The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 培養ラットアストロサイトの細胞死とミトコンドリア機能変化 |
| Author(s) | Patamawan, Phuagphong |
| Citation | 大阪大学, 2004, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/44813 |
| 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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【20】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | PATAMAWAN PHUAGPHONG（パタマワン プグポン） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（薬　学） |
| 学 位 記 番 号 | 第　18646　号 |
| 学位授与年月日 | 平成16年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>薬学研究科応用医療薬科学専攻 |
| 学 位 論 文 名 | **培養ラットアストロサイトの細胞死とミトコンドリア機能変化** |
| 論 文 審 査 委 員 | （主査）<br>教　授　馬場　明道<br>（副査）<br>教　授　真弓　忠範　　教　授　松田　敏夫　　教　授　東　　純一 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

ミトコンドリアは、主にエネルギー代謝のみに関与する細胞内小器官であると理解されてきた。細胞のエネルギーとなる ATP は、細胞質におけるグルコースからピルビン酸生成に至る解糖系と、ピルビン酸が TCA 回路に入り、NADH 等の産生を介する電子伝達系によって供給される。電子伝達系では、ミトコンドリア内膜の内外にプロトン勾配、すなわちミトコンドリア膜電位（MMP）が形成され、これを利用して ATP が生合成される。しかし最近になって、ミトコンドリアが細胞の生存や分化、生殖細胞の形成などに重要であることが示唆されるようになってきている。さらに特に注目を集めているものは、apoptosis などの細胞死の制御への関与であり、super oxide などの reactive oxygen species (ROS) を代謝する superoxide dismutase (SOD)、細胞傷害時に開口して細胞死を招く mitochondrial permeability transition pore (mPTP) をブロックして細胞を保護する cyclosporin A (CsA) や、mitochondrial KATP channel の開口によって心筋細胞の虚血障害などを保護する diazoxide などの作用機序が調べられ、特に MMP が重要であることが示されてきている。

中枢神経系は神経細胞とその間を埋めるグリア細胞から構成されている。グリア細胞の一つであるアストロサイトは、中枢神経系の神経ネットワークの支持体となり、脳傷害時には神経の修復などに関与する。神経細胞と比べて、アストロサイトは ATP 産生における解糖系の関与が大きく、ミトコンドリア機能を調べる上で有用な細胞モデルである。そこで本研究では、培養アストロサイトにおける、種々の細胞死誘発ストレスとミトコンドリア機能変化との関連性を明らかにする目的で、酸化ストレス細胞傷害モデル、小胞体ストレス細胞傷害モデルを作成し、これらのモデルにおける SOD、CsA、diazoxide の作用を検討することにより、これらアストロサイトの細胞死とミトコンドリア機能の関連を追究した。

まず酸化ストレスモデルにおける検討を行った（第1章）。Nitric oxide（NO）、ROS などの細胞傷害性因子は、中枢神経系の細胞に対して酸化ストレスによる神経細胞死を引き起こすことが知られている。ミトコンドリア機能低下から、どのような経路でアポトーシスあるいはネクローシスが生じるかは各々詳細な検討が行われているが、いずれにしても MMP が重要な役割をもつと考えられている。そこで、これらミトコンドリア機能低下とアポトーシスもしくはネクローシスの方向性の関連を明らかにする目的で、2種類の NO 誘導性細胞死モデルを用いた検討を行った。また NO は細胞傷害性とは、逆に、免疫細胞のアポトーシスを抑制することも報告されている。そこでアストロサイトにおいてもこのような保護効果がみられるかどうかについて、$H_2O_2$ 細胞傷害モデルを用いて検討を行い、以下の

各知見を得た。

1. グルコース除去（GD）＋$ONOO^-$ドナーである3-morpholinosydnonimine（SIN-1）（GD/SIN-1）モデルではまずROS産生の上昇が起こり、引き続いてミトコンドリア膜電位の低下およびATP量の減少、そしてそれに続くネクローシスを起こすことが示された。ATPの減少とMMPの低下は、CsA、diazoxideによってほぼ完全に抑制されたが、ROS上昇は抑制されなかった。一方、SODはMMPの減少とROS上昇を抑制した。
2. Sodiumnitroprusside（SNP）モデルにおいても、まずROS産生の上昇、ミトコンドリア膜電位の低下が起こり、それに続いて細胞死が起きることを明らかにした。GD/SIN-1モデルとは異なり細胞死に至る段階の細胞内ATP量はあまり変化しなかった。MMPの低下はCsA、diazoxideによってほぼ完全に抑制されたが、ROS上昇は抑制されなかった。またSODはMMPの減少とROS上昇を抑制した。
3. $H_2O_2$モデルではMMPの減少を伴うアポトーシスが認められた。これらはいずれもNOC12処置によって、用量依存的に抑制された。NOC12の効果にはcGMP-PKG経路が関与することが示された。

上記1及び2より、GD/SIN-1モデルとSNPモデルでは、MMPの低下がアストロサイトの細胞死（ネクローシス、アポトーシス共に）に先行して生じること明らかとなった。その際の細胞内ATP量により、ネクローシスあるいはアポトーシスの細胞死の方向が決まる可能性が示されたと言える。一方、傷害時のMMP低下を薬物で抑制できれば、ROS産生の変化に関わらず細胞傷害も抑制されると考えられた。また、細胞傷害時に認められるROSは、傷害を起こす因子ではあるものの、細胞死に直接的に関わるものではなかった。我々は上記3の経路がMMP低下を抑制するという知見も明らかにしている。これらの一連の結果は、細胞内シグナル伝達系によるMMP制御の可能生を強く示すものと考えられる。

次に小胞体ストレスにおける検討を行った（第2章）。近年、アルツハイマー病やパーキンソン病が、小胞体ストレスを起源とするアポトーシスに原因があると指摘する報告があり注目されている。しかし小胞体ストレスから、細胞死に深く関わるミトコンドリアへのストレス情報の伝達経路はほとんど明らかになっていない。そこで、小胞体$Ca^{2+}$-ATPaseを阻害して小胞体の$Ca^{2+}$ストアを枯渇させるthapsigarginと、タンパク質のglycosylationを抑制して成熟蛋白質の生成を抑制するtunicamycinを用いて、アストロサイトに小胞体ストレスを与え、その際のミトコンドリア機能を解析することにより、以下の各知見を得た。

1. Thapsigargin処置において細胞内$Ca^{2+}$濃度の上昇、MMPの減少が認められたが、細胞死は観察されなかった。Thapsigarginによる細胞内$Ca^{2+}$濃度の上昇は細胞内$Ca^{2+}$キレーターであるBAPTA-AM前処置によってほぼ完全に抑制されたが、MMPの減少は抑制されなかった。
2. Tunicamycin処置においてもthapsigarginの場合と同様、MMPの減少が認められた。

よって、小胞体ストレスモデルでも、細胞内$Ca^{2+}$以外の何らかのシグナルが、小胞体に負荷されたストレス情報をミトコンドリアへと伝達し、MMPを低下させることを初めて見い出した。

以上の研究は、ミトコンドリア機能のうち、特にMMPの変化は細胞死と直接関わるものであること、さらに細胞内シグナル伝達系によりMMPの制御を含めたミトコンドリア機能が調節されることを示唆したものと考えられる。本研究から得られた知見をもとに、MMPや細胞内ATP量の調節を標的とする新しい薬物や治療法の開発が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、中枢神経系の大部分を占めるグリア細胞のアストロサイトに注目し、その細胞死の方向性とミトコンドリア機能との関連について検討したものである。

その結果、

1. アストロサイト酸化ストレスモデルにおけるネクローシス、アポトーシスでは、共に細胞内ROS上昇、ミトコンドリア膜電位の低下が細胞死に先行して生じた。また、膜電位の低下のみを抑制することで細胞死を抑制できる可能性を示した。また、その際の細胞内ATP量によりネクローシス/アポトーシスの細胞死の方向が決まる可能性を

示した。

2. アストロサイトにおいてNOは酸化ストレスとしてアポトーシスを誘導する一方、低濃度においては酸化ストレスによるアポトーシスをcGMP-PKGシグナル系を介して抑制すること見い出した。

3. アストロサイトの小胞体ストレスモデルにおいて、小胞体に負荷されたストレス情報は $Ca^{2+}$ イオン以外のシグナル伝達系によってミトコンドリアへ伝えられ、その膜電位を低下させることを見い出した。

以上の研究は、ミトコンドリア機能のうち、特に膜電位の変化は細胞死と直接関わるものであること、更に細胞内シグナル伝達系により膜電位の制御を含めたミトコンドリア機能が調節されることを見い出したものである。これらの研究は博士（薬学）の学位授与に価するものである。