

氏名(本籍)	さがら じゆん いち (東京都)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 1,412 号		
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
審査研究科	医 学 研 究 科		
学位論文題目	培養神経細胞・グリア細胞におけるグルタチオンのレベルと その維持に関する研究		
主 査	筑波大学教授	薬学博士	後 藤 勝 年
副 査	筑波大学教授	医学博士	大 塚 藤 男
副 査	筑波大学教授	医学博士	岡 野 栄 之
副 査	筑波大学教授	医学博士	庄 司 進 一
副 査	筑波大学助教授	医学博士	中 村 了 正

## 論 文 の 要 旨

### 〈目的〉

グルタチオンは抗酸化能の中心的存在であり、生体防御に深く関与している。中枢神経系でもグルタチオンは高濃度に存在し、神経細胞よりもグリア細胞に多く存在することが報告されている。グリア細胞による神経細胞の支持機構の一つにグルタチオンによる維持機構が含まれる可能性があるが、不明な点が多い。アストロサイトがグルタチオンを放出することが報告されているが、その放出機構の詳細な解析はまだ行われていない。

本研究では神経・グリアのグルタチオン動態を明らかにするために、神経・グリア間のグルタチオン維持機構を前駆アミノ酸であるシスチン、システインの供給の観点から調べた。さらにアストロサイトのグルタチオン放出機構を調べた。

### 〈方法〉

培養神経細胞と培養グリア細胞は妊娠17日のラット胎児の脳より調製した。神経細胞を一般に広く用いられている方法で調製するとグリア細胞の混入が無視できないので、神経細胞とグリア細胞を分離することにより、神経細胞を調整し、グリア細胞の混入が極めて少ないことをGFAP染色等により確認した。初代培養アストロサイトはラット新生仔の脳より調製した。細胞内グルタチオンはTietzeの方法、細胞外グルタチオンはBreheの方法を用いて、酵素反応を利用して定量した。システイン、シスチンの取り込みは<sup>14</sup>Cラベルしたものを用いて、取り込まれた放射能により測定した。

## 〈結果及び考察〉

分離された神経細胞では細胞内グルタチオン量の減少が見られたが、グリア細胞では見られなかった。グルタチオンの前駆アミノ酸であるシスチン、システインの取り込み速度を神経細胞、グリア細胞で調べたところ、どちらの取り込み速度も神経細胞よりもグリア細胞のほうが大きいことがわかった。神経細胞のシスチン取り込み活性は非常に低いが、システイン取り込み活性は比較的高く、システインを取り込んで、グルタチオン合成に利用していると考えられた。

グリア細胞の培養上清中のシステイン濃度が、培養時間の経過につれて増加することがわかり、グリア細胞がシステインを細胞外へ放出していることが示唆された。シスチン取り込みを阻害したり、シスチンを含まない培地で培養すると、システインの放出が見られなかったことから、このシステインはシスチンに由来していることが示唆される。従ってグリア細胞はシスチンを取り込んでシステインに還元し、グルタチオン合成に利用する一方、システインの一部を細胞外へ放出している。そのシステインを神経細胞が取り込んで、グルタチオン合成に利用していると結論された。

次にアストロサイトのグルタチオン放出機構について調べた。通常培養下のアストロサイトによるグルタチオンの放出は還元型で起こり、温度感受性があり、細胞内に入らないSH試薬であるPCMBsで阻害され、放出速度はMichaelis-Mentenのモデルに合うものであった。これらの結果はグルタチオンの放出が単純な拡散ではなく、輸送担体を介するものであることを示している。アストロサイトに過酸化水素を与えて酸化ストレスを負荷したり、塩化カドミウムを添加すると、シスチン取り込みが上昇し、それに伴い細胞内グルタチオン量が増加した。アストロサイトの細胞内グルタチオン量はタンパク質1mg当たり100nmol以上になり、他の細胞では見られない高い値になった。シスチン取り込みを阻害すると、グルタチオンの増加が妨げられた。これらのことは、ストレス負荷時のグルタチオン量の増加にはシスチン取り込み活性の上昇が関与していることを示している。ストレスを負荷すると細胞内グルタチオン量の増加に伴い、還元型グルタチオン放出速度も増加したが、 $K_m$ 、 $V_{max}$ の有意な変化は見られなかった。還元型グルタチオンを神経細胞に与えても、グルタチオン量の有意な増加は見られなかった。このことから、神経細胞は細胞外のグルタチオンを取り込んでいないと考えられた。

## 審 査 の 要 旨

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドで、その抗酸化能により生体防御に関わっている。本研究は、神経細胞とグリア細胞（主としてアストロサイト）におけるグルタチオン動態を解析したものである。通常、システインは容易に酸化され、殆どはジスルフィド型のシスチンとして存在する。神経細胞はシステインを取り込むことはできるが、シスチンの輸送系を持たないため、これを利用できない。これに対し、アストロサイトはシスチン取り込み活性が高く、グルタチオンを合成すると同時にシステインを細胞外に放出し、それが未酸化のうちに神経細胞に取り込まれてグルタチオン合成に利用されることが示唆された。また、様々なストレス負荷時に、アス

トロサイトのシスチン取り込みが増し、グルタチオン合成が盛んになることも判明した。本研究は、グリア細胞から放出されたシステインが実際に神経細胞に取り込まれる様式など、詳細な機構の解析は残されているが、グリア細胞による神経細胞の防御機構を初めて明らかにした点で、高く評価されるものである。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。