

## 学位論文題名

Studies of regulatory mechanisms of neuronal death induced by trophic factor deprivation : suppression of neuronal death by second messengers.

(神経成長因子欠乏による神経細胞死の制御機構の研究 : セカンドメッセンジャーによる神経細胞死の抑制)

## 学位論文内容の要旨

発生過程で過剰に生産された神経細胞は、特定の発生段階に脱落し、成体での細胞数(初めの細胞数の40~70%)に調節される。この脱落は、自然に起こる神経細胞死と呼ばれ、神経栄養因子の供給が限られている為それを獲得できなかった細胞に起こると考えられている。ラットの上頸神経節(Superior Cervical Ganglia, SCG)から得られた神経細胞は、生存に神経成長因子(Nerve Growth Factor, NGF)を必要とし、NGFを除去すると細胞死を起こす。この細胞死については、mRNAや蛋白質の合成を阻害することで抑えられる積極的な細胞死であること、高 $K^+$ 培地やコリン作動性アゴニストであるカルバミルコリン等の脱分極刺激により阻止されることが知られている。*in vivo*でもシナプス活動を介して神経細胞の生存が制御されていることが示唆されている。節前細胞からの神経伝達物質や脱分極刺激による細胞死の調節には、セカンドメッセンジャーが関与していると考えられている。しかし、細胞内セカンドメッセンジャーレベルとの対応やその機構についての研究は少ない。

本研究では、ラットSCG神経細胞の培養系を用いて、NGF除去後の神経細胞死を抑制する神経伝達物質や脱分極刺激の作用、及びその作用と細胞内セカンドメッセンジャーレベルとの関係について調べた。

I. 培養SCG神経細胞の生存のNGF依存性と細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度( $[Ca^{2+}]_i$ )との相関。

小池ら(1989)は、 $[Ca^{2+}]_i$ が神経細胞生存の栄養因子依存性の程度を決めるとする、 $Ca^{2+}$ セットポイント仮説を提唱した。蛍光色素fura-2を用いて $[Ca^{2+}]_i$ を測定した結果、(1)NGF除去後の培養SCG神経細胞を種々の $K^+$ 濃度で培養した時の生存率と $[Ca^{2+}]_i$ が相関する、即ち $[Ca^{2+}]_i$ が184nMでは50%の細胞が死ぬが、240nMでは細胞はNGFに依存せず生存可能となること、(2) $[Ca^{2+}]_i$ は、培養6~8日のSCG神経細胞では相対的に低い(93.0±10.5nM)が、培養時間の長期化に伴ない上昇し、約3週間で一定の高い値(241±7nM)になり、細胞はNGFなしでも生存可能となることが明らかになった。これらは、小池らの仮説を強く支持している。

## II. cAMPレベルの上昇によるNGF除去後の培養SCG神経細胞の生存。

(1)カフェインの細胞死抑制効果：カフェインは濃度依存的( $EC_{50}=6\text{mM}$ )にNGF除去後のSCG神経細胞の死を抑制し、同類のフォスホジエステラーゼ阻害剤テオフィリン( $EC_{50}=3\text{mM}$ )やイソブチルメチルキサンチン(IBM $X$ ,  $EC_{50}=0.4\text{mM}$ )の細胞死抑制効果を促進した。別類のフォスホジエステラーゼ阻害剤Ro20-1724は、カフェインの細胞死抑制効果を促進した。しかしながら、一時的に $[Ca^{2+}]_i$ を高めるカフェインや高 $K^+$ 培地(40mM)のパルスの処理は、細胞死を抑制できなかった。細胞のcAMPレベルを調べた結果、20mMカフェインは10分でNGF除去による減少を回復させ(0.34pmol/well)、10時間で一定の高いcAMPレベル(0.69pmol/well)にさせていた。一時的にcAMPレベルを高めるノルアドレナリンやイソプロテレンオールは、NGF除去後の細胞死を抑制できなかった。これらは、 $[Ca^{2+}]_i$ やcAMPレベルが一定の高いレベルに保たれることが、SCG神経細胞のNGF非依存的生存を促すことを示している。更に、細胞死抑制効果のコミットメントタイムの解析から $[Ca^{2+}]_i$ やcAMPは翻訳後修飾によって細胞死を抑制することが判った。

(2)Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)の細胞死抑制効果：NGF除去による神経細胞死は、培地にVIP(3 $\mu\text{M}$ )を加えることで約6時間遅れた。このVIPの効果は濃度依存的( $EC_{50}=2.5\mu\text{M}$ )であり、それ自身では効果のない低濃度のIBM $X$  (0.2mM)と共存させると増強( $EC_{50}=8\text{nM}$ )され、細胞死は完全に阻止された。これらは、SCG神経細胞の生存が、神経伝達物質によっても調節されることを示し、*in vivo*でもVIPによりcAMPレベルの変動を介して制御されている可能性を示唆する。

## III. NGFによるL型 $Ca^{2+}$ チャンネル発現量増大と高 $K^+$ の細胞死抑制効果との相関。

新生児ラットより単離直後のSCG神経細胞は、高 $K^+$ (40mM)では生存を維持できないが、ベラトリジン(3 $\mu\text{M}$ )による脱分極では培地中の $Ca^{2+}$ に依存して生存可能となった。Fura-2を用いた $[Ca^{2+}]_i$ 測定の結果、高 $K^+$ 処理後の $[Ca^{2+}]_i$ は若い細胞では91nMと低く、NGF存在下で5~7日培養された細胞では238nMとなり、高 $K^+$ により生存可能となることが判った。RT-PCR法を用いたL型 $Ca^{2+}$ チャンネルmRNAの定量からは、この転写量は培養1日の細胞と比較して、培養3日で急増し培養5日で一定のレベル(細胞体あたり約9倍)に達することが判った。これらは、未発達のSCG神経細胞も $Ca^{2+}$ に依存した生存の機構を持つこと、L型 $Ca^{2+}$ チャンネルの遺伝子発現はNGFによる正の制御を受けること、この増加レベルが高 $K^+$ によるステージ依存的な神経細胞生存と相関していることを示している。脱分極刺激がNGFの効果を促す作用を持つことから、SCG神経細胞では、節前節後の両シナプスからの刺激即ち脱分極刺激とNGFが、相互に増強して細胞の生存を制御していると思われる。

## IV. $Na^+$ の細胞内流入による神経突起変成とNGF除去後の神経細胞死の抑制。

低濃度(0.75 $\mu\text{M}$ )のベラトリジンは、NGF除去後の培養SCG神経細胞の死を遅らす一方で、神経突起の変成も引き起こした。これらの効果はテトロドトキシン(TTX, 1 $\mu\text{M}$ )、ベンザミル(25 $\mu\text{M}$ )及びフルナリジン(1 $\mu\text{M}$ )で阻止され、細胞外 $Na^+$ に依存していた。ベラトリジンによる突起変成は、NGFやcAMP存在下でも起こり、細胞体の変成死とは別の事象であることが判った。細胞内 $Na^+$ 濃度( $[Na^+]_i$ )の変化を蛍光色素SBFIを用いて調べた結果、低濃度のベラトリジンでも $[Na^+]_i$ の上昇(4.2mMから12.9mM)が見られ、この上昇はTTX、フルナリジンで抑えられた。低濃度のベラトリジンは、単離直後のSCG神経細胞には効果が無かった。 $Na^+$ イオノフ

オアのモネンシンもNGF除去後の細胞死を遅らせた。これらは、SCG神経細胞の発達に伴い $\text{Na}^+$ チャンネルの発現(又は機能)が増強されること、分化した細胞の生存は脱分極に伴う $\text{Na}^+$ 流入を介した機構でも調節されていることを示唆する。 $\text{Na}^+$ の効果は、 $\text{Na}^+$ の直接の作用か、セカンドメッセンジャー系を介した作用かは不明である。

この研究によって、神経伝達物質や脱分極刺激による神経細胞の死/生存の調節に、セカンドメッセンジャー( $\text{Ca}^{2+}$ またはcAMP)の細胞内濃度が重要な役割を持つことが強く示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 達 郎  
副 査 教 授 浦 野 明 央  
副 査 教 授 高 畑 雅 一  
副 査 教 授 高 橋 孝 行

## 学位論文題名

Studies of Regulatory Mechanisms of Neuronal Death  
Induced by Trophic Factor Deprivation : Suppression of  
Neuronal Death by Second Messengers.

(神経成長因子欠乏による神経細胞死の制御機構の  
研究 : セカンドメッセンジャーによる神経細胞死の抑制)

発生過程で過剰に生産された神経細胞は、特定の発生段階に脱落し、成体での細胞数に調節される。近年、この発生過程で起こる神経細胞死はその生物学的重要性から、また、細胞が自殺をするというメカニズム解明の重要性から極めて盛んに研究されている。特に、自殺メカニズムに関与する遺伝子の同定には激しい世界的な競争が展開されている。しかしながら、神経細胞死を制御する因子は多様であり、且つその機構解明はまだなされていない。

本論文は、神経栄養因子欠乏による神経細胞死の制御機構のうち特に、細胞内カルシウム及び cAMP による抑制機構の解明に重点をおき、培養神経細胞を用いて解析したもので、以下のような重要な結論を得ている。

### (1) 培養上頸神経節細胞の細胞死抑制と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)との相関

膜脱分極は神経細胞死を抑制するが、その効果はL-型Ca<sup>2+</sup>チャンネルからの細胞外Ca<sup>2+</sup>の流入による。蛍光色素fura-2を用いたイメージング法による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の測定から、流入したカルシウム濃度と神経細胞死の抑制との間に相関関係を見だし、Ca<sup>2+</sup>セットポイント仮説として証明した。このセットポイント仮説から予想された[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は種々の培養条件下での神経細胞の生存と良く相関した。例えば、生後1日目のラットの上頸神経節神経細胞を培養すると[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は相対的に低く(93.0±10.5nM)、神経成

長因子(NGF)除去により細胞死が起こる。NGF存在下で培養すると $[Ca^{2+}]_i$ は上昇し、約3週間で一定の高い値( $241 \pm 7 \text{ nM}$ )になり、この条件では神経成長因子除去による細胞死は起こりにくい。これは*in vivo*で起こる現象と対応していると考えられた。

## (2) cAMPレベルの上昇による培養上頸神経節細胞の細胞死の抑制

本論文では、一過性でなく持続的に細胞内cAMPレベルを上昇させると、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇とは別の機構で、神経細胞死を阻止することを見いだした。更に、検討した種々のペプチドのなかでVIPが濃度依存的( $EC_{50} = 2.5 \mu\text{M}$ )に細胞死を遅延させた。それ自身では効果のない低濃度のIBMX ( $0.2 \text{ mM}$ )と共存させると増強( $EC_{50} = 8 \text{ nM}$ )され、細胞死は完全に阻止された。これらは、上頸神経節神経細胞の生存が、神経伝達物質によっても調節されることを示し、*in vivo*でもVIPによりcAMPレベルの変動を介して制御されている可能性を示唆する。更に、細胞死抑制効果のコミットメントタイムの解析から $[Ca^{2+}]_i$ やcAMPは翻訳後修飾によって細胞死を抑制することが判った。

## (3) 神経成長因子によるL型 $Ca^{2+}$ チャンネル発現量増大と膜脱分極による細胞死抑制効果との相関

本論文では(1)で述べた $Ca^{2+}$ に依存した生存促進の機構が発達することを見いだした。イメージング法による細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の測定から、脱分極により流入するカルシウム量が発達により増大することがわかった。この理由は、L型 $Ca^{2+}$ チャンネルの遺伝子発現がNGFによる正の制御を受けることであり、この増加レベルが高 $K^+$ によるステージ依存的な神経細胞生存と相関していた。脱分極刺激がNGFの効果を促す作用を持つことから、上頸神経節細胞では、節前節後の両シナプスからの刺激即ち脱分極刺激とNGFが、相互に増強して細胞の生存を制御していると考えられた。

以上の結果は、神経細胞死制御機構に関する細胞内カルシウム、cAMPによる抑制機構の解明に寄与するもので、この分野における先駆的な貢献をなした業績と考えられる。その成果は米国科学アカデミー紀要、DEVELOPMENTAL BIOLOGYなどの国際雑誌に公表され、高い評価を得ている。よって、著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。