固定した後, 位相差顕微鏡で 100 μm 以上の突起を持った細胞を計数した。

[EGF receptor の発現]

ニューロンを EGF 非存在下に無血清培地で培養し、Day 1 から Day 3 で培養細胞を固定した。これに抗 EGF receptor 抗体を一次抗体として反応させ EGF receptor を免疫細胞化学的に染色した。

[EGF receptor binding assay]

Day 0 で無血清培地に交換した後 EGF 10 ng/ml 存在下に、あるいは EGF 非存在下に 5 日間培養したニューロンを用い、Day 5 に結合実験を行った。

(結 果)

[EGF 受容体の発現について]

Day 1 から Day 3 まで EGF receptor 陽性細胞を細胞100個あたりで計数すると、Day 1 で約10%の細胞に EGF 受容体の発現がみられ、Day 2 ではほぼ50%、Day 3 ではほぼ70%が陽性に染色された。EGF 受容体はおもに細胞体に偏在して存在した。

[培養ニューロンの生存曲線について]

低酸素負荷をしなかったニューロンでは rEGF が 10 ng/ml の濃度で明らかなニューロンの生存延長を認め、また 1 ng/ml の濃度では効果がなく、100 ng/ml の濃度では軽度の効果にとどまった。低酸素負荷を行ったニューロンでは rEGF 無添加の場合、生存するニューロンの数は無負荷の場合の10分の1以下に低下した。rEGF を添加することにより容量依存的に生存細胞数が増加し、rEGF が低酸素負荷に拮抗して、ニューロンに対して生存維持効果を持つことが示唆された。

[EGF 受容体の機能発現について]

EGF 受容体の receptor binding assay を行うことにより親和係数 (Kd 値) 及び細胞 1 個当りのレセプター数を求めた。その結果、Day 0 から rEGF を 10 ng/ml 添加した群で EGF 受容体の高親和性レセプターの出現が確認され、低親和性レセプターとの細胞 1 個当りのレセプター数の比は 12:88 であり Kd 値の比は 52:1 であった。一方、低親和性レセプターは EGF 添加の有無にかかわらず同程度に存在した。

(総 括)

ラット大脳皮質ニューロンの培養による in vitro hypoxia model を用いて低酸素性神経細胞傷害に対する rEGF の効果を検討した。rEGF は適当量 (10 ng/ml) で栄養効果を発揮し、過量 (100 ng/ml) ではかえって細胞の生存を阻害した。この現象の説明として、1 つには余剰の EGF による過度の down regulation が起こり、結果として EGF セプターの数が増減し、rEGF の生存維持効果を損なったと説明することができる。また、用いた EGF はヒトの遺伝子組換えによって得られたものであり、その効果を検定した培養細胞はラットのものであることから、両者の種差があるため過量の EGF が生存維持を阻害したとも考えることができる。ついで receptor binding assay を行うことにより培養ニューロンの EGF receptor の性質について検討した。その結果、high affinity binding site が rEGF (10 ng/ml) と共存培養したときにのみ認められた。従って rEGF が high affinity site を誘導したと考えられ、それが低酸素性神経細胞傷害の改善に関連しているものと示唆される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト recombinant EGF のニューロンに対する作用をラット胎仔大脳より得た初代培養神経細胞を用いて検討すると共に、ニューロン上での EGF レセプターの発現とその性質及び rEGF の作用機作について考察したものである。その結果、rEGF は培養ニューロンに対して低酸素性傷害の改善を中心として神経栄養効果をもつことが明らかとなった。これは、虚血性あるいは低酸素性脳傷害に対する神経成長栄養因子の効果に関する研究の先駆けとなるものであり、今後の低酸素性あるいは虚血性脳損傷の病態の解明ならびに治療法の開発につながる重要な知見であり、学位に値するものであると考える。