



Title	Hypoxia/Reoxygenation-mediated Induction of Astrocyte Interleukin 6 : A Paracrine Mechanism Potentially Enhancing Neuron survival
Author(s)	前田, 裕輔
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38990">https://hdl.handle.net/11094/38990</a>
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、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	まえだ ゆう輔
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11784 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Hypoxia/Reoxygenation-mediated Induction of Astrocyte Interleukin 6: A Paracrine Mechanism Potentially Enhancing Neuron Survival (低酸素暴露・再酸素化による astrocyte よりの IL-6 の誘導: その発現のメカニズムと脳虚血における役割)
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信
	(副査) 教授 早川 徹 教授 木下タロウ

## 論文内容の要旨

## 【目的】

従来から神経細胞の支持細胞であると考えられてきた Astrocyte (AST) は、興奮性アミノ酸の処理や種々のイオンの homeostasis 等の環境の維持をおこなっているのみならず、組織損傷後の治癒過程や感染に対する防御機構が発動されるような状況下で神経保護因子やサイトカインの発現等を通じて、神経機能の維持に極めて重要な働きをしていることが明らかとなってきた。我々は砂ネズミを用いた実験的脳虚血モデルを用いて、あらかじめ非致死的な虚血を加える事により、神経細胞に虚血に対する tolerance が誘導されうる事を示してきた。虚血などの環境変化に極めて脆弱であるはずの神経細胞が虚血に対する抵抗性を示す際には、その支持細胞である AST が何らかの神経保護機作を発現している可能性を考慮する必要がある。本研究は、我々が確立した大規模細胞培養系での虚血モデルを用いて低酸素暴露後再酸素化された AST がどのような神経保護機作を発現するかを細胞・分子レベルで検討する事によって、かかる細胞種の脳虚血における役割を明らかにしようとした。

## 【方法ならびに成績】

## 1. 低酸素・再酸素化によって AST より誘導される神経保護因子の同定

新生ラット脳より McCarthy らの手法にしたがって AST およびマイクログリアを分離、第 2 代まで継代培養した AST を低酸素 chamber によって低酸素環境 ( $pO_2 < 10 \text{ torr}$ ) に暴露した後、再酸素化した。約 30 時間低酸素暴露した後、再酸素化後約 8 時間経過した AST 培養上清を約 20 倍に限外ろ過にて濃縮、未分化の PC-12 細胞に添加すると、PC-12 細胞の分化（神経突起の伸長）が観察された。その作用は抗 IL-6 中和抗体にて阻害されたが、抗 NGF (Nerve Growth Factor) 中和抗体は効果を示さなかった。よって低酸素・再酸素化により、AST が IL-6 を産生したことが示唆された。

## 2. AST より誘導される IL-6 の定量

AST より誘導される IL-6 活性の測定のため IL-6 dependent cell である MH-60 細胞と dimethyl thiazol diphenyltetrazolium (MTT) を用いた IL-6 のアッセイ系を用いて AST 上清中の IL-6 活性を測定したところ、AST の IL-6 産生は再酸素化後 8-16 時間後にピークを認めた。再酸素化によって AST から産生される IL-6 量は、低酸素暴露時の酸素濃度が低いほど多く認められた。さらに、マイクログリアでは、再酸素化による IL-6 の誘導は見られなかった。また、IL-6 を誘導する事が知られている Tumor Necrosis Factor (TNF) および IL-1 に

関しては、その感受性細胞である L-M 細胞、A375S 2 細胞を用いたバイオアッセイによって、低酸素・再酸素化された AST からは、これらのサイトカイン活性を検出できなかった。再酸素化直前に加えられた TNF、IL-1 の中和抗体は IL-6 の誘導を抑制し得ず、再酸素化による AST よりの IL-6 の誘導が選択的に起こっている事が示された。RT-PCR 法によって半定量的に計測された AST 内の IL-6 transcript 量は低酸素負荷によって増加、再酸素化 1 時間をピークとして急増、以後減少した。Nuclear run off アッセイも同様に IL-6 の転写速度が低酸素負荷によって有意に、また再酸素化後ごく短時間に限って強く増加することが認められた。次に、AST を<sup>35</sup>S-methionine でラベルし抗 IL-6 抗体を用いた免疫沈降法をおこなうことにより、低酸素下では培養上清や細胞内にも IL-6 抗原が検出されないのにもかかわらず、再酸素化に伴って IL-6 抗原が出現することが示された。

### 3. 再酸素化による AST よりの IL-6 誘導のメカニズム

Lucigenin を用いた化学的発光法は、再酸素化に伴い、AST 内に再酸素化 15 分以内に活性酸素が発生することを示し、これは allopurinol や N<sup>6</sup>-monomethyl L-arginine (L-NMMA) では阻害されなかった。これに対し、radical scavenger として働くと考えられる N-acetyl cysteine (NAC) は部分的に、更に NADPH oxidase 阻害剤である diphenyl iodonium (DPI) は、ほぼ完全に再酸素化に伴う活性酸素の発生を抑制した。また、Cytochrome-C 法でも再酸素化に伴う AST の NADPH oxidase の活性化が確認された。また NAC および DPI は再酸素化に伴った IL-6 活性および抗原の誘導を抑制したが、その効果は再酸素化 15 分以内に添加されたときに限って見られ、それ以後では抑制効果を示さず、再酸素化時に一過性に発生する活性酸素が IL-6 の産生を引き起こしている事が示唆された。再酸素化に伴って見られる IL-6 の誘導はヒト AST の cell line である U373 細胞でもみられ、再酸素化はその IL-6 の産生を約 4.5 倍に増加させた。

### 4. 脳虚血における IL-6 の役割とその発現

分化した PC-12 細胞を低酸素暴露後再酸素化すると、再酸素化後に細胞障害が引き起こされたが、再酸素化後の AST 培養上清は低酸素・再酸素化による細胞障害を明らかに軽減し、この作用は抗 IL-6 中和抗体で失活したが、抗 NGF 中和抗体は効力を示さなかった。また、murine-recombinant IL-6 (10 ng/ml) は同様の保護作用を発揮した。更に、砂ネズミ脳虚血モデルにおいて、両側頸動脈血流遮断（5 分）・再灌流後に 24-48 時間後をピークとして、虚血に際して神経細胞がより脆弱とされる海馬領域のそれに比し、皮質領域の IL-6 活性は約 4-5 倍の増加を認め、免疫組織染色でも、皮質領域の AST を中心に明らかな IL-6 抗原の発現を認めた。

### 【総括】

AST は虚血・再灌流時に際し、NADPH oxidase の活性化によって、再酸素化を感知、IL-6 を選択的に産生することを明らかとした。またこの AST に誘導される IL-6 が PC-12 細胞に対して分化及び保護因子として働くこと、更に IL-6 の発現が虚血に脆弱な海馬領域より、虚血に対してより抵抗性を示す皮質領域に顕著にみられることから、AST が神経保護因子である IL-6 の産生を通じて、かかる病態下の神経細胞を保護している可能性のあることを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、虚血・再灌流におけるアストロサイトの役割を検討する目的で、低酸素暴露・再酸素化によるアストロサイトからの IL-6 の誘導およびその発現のメカニズムに関する研究を行ったものである。低酸素暴露後再酸素化されたアストロサイトは培養上清中に IL-6 を産生し、その誘導には再酸素化に伴う活性酸素の生成が関与していることを明らかにした。また、砂ネズミの脳虚血モデルにおいても虚血再灌流後、アストロサイトが IL-6 を発現していることを示した。このことは、低酸素暴露・再酸素化というストレスに対するアストロサイトの細胞応答を考える上で意義深い。本研究は、脳虚血などの、in vivo における虚血再灌流の関与する病態を究明する上で極めて重要であり、学位に値する研究であると考えられる。