



Title	Induction of mRNAs and proteins for Na/K ATPase α 1 and β 1 subunits following hypoxia/reoxygenation in astrocytes
Author(s)	河西, 克介
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43818
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 か河 さい西 こう克 すけ介

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 7 6 5 7 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 15 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科生体統合医学専攻

学 位 論 文 名 Induction of mRNAs and proteins for Na/K ATPase $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits following hypoxia/reoxygenation in astrocytes
(低酸素後再酸素負荷時のアストログリア細胞における Na-K ATPase $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ subunit mRNA および蛋白の誘導)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 杉 本 壽

(副査)
教 授 吉 峰 俊 樹 教 授 遠 山 正 彌

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

中枢神経において神経細胞に比べ、グリア細胞が虚血/再還流や外傷などの損傷刺激に対して抵抗性を示し、生存、再生することが知られている。今回我々はアストログリアから脳虚血/再灌流時に働くストレス応答因子の検索を、発現量の変化する遺伝子を同定することにより試みた。また、同定した遺伝子産物を培養細胞で発現させたとき、低酸素/再酸素化状況での細胞傷害が変化するか調べることで細胞のもつストレス耐性に影響する因子かどうかを確認した。

今回、我々が検出した因子の一つに Na-K ATPase があった。Na-K ATPase は細胞膜上にも存在し、細胞膜外環境とのイオンの能動輸送機能を持つ。しかし活性酸素などにより細胞膜に過酸化障害がおけると Na-K ATPase 自身も過酸化され機能障害がおこることが報告されている。Na-K ATPase は α 、 β の 2 つの subunit で構成されるが、このうち α subunit は触媒機能があることがわかっている。 β subunit の機能についてはイオンが細胞膜を通過する際のゲートとなる働きがあるが、それ以外にも Na-K ATPase の細胞膜上での安定性に寄与するとの報告が近年あるものの明らかではない。そこで、われわれはグリア細胞において Na-K ATPase $\beta 1$ subunit がストレス耐性に影響する可能性を考え、低酸素/再酸素化状況での Na-K ATPase の各 subunit の発現変化と Na-K ATPase $\beta 1$ subunit を強制発現させたときの細胞でのストレス耐性への影響を調べた。

【方法ならびに成績】

E18 Wister ラット胎児脳から取り出した培養アストロサイトについて、酸素濃度 1 % 以下の密閉チャンバー内で 24 時間インキュベートしたグループを低酸素群とし、その後 21%酸素濃度環境に 2 時間もどしたグループを再酸素化群とした。各グループで抽出したトータル RNA に対して RT-PCR 法、ディファレンシャルディスプレイ法を行ない、低酸素負荷で発現が上昇した後再酸素化でさらに強く発現が上昇した cDNA のシーケンスを行なったところ、そのなかに陽イオントランスポーターである Na-K ATPase を認めた。再酸素化後 24 時間までの mRNA 発現状況の変化を Northern blotting 法で確認したところ Na-K ATPase $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ subunit とも 12 時間以内に発現上昇のピー

クを認めた。一方、再酸素化後 24 時間までの蛋白発現状況を Western blotting 法で確認したところ Na-K ATPase α 1、 β 1 subunit とも低酸素下よりも蛋白発現は上昇しているが、不安定な発現経過を示した。

Na-K ATPase β 1 subunit のクローニングのため、ラット脳組織より抽出した cDNA を template として、PCR 法で Na-K ATPase β 1 subunit の coding 領域を合成した。配列に突然変異が無いことを確認し、EGFP ベクターに組み込んで sense、antisense 発現ベクターを作成した。発現ベクターを HEK293 細胞へリポフェクション法で導入し、Na-K ATPase β 1 subunit の発現と antisense 導入による Na-K ATPase β 1 subunit 発現の抑制を Western blotting 法で確認した。

つづいて発現ベクターを導入した HEK293 細胞へアストロサイトと同様に低酸素後再酸素化ストレス負荷を加えた。Na-K ATPase β 1 subunit を強制発現した細胞群ではコントロール群と比較して細胞傷害が有意に抑えられており、一方 Na-K ATPase β 1 subunit antisense を導入して Na-K ATPase β 1 subunit の発現増強を抑えた細胞群ではコントロール群と比較して細胞傷害が有意に促進していた。これらの差は再酸素化後 8 時間から 12 時間までに顕著となった。

【総括】

今回の結果より Na-K ATPase β 1 subunit は低酸素後、再酸素化ストレス負荷時にストレス応答因子として発現するものであることがいえる。また、 β 1 subunit 単独についての強制発現と抑制によりストレス耐性が変化することから、発現増強させることにより細胞保護効果が期待できる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、アストログリアから脳虚血/再灌流時に働くストレス応答因子の検索を、発現量の変化する遺伝子を同定することにより試みたものである。また、同定した遺伝子産物を培養細胞で発現させ、低酸素/再酸素負荷状況での細胞のストレス耐性に影響する因子かどうかを確認したものである。今回の結果より Na-K ATPase β 1 subunit が低酸素後、再酸素化ストレス負荷時にストレス応答因子として発現するものであること、また β 1 subunit 単独についての強制発現と抑制によりストレス耐性が変化することが確認された。 β 1 subunit を発現増強させることにより受傷早期の細胞保護効果が期待できる。脳虚血および頭部外傷について傷害が加わってからどれだけ神経細胞を不可逆的な変性から救えるかは、神経再生研究と並んで非常に重要なテーマである。

今回の結果は in vivo での効果確認のためのさらなる実験と細胞保護効果のメカニズムについてのさらなる解明とにつなげていくべき課題がある。しかし、治療手段となる様々な因子が近年求められている中で、特に電解質勾配の改善という神経組織に特異的な治療手段の候補がしめされたのは非常に意義あることであり、学位の授与に値すると考えられる。