

学 位 論 文 題 名

Studies on the Mechanisms of Membrane
Depolarization-Mediated Cell Survival and
Microtubule Disruption-Induced Neurite Degeneration
in Cultured Sympathetic Neurons

(培養交感神経細胞における膜脱分極による細胞生存機構、
および微小管崩壊による神経突起変性機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

神経系の発達過程において、分化した神経細胞の約半数が細胞死を起こす。神経細胞から伸びる神経突起もまた、発生過程において突起変性により失われる。これらの現象は「死」あるいは「変性」という否定的な単語で表現されているにも関わらず、正確な神経ネットワークの形成にとって必要不可欠な現象である。神経系の発達は、非常に高度に制御された「死と生」、「変性と維持」のバランスにより成し遂げられる。このバランスがどちらに傾いても、正常な発達は妨げられる。これは発達後の神経系においても同様であり、これらのバランスが「死」や「変性」側に傾くことは、様々な神経変性疾患の原因となる。このような観点より、神経細胞死や突起変性のメカニズムに関する研究は、生理学的、病理学的に極めて有意義なものと言える。本研究は、げっ歯類の培養交感神経細胞を用い、細胞膜脱分極による栄養因子非依存的な生存機構、および微小管崩壊による神経突起変性機構の解明を目的とし行なわれた。以下に本研究の要旨を示す。

神経細胞の生存機構には、神経栄養因子に依存するものと依存しないものが存在する。後者の例として、細胞膜の脱分極など神経細胞の電気的活動による生存が挙げられる。栄養因子による細胞生存機構が詳しく解明される一方、脱分極による生存機構については、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の重要性が知られている以外、不明な点が多い。第一章では、ラット上頸神経節 (SCG) より単離した培養交感神経細胞を用い、脱分極による生存機構の解析を行った。栄養因子による生存に重要なホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) の下流に存在する Akt は、脱分極刺激によりリン酸化された。しかし、PI3K の阻害剤は、Akt のリン酸化を阻害する濃度では十分な生存阻害効果を示さなかった。そこで、PI3K 以外の酵素の関与を想定し、 Ca^{2+} に応答する Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) に着目した。PI3K, CaMKII を同時に阻害した結果、阻害剤の副作用を受けることなく、脱分極の生存促進効果は顕著に抑制された。本研究により、PI3K 及び CaMKII が同時かつ独立に働き、神経細胞の生存を補償的に制御している可能性が見出された。複数の経路による補償的な細胞生存制御機構を明らかにした本研究は、脱分極による神経生存の分野にとどまらず、様々な分野のカスケード研究に見られる多くの矛盾を解決する糸口になると思われる。

神経系の発達において、細胞死による過剰な神経細胞の淘汰と同様に重要な現象として、神経突起の変性による不必要な投射繊維の淘汰が挙げられる。現在まで、神経細胞死に関す

る多くの研究がなされてきたが、その大部分が神経細胞全体での変化に着目したものであり、神経突起の変性に着目したものは非常に少ない。第二章では、神経細胞死における神経突起変性に着目し、神経細胞死と神経突起変性が区別可能な現象であるかについて検討した。本研究では、ウォーラーの変性が異常に遅延する突然変異型マウス (Wld^s) および野生型マウスより単離した SCG 細胞を用い、微小管重合阻害剤による細胞体および神経突起の変化を別々に調べた。突然変異型の SCG 細胞は、微小管重合阻害剤により、野生体と同様、アポトーシス様の細胞死を引き起こすが、突起変性に対し顕著な耐性を示した。この結果は、細胞死と突起変性が独立した現象であり、それぞれ独立した変性カスケードにより支配されていることを示唆している。ミトコンドリア膜電位感受性色素を用い、突起変性とミトコンドリア機能との関係を調べた結果、野生型 SCG 細胞では突起変性に先立ち突起内のミトコンドリア膜電位が消失し、突起内の ATP 量が著しく減少した。これに対し、突然変異型の細胞では双方とも長時間維持されていた。突然変異型の突起変性に対する耐性は、ミトコンドリア機能の阻害剤により容易に消失した。これらの結果は、突起変性がエネルギー枯渇によるネクロシス様の現象であることを示唆している。一方、突起内の ATP が枯渇した状態に関わらず、細胞体の ATP レベルは維持されていた。以上の結果より、同一の細胞において、細胞体と突起、異なる区画の変性がそれぞれ独立に、かつ異なる機構により制御されていることが示唆された。

第三章では、突起変性時に見られる ATP 量の減少に焦点を絞り、ATP 減少と突起変性の分子基盤の解析を試みた。本研究では、第二章で述べた個体、細胞種、薬剤を引き続き用い研究を行なった。微小管重合阻害剤処理により、野生型 SCG 細胞では急速に突起内の ATP 量が減少した。ATP の減少と平行し、突起上にプレッキングが現れた。興味深いことに、この ATP 減少はミトコンドリアの膜電位消失を伴わなかった。この結果は、ATP の減少がミトコンドリアの機能障害による単なる結果ではないことを示唆している。トリプシン様プロテアーゼの阻害剤 (TLCK) 処理により、ATP の減少、突起変性が顕著に抑制された。TLCK 処理は、いくつかの点において、突然変異型の表現型を再現していた。類似点として、ATP の減少を阻止すること、微小管重合阻害剤による形態学的変化を抑制すること、さらには突起切断による変性を劇的に抑制することが挙げられる。これらの結果は、突起変性早期の形態変化や ATP 減少における TLCK 感受性プロテアーゼの関与を示唆して。また、Wld^s 突然変異がそれらのプロテアーゼの活性化を阻害している可能性も示唆される。

本研究により示された結果は、以下の二点において有意義であると考えられる。すなわち、細胞内カスケードの研究において複数経路の関与を検討する必要性を提示した点、細胞をより詳細な区画、部域に分割する必要性を提示した点である。これらは、今後、細胞生物学分野の新たな発展に必要な留意点になると考えられる。

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 助 教 授 伊 藤 悦 朗

学 位 論 文 題 名

Studies on the Mechanisms of Membrane Depolarization-Mediated Cell Survival and Microtubule Disruption-Induced Neurite Degeneration in Cultured Sympathetic Neurons

(培養交感神経細胞における膜脱分極による細胞生存機構、
および微小管崩壊による神経突起変性機構に関する研究)

神経系の発達過程において、分化した神経細胞の約半数が細胞死を起こす。神経細胞から伸びる神経突起もまた、発生過程において突起変性により失われる。これらの現象は「死」あるいは「変性」という否定的な単語で表現されているにも関わらず、正確な神経ネットワークの形成にとって必要不可欠な現象である。神経系の発達は、非常に高度に制御された「死と生」、「変性と維持」のバランスにより成し遂げられる。このバランスがどちらに傾いても、正常な発達は妨げられる。これは発達後の神経系においても同様であり、これらのバランスが「死」や「変性」側に傾くことは、様々な神経変性疾患の原因となる。本論文はこのような観点より、「生存」と「変性」のそれぞれの分子メカニズムを研究したものである。具体的には、げっ歯類の培養交感神経細胞を用い、細胞膜脱分極による栄養因子非依存的な生存機構、および微小管崩壊による神経突起変性機構の解明を試みている。

第一章では、ラット上頸神経節 (SCG) より単離した培養交感神経細胞を用い、脱分極による生存機構の解析を行った。神経細胞の生存機構には、神経栄養因子に依存するものと依存しないものが存在する。後者の例として、細胞膜の脱分極など神経細胞の電氣的活動による生存が挙げられる。栄養因子による細胞生存機構が詳しく解明される一方、脱分極による生存機構については、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の重要性が知られている以外、不明な点が多い。栄養因子による生存に重要なホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) の下流に存在する Akt は、脱分極刺激によりリン酸化された。しかし、PI3K の阻害剤は、Akt のリン酸化を阻害する濃度では十分な生存阻害効果を示さなかった。そこで、PI3K 以外の酵素の関与を想定し、 Ca^{2+} に応答する Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) に着目した。PI3K, CaMKII を同時に阻害した結果、阻害剤の副作用を受けることなく、脱分極の生存促進効果は顕著に抑制された。本論文により、PI3K 及び CaMKII が同時かつ独立に働き、神経細

胞の生存を補償的に制御している可能性が見出された。複数の経路による補償的な細胞生存制御機構を明らかにした本研究は、脱分極による神経生存の分野にとどまらず、様々な分野のカスケード研究に見られる多くの矛盾を解決する糸口になると思われる。

第二章では、神経細胞死における神経突起変性に着目し、神経細胞死と神経突起変性が区別可能な現象であるかについて検討した。現在まで、神経細胞死に関する多くの研究がなされてきたが、その大部分が神経細胞全体での変化に着目したものであり、神経突起の変性に着目したものは非常に少ない。本論文では、ウォーラーの変性が異常に遅延する突然変異型マウス (Wld^s) および野生型マウスより単離した SCG 細胞を用い、微小管重合阻害剤による細胞体および神経突起の変化を別々に調べた。突然変異型の SCG 細胞は、微小管重合阻害剤により、野生体と同様、アポトーシス様の細胞死を引き起こすが、突起変性に対し顕著な耐性を示した。この結果は、細胞死と突起変性が独立した現象であり、それぞれ独立した変性カスケードにより支配されていることを示唆している。ミトコンドリア膜電位感受性色素を用い、突起変性とミトコンドリア機能との関係を調べた結果、野生型 SCG 細胞では突起変性に先立ち突起内のミトコンドリア膜電位が消失し、突起内の ATP 量が著しく減少した。これに対し、突然変異型の細胞では双方とも長時間維持されていた。突然変異型の突起変性に対する耐性は、ミトコンドリア機能の阻害剤により容易に消失した。これらの結果は、突起変性がエネルギー枯渇によるネクローシス様の現象であることを示唆している。一方、突起内の ATP が枯渇した状態に関わらず、細胞体の ATP レベルは維持されていた。以上の結果より、同一の細胞において、細胞体と突起、異なる区画の変性がそれぞれ独立に、かつ異なる機構により制御されていることが示唆された。

第三章では、突起変性時に見られる ATP 量の減少に焦点を絞り、ATP 減少と突起変性の分子基盤の解析を試みた。微小管重合阻害剤処理により、野生型 SCG 細胞では急速に突起内の ATP 量が減少した。ATP の減少と平行し、突起上にプレッキングが現れた。この ATP 減少はミトコンドリアの膜電位消失を伴うことなく起こり、ATP の減少がミトコンドリアの機能障害による単なる結果ではないことを示唆している。トリプシン様プロテアーゼの阻害剤 (TLCK) 処理により、ATP の減少、突起変性が顕著に抑制された。TLCK 処理は、いくつかの点において、突然変異型の表現型を再現していた。類似点として、ATP の減少を阻止すること、微小管重合阻害剤による形態学的変化を抑制すること、さらには突起切断による変性を劇的に抑制することが挙げられる。これらの結果は、突起変性早期の形態変化や ATP 減少における TLCK 感受性プロテアーゼの関与を、Wld^s 突然変異がそれらの活性化を阻害している可能性が示唆された。

本論文により示された結果は、以下の二点において有意義であると考えられる。すなわち、細胞内カスケードの研究において複数経路の関与を検討する必要性を提示した点、細胞をより詳細な区画、部域に分割する必要性を提示した点である。審査員一同は本論文が神経生物学領域の発展に重要な寄与をなすものと考えた。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があるものと認める。