

学位論文審査の結果の要旨

平成 28年 5月 17日

審査委員	主 査	田宮 隆		
	副 主 査	徳田 雅明		
	副 主 査	五木 崇 記		
願 出 者	専攻	機能構築医学	部門	神経構造学
	学籍 番号	12D709	氏名	丸山恵美
論 文 題 目	Ryanodine receptors contribute to the induction of ischemic tolerance.			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格	<input type="radio"/> 不合格	(該当するものを○で囲むこと。)	

[要 旨]

様々な臓器において、あらかじめ細胞死が起こらない程度の虚血ストレスを負荷すると (ischemic preconditioning; IPC)、その後致死的な虚血ストレスを受けても細胞死が軽減されるという現象が起こり、このとき細胞は虚血耐性 (ischemic tolerance; IT) を獲得していると考えられている。虚血耐性獲得機構のメカニズムとして様々な報告があるが、願出者はそのうちの細胞内 Ca^{2+} 動態に着目した。興奮性神経細胞死の原因の一つとして、シナプス間での過剰なグルタミン酸放出とその後の細胞内 Ca^{2+} の上昇が指摘されている。このとき重要な役割を担っているのが小胞体膜状に存在し、 Ca^{2+} - induced Ca^{2+} release (CICR)を引き起こしているリアノジン受容体 (Ryanodine Receptor; RyR) である。彼らは、脳神経の IT の獲得機構においても Ca^{2+} 濃度の変化が関連しているとする仮説のもと、RyR の関与を調べた。

まず、スナネズミの両側総頸動脈を閉塞する前脳虚血モデルを用いて実験を行った。海馬 CA1 領域の錐体細胞数および自発行動量の変化を測定することで IPC の効果を評価した。スナネズミは両側総頸動脈を 5 分間閉塞 (本虚血) することによって CA1 錐体細胞が 9 割以上死滅、また、施術後覚醒からの 24 時間の総自発行動量は 3.6 倍に増加する。しかし、その 3 日前に 2 分間の閉塞をあらかじめ施す (IPC) ことによって、CA1 領域の錐体細胞は 60% が生き残り、自発行動量の増加は 1.8 倍までに抑制された。これは IPC によって IT が獲得されたことを示す。このモデルにおいて、RyR のアンタゴニストであるダントロレンをあらかじめ IPC 施術前に投与しておくこと、錐体細胞の生存率は IPC を施していない群と同程度にまで減少し、自発行動量も増加、つまり IT の獲得が認められなかった。一方、1 分間の IPC では IT は獲得されないが、

このときRyRのアゴニストであるカフェインを前投与しておく、その後の5分間の本虚血に対して錐体細胞の生存率は50%程度有意に上昇するとともに自発行動量は対照群とほぼ同程度まで減少したことから、ITの獲得が促進されたと考えられた。

次に、こうした効果を神経細胞において直接確認するために、ラットの胎児から摘出した海馬神経細胞の初代培養細胞に対して2時間のoxygen-glucose deprivation (OGD)を行うことで虚血状態を再現した疑似虚血モデルを用いて実験を行った。この疑似虚血モデルにおいてもスナネズミの*in vivo*実験と同様に、10分間のOGDによりpreconditioning (PC)をおこなうと、その後の2時間のOGDによっても生細胞数の減少は認められないが、この際にダントロレンを前投与しておく、生細胞数は濃度依存的に減少した。すなわちPCの際にRyRをブロックすることでIT獲得が抑制されたことを示す。これらのことから、神経細胞において虚血ストレスによりITが獲得される際にはRyRが関与するCICRによる細胞内Ca²⁺上昇が重要であると考えられた。

また、ITはPC後一定期間保持されるが数日後に効果が消失する。RyRが虚血時の細胞内Ca²⁺上昇に関与することから、この間のRyRに何らかの変化があるかどうか、同培養系でRyRの発現量をウェスタンブロットおよびRT-PCRにて調べた。RyRの蛋白量およびmRNA量はいずれもITが発現している時は減少傾向を示したが、ITの減弱時期には回復傾向が見られた。すなわち、RyRの発現量の低下によって致死的虚血ストレス時の過剰な細胞内Ca²⁺濃度の上昇が減弱され、それが神経細胞死の抑制、つまり虚血耐性を発現する一因となっている可能性が考えられる。以上のことから、RyRは虚血耐性獲得時だけでなく、その維持機構においても重要な役割を担っていることが示唆された。

以上のように、本研究は、脳虚血耐性獲得機構に対するRyRの関与を明らかにしたものであり、脳梗塞による神経細胞傷害の予防にあらたな選択肢を加えうる知見である。平成28年5月16日におこなわれた学位論文審査会において、上記発表に引き続いて質疑応答を行い、RyRの生理機能や薬物半減期を考慮した実験条件の妥当性・他臓器に対する効果とその実験結果解釈に及ぼす影響・細胞保護効果の評価法の妥当性・*in vivo*と*in vitro*での実験結果の整合性・海馬以外の領域に対する影響・postconditioningへの関与・ペナンプラ領域の機能障害回避への有用性・RyRサブタイプのPCにおける反応性の違いの意義を含む諸点について質疑がなされ、知見が得られていないものを除いては、おおむね適切な回答が得られた。これにより、本学位論文審査委員会は、本論文を博士（医学）の学位に相応しいものと判定し、願出者を学位授与に値する見識と能力を有するものと認め、合格とした。

掲 載 誌 名	Brain Research Bulletin 第 122 卷		
(公表予定) 掲 載 年 月	2016年 2月	出版社 (等) 名	Elsevier

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。