



Title	EFFECT OF GLUTAMINE SYNTHETASE INHIBITION ON ASTROCYTE SWELLING AND ALTERED ASTROGLIAL PROTEIN EXPRESSION DURING HYPERAMMONEMIA IN RATS
Author(s)	谷上, 博信
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46271
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、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 谷 上 博 信

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19830 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 年 10 月 19 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 EFFECT OF GLUTAMINE SYNTHETASE INHIBITION ON ASTROCYTE SWELLING AND ALTERED ASTROGLIAL PROTEIN EXPRESSION DURING HYPERAMMONEMIA IN RATS
(ラットにおける、高アンモニア血症による星状膠細胞の腫脹とタンパク発現の変化に対する、グルタミン合成酵素阻害の効果について)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 真 下 節

(副査)
教 授 杉 本 壽 教 授 吉 峰 俊 樹

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

肝不全で死亡したヒトの知見として、脳における星状膠細胞の腫脹があり、また、実験的な高アンモニア血症でも同様の所見を認める。いずれも、アンモニアとグルタミン酸が星状膠細胞で反応し、グルタミンとなる結果であると思われる。この反応を阻害することで、星状膠細胞の腫脹と、それに伴う異常を軽減できる可能性があり、麻酔下の短時間の高アンモニア血症では、そのことが実証されている。しかし、軽減効果には、麻酔による脳保護作用の関与は否定できず、また臨床的には、より長時間の高アンモニア血症に対するグルタミン合成の阻害の効果を知ることが重要である。そこで、麻酔の影響がない状態での、比較的長時間の高アンモニア血症に対するグルタミン合成の阻害の効果について調べた。

〔 方法ならびに成績 〕

まず、予備実験として、オスの Wistar ラットを用いて、グルタミン合成酵素 (GS) 阻害薬である methionine-sulfoximine (MSO) の GS 阻害効果を、MSO 投与後 2 週間まで追跡測定した。結果は、GS 活性が、投与後 3 時間後より 3 日後までの間、一定して約 64% 阻害され、その後徐々に回復した。今回の 24 時間の高アンモニア血症の間は、安定して GS 活性を阻害することがわかった。

本実験として、オスの Wistar ラットを、前処置として MSO を腹腔内投与したか否か、また酢酸アンモニウム (NH₄) を 24 時間持続投与したかコントロールの酢酸ナトリウム (Na) を投与したかで合計 4 群に分けた (MSO-NH₄ 群 : n=12、MSO-Na 群 : n=11、C-NH₄ 群 : n=13、C-Na 群 : n=12)。いずれも前処置 1 時間後にハロセン麻酔下にて大腿静脈カニューレーションし、その後十分に覚醒させた 2 時間後に、NH₄ または Na の 24 時間持続投与を開始した。持続投与の間、ラットはケージ内で自由に動き、また水分・食物を摂取できるようにした。持続投与終了時に、各群のラットを半数ずつに分け、採血後に一方はアミノ酸分析のために直ぐに断頭処理し、もう一方は組織学的及び免疫細胞化学的分析のために脳灌流してホルマリン固定を行った。

血漿アンモニア濃度は、アンモニア投与の 2 群で 30 から 400 μ mol/l になった。

アミノ酸分析では、GS 活性は 57% 抑制され、アンモニア投与下での脳皮質におけるグルタミン合成は、71% 抑制

された。また、脳水分量と血漿浸透圧は、C-NH₄ 群で高値となり、星状膠細胞の腫脹が示唆された。

ホルマリン固定した脳スライスを HE 染色し光学顕微鏡で観察し、腫脹した星状膠細胞数をカウントしたところ、C-NH₄ 群のみが高値を示した。また免疫化学的にも GS 活性を測定するために、GS immunopositive な細胞数と optical density を測定したところ、GS immunopositive な細胞は MSO により 69%減少していた。

同様の手法で、タンパク発現の変化を見るために、星状膠細胞の異常時に発現することが多い glial fibrillary acidic protein (GFAP) と、星状膠細胞の gap junction 機能に関わる connexin-43、星状膠細胞内でのグルタミン酸の輸送に関わる GLT1 の3つのタンパクについても調べた。その結果、GFAP は高アンモニア血症で強く発現するものの、MSO により一部抑制された。connexin-43 は、アンモニア投与の2群 (C-NH₄ 群、MSO-NH₄ 群) で発現が大きかったものの、MSO には影響されなかった。また、GLT1 については、4群間に差がなかった。

[総 括]

この実験で、血中アンモニア濃度を 300~400 μ mol/l とした 24 時間に及ぶ無麻酔下の高アンモニア血症では、脳のグルタミン濃度は5倍に増加して、脳水分量の増加や星状膠細胞の腫脹をもたらし、機能的にも GS や GFAP、connexin-43 の発現を増強させた。MSO の前処置によりグルタミンの合成が抑制されると、星状膠細胞の腫脹や GFAP の発現の増強も減弱された。

これらの知見は、高アンモニア血症においては、脳内で異常に増加したグルタミンが、星状膠細胞の水性腫脹や、GFAP などの一部のタンパク発現の異常の原因であり、アンモニアそのものの影響によるものではないことを示している。ただし、gap junction 機能に関わる connexin-43 は、MSO に影響されず、アンモニアの直接的な関与が示唆され、また、星状膠細胞内でのグルタミン酸の輸送に関わる GLT1 は、高アンモニア血症や MSO に影響されなかった。

ラットの長時間の高アンモニア血症において、グルタミン合成酵素を阻害することで、星状膠細胞の形態的变化を抑制することができ、またタンパク発現の異常も一部減弱させることができた。

論文審査の結果の要旨

肝不全に伴う高アンモニア血症により、アンモニアとグルタミン酸が星状膠細胞で反応して過剰なグルタミンとなり、星状膠細胞の腫脹が生じて不可逆性肝性脳症の主因となる。このグルタミン合成反応を阻害することで、星状膠細胞の腫脹と、それに伴う異常を軽減できる可能性がある。本研究の目的は、麻酔による脳保護作用を除外した、長時間の高アンモニア血症モデルを用いて、グルタミン合成の阻害が、星状膠細胞の腫脹やタンパク発現の異常を軽減できるかどうかを実証することにある。ラットを用いた実験の結果、高アンモニア血症で脳のグルタミン濃度は5倍に増加して、星状膠細胞の腫脹をもたらし、GFAP 等のタンパク発現を増強させた。グルタミン合成酵素を阻害することで星状膠細胞の腫脹や GFAP の発現の増強も減弱された。即ち、高アンモニア血症においては、脳内で異常に増加したグルタミンが、星状膠細胞の腫脹や、GFAP などの一部のタンパク発現の異常の原因であり、アンモニアそのものの影響によるものではないことを示している。以上、高アンモニア血症において、グルタミン合成の阻害により、星状膠細胞やタンパク発現の異常が軽減することを明らかにしたことは、将来において肝不全患者の致死性肝性脳症の発症予防への有用な知見を与えるものであり、学位の授与に値すると考えられる。