

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	呉 曉峰
論文題目	Roles of angiotensin type 1 receptor signaling in neuroprotection (アンジオテンシン1型受容体による神経保護作用の研究)		
(論文内容の要旨)			
<u>Chapter 1: Angiotensin receptor type 1 blockers (ARBs) protected against neuronal injury induced by oxygen-glucose depletion (OGD).</u>			
Several clinical trials and <i>in vivo</i> animal experiments have suggested that blockade of angiotensin type 1 receptor (AT1) improves ischemic outcomes. In the present study, we investigated the molecular mechanism of the protective effect of AT1 blockade against ischemia. 48 hours of pre-treatment with ARBs, losartan or telmisartan, protected neuronal cells against ischemic insult <i>in vitro</i> . Pre-treatment with AT2 agonist (CGP48933) did not show any neuroprotective effects. AT2 antagonist (PD123319) did not abolish the protective effect of ARBs. Blockade of AT1-mediated signaling, rather than AT2 stimulation, is involved in the ARB-induced protection. OGD-induced extracellular glutamate release, reactive oxygen species (ROS) production, and nitric oxide (NO) generation were all significantly suppressed by ARBs. Furthermore, glutamate transporter 1 (GLT1) expression and glutamate uptake in neuron-astrocyte co-cultures were significantly enhanced by ARBs, and impaired by AT1 agonist (L162313). In postnatal rat brains, P1 to P21 showed an inverse correlation between the protein levels of GLT1 and AT1. These results suggest AT1 receptor-mediated signaling might be involved in GLT1 regulation, and ARBs protect cells against ischemia via GLT1 upregulation.			
<u>Chapter 2: AT1 stimulation impaired GLT1 expression in astrocyte-defined medium (ADM) cultured astrocytes: involvement of PI3K/Akt/mTOR signaling regulation and the possibility of calcium oscillation.</u>			
Using pure astrocytes, we confirmed that AT1 stimulation with L162313 suppressed ADM-induced GLT1 expression in a concentration-dependent manner. In addition, the GLT1 mRNA level was significantly reduced. AT1b knock-down using siRNA significantly enhanced ADM-induced GLT1 expression. Mammalian target of rapamycin (mTOR) was significantly phosphorylated in ADM-cultured astrocytes. PI3K inhibitor or Akt inhibitor VIII treatment, which decreased GLT1 upregulation in ADM culture, also abolished mTOR phosphorylation. mTOR inhibitor rapamycin decreased both GLT1 mRNA, protein level and glutamate uptake, however, Akt phosphorylation level was not affected.			

It indicates that mTOR is one of the targets of PI3K/Akt signaling, and phosphorylation of mTOR upregulates GLT1 in ADM-cultured astrocytes. L162313 treatment significantly attenuated this PI3K/Akt/mTOR signaling by facilitating receptor tyrosine kinase (RTK) endocytosis, which, as a result, decreased its activity. It suggests that a negative cross-talking exists between G protein-coupled receptor (GPCR) and RTK signaling. AT1 stimulation also elicited a robust calcium oscillation in astrocytes. We investigated whether calcium wave affect GLT1 expression, using calcium chelator (BAPTA-AM and BAPTA) and ionophore (ionomycin). BAPTA-AM and BAPTA treatment significantly increased GLT1 expression and glutamate uptake in ADM-cultured astrocytes, while ionomycin treatment brought an opposite effect. Although the underlying mechanism needs to be clarified, our data implied a possible inverse correlation between intracellular calcium level and GLT1 expression in astrocytes.

Conclusion: the present study revealed a new mechanism of neuronal protective effects of AT1 blockade via astrocytic GLT1 regulation, and PI3K/Akt/mTOR signaling and calcium wave might be involved.

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

アンギオテンシンⅡは、血圧上昇作用に加えて心血管系の組織障害にも関与する生理活性ペプチドであり、最近の研究により中枢神経系における発現と機能の解析も進められてきた。その受容体サブタイプの一つであるアンギオテンシン1型受容体(AT1)の遮断により脳虚血による障害が軽減されることが臨床試験や動物実験の結果から示唆されているが、その機序の詳細については不明の点が多い。申請者は、AT1遮断による虚血に対する神経保護作用機構に関する研究を行い、以下の新知見を得た。

第一章 OGD誘発神経毒性に対するアンギオテンシン1型受容体遮断薬による神経保護作用

虚血不可により惹起される神経細胞死に対するAT1アンタゴニスト(ARB)の保護作用を検討する目的で、神経-アストロサイト共培養を用いた検討を行った。虚血負荷には oxygen-glucose depletion (OGD) を用いた。ARB(ロサルタンあるいはテルミサルタン)を48時間前処置したところ、OGDによる神経細胞死が減弱した。アンギオテンシン2型受容体(AT2)アゴニストであるCGP48933は神経保護作用を示さなかった。さらに、AT2アンタゴニストであるPD123319は、ARBによる神経保護作用を抑制しなかった。したがって、ARBの神経保護作用にはAT1受容体シグナルの遮断が重要な役割を果たしており、AT2は関与しないことが示唆された。OGDにより細胞外グルタミン酸遊離、活性酸素種産生およびNO産生が増大し、これらの変化はARB処置により抑制された。さらに、グルタミン酸トランスポーター1(GLT1)発現量およびグルタミン取込み能がARB処置により増大した。これらの結果より、OGDにより誘発される細胞外グルタミン酸濃度の上昇がARBにより減少し、虚血誘発神経細胞死が抑制されたものと推定された。AT1とグルタミン酸取込み能との関係を検討した結果、AT1アゴニストであるL162313処置によりGLT1発現量およびグルタミン取込み能は低下すること、および、新生仔ラット脳(P1からP21)ではGLT1発現量が日齢に従い増加するのに対してAT1発現量は減少し、GLT1発現とAT1発現が負の相関関係にあることを見出した。

以上、AT1を介したシグナルはGLT1の制御に関与し、ARBはAT1シグナルの遮断によりGLT1の発現量およびグルタミン酸取込み能を上昇させ、脳虚血による神経細胞死を抑制することを明らかにした。

第二章 Astrocyte-defined medium培養アストロサイトにおけるAT1刺激による

GLT1の低下：PI3K/Akt/mTORシグナルとカルシウムオシレーションの関与

GLT1はアストロサイトに発現することが報告されていることから、アストロサイト純培養系を用いてAT1シグナルとGLT1との関連について検討した。アストロサイトをAstrocyte-defined medium (ADM) で培養するとGLT1発現が上昇し、その効

果はL162313によるAT1刺激により濃度依存的に抑制された。さらにGLT1のmRNA量が有意に減少することを確認した。siRNAを用いたAT1ノックダウンによりADMで誘導されるGLT1発現上昇はさらに増加した。ADMで培養したアストロサイトでは、mammalian target of rapamycin (mTOR) のリン酸化を認めた。ホスファチジルイノシトール3キナーゼ (PI3K) 阻害薬およびAkt阻害薬は、ADM培養によるGLT1の上昇を抑制し、mTORのリン酸化も抑制した。mTOR阻害薬であるラパマイシンは、GLT1のmRNA量、タンパク質発現量およびグルタミン取込み能を減少させた。他方、リン酸化Aktには影響しなかった。以上の結果より、ADM培養アストロサイトでは、mTORがPI3K/Aktシグナルの下流標的の一つであり、mTORリン酸化がGLT1上昇に関与することが示された。

ADMにはEGFなどの栄養因子が含まれ、その受容体チロシンキナーゼ (RTK) の下流にPI3K/Aktは位置する。L162313処置によるAT1受容体刺激は、RTKのエンドサイトーシスを促進し、PI3K/Aktへのシグナルを減弱した。したがって、Gタンパク質共役受容体 (GPCR) とRTKの間にクロストークの存在することが示唆された。

ADM培養アストロサイトではAT1刺激が顕著なカルシウムオシレーションを誘発した。カルシウムキレーター (BAPTA-AMおよびBAPTA) あるいはカルシウムイオノフォア (イオノマイシン) を用いて検討したところ、BAPTA-AMおよびBAPTAはGLT1の発現およびグルタミン取込み能を有意に上昇させたのに対し、イオノマイシンは逆の効果を示した。これらの結果より、アストロサイトにおいて細胞内カルシウムレベルとGLT1発現との間に負の相関関係のあることが示唆された。

以上、申請者は、アストロサイトのAT1受容体遮断を介したGLT1制御による神経保護作用を示した。その分子機構としてPI3K/Akt/mTORシグナルおよび細胞内カルシウムの関与を明らかにした。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年2月23日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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降