

氏 名	おお かに よし かず 大 谷 賀 一
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 490 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	グリア細胞におけるケモカイン産生調節機構に関する分子細胞薬理学的研究

論文調査委員 (主 査)
教授 佐藤公道 教授 赤池昭紀 教授 市川 厚

論 文 内 容 の 要 旨

ケモカインは炎症反応時に好中球やマクロファージなどの白血球の遊走や活性化を調節する構造的に類似した一群のサイトカインであり、脳内においてもケモカインおよびその受容体の発現が報告されている。また、脳虚血負荷によりグリア細胞においてケモカイン遺伝子発現が誘導されることが報告されている。本研究室では、これまでに、ケモカイン受容体拮抗物質の脳室内投与により、脳虚血による細胞障害が減弱することを明らかにしており、虚血性脳細胞障害に脳内ケモカインが重要な役割を果たしている可能性が考えられる。著者は、脳内ケモカインの産生調節機構を解明することは新規な脳細胞保護薬の創製につながると考え、本研究では、グリア細胞を活性化させることが知られている ATP に着目し、グリア細胞におけるケモカイン産生調節機構についてラット初代培養グリア細胞を用いたインビトロでの解析、さらにラット脳内への薬物投与によるインビボでの解析を行い、以下の新知見を得た。

第一章 培養グリア細胞における各種刺激によるケモカイン発現誘導

虚血障害時には神経細胞のエネルギー涸渇により再分極のためのイオン輸送が滞り、細胞外 K^+ 濃度が上昇する。また、ATP は過剰興奮した神経細胞から遊離あるいは損傷した神経細胞から漏出することが考えられる。これらの刺激によりグリア細胞が活性化しケモカイン遺伝子を発現する可能性が考えられる。ラット培養ミクログリアおよびアストロサイトに K^+ 50mM, ATP 300 μ M および、ポジティブコントロールとして LPS 100ng/ml を処置したところ、ミクログリアにおいて CC ケモカイン monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) および macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), CXC ケモカイン cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) をコードする mRNAs が一過性の発現上昇を示した。また、アストロサイトにおいては MCP-1, CINC-1, CXC ケモカイン stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) の mRNAs が一過性の発現上昇を示した。代表的な CC および CXC ケモカインとしてそれぞれ MCP-1 および CINC-1 タンパクの ATP による培養上清中への遊離を ELISA 法により検討したところ、MCP-1 は培養アストロサイトにおいて、CINC-1 は培養ミクログリアおよびアストロサイトにおいて濃度依存的な遊離増加が見られた。これらの結果より、虚血脳内で起こっていると考えられる K^+ や ATP の細胞外濃度上昇により、グリア細胞でケモカイン遺伝子が発現し、MCP-1, CINC-1 については ATP 処置によりタンパクの遊離が増加することが明らかとなった。

第二章 培養グリア細胞における ATP によるケモカイン遺伝子発現調節機構

ラット培養ミクログリアおよびアストロサイトにおける ATP によるケモカイン遺伝子発現誘導に焦点を当て、それに関与する ATP 受容体サブタイプを明らかにすることを目的として、まずこれら培養グリア細胞に発現する ATP 受容体を RT-PCR 法により検討したところ、培養グリア細胞に発現する ATP 受容体サブタイプとして、ミクログリアにおいては P2X₁, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₇ および P2Y₁, P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₂ 受容体の発現が、アストロサイトにおいては P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₇ および P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ 受容体の発現が確認された。さらに、培養ミクログリアおよびアストロサイトにおける MCP-1, CINC-1 および MIP-1 α 遺伝子発現に対する ATP の濃度依存性および各種 ATP アナロ

グ、ATP 受容体アンタゴニストの効果を検討した結果、MCP-1 発現誘導は、ミクログリア、アストロサイトいずれにおいても、P2X₅ および P2Y₁ 受容体の関与が大きいこと、CINC-1 遺伝子発現誘導は、ミクログリアでは P2X₇ 受容体を主に介し、アストロサイトでは P2X および P2Y₁ 以外の P2Y 受容体が関与していることおよび、ミクログリアにおける MIP-1 α 遺伝子発現誘導には P2X₄ および P2Y₁ 以外の P2Y 受容体が関与していることが示された。ATP によるケモカイン遺伝子発現誘導の細胞内シグナル伝達機構について P2Y 受容体が共役していると考えられるホスホリパーゼ C (PLC) の阻害薬である U73122 を用いて検討したところ、ミクログリアにおける MCP-1, CINC-1, MIP-1 α 遺伝子発現誘導は阻害されたが、アストロサイトにおけるケモカイン遺伝子発現誘導は影響を受けなかったことから、ミクログリアにおいては P2Y 受容体—PLC 活性化を介した系によりケモカイン遺伝子発現が調節されるが、アストロサイトでは PLC 活性化を介さない系によりケモカイン遺伝子発現が調節されていることが示唆される。以上の結果から、培養グリア細胞における ATP による MCP-1, CINC-1 および MIP-1 α 遺伝子発現誘導に関与する ATP 受容体が明らかとなった。

第三章 ラット線条体への ATP γ S 微量投与による脳内ケモカイン遺伝子発現誘導

ラット脳内において ATP 受容体刺激によりケモカイン遺伝子発現が誘導されるか否かを検討するため、ATP の非水解アナログである ATP γ S を線条体内に 10nmol, 5 μ l 投与することによるケモカイン遺伝子発現への影響を、in situ hybridization 法を用いて検討したところ、MCP-1, CINC-1 および MIP-1 α mRNAs の発現が誘導された。発現時間のピークは処置後 2-4 時間であった。シグナルはニッスル染色で濃染される小型の核を有する細胞上に観察された。これらの結果から、インビボの脳内において ATP 受容体活性化によりケモカイン遺伝子発現が惹起されることが示された。また、その主な発現細胞種はグリア細胞であると推察される。

以上、著者は、ラット培養ミクログリアおよびアストロサイトにおける各種ケモカインの発現調節に細胞外 ATP および K⁺ 濃度が関与していることを明らかにし、ATP に関しては細胞種およびケモカインによって異なったサブタイプの ATP 受容体が関与していることを示した。さらに、インビボにおいても ATP 受容体活性化によりケモカイン遺伝子発現が惹起されることを示した。本研究成果は、脳内グリア細胞によるケモカイン産生調節機構の一端を明らかにしたものであり、グリア細胞により産生されるケモカイン類が関与すると考えられる虚血性脳細胞障害や種々の神経変性疾患の病態形成機構の解明にも有用な基礎的知見を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

ケモカインは、白血球やマクロファージなどの免疫細胞に対して走化活性を持ち、構造的に類似した一群のサイトカインの総称で、大きなファミリーを構成することが明らかにされてきた。最近、脳内にもケモカインとその受容体が存在し、脳虚血負荷によりグリア細胞にケモカイン遺伝子発現が誘導されること、そのケモカインは虚血性脳障害形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている。著者はラット脳内ケモカインの産生調節機構に関して、初代培養グリア細胞を用いたインビトロ解析および脳内薬物投与によるインビボ解析を行い、以下の新知見を得た。

第一章 培養グリア細胞における各種刺激によるケモカイン発現誘導

ラット初代培養ミクログリアおよびアストロサイトを K⁺ (50mM) あるいは ATP (300 μ M) で処置したときの CC ケモカインである MCP-1 および MIP-1 α , CXC ケモカインである CINC-1 および SDF-1 α の各 mRNA の発現誘導を調べた結果、ミクログリアでは、K⁺ により MCP-1 および MIP-1 α が、ATP により MCP-1, CINC-1 および SDF-1 α が、アストロサイトでは、K⁺ により MCP-1, CINC-1 および SDF-1 α が、ATP により MCP-1, CINC-1 および SDF-1 α が、それぞれ特有の時間経過で発現することを明らかにした。さらに、ATP 処置により MCP-1 および CINC-1 タンパクの培養上清中への遊離が増加することを確認し、mRNA 発現誘導がタンパク合成増加に繋がっている可能性を示した。

第二章 培養グリア細胞における ATP によるケモカイン遺伝子発現調節機構

まず、培養グリア細胞に発現する ATP 受容体サブタイプを RT-PCR 法で検討し、ミクログリアにおいては P2X₁, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₇ および P2Y₁, P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₂ が、アストロサイトにおいては P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₇ および P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ が、それぞれ発現していることを確認した。さらに、MCP-1 mRNA 発現誘導には、ミクログリア、アストロサイトいずれにおいても P2X₅ および P2Y₁ が関与すること、MIP-1 α mRNA のミクログリ

アでの発現誘導には P2X₄ および P2Y₁ 以外の P2Y が関与すること, CINC-1 mRNA 発現誘導には, ミクログリアでは P2X₇, アストロサイトでは P2X および P2Y₁ 以外の P2Y が関与すること, また, ケモカイン遺伝子発現調節は, ミクログリアにおいては P2Y → ホスホリパーゼ C 活性化の系を介して行われるが, アストロサイトではこれ以外の系が関与していることなどを示した。このように, MCP-1, MIP-1 α および CINC-1 遺伝子発現誘導に関与する ATP 受容体を明らかにした。

第三章 ラット線条体への ATP γ S 微量投与による脳内ケモカイン遺伝子発現誘導

加水分解抵抗性 ATP アナログ ATP γ S をラット線条体に微量適用することにより, MCP-1, MIP-1 α および CINC-1 の各 mRNA の発現が同部位内で誘導されることを見出した。各ケモカイン mRNA の発現はいずれも適用後 2~4 時間がピークで, 24 時間後には対照群と同レベルにまで減少した。また, そのケモカイン遺伝子を発現しているのはグリア細胞と考えられる細胞であることも示した。

以上の研究成果は, 脳内グリア細胞によるケモカイン産生調節機構の一端を明らかにしたものであり, グリア細胞が産生するケモカイン類が関与すると考えられる虚血性脳細胞傷害や種々の神経変性疾患の病態形成機構の解明にも有用な基礎的知見であるといえよう。

よって, 本論文を博士(薬学)の論文としその価値あるものと認める。さらに, 平成14年2月15日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果, 合格と認めた。