

氏名(本籍)	はま 濱	ひろし 裕 (神奈川県)
学位の種類	博士(医学)	
学位記番号	博甲第1,289号	
学位授与年月日	平成6年3月25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	アストロサイトに対するエンドセリンの作用に関する研究	
主査	筑波大学教授	医学博士 杉田良樹
副査	筑波大学教授	医学博士 小田晋
副査	筑波大学教授	医学博士 工藤典雄
副査	筑波大学教授	薬学博士 下条信弘
副査	筑波大学助教授	理学博士 照井直人

## 論文の要旨

### 〈目的〉

本研究は、中枢神経系を構成するグリア細胞の一つであるアストロサイトと強力な血管収縮物質として知られるエンドセリン(ET)との関係を追求することを目的とした。*In vitro*では dibutyryl cyclic AMPにより分化誘導を行ったアストロサイトに対するETの作用を検討し、*in vivo*では脳損傷修復過程の細胞増殖への関与を検討した。

### 〈方法〉

分化および未分化のアストロサイトにET-1( $10^{-18}$ ~ $10^{-6}$ M)を作用させ、細胞の形態に及ぼす影響、細胞増殖活性およびアストロサイトの分化マーカーであるグルタミン合成酵素活性およびETレセプター量の測定を行った。また、アストロサイトの細胞増殖を伴う脳損傷モデルラットを作成し、ETの関与の可能性を検討した。ラットの大脳半球に凍結損傷を行った後、経日的に(損傷後1,3,5および7日目の)損傷部位より組織を摘出し、脳抽出液を調製し、そのET含量および培養細胞への効果を以下の方法で測定した。損傷部位におけるアストロサイトの分化度をモノクローナル抗体RC1を用いた免疫組織染色により観察した。また、損傷部位におけるグルタミン合成酵素の活性およびET<sub>B</sub>レセプターmRNAの発現を測定した。脳抽出液中のET含量を酵素免疫測定法により測定した。さらに、培養細胞に脳抽出液を作用させ、<sup>3</sup>H] thymidineの取り込み量によりDNA合成活性を測定した。

### 〈結果および考察〉

*In vitro*における検討から、ET-1は分化したアストロサイトに認められる星状形態から未分化なアストロサイトに認められる扁平な形態へと変化させることが認められた。また、ET-1は分化したアス

トロサイトの増殖を濃度依存的に活性化し、 $10^{-16}$ M から細胞増殖促進作用が認められた。さらに、ET-1により濃度依存的にグルタミン合成酵素活性の低下が認められ、ET-1によってアストロサイトが脱分化し増殖状態に移行することが確認された。

Dibutyryl cyclic AMP によって分化したアストロサイトでは、ET<sub>B</sub>レセプター mRNA の up-regulation が認められた。<sup>[125I]</sup> ET-1を用いたレセプター結合実験からET<sub>B</sub>レセプタータンパクの発現量を検討した結果、分化したアストロサイトでは結合部位数が1細胞当たり約370万 sites 存在し、未分化なアストロサイトの場合の約16倍のレセプターが発現していることが確認された。分化したアストロサイトは低濃度のET-1に対して鋭敏に反応し得ることが示唆された。

*In vivo* における検討から、損傷部位では幼若化したアストロサイトの出現が認められた。また、損傷部位におけるグルタミン合成酵素の活性およびET<sub>B</sub>レセプター mRNA の発現は損傷後1日目に一過性に低下し、アストロサイトが分化状態から離脱した可能性が示唆された。さらに損傷組織由来の脳抽出液中のET様免疫反応物を酵素免疫測定法により検出した結果、損傷後1日目よりET-1様免疫反応物の増加が認められた(ET-3様免疫反応物は検出されなかった)。すなわち、脳抽出液中にET-1が存在する可能性が示された。

培養アストロサイトをアッセイ系として損傷後1日目の組織由来の脳抽出液を作用させることにより、アストロサイトのDNA合成が促進された。また、損傷後1日目の組織由来の脳抽出液によって促進されたアストロサイトのDNA合成は、ETペプチドのC末端を認識する抗ETモノクローナル抗体の添加により約40%抑制された。抗ETモノクローナル抗体によるDNA合成の抑制効果は損傷後1日目の脳抽出液の場合のみに認められた。損傷後1日目の脳抽出液中のET-1が培養アストロサイトの細胞増殖能の活性化に関与することが示唆された。

#### 〈結論〉

ET-1は、分化したアストロサイトに対してきわめて低濃度で作用する growth factor であることが認められた。また、脳損傷後の組織修復過程の初期に関与し、アストロサイトの増殖の trigger として作用する可能性が考えられた。

## 審 査 の 要 旨

エンドセリンは強力な血管収縮物質として知られているが、種々の組織においてもいろいろな生理活性を示し、ヒトでエンドセリンが果たす主な生理機能については未だ明確になっていない。

本研究は、中枢神経系におけるエンドセリンの作用を追求した。in vitro でグリア細胞の一種であるアストロサイトの培養細胞を用い、エンドセリンが細胞を増殖状態に移行させることを明らかにした。また、in vivo で大脳に凍結損傷を行い、浮腫液を含む脳抽出液にエンドセリンが増加し、損傷部位でアストロサイトが増殖状態に移行すること、この脳抽出液の細胞増殖誘導活性は抗エンドセリン抗体で抑制されることを示した。これらの研究成果は脳損傷初期の組織修復過程におけるエンドセリンの役割を示唆するもので、今後の研究の発展が期待される成果であると評価される。

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。