



Title	Involvement of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase in Gliosis Induced during Recovery from Metabolic Inhibition
Author(s)	増原, 完治
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/42795
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	増原完治
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15765 号
学位授与年月日	平成12年10月31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 Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase in Gliosis Induced during Recovery from Metabolic Inhibition (代謝抑制よりの回復期におけるグリオーシスと Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase との関係)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二 (副査) 教授 松澤 佑次 教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

〔目的〕

周産期における神経学的な後障害の一つ、痙性麻痺との関連から脳室周囲白質軟化症が重要視されている。脳室周囲白質軟化症は組織学的にはグリオーシス、髄鞘形成の欠損等が特徴的であり、脳虚血よりの再灌流が病因の一つとして考えられているがそのメカニズムは不明であった。そこで、*in vitro*での代謝抑制モデルを用い、虚血状態よりの回復期がグリアへ及ぼす影響を観察した。

〔方法ならびに成績〕

1. グリア初代培養系の作成 胎齢18日目のラットの前脳を5-7日間初代培養した後、トリプシン処理で継代することでグリアのみの培養系を作成し5日目に下記の実験に供した。
2. *in vitro*での代謝抑制モデルの作成 1mM NaCNと20mM 2-deoxyglucoseを含む溶液で30分間培養することにより*in vitro*で細胞内環境が低酸素及び虚血状態になるようにした状態(代謝抑制モデル:MI)と、その後通常の培地で細胞を培養し代謝抑制より回復するようにした状態(回復期モデル:Re)を設定した。
3. ERKの活性化 脳室周囲白質軟化症の病態の一つにグリオーシスがあるので、細胞内伝達系の一つで主に増殖に関与しているERKに着目した。細胞内のERKの活性化は抗ERK抗体で免疫沈降後その基質であるMBPへの³²Pの取り込みより測定した。代謝抑制されたグリアにおけるERK活性は5分以内に増強し15分でピークとなり、その後減弱した。回復期におけるERK活性は代謝抑制時よりも明らかに強く刺激され持続した。
4. ERK活性化の機構 次に回復期におけるERK活性化の機構を検討した。細胞内のCa²⁺が増加し、PKC活性が変化することで脳に障害を与えられていることからPKC活性とERK活性との関連を検討した。1μM PMAを16時間添加し細胞内PKCを枯渇させたり、PKC阻害剤である1μM staurosporineを10分間添加すると回復期30分後のERK活性化は明らかに抑制された。このことから、回復期におけるERK活性化にPKCが関与している事が示唆された。さらに細胞外のCa²⁺の流入と脳障害との関与が言われており、Ca²⁺とERKとの関連を検討した。細胞外Ca²⁺を除去する目的でEGTAを添加したところ、回復期30分後のERKは完全に抑制される事より、回復期におけるERK活性化に細胞外Ca²⁺の流入の関与が示唆された。Lチャンネル阻害剤であるnifedipineを添加してもERK活性は抑制されず、NMDA受容体阻害薬を添加すると一部抑制されることより、NMDA受容体を介するCa²⁺の流入が主に関与していると思われる。細胞内Ca²⁺の増加が再灌流時の過酸化反応を惹起し細胞障害を起こ

すと考えられているため、活性酸素と ERK 活性との関連を検討した。活性酸素除去剤である SOD 添加により回復期30分後における ERK 活性が明らかに抑制された。このことから回復期における ERK 活性化と活性酸素との関与が示唆された。

5. ERK 活性化のグリオーシスへの関与 MTS アッセイにて代謝抑制の有無によりその後のグリアの増殖に違いがあるか否かを比較検討した。グリアの増殖は代謝抑制を受けた場合に有意に認められ、ERK 活性化阻害剤である PD98059 を添加するとこの増殖が抑制された。このことからグリオーシスと ERK 活性化との関与が示唆された。

〔総括〕

代謝抑制状態よりの回復期の ERK 活性化はグリオーシスと関与し、この現象より脳虚血後の再灌流における脳損傷と ERK 活性化との関連が示唆される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、脳性麻痺の主因である脳室周囲白質軟化症の病態であるグリア細胞の増殖のメカニズムを解明するために、ラット胎生期のグリア培養細胞を用い、細胞内情報伝達の中核である Extracellular signal-Regulated protein Kinase (ERK) の関与を検討したものである。In vitro でグリア培養細胞に30分間の代謝抑制期を与えると回復期のグリア細胞数が有意に増加し、また ERK も代謝抑制期よりの回復期に活性化された。さらに、ERK 活性化経路を遮断すると代謝抑制期よりの回復期のグリア細胞数増加が有意に抑制された。従来考えられている脳室周囲白質軟化症のメカニズムと同様に、この ERK 活性化には NMDA 受容体を介した protein kinase C、superoxide の関与があきらかとなった。これらの事実より、脳室周囲白質軟化症の病態であるグリア細胞の増殖のメカニズムに ERK が関与している事が示された。

本研究は、今後、脳室周囲白質軟化症の予防を考える上で基礎的データを集積したものであり、先進的内容を含んでいる点で非常に価値のある研究であり、学位論文に値すると考えられる。