The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	培養アストロサイトでの一酸化窒素誘発細胞障害におけるNa+/Ca2+交換系の関与に関する研究
Author(s)	北尾, 達哉
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49661
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

【12】

氏　　名	北（きた）　尾（お）　達（たつ）　哉（や）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２２８８１　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	**培養アストロサイトでの一酸化窒素誘発細胞障害における Na^+/Ca^{2+} 交換系の関与に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　松田　敏夫 （副査） 教　授　馬場　明道　　教　授　八木　清仁　　准教授　藤尾　　慈

論　文　内　容　の　要　旨

脳虚血、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の病態発現において酸化ストレスの重要性が示されている。酸化ストレスの中の一酸化窒素 (NO) に関しては、ラット脳虚血モデルにおいて誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 阻害剤が脳障害に対し保護作用を示すこと、また、NO はラット初代培養ミクログリアおよびラット初代培養神経細胞など中枢神経系の種々の細胞において細胞死を誘導することが報告されている。

さらにパーキンソン病モデルマウスにおいて内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) および iNOS から産生される NO により脳グリア細胞の一つであるアストロサイトが障害されることが報告されており、NO は神経変性疾患における細胞障害およびその進行に深く関わっている。一方で、ラット海馬神経細胞において NO により細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が引き起こされること、ヒト神経芽細胞種 IMR-32 において NO が細胞内 Ca^{2+} 濃度調節を介して細胞増殖を制御していることが報告されており、NO と Ca^{2+} との関連が示されている。Na^{+}/Ca^{2+} exchanger (NCX) は、Na^{+} 濃度勾配および膜電位依存的に Ca^{2+} を排出または流入させることで細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節する膜タンパクである。NCX と NO の関連は、NCX 活性が NO により活性化されることがラット大脳皮質由来初代培養アストロサイト、平滑筋細胞などで報告されている。これらの知見は、NCX と NO の関与の可能性を示しているが、その詳細は不明である。そこで本研究では、培養アストロサイトにおける NO 誘発細胞障害における NCX の病態的意義を追究した。アストロサイトは中枢神経系において最も多く存在する細胞であり、神経栄養因子の産生、神経伝達物質グルタミン酸の放出や取り込み、シナプス形成およびシナプス伝達効率の促進、抗酸化物質の産生など、神経機能の調節に重要な役割を果たしている。まず、アストロサイトの NO 障害の分子機構について、そしてアストロサイト NO 障害における Ca^{2+} の関与について、さらに本障害への NCX の関与について選択的阻害薬 SEA0400、及び siRNA を用いた解析により検討した。

アストロサイトの NO 誘発細胞障害のシグナル系について検討し、NO が caspase 非依存的なアポトーシス様の細胞死を引き起こすこと、その細胞障害に caspase 非依存的にアポトーシスを誘導する apoptosis inducing factor (AIF) が関与することを明らかにした。また、細胞障害に JNK、p38-MAPK 及び ERK の活性化が重要な役割を担い、特に ERK の活性化は NO による活性酸素種（ROS）の産生や JNK、p38-MAPK の活性化にも関与することを明らかにした。これらの成績は、アストロサイトにおける NO 障害への ERK の重要性を示唆している。

次に NO 誘発細胞障害の細胞外 Ca^{2+}依存性について、さらに、細胞内プロテアーゼの一つであるカルパインや Ca^{2+} 結合タンパク質であるカルモジュリンの NO 障害への関与について薬理学的に検討した。細胞内 Ca^{2+} の蛍光イメージング解析において、SNP による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は観察されなかったが、$^{45}Ca^{2+}$ で検討すると、SNP 処置により僅かではあるが有意な $^{45}Ca^{2+}$ 取り込み増加が認められた。これらのことから、細胞内 Ca^{2+} の動態変化を細胞内 Ca^{2+} の機能の面から検討した。その結果、NO による ERK、JNK および p38 MAPK の活性化が細胞外 Ca^{2+} の存在に依存していることを明らかにした。また、カルパインおよびカルモジュリンの阻害薬は NO による ERK 活性化を抑制し、細胞内 Ca^{2+} が NO 障害に関与することを明らかにした。以上の結果は、細胞外からの Ca^{2+} 流入による細胞内 Ca^{2+} の増加がアストロサイト NO 誘発細胞障害に重要であることを示している。

さらに、NO による細胞外からの Ca^{2+} 流入における NCX の関与を明らかにする目的で、Ca^{2+}流入およびその後の細胞障害に対する選択的 NCX 阻害薬 SEA0400 の作用を検討した。NO による細胞内 $^{45}Ca^{2+}$ 取り込み量の増加は、選択的 NCX 阻害薬 SE0400 により抑制された。また、SEA0400 は NO による MTT 還元能およびミトコンドリア膜電位の低下、さらには核への AIF の移行に対しても抑制作用を示した。さらに SEA0400 は NO による MAPK の活性化を抑制した。SEA0400 は NCX ノックアウトマウス胎児心臓での Ca^{2+} レスポンスを抑制することが報告されており、未知の標的分子への作用が示唆されている。そこで、NO 誘発細胞障害への NCX の関与について、SEA0400 を用いた検討に加え、NCX ノックダウン系での検討を行った。結果、NCX ノックダウン系によっても NO による ERK 活性化、細胞障害が抑制されることを明らかにした。これらの成績は、SEA0400 が NCX を阻害することで NO による細胞内への Ca^{2+} の流入とそれに引き続くシグナル系のすべてを抑制することを示している。

本研究において、アストロサイトでの NO 誘発細胞障害における Ca^{2+} の関与とそのシグナルカスケードについて検討した。NO は NCX 逆モードを活性化し細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入と、それに伴う Ca^{2+} 依存性の酵素および MAPK に影響を与え細胞障害を惹起することを明らかにした。NO は神経変性疾患などの多くの病態発現に関わっており、NO 誘発細胞障害に NCX を介した Ca^{2+} 動態が重要な役割を演じていることを検証した本研究成果は、NCX の阻害が NO 関連の疾患の治療戦略になりうる可能性を示している。

論文審査の結果の要旨

脳虚血やパーキンソン病、アルツハイマー病などの神経変性疾患の病態において酸化ストレスの重要性が示されている。酸化ストレスの中の一酸化窒素（NO）に関しては、障害保護的作用と細胞障害作用の二つの作用が報告されている。また、NOの作用にCa^{2+}が関わっていることも示されている。一方、Na^{+}/Ca^{2+}交換系（NCX）はNa+濃度勾配および膜電位依存的にCa^{2+}を排出または流入させることで細胞内Ca^{2+}濃度を調節する膜タンパク質である。NCXはNOにより活性化され、NCXとNOの関連が注目されるが、NOの細胞障害作用におけるNCXの関与は不明である。本研究は、神経細胞の生存・維持に重要な役割を演じているアストロサイトの培養系で、NO誘発細胞障害の分子機構について解析し、またその障害発現におけるCa^{2+}およびNCXの関与について、NCX選択的阻害薬SEA0400、及びsiRNAを用い検討した。その結果、アストロサイトでのNO障害がカスパーゼ非依存的でアポトーシス誘導因子を介したアポトーシス様細胞死であること、本障害にMAPKが関与していること、特にERK1/2がROS産生にも関わっていることを明らかにした。また、NO誘発細胞障害に細胞外からの細胞内へのCa^{2+}流入、そしてCa^{2+}依存性酵素カルパイン、Ca^{2+}依存性タンパク質カルモジュリンが関与していることを示した。さらに、NOによる細胞内へのCa^{2+}流入、NO障害がSEA0400により抑制されること、NOの作用、細胞障害がNCXノックダウン系において抑制されることから、NO誘発細胞障害発現におけるNCXの関与を明らかにした。以上の成果は、NCXの阻害がNO関連の疾患の治療戦略になりうることを示しており、博士（薬学）の

学位授与に充分値するものである。