



Title	LPSによるミクログリアの活性化におけるMAPキナーゼの関与に関する研究
Author(s)	木村, 裕治
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41974">https://hdl.handle.net/11094/41974</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</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	木 村 裕 治
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 3 7 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 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	LPS によるミクログリアの活性化における MAP キナーゼの関与に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 馬場 明道  (副査) 教 授 山元 弘    教 授 松田 敏夫    教 授 東 純一

### 論 文 内 容 の 要 旨

中枢神経系を構築する細胞には神経細胞のほかにその間を埋めるグリア細胞が存在する。グリア細胞にはアストロサイト、オリゴデンドロサイトなどのマクログリアと、ミクログリアとがある。これらのグリア細胞は、神経細胞との間に細胞間分子相関をつくる。ミクログリアは、神経細胞の変性により、活性化し様々に細胞機能並びに形態を変化させる。さらに、ミクログリアは外的環境の変化により活性化することが知られ、事実、中枢神経疾患や頭部外傷、などの各種疾患において、病巣に活性化し形態を変化させたミクログリアの集積が見られる。これら活性化ミクログリアは、食欲性やサイトカイン、NO、神経栄養因子などの産生が亢進させ、アストロサイトの活性化を引き起こすと共に更なる神経細胞死の抑制や促進の重要な要因となる。従って、ミクログリア活性化によるミクログリア機能変化を明らかにすることは、中枢系の病態でのミクログリアの関与を明らかにすることであり、中枢神経障害の各病態の発現機序の解明に意義をもつことである。

脳虚血などの細胞傷害性の環境の中で、神経細胞が細胞死を起こすのに対して、ミクログリア、アストロサイトは細胞死を起こさずむしろ活性化、増殖する。このことは、活性化ミクログリアが細胞傷害性因子に対して特別な防御機構を持つ可能性を示唆している。また、増殖した活性化ミクログリアは、やがて細胞死を伴い減少し静止状態に戻る。これらの知見は、脳傷害時においてミクログリア細胞死が精密に制御されている可能性を示す。しかしながら、ミクログリアの細胞死の制御については、in vivo、in vitro を含めほとんど研究がなされていない。リポポリサッカライド (LPS) は、チロシンリン酸化系をはじめとする種々の細胞内シグナル系を活性化し、これらの細胞内機構を介して食欲作用をはじめとするミクログリア活性化を引き起こす。従って、in vitro での LPS によるミクログリア活性化はそのモデルの一つとして位置づけられている。

MAP キナーゼ (mitogen activated protein kinase) 系は、細胞外の栄養因子や、浸透圧の変化によりリン酸化され活性化が引き起こされる蛋白質である。虚血条件下において MAP キナーゼがリン酸化されるという報告が存在する。細胞死の制御に関して、小脳顆粒細胞のグルタミン酸毒性が MAP キナーゼ系の p38 の阻害剤により抑制されるという報告や、培養大脳皮質神経細胞の DNA 傷害因子による細胞死に対する神経栄養因子の保護効果が MAP キナーゼ系阻害剤により消失するという知見など、最近の多くの研究から MAP キナーゼ系が、アポトーシスの誘導や抑制に関わる因子であることが明らかにされつつある。そこで、本研究は、ミクログリアの活性化によるミクログリアの機能変化、特にミクログリアの細胞死の制御について、in vitro での LPS によるミクログリアの活性化系

を用い、細胞内シグナル系特にMAP キナーゼ系との関連から明らかにする目的で行った。

ミクログリアは、低密度培養条件下 ( $> 1 \times 10^5$  cells/ml)、血清除去により細胞死を起こし、 $6 \times 10^5$  cells/ml の培養条件下においても NO 産生薬 sodium nitroprusside (SNP) 1 mM 16 時間処置により約40%の細胞死を起こした。LPS はこれら細胞死に対して24時間前処置により濃度依存的に有意に抑制したことから、LPS 処置したミクログリアが細胞死抵抗性を示すことが明らかとなった。この保護効果はERK キナーゼ (MEK) の阻害剤である PD98059 ( $50 \mu\text{M}$ ) 共存下では消失した。培養ミクログリアが血清除去により細胞死を引き起こす条件下で、Bax、p53 の発現は、6 時間まで経時的に増加した。p38 の阻害剤 SB203580 ( $20 \mu\text{M}$ ) 処置により、血清除去による Bax の発現上昇、および、細胞死は共に抑制された。一方、LPS12、24時間処置によっても、各々147%、178%のBax の発現量の経時的増加が見られたが、その24時間処置により Bax 発現上昇が、顕著に見られた細胞において細胞死が見られなかった。そこで、更に長期間 LPS 共存下に培養した結果、48、72時間において各々31.4%、69.8%の細胞死が認められた。また、LPS 処置後、LPS を取り除いた後 2-3 日間培養することにより顕著な細胞死が認められた。この遅発性ミクログリア細胞死は、PD98059 ( $50 \mu\text{M}$ ) により完全に抑制されたが SB203580 ( $20 \mu\text{M}$ ) では変化しなかった。

新規脳機能改善薬 T-588 ( $100 \mu\text{M}$ ) は ERK のリン酸化を介してアストロサイトの  $\text{H}_2\text{O}_2$  による細胞死を抑制することを見いだした。T-588 は同時にミクログリアの ERK のリン酸化を引き起こしたが、LPS とは異なり p38 のリン酸化は引き起こさなかった。T-588 はミクログリアの SNP 誘発細胞死を用量依存的に保護した。この保護効果は、PD98059 ( $50 \mu\text{M}$ ) により消失した。以上の結果は、ミクログリアの血清除去による細胞死に p38-Bax の経路が関与すること、並びに、ERK シグナルが外来性傷害性因子に対するミクログリア細胞死抵抗性獲得と、活性化後の自ら細胞死に関与する可能性を示すものであり、更に、薬物による ERK のリン酸化を介した、グリア細胞死の制御の可能性を示すものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は脳傷害時にみられるミクログリアの活性化に伴う細胞死制御機構を in vitro においてリポポリサッカライド (LPS) による活性化をモデルとして検討したものである。LPS による活性化によりミクログリアは NO ラジカルなどによる細胞傷害に対し抵抗性を獲得すること、更に LPS 処置後非刺激時には長期において自ずからアポトーシスを起こすことを明らかにした。また、これらの細胞内機構に MAP キナーゼ系の ERK が関与していることを見出した。更に新規脳機能改善薬 T588 が ERK を介してグリア細胞死制御を示すことも明らかにした。

これらの成果は、薬学博士の学位に十分に値するものである。