

Title	グリア細胞Na ⁺ -Ca ²⁺ 交換系の生理的及び病理的意義に関する研究
Author(s)	田熊, 一浩
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39717
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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	田 熊 一 浩
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 12453 号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学位論文名	グリア細胞 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系の生理的及び病的意義に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 馬場 明道 (副査) 教授 真弓 忠範 教授 溝口 正 教授 東 純一

論文内容の要旨

細胞内 Ca^{2+} イオンは細胞内情報伝達系の重要なシグナル物質であり、細胞外刺激により上昇し、種々の生理反応あるいは細胞毒性を引き起こす。したがって、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の調節機構を解明することは、細胞の様々な機能発現を理解するうえで重要であると考えられる。 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系は、 Na^+ と Ca^{2+} を逆輸送するアンチポーターで、その活性は細胞膜を介する Na^+ および Ca^{2+} 濃度勾配に依存し、 Ca^{2+} 排出および Ca^{2+} 流入の両方向性 Ca^{2+} を輸送する。 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系は、心筋、視細胞をはじめ様々な細胞での存在が知られており、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節を介して細胞の生理機能、病態機能発現に重要な役割を果たしていると考えられている。中枢神経系においては、神経膜標品で存在が報告され、脳傷害や脳虚血による神経細胞死への関与が示唆されているが、その役割の詳細は不明である。

一方、脳はニューロンとそれを取り囲むグリア細胞とから構築されている。グリア細胞のうち最も数の多いアストロサイトは、血液脳関門の形成、細胞間隙の K^+ 濃度の調節、神経伝達物質の代謝などの機能を持ち、脳機能の維持において生理学的にも病態的にも重要な役割を持つことが考えられている。また、近年、神経細胞と同様にアストロサイトにも種々の神経伝達物質受容体、チャネルの存在が報告されている。しかしながら、アストロサイトの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節系については不明な点が多く、 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系の存在は解明されていない。

本研究では、アストロサイト $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系の生理的および病態的役割を追究することを目的として、まずアストロサイトにおける本交換系の存在を活性 (Na^+ 依存性 Ca^{2+} 流入と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加)、蛋白、mRNA のレベルで検討した。細胞内 Na^+ 濃度を上昇させる薬物であるウアバインとモネンシンにより、 Na^+ 依存性 Ca^{2+} 取り込みの促進および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加が認められた。この Ca^{2+} 取り込みは、 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系の選択的阻害薬である 3, 4-ジクロロベンズアミルにより濃度依存的に阻害され、 Ca^{2+} チャネル阻害薬により影響を受けなかった。また、この Ca^{2+} 取り込みは、心臓型 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系と同様に、細胞外 K^+ により活性化され、かつ K^+ 非存在下でも認められた。心臓 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系の抗体を用いたウェスタンブロット解析により、アストロサイトにおける本交換系蛋白の存在を示した。心臓 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系 cDNA 由来のプローブを用いたノザンブロット解析により mRNA の発現を認めた。これらの成績から、アストロサイトにおける心臓型 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系の存在が明らかになった。

次に、内因性物質によるその活性調節について検討した。アスコルビン酸は、アストロサイト $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換活性を濃度および処置時間依存的に抑制した。本阻害作用は、細胞内アスコルビン酸含量の多い細胞ほど大きく、その

作用点が細胞内であることが示唆された。また、タウリンによっても $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換活性の阻害作用が認められた。一方、一酸化窒素産生薬であるニトロプルシドナトリウム (SNP) および cGMP の膜透過性アナログである 8-ブロモ-cGMP の前処置は、アストロサイト $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換活性を著明に促進した。SNP による本促進作用は、cGMP 依存性蛋白質リン酸化酵素阻害薬共存下でも認められた。

さらに、その生理的病態的意義を追究する目的で、正常モードでの Ca^{2+} 排出、逆モードでの Ca^{2+} 流入における本交換系の関与について検討した。 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系を促進する SNP は、神経伝達物質刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を減少した。また、SNP は Ca^{2+} イオノフォアであるイオノマイシンによる受容体非依存的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加も抑制した。NE による Ca^{2+} 応答は、SNP 以外の $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系促進薬である S-ニトロソ-L-システインおよび 8-ブロモ-cGMP 処置により減弱し、3, 4-ジクロロベンズアミル処置により増大した。 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換活性および本交換系蛋白質の発現量は、本交換系 mRNA に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置により著明に減少したが、センス処置による影響は軽度であった。本アンチセンス処置細胞においては、SNP による NE の Ca^{2+} 応答抑制作用は認められなかった。以上の成績は、 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系の順モードを介する Ca^{2+} 排出が、受容体刺激による Ca^{2+} シグナルの調節に関与することを示している。次に、 Ca^{2+} パラドックスについて検討した。アストロサイトを Ca^{2+} -free 溶液に曝露後 Ca^{2+} 含有溶液で再インキュベートすると、定常状態を越える持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が認められ、3-5 日後に生細胞数の減少が認められた。再灌流による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加および遅発性細胞死は、 Ca^{2+} チャンネル阻害薬より影響を受けず、3, 4-ジクロロベンズアミル処置により軽減した。一方、 Ca^{2+} -free 溶液に曝露後 SNP および 8-ブロモ-cGMP を含む溶液でインキュベートした場合、 Ca^{2+} パラドックスによる細胞障害は増悪した。さらに、 Ca^{2+} 再負荷による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加および細胞死に対する $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系アンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果について検討した。 Ca^{2+} 再灌流による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加および細胞死は、センス処置により影響を受けなかったが、アンチセンス処置により有意に減少した。これらの成績は、アストロサイトにおいて、 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系の逆モードを介する Ca^{2+} の過流入が、 Ca^{2+} パラドックスによる細胞障害発現に関与することを示している。

論文審査の結果の要旨

本論文は従来、その存在並びに生理・病態的意義の不明であった脳 Na-Ca アンチポーターについて、アストログリアに存在することを活性、mRNA、蛋白のレベルで明らかにしたものである。更に、その調節機構として、NO-cGMP 系、アスコルビン酸を見だし、生理的機能としては受容体刺激による細胞内 Ca 濃度の調節に関与することを明らかにした。病態的には再かん流傷害による遅発性のグリア細胞死が生じることを初めて見だし、その原因となる細胞内 Ca の急激な上昇がこのアンチポーターを介することを証明した。

本研究は Na-Ca アンチポーターの脳における生理・病態的意義を初めて明らかにしたことで、薬学博士の授与に充分値するものであると判断する。