



Title	Exposure of cultured primary rat astrocytes to hypoxia results in intracellular glucose depletion and induction of glycolytic enzymes
Author(s)	新津, 陽一
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42730
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、 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	にい っ よう いち 新 津 陽 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 6 3 5 号
学位授与年月日	平成12年6月2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	Exposure of cultured primary rat astrocytes to hypoxia results in intracellular glucose depletion and induction of glycolytic enzymes (低酸素環境下の培養ラットアストログリア細胞における細胞内グルコースの欠乏と解糖系酵素の誘導について)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 吉峰 俊樹 教授 武田 雅俊

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

アストログリア細胞は虚血に対して抵抗性を示すことが知られている。本研究では、虚血の主要因子である低酸素環境下における培養ラットアストログリア細胞のエネルギー代謝の変化を調べた。

〔方法ならびに成績〕

新生ラット由来アストログリア細胞を低酸素チャンバー内に移すことにより48時間の低酸素負荷を与え、その後正常酸素環境下で48時間培養した。培養上清中の遊離 LDH 活性測定、trypan blue 染色及び形態学的観察から、アストログリア細胞の生存は低酸素負荷・再酸素化の過程を通じて維持されていた。低酸素暴露48時間後における蛋白合成能を³H-leucine の蛋白質への取り込みを指標として調べると、正常酸素環境下の約70%に低下していた。また細胞内 ATP 量を逆相 HPLC にて調べると約70%に低下していた。

続いて、アストログリア細胞の細胞外グルコースの取り込みを³H-2-deoxyglucose の取り込みを指標として経時的に調べると、取り込み速度は低酸素暴露12時間後から上昇し、48時間後から再酸素化8時間後まで正常酸素環境下の約1.7倍であった。しかし再酸素化48時間後には元のレベルに戻った。低酸素暴露48時間後における取り込み速度と濃度の関係を Lineweaver-Burk プロットにて解析すると、 K_m 値は正常酸素環境下と同等であったが、 V_{max} は約1.5倍であった。続いて、細胞内グルコース量を hexokinase II/G-6-P dehydrogenase 法にて経時的に調べると、低酸素暴露12時間後から顕著に減少し始め、24時間後から再酸素化8時間後までの間、正常酸素環境下の約40%であった。しかし、再酸素化48時間後には元のレベルにまで回復した。細胞内グリコーゲン量も低酸素暴露24時間後から顕著に低下し再酸素化8時間後には正常酸素環境下の約30%であった。しかし、再酸素化48時間後には元のレベルにまで回復した。これらの結果から、低酸素環境下のアストログリア細胞では、細胞外グルコースの取り込み速度が上昇している一方で、細胞内グルコース及びグリコーゲン量は徐々に減少していくことが明らかになった。このことから、低酸素環境下のアストログリア細胞のエネルギー代謝は、細胞内グリコーゲン分解による嫌氣的解糖系に依存していることが示唆された。

このことをさらに確かめるために、幾つかの代謝阻害剤処置による細胞内 ATP 量の変化を調べた。低酸素暴露24時間後の培養アストログリア細胞に、嫌氣的解糖阻害剤 2-deoxyglucose (20mM) あるいはグリコーゲン分解阻害剤 gluconolactone (5mM) を処置すると、急激な ATP レベルの低下と細胞死が起こった。一方、グルコーストラ

ンスポーター阻害剤 cytochalasin B (10 μ M) あるいは無グルコース培養液処置では細胞内 ATP レベルに顕著な影響は及ぼさなかった。これらの結果から、低酸素環境下のアストログリア細胞は、細胞外グルコースの利用よりもむしろ細胞内グリコーゲン分解による嫌氣的解糖系に強く依存していることが示唆された。

次に、低酸素環境下のアストログリア細胞の生存に蛋白新生が必須であるか調べるため、蛋白合成阻害剤である cycloheximide (2 μ g/ml) を処置し、低酸素負荷を与えた。その結果、低酸素暴露12-24時間後にかけて著しい細胞死が観察された。このことから低酸素環境下のアストログリア細胞の生存には蛋白新生が必須であることが示唆された。そこで differential display 法により低酸素暴露24時間後に発現上昇している遺伝子を解析してみると嫌氣的解糖系酵素の aldolase A, hexokinase II, triosephosphate isomerase が同定された。これらの遺伝子の誘導は Northern blot 法によっても確認された。一方、TCA 回路酵素の NAD (+) -isocitrate dehydrogenase の発現は幾分抑制されていた。これらの結果から、低酸素環境下のアストログリア細胞では嫌氣的解糖系関連酵素が誘導されていることが明らかになった。

〔総括〕

低酸素環境下のアストログリア細胞では細胞外グルコースの取り込みの上昇がみられるが、エネルギー代謝及び細胞生存能は細胞内グリコーゲンの分解による嫌氣的解糖系に強く依存していた。同時に嫌氣的解糖系関連酵素も誘導されていた。これらの事実は、アストログリア細胞が虚血に強いことの理論的裏付けのひとつになり得るものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

アストログリア細胞は脳虚血などの侵襲に対して神経細胞と比べ抵抗性を示すことが知られているが、エネルギー代謝の面からそれを裏付けする明確な実験的根拠はあまり知られていない。

本研究は培養ラットアストログリア細胞を用いて、低酸素環境下におけるエネルギー代謝の変化を嫌氣的解糖系を中心に調べた。アストログリア細胞は低酸素環境下では細胞外グルコースの取り込み速度が約1.7倍上昇しているにもかかわらず、細胞内グルコース量及びグリコーゲン量は約30%に減少していた。

また、細胞内 ATP 含量はグルコースの取り込みを阻害しても変化しなかったのに対して、グリコーゲン分解を阻害すると、急激に減少し、細胞死が引き起こされた。さらに、低酸素環境下では嫌氣的解糖系酵素遺伝子の発現が上昇していたことから、グリコーゲン分解に引き続く嫌氣的解糖系が活性化していることが示唆された。

本研究は、アストログリア細胞が低酸素環境下に強いことを理解するためのひとつの理論的根拠を与えたものとして、博士論文に値するものと考えられる。