



Title	The P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning
Author(s)	尾崎, 友彦
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/67127
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 尾崎 友彦

	(職)	氏名
論文審査担当者	主査	大阪大学教授 骨島 晴彦
	副査	大阪大学教授 畑 環 俊
	副査	大阪大学教授 望 月 秀 樹

論文審査の結果の要旨

軽度脳虚血 (Ischemic preconditioning、以下IPC) が加わると神経細胞は虚血耐性を獲得する。申請者は血管内皮細胞特異的にP2X4受容体をノックアウトさせたマウスを作成し、IPCによる虚血耐性獲得に血管内皮細胞のP2X4受容体が関与していることを示した。次にIPCを行なったマウスの脳血管内皮細胞を単離し網羅的探索を行い、神経保護分子であるオステオポンチン (以下OPN) の発現上昇を明らかにした。続いて、細胞にずり応力をかける実験装置を作成し、ずり応力によるマウス脳血管内皮細胞でのOPNの発現上昇を示した。siRNAを用いてP2X4受容体の働きを阻害させると、OPNの発現上昇が抑制され、OPNの発現上昇におけるP2X4受容体の関与を示した。これはマウスでもP2X4受容体を阻害することにより抑制された虚血耐性が、OPNを投与することにより再現されることで示された。

以上より、IPCによる血流変化をずり応力の変化として感知したP2X4受容体がOPNを上昇させ虚血耐性が獲得されることが示された。当論文は脳梗塞に対する虚血耐性獲得における脳血管内皮細胞の役割を解明したものであり、学位に値すると考える。

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	尾崎 友彦
論文題名 Title	The P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning (P2X4受容体を介した虚血耐性獲得のメカニズム)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>虚血耐性現象は、脳虚血実験系では確実な脳保護効果を示す実験系として知られている。様々な刺激により脳は虚血耐性を獲得するが、いかにして神経細胞の保護がもたらされるか、その分子メカニズムに不明な点が多い。一過性の虚血(ischemic preconditioning <IPC>)は虚血耐性を獲得する刺激の一つと知られる。IPCにより血流が停止・再灌流し、その物理的的刺激は流れ刺激に基づくずり応力の変化として血管内皮細胞に伝わると考えられる。そのため、IPCによる虚血耐性の獲得に血管内皮細胞が関与すると考えられる。本研究では、ずり応力のセンサーとして知られる血管内皮に存在するP2X4受容体の虚血耐性獲得への関与を解明することを目的とした。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>8～10週齢、雄のC57BL/6マウスを用い、脳梗塞モデルとして、塞栓糸を使用した中大脳動脈閉塞(MCAO)を行い、60分の閉塞を施した。IPCには60分MCAOの48時間前に15分間MCAOの閉塞を施した。60分MCAOの24時間後に梗塞体積を2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC)を用いて評価したところ、IPC群で梗塞体積の有意な縮小を認め、神経学的にも有意に良好であった。さらに、この実験モデルにおいて、15分MCAOの1時間前にP2X4受容体の拮抗薬である[5-(3-bromophenyl)-1,3-dihydro-2H-benzofuro[3,2-e]-1,4-diazepin-2-one] (5BDBD)を脳室内に投与するとIPCの効果が阻害され梗塞体積の有意な再増大を認めた。次に、血管内皮特異的にP2X4受容体をノックアウトさせたマウスを作成した。同様に60分MCAOの48時間前に15分MCAOを行った。P2X4受容体+/+:flox/floxマウスと比較しP2X4受容体cre+/+:flox/floxマウスではIPC効果が認められず、有意に梗塞体積が大きく、神経症状も悪い結果であった。次にMouse Angiogenesis Array Kit (R&D)を用いて15分MCAOを行った48時間後のマウスの脳を網羅的に解析したところ神経保護分子であるタンパク質のオステオポンチンの上昇を認めた。15分MCAOを行った48時間後のマウスの血管内皮細胞をMACS (Miltenyi Biotec)を用いて採取しReal-time PCRを行ないmRNAの発現を調べたところ、オステオポンチンの有意な上昇を認めた。次にmouse brain vascular endothelial cell (b.End3細胞)を用いて48時間のずり応力をかけReal-time PCRを行ないmRNAの発現を調べたところ、ずり応力をかけない群と比較し、オステオポンチンの有意な上昇を認めた。さらに、ずり応力をかける前にP2X4受容体siRNAを3日間b.End3細胞と共培養させP2X4受容体の働きを阻害させると、ずり応力をかけてもオステオポンチンの上昇は認めなかった。次に、P2X4受容体拮抗剤5BDBD投与後に15分MCAを行い、その48時間後に60分MCAOを行うコントロール群に対して60分MCAOの15分前にオステオポンチンリコンビナントを脳室内投与した群を比較した結果、オステオポンチンのリコンビナント投与群で有意な梗塞体積の縮小と、神経症状の改善を認めた。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>血管内皮に存在するP2X4受容体はずり応力を感知することにより神経保護分子であるオステオポンチンの発現を上昇させ虚血耐性獲得に関わっていることが示された。</p>	