

氏名(本籍)	あさ だ さち え 浅田幸江(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2386号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Cytodifferentiation selectively enhances a pertussis toxin-sensitive Erk activation induced by endothelin-1 in primary cultured astrocytes (初代培養アストロサイトにおいて細胞分化が特異的に endothelin-1 による pertussi toxin 感受性 Erk 活性化を増幅させる)
主査	筑波大学教授 理学博士 坂内四郎
副査	筑波大学教授 医学博士 久保武士
副査	筑波大学助教授 理学博士 志賀隆
副査	筑波大学講師 医学博士 山本三幸

論文の内容の要旨

(目的)

脳内のグリア細胞の一種である astrocytes (AC) は中枢神経系において、脳内環境の維持を中心とした多様な機能を持つ細胞である。ACは成熟脳にあっては分化状態にあるが、障害を受けると脱分化・増殖し、組織再構築過程において重要な役割を果たしている。エンドセリン (ET) には、ET₁, -2, -3の3つのアイソペプチドとともに、その受容体として ET_AR および ET_BR の2つが存在し、様々な組織、細胞において増殖促進作用を含む多様な生理活性を持つことが明らかにされている。著者らはこれまで、ET-1がACに対して強力な増殖因子として作用し、さらに、初代培養ACに分化誘導を行うことにより、通常培養下のACに比べ、より低濃度のET-1に応答し増殖することを見いだした。そこで、ACのET-1に対する応答性が分化誘導によって亢進されるメカニズムを、シグナル伝達系を中心に解明することを目的とした。

(対象と方法)

初代培養ACは、ウイスター系ラット胎児(妊娠後期)の脳より調製し、継代3代目のACを各実験に供した。通常培養AC(Q-AC)は実験前、48時間無血清培地で置換した。分化誘導AC(DB-AC)は実験前、24時間無血清培地に置換し、さらに、24時間1mM dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP)を含む無血清培地に置換した。本研究では、以下のアッセイ方法を用いて解析を行った。

- i) Erk (extracellular signal-regulated kinase) の活性測定: ミエリン塩基性タンパクのゲル内リン酸化法による。
- ii) PI (phosphoinositide) 代謝回転の測定: 1, 4, 5-inositol trisphosphates (IP₃) 産生量測定による。
- iii) PKC (protein kinase C) の活性測定: PKCの膜移行測定法による。
- iv) p21^{ras} 活性測定: p21^{ras} 結合型 GTP/GDP 比測定による。
- v) ET-1 受容体結合実験: ヨード標識 ET-1 の結合量からの受容体発現量測定による。
- vi) シグナル分子の発現量測定: 特異抗体を用いたイムノブロットング法による。

(結果と考察)

ACをET-1で刺激すると、通常培養AC (Q-AC) においては 10^{-10} M以上のET-1でErkの活性化が認められ、一方、分化誘導AC (DB-AC) においては100倍低濃度の 10^{-12} M以上のET-1でErkの活性化が認められた。ACにおけるErk活性化はPKC依存性経路と、百日咳毒素 (pertussis toxin:PTX) 感受性経路の二つの経路が存在する。そこで、まずPKC依存性経路に関して、PKC活性化に至るPI代謝回転反応とPKC活性化の指標であるPKC活性の膜移行を測定したところ、それらのET-1による濃度依存的活性化はQ-ACとDB-ACの両者においてまったく差はなかった。次にPTX感受性経路に関して、そのシグナルを仲介すると思われるp21^{ras}の活性化を指標に調べた。その結果、ET-1はQ-ACにおいて 10^{-10} M以上で、DB-ACにおいては 10^{-12} M以上でp21^{ras}の活性化を促し、これらの濃度依存性は、上述のET-1によるErk活性化の濃度依存性とよく一致した。しかも、このET-1によるp21^{ras}の活性化はPTX処理により有意に抑制された。さらに、DB-ACにおいて確認された、Q-ACの場合と比べ100倍低濃度のET-1によって誘導されるErkの活性化は、PTX処理によって阻害された。以上のことから、ACにおいてET-1により惹起されるPTX感受性のp21^{ras}/Erk情報伝達経路は、DBcAMPによる細胞分化により特異的に亢進することが明らかとなった。そこで、この亢進機構を知る上で、ET受容体からp21^{ras}に至る情報伝達経路に介在する分子の発現を調べた。著者らは、ACにおいてETのシグナルを伝える受容体はET_bRであり、このET_bRがDBcAMPによる分化誘導によって発現が上昇することを報告している。また、ACを含めた神経系の細胞には、Gi subunitが多く発現しているとの報告もある。そのため、Gi proteinを介するPTX感受性のp21^{ras}/Erk情報伝達経路が分化誘導時に亢進されている可能性が考えられる。しかし、G α i2 subunitの発現量は分化誘導により変化は認められなかった。また、ET受容体結合実験により、Q-ACおよびDB-ACにおけるET_bRの発現をScatchard Plot解析すると、Q-ACでは1種類の結合部位であったが、DB-ACにおいてはET-1に対し親和性の異なる2種類の結合部位の発現が見られた。DB-ACにおける親和性の高い方の結合部位の発現数 (42万 sites/cell) と解離定数 (0.28nM) は、Q-ACで確認された結合部位のそれら (48万 sites/cell, 0.33nM) とほぼ一致した。DB-ACでみられたもう一つの結合部位は発現数は多いが (304万 sites/cell) 親和性は低かった (3.86nM)。これらの結果より、ET受容体の発現上昇によって、ET-1によるPTX感受性p21^{ras}/Erk情報伝達経路が亢進するという可能性は低いと考えられた。そこで、さらにp21^{ras}を活性化させるシグナル分子の分化誘導に準じた発現変化を調べた。しかし、G $\beta\gamma$, SHC, Grb2, SOSの蛋白発現量およびp21^{ras}のmRNA発現量は、Q-ACおよびDB-ACにおいては差は見られなかった。これらのことより、ACにはET応答性の細胞内シグナルが分化により亢進し、この亢進機構はそのシグナルに介在する分子の発現変化には依存しないことが示された。

審査の結果の要旨

本論文は、エンドセリン-1 (ET-1) が培養アストロサイト (AC) に対して強力な増殖促進作用を示すという著者らの以前の発見も基に、このACを分化誘導したときの増殖促進機構の変化をシグナル伝達系を中心に調べたものである。分化誘導されたACは未分化のものに比べ、ET-1に対し感受性がおよそ百倍高まることが示され、その変化がどのようなシグナル伝達経路を経るのかについて数々の知見を得ている。経路の全体を明らかにするには至っていないが、残された可能性についても的確に示している。これらは、脳障害時の組織修復に関与すると考えられているET-1の、中枢神経系における生理的、病理的作用を解明する上で重要な知見である。

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。