



Title	Activation of NR2A receptors induces ischemic tolerance through CREB signaling
Author(s)	寺崎, 泰和
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54231
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

【86】				
氏 名	てら	さき	やす	かず
	寺	崎	泰	和
博士の専攻分野の名称	博 士（医 学）			
学 位 記 番 号	第	2 3 6 5 5	号	
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日			
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻			
学 位 論 文 名	Activation of NR2A receptors induces ischemic tolerance through CREB signaling (NR2A受容体の活性化はCREBシグナルを介して虚血耐性を誘導する)			
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 佐古田三郎 (副査) 教 授 吉峰 俊樹 教 授 山下 俊英			

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

脳虚血耐性は動物実験レベルで証明され、臨床症例でもその存在が示唆される普遍的な現象であり、そのメカニズムの解明は脳虚血に対する治療戦略において重要と考えられる。虚血性神経細胞障害において、NMDA-グルタミン酸受容体を介した細胞内へのCa²⁺流入が、その後の細胞障害に関与するシグナルカスケードを活性化する。近年、NMDA受容体サブタイプの差異が細胞生死に影響を与えることが報告されたが、虚血耐性における意義は不明である。他方、転写因子CREB (cAMP response element (CRE) binding protein) は学習や記憶、神経可塑性に加え脳虚血後の神経保護シグナルとして重要であり、Ser-133リン酸化がその活性化に必要である。虚血耐性においてNR2Aサブユニットの重要性和CREBシグナルの関与を明らかにすることを目的に本研究を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

妊娠16日目のラット胎児より初代神経培養系を作成した。虚血再灌流モデルとしてoxygen-glucose deprivation (OGD)を行い、細胞障害をLDH assayで評価した。CREB抗体およびCREB Ser-133リン酸化抗体を用いたWestern blotを施行した。また、CRE転写活性の評価には、アデノ化したCRE reporterとinternal controlであるTK reporterをtransfectionしてdual-luciferase assayを用いた。加えてCREB下流の保護シグナルを検討するため、Ca²⁺-CREB依存的な発現が報告されているBDNFについて、BDNF exonIVの reporter (BDNF-luc) とCREを欠損したmutant reporter (mt-BDNF-luc) を作成し同様に評価した。

致死的180分OGDの24時間前に予め非致死的45分OGDを加えることで虚血耐性は誘導された (ischemic tolerance)。また、45分OGDはグルタミン酸や過酸化水素による致死的刺激に対しても耐性を誘導した (cross tolerance)。45分OGDの1～6時間後で有意にCREBリン酸化が亢進し、CRE転写活性は24時間後まで亢進が持続した。CREBシグナルの重要性を確認するため、dominant negative体であるCREB-S133Aをアデノ化してtransfectionしたところ、45分OGD後のCREBリン酸化やCRE転写活性の亢進が抑制され、虚血耐性も誘導されなかった。これらの結果より、CREBシグナルは虚血耐性誘導に必要であることが示唆された。

次に、虚血耐性現象におけるNMDA受容体サブタイプの寄与を検討するため、非選択的NMDA受容体拮抗薬、NR2A選択的拮抗薬（NVP-AAM077; NVP）やNR2B選択的拮抗薬を投与したところ、NVPのみが非致死のOGDによる虚血耐性効果を有意に減弱させた。NVPによりCREBリン酸化亢進やCRE転写活性亢進が抑制された。次に、シナプス刺激によるNR2A受容体の活性化が虚血耐性を誘導するかをbicuculline/4-AP（BIC）を投与して検討した。BIC投与によりCRE転写活性の亢進を認め、180分OGDに対する虚血耐性を獲得した。また、NVPとBICを同時に投与するとCRE転写活性の亢進が減弱し、虚血耐性も誘導されなかった。これらから、NR2A受容体の活性化が虚血耐性誘導に必要かつ十分であることが示された。

CREBはCRE motifを有する標的遺伝子の転写を介して神経保護効果をもたらすが、その下流因子の一つであるBDNFについて検討した。非致死のOGDの後、BDNF-lucは亢進したがmt-BDNF-lucは亢進しなかった。また、NVPを作用させるとBDNF-lucの亢進は有意に減弱した。さらにBIC投与でBDNF-lucは亢進したが、mt-BDNF-lucの亢進は認めなかった。これらからBDNF転写活性はCREに依存し、NR2Aを介したCREBシグナルの活性化がBDNF発現を増強させることが示された。

〔 総 括 〕

培養神経細胞では、致死の虚血の前に非致死の虚血が加えられると虚血耐性が誘導され、そこにCREBシグナルが関与していた。また、細胞内カルシウム流入経路の一つであるNMDA受容体のNR2Aサブユニット阻害により虚血耐性は消失し、シナプス刺激によるNR2A活性化は虚血耐性を誘導した。これらから、NR2A受容体活性化から始まるCREBシグナルが虚血耐性の獲得に関与していることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

虚血耐性は、あらかじめ軽度の虚血を加えておくとその後加わる重度の虚血に対して抵抗性を獲得する現象であり、そのメカニズム解明は脳虚血の治療応用において重要である。そのメカニズムの一端に迫り、グルタミン酸受容体であるNMDA受容体とCREBシグナルの虚血耐性への関与を明らかにするため、本研究を行った。

まず培養神経細胞において虚血耐性の系を確立し、虚血耐性誘導刺激がCREBシグナルを活性化させ、CREBシグナルを抑制すると虚血耐性が消失することを明らかにした。また、NMDA受容体サブユニットであるNR2Aを阻害すると虚血耐性は消失し、シナプス刺激によるNR2A活性化が虚血耐性を誘導することを示した。さらに、神経保護因子のBDNFがCREBシグナルの下流に存在し、虚血耐性を誘導する刺激で活性化し、NR2A受容体阻害により活性化が抑制されることを示した。本研究がNR2A受容体活性化から始まるCREBシグナルが虚血耐性の獲得に関与していることを明らかにしたことは、将来の臨床応用に一つの道筋を示しており、脳虚血の治療戦略に与える影響は大きいと考えられる。以上より、本研究は学位に値すると認める。