



Title	Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis : a possible neuroprotective mechanism of growth factors
Author(s)	玉谷, 実智夫
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41124
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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	たま 谷 実 智 夫
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 6 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 2 月 12 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis: a possible neuroprotective mechanism of growth factors (一酸化窒素により引き起こされる神経細胞死における Bcl-2 ファミリーとカスパーゼ-3 様プロテアーゼの関与：成長因子の神経保護機構との関連)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠山 正弥 (副査) 教 授 辻本 賀英 教 授 荻原 俊男

論 文 内 容 の 要 旨

[背景および目的]

これまで虚血脳における神経細胞死はネクロシスの形態をとると考えられてきたが、近年、形態学および生化学的所見よりアポトーシスを介する細胞死が関与することがわかってきた。今回、我々は初代培養神経細胞とアストロサイトの共存培養系を用いた虚血再灌流モデルを作成し、低酸素刺激後のアストロサイトが神経細胞の生死にいかなる影響をおよぼすか、またその際に神経細胞内の Bcl-2 family と caspase-3 が関与するかについて検討した。さらに、神経保護作用を示すインスリン用成長因子-1 (IGF-1) と塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) のこれらアポトーシス関連蛋白に対する影響につき検討した。

[方法ならびに成績]

まず、低酸素刺激後のアストロサイトが共存培養した神経細胞の生存率に対しいかなる影響を与えるかをみた。トランスウェルに培養したアストロサイトを24時間正常酸素あるいは低酸素暴露しその後培養神経細胞のプレートと組み合わせ、48時間正常酸素濃度下で共存培養した。低酸素刺激したアストロサイトと共存培養した神経細胞の生存率は有意に低下し、一酸化窒素 (NO) 合成酵素の阻害剤である L-NMMA の共存培養系への添加により神経細胞死は抑制された。また、interleukin-1 β (IL-1 β) は低酸素暴露後のアストロサイトの神経細胞毒性を増強し、この効果は L-NMMA により抑制され、アストロサイトが産生する NO が神経細胞死を惹起していると示唆された。さらに、これらの神経細胞死は核の凝縮、DNA Laddering を伴いアポトーシスを介するものであった。

次に、アストロサイトの NO 産生及び誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の誘導について検討した。24時間低酸素暴露後アストロサイトは Griess 法で検出できる NO を産生しなかったが、その後再酸素化48時間後大量の NO を産生し、IL-1 β はさらにこの効果を増強した。また、Western blotting 法及び Northern blotting 法を用い低酸素刺激が iNOS を誘導し、さらに IL-1 β はこの誘導を増強することが確かめられた。

次にこのモデルにおける NO が惹起する神経細胞のアポトーシスのメカニズムを明らかにするため共存培養後48

時間後の神経細胞内 caspase-3 様プロテアーゼ活性及び Bcl-2 と Bax レベルの関与について検討した。caspase-3 様プロテアーゼの阻害剤 Ac-DEVD-CHO は用量依存性に共存培養系でのアストロサイトの神経毒性を抑制した。また低酸素刺激したアストロサイトは共存培養神経細胞の caspase-3 様プロテアーゼを活性化し、この作用は IL-1 β により増強、さらに共存培養系への L-NMMA の添加により抑制された。また、低酸素刺激したアストロサイトは共存培養神経細胞の Bcl-2 タンパクレベルを低下、Bax タンパクレベルを上昇させ、この作用は IL-1 β により増強、さらに共存培養系への L-NMMA の添加により抑制された。

NO で惹起される caspase-3 様プロテアーゼの活性化及び細胞死における Bcl-2/Bax 比の役割を調べるため Bax mRNA に対する antisense ODN を NO donor である sodium nitroprusside (SNP) と同時に培養神経細胞に加えた。Bax antisense は SNP による caspase-3 様プロテアーゼの活性化及び細胞死を有意に抑制したことより Bcl-2/Bax 比が caspase-3 様活性をコントロールしていると示唆された。

IGF-1 及び bFGF は虚血性神経細胞死を抑止するとされている。これらの成長因子が NO による細胞死カスケードのどこに作用するかを検討した。いずれの成長因子も SNP で惹起される caspase-3 様プロテアーゼの活性化を用量依存性に抑制した。また、SNP による Bcl-2 タンパクレベルの低下及び Bax タンパクレベルの上昇を抑制した。

[総括]

虚血再灌流後の神経細胞死のメカニズムを説明する新しい説を提唱する。つまり、虚血再灌流後のアストロサイトが産生した大量の NO が近傍の神経細胞のアポトーシスを惹起し、そのメカニズムに Bcl-2/Bax タンパクレベルの変化およびそれに引き続く caspase-3 様プロテアーゼの活性化が関与することが示唆された。また、IGF-1 及び bFGF の神経保護作用は NO によって引き起こされる Bcl-2/Bax タンパクレベルの変化を抑制することによる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

これまで虚血脳における神経細胞死はネクローシスの形態をとると考えられてきたが、近年、形態学的および生化学的所見よりアポトーシスを介する細胞死が関与することがわかってきた。しかしながらそのメカニズムに関する報告は少ない。

本研究は初代培養神経細胞とアストロサイトの共存培養系を用いた虚血再灌流モデルを作成し、虚血再灌流後の神経細胞死のメカニズムを解析したものである。その結果、低酸素刺激後のアストロサイトが神経細胞のアポトーシスを誘導し、そのメカニズムに低酸素刺激後にアストロサイトで産生された大量の一酸化窒素が神経細胞の Bcl-2/Bax タンパクレベルの変化を引き起こし、これによって caspase-3 様プロテアーゼが活性化されアポトーシスが惹起されるカスケードが関与することを示唆した。さらに、インスリン用成長因子-1 (IGF-1) と塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) の神経保護作用は一酸化窒素によって引き起こされる Bcl-2/Bax タンパクレベルの変化を抑制することによる可能性を明らかにした。

以上の研究成果は虚血脳の病態の解明に大きく貢献するものであり、学位に値すると考える。