



Title	Brief exposure to hypoxia induces bFGF mRNA and protein and protects rat cortical neurons from prolonged hypoxic stress
Author(s)	榑, 孝之
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40048
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	さかき 榊 孝 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 0 5 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 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	Brief exposure to hypoxia induces bFGF mRNA and protein and protects rat cortical neurons from prolonged hypoxic stress (低酸素耐性モデルの開発と耐性獲得におけるbFGFの役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 早川 徹 (副査) 教 授 遠山 正彌 教 授 柳原 武彦

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

あらかじめ軽度の脳虚血負荷を与えることにより、神経細胞がその後の致死的な負荷に対して抵抗性を獲得することが、虚血耐性現象として報告された。この耐性現象には、特定の遺伝子、蛋白の発現が不可欠と考えられている。耐性獲得機構の解明、および耐性関連遺伝子の検索のため、神経細胞初代培養系を用い、低酸素性神経細胞傷害に対する耐性獲得モデルを作成した。このモデルを用いて神経栄養因子の 1 つである塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) の mRNA および蛋白の発現を耐性獲得との関連において経時的に解析した。

【方法ならびに成績】

18日齢の Wistar ラット胎子を用い、大脳皮質細胞の高密度初代培養を行った。10%血清培地で24時間培養した後24-72時間無血清培地で維持し、低酸素負荷を加えた。低酸素負荷は、密閉されたチャンバー内を95% NO₂, 5% CO₂ に置換し、培地中の酸素分圧を対照群の 1/4 以下とすることにより作成した。実験群を 1) 対照群 2) 短時間 (4 時間) 低酸素負荷群 3) 短時間低酸素+長時間 (24 時間) 低酸素負荷群 4) 長時間低酸素負荷群の 4 群に分けた。細胞傷害は培地中に傷害を受けた細胞より遊離された LDH を定量し判定した。また、低酸素負荷前後における bFGF mRNA および蛋白の発現をそれぞれ Northern blot と Western blot で解析した。

細胞傷害を LDH の定量により経時的に検討したところ、短時間の低酸素負荷では対照群と比較して有意な細胞傷害を認めなかった。一方、長時間の低酸素負荷を加えると神経細胞の膨化、神経突起の消失、有意な LDH の増加を認め神経細胞傷害が生じた。しかし、あらかじめ短時間の低酸素負荷を加えておくと、その後に長時間低酸素負荷を加えても LDH の増加は認めず、耐性が獲得されたと考えられた。次いで、低酸素負荷前後における bFGF 発現の変化を検討したところ、短時間の低酸素負荷を加えることにより、24 時間後には bFGF mRNA、蛋白の発現を認めた。一方、長時間低酸素負荷では、bFGF mRNA は 48 時間後まで遅延して発現していたが、bFGF 蛋白の合成は 72 時間後まで検出されなかった。これに対し、短時間の低酸素を負荷し、その 48 時間後にさらに長時間の低酸素負荷を加えると、最初の短時間の低酸素負荷後から bFGF 蛋白が持続的に発現していた。さらに、本培養系に、bFGF を外部より添加すると低酸素性細胞死が有意に減少することを確認した。

【総括】

低酸素耐性現象をラット神経細胞培養系において検討し、耐性獲得の機構および耐性関連因子について考察した。

培養神経細胞にあらかじめ細胞傷害をきたさない程度の短時間低酸素負荷を加えると、その後の長時間低酸素負荷に対する耐性が確立されることが示された。またbFGFが重要な関連因子であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、脳虚血耐性獲得機構の解明、および耐性関連遺伝子の検索のため、神経細胞初代培養系を用い、低酸素性神経細胞傷害に対する耐性獲得モデルを作成した。また、このモデルを用いて神経栄養因子の1つである塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）の蛋白およびmRNAの発現をNorthern blotおよびWestern blot法を用いて耐性獲得との関連において経時的に解析した。さらに、本培養系に、bFGFを外部より添加すると有意に低酸素性細胞傷害が減少することを確認した。細胞傷害の認められない短時間の低酸素負荷では、bFGF蛋白が24時間後に発現するのに対し、有意に細胞傷害の認められる長時間低酸素負荷では低酸素負荷24時間後よりbFGF mRNAの発現が認められるにもかかわらず、bFGF蛋白発現は低酸素負荷72時間後となり、遅延が認められた。一方、あらかじめ短時間低酸素負荷により蛋白発現を誘導しておくことにより、低酸素性細胞傷害に対する耐性を獲得することが明らかとなった。このことは、bFGFが本現象についての重要な関連因子であることを示唆するものである。本研究は脳虚血耐性の機構解明に寄与するものであり、学位に値するものと評価される。