

Title	Neurotrophic Action and Signalling of Epidermal Growth Factor in PC12h-R Cells and Cultured Cerebral Cortical Neurons
Author(s)	山田, 雅司
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3109901
DOI	10.11501/3109901
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	やま だ まさ し 山 田 雅 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 2 3 3 2 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	Neurotrophic Action and Signalling of Epidermal Growth Factor in PC12h-R Cells and Cultured Cerebral Cortical Neurons (上皮成長因子の神経栄養因子作用機序の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 畠中 寛 (副査) 教授 永井 克也 教授 吉川 和明

論 文 内 容 の 要 旨

私は、PC12細胞の亜株であるPC12h-R細胞が、EGFに应答してNGFの時と同様に神経突起の伸展、細胞増殖能の低下、チロシン水酸化酵素の発現上昇およびアセチルコリンエステラーゼの活性上昇を示し、神経細胞様に分化することを見いだした。続いて私は、PC12h-R細胞におけるEGF应答の原因を探る目的で、EGFによる細胞内シグナルの解析を、PC12h-R細胞の親株でEGFに対して分化应答を示さないPC12h細胞と比較することにより行った。その結果、PC12h-R細胞では、EGFによるEGFレセプターのチロシンリン酸化およびMAPキナーゼの活性化がPC12h細胞と比べ顕著に持続していることを見いだした。また、PC12h-R細胞では、EGF添加にともなうEGFレセプター量の減少速度が低下していることを観察した。EGFレセプターは、EGFの結合にともない細胞内に取り込まれリソソームで分解を受けることによりdown-regulationされることが知られており、PC12h-R細胞では、そのEGFレセプターのdown-regulation能が低下しているものと思われる。PC12h-R細胞では、EGFレセプターのdown-regulation能が低下しているため、EGFレセプターの活性化が持続し、その結果、EGFに対し分化应答を示すのではないかと考えられる。

私は、胎生20日齢ラット大脳皮質ニューロンを高酸素濃度(50%O₂)下で培養した際に起こる細胞死を、EGFが抑制することを見いだした。この高酸素負荷による神経細胞死は、RNA合成阻害剤であるアクチノマイシンDおよび蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミドにより抑えられることを観察した。さらに、高酸素濃度下で培養した大脳皮質ニューロンにおいてクロマチンの凝集が観察されることから、この神経細胞死がアポトーシスの性質を示すことがわかった。EGFは、この神経細胞死を濃度依存的に抑制し、そのEC₅₀値は0.3ng/mlであり、EGFレセプターのKd値とほぼ同様の値を示した。また、培養大脳皮質ニューロン中に、抗EGFレセプター抗体によって染色されるニューロンおよびEGFに应答して抗c-Fos抗体によって染色されるニューロンを観察した。培養は、細胞分裂阻害剤であるシトシンアラビノシド存在下で行っており、しかも抗グリア繊維性酸性蛋白質抗体で染色される細胞数の割合は、抗微小管関連蛋白質2抗体によって染色されるニューロン数の0.5%以下であった。以上のことから、培養大脳皮質ニューロンに対するEGFの効果は、グリア細胞を介した二次的なものではなく、ニューロンへの直接作用によって発揮されていると考えられる。次に私は、細胞内シグナルの持続性に注目し、培養大脳皮質ニューロンにおけるEGFによるEGFレセプターのチロシンリン酸化およびMAPキナーゼ活性化の経時変化を調べた。その結果、培養大脳皮質ニューロンでは、PC12h-R細胞の場合と同様、EGFによるEGFレセプターのチロシン

リン酸化が顕著に持続していた。また、MAPキナーゼの活性化においても持続傾向があることを観察した。これらのことから、EGFは、大脳皮質ニューロンにおいて、その細胞内シグナルを持続させることによって、神経栄養因子作用を発揮していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、細胞の増殖にかかわる成長因子である上皮成長因子のニューロンに対する栄養因子作用を新たにクローン化されたPC12h-R細胞や中枢神経細胞の初代培養系を用いて解析したものであり、上皮成長因子の新たな神経栄養因子としての役割を明らかにしたものである。

以上のように、本論文はニューロンへの上皮成長因子の作用について新しい知見を得ており、博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。