

Title	Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity : signal transduction cascades
Author(s)	松崎, 秀夫
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44632
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	まつ ぎま ひで お 松 崎 秀 夫
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 18037 号
学位授与年月日	平成 15 年 5 月 30 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	Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity : signal transduction cascades (血管内皮成長因子はグルタミン酸による毒性から海馬神経細胞を保護する)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正弥 (副査) 教授 吉峰 俊樹 教授 佐古田三郎

論 文 内 容 の 要 旨

(目的)

様々な神経変性疾患における神経細胞死の要因としてグルタミン酸による興奮性神経毒性が知られている。近年、神経成長因子 (NGF) をはじめ緑維芽細胞成長因子 (bFGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、インスリン様成長因子 (IGF-1) 等の神経栄養因子がグルタミン酸によって誘導されるアポトーシスから神経を防御するという報告が相次いでなされてきた。

血管内皮成長因子 (VEGF) は血管発生・増殖・分化を司り、血管透過性の亢進を促す糖蛋白で、分子量約 20 kD のサブユニットが二量体を形成すること、血小板由来成長因子 (PDGF) と高い相同性を持つことを構造的特徴とする。脳、肝、腎、卵巣など血管を豊富に含む器官に多く分布し、細胞上に発現する特異的 Tyrosine Kinase 型受容体 Flt-1 (VEGFR-1)、Flk-1 (VEGFR-2) の二つを介して作用を発揮する。各受容体ノックアウトマウスの解析の結果、Flt-1 (-/-) では内皮細胞の過増殖、Flk-1 (-/-) では内皮細胞、造血細胞の形成阻害が生じたことから、血管内皮系の構築に関しては Flt-1 が細胞増殖抑制、Flk-1 が細胞増殖亢進のシグナルを担うと考えられている。さらに内皮細胞での VEGF 受容体以降のシグナル伝達は PI3K-Akt 経路を介した生存シグナルと PKC-MAPK 経路を介した増殖シグナルに大別される。

神経系においても VEGF 及び VEGF 受容体の発現は認められており、ことに虚血脳におけるペヌンブラ領域での発現が知られているが、それらはこれまで虚血による代償性血管新生を導くための発現と解釈されてきた。一方 PDGF を筆頭にいくつかの血管新生因子で神経栄養作用が報告されていることから、我々はラット海馬の初代培養神経細胞を用いて VEGF の神経保護効果およびそのシグナル伝達機序について検討した。

(方法ならびに成績)

① VEGF を神経細胞に与えて 12 時間培養したあとグルタミン酸を培地に添加して誘導される神経細胞死を LDH assay、Caspase3 活性測定により調べた。また、このとき神経細胞内で Akt、ERK がどのように変化するかについて Western Blotting を行い調べた。

その結果、VEGF はグルタミン酸による神経細胞死を用量依存性に抑制し、Akt、ERK のリン酸化による活性化を

誘導した。

②この VEGF の神経保護効果が Akt、ERK シグナルを阻害することでどのように変化するかをみるため、Wortmannin ないし LY294002 (Akt の上流で働く PI3Kinase の選択的阻害剤) および U0126 (ERK の上流で働く MEK の選択的阻害剤) をあらかじめ培地に添加したのち実験①を再び行った。

その結果、この VEGF の神経保護効果は PI3Kinase、MEK の阻害により抑制された。

③Akt、ERK のリン酸化による活性化が神経保護効果に寄与しているのかどうかを確かめるため、アデノウイルスベクターを用いて活性化型 Akt ないし MEK を神経細胞に強制発現させたのちグルタミン酸を添加し、実験①同様に LDHassay、Caspase3 活性測定により神経細胞死を測定した。

その結果、Akt、ERK のリン酸化による活性化でグルタミン酸による神経細胞死は有意に抑制された。

④VEGF の神経保護効果が Akt、ERK のリン酸化による活性化を介して行われることが判明したが、これが複数知られている VEGF 受容体のうちいずれを介して行われるものかをつきとめるため、VEGF 受容体 (Flt-1、Flk-1) のアンチセンスオリゴを加えて神経細胞を培養し、各受容体を選択的に阻害したのち実験①を再び行った。

その結果、Flk-1 を阻害した場合にのみ VEGF の神経保護効果および Akt、ERK の活性化が顕著に抑制された。

(総括)

VEGF は (Flt-1 受容体でなく) Flk-1 受容体を介して Akt、ERK を活性化することでグルタミン酸による神経毒性から神経細胞を保護する作用を有することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

脳梗塞などでみられる虚血性神経細胞死のメカニズムの解明は現代医学の主要なテーマのひとつである。脳梗塞発症時にはその梗塞領域 (特にペヌンプラ領域) において血管内皮成長因子 (VEGF) およびその受容体が発現することが知られているが、それらはこれまで虚血に伴う代償性血管新生作用によるものと単に解釈されてきた。今回、申請者は VEGF が直接に中枢神経細胞を興奮性神経毒性によるアポトーシスから保護する作用を有することを発見し、さらに複数知られている VEGF 受容体のうち Flk-1 受容体を介して神経細胞内の PI3E-Akt 経路、MEK-ERK 経路をそれぞれ活性化することでその神経細胞保護作用が発揮されることを明らかにした。これらの研究成果は虚血性中枢神経疾患の治療法開発に資するのみならず、中枢神経系と血管系の密接な関連を分子レベルで示唆した研究としても評価される。よって本研究は学位に値するものと考えられる。