



Title	Involvement of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase in Gliosis Induced during Recovery from Metabolic Inhibition
Author(s)	増原, 完治
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42795
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	増 原 完 治
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 7 6 5 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 1 mM NaCN と 20 mM 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ていることから PKC 活性と ERK 活性との関連を検討した。1 μM 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 1 μM 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 活性化のグリオーススへの関与 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ススと 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 活性化はグリオーススと関与し、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。