



Title	Functions of neurotrophins in cultured CNS neurons
Author(s)	野々村, 健
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39053
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	野々村 健
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 11740 号
学位授与年月日	平成7年3月23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	Functions of neurotrophins in cultured CNS neurons (培養中枢神経細胞を用いたニューロトロフィンの機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 畠中 寛 (副査) 教授 小倉 明彦 教授 中川 八郎

論文内容の要旨

神経栄養因子とは一般に標的細胞から供給され、発生期のニューロンの分化促進と生理的細胞死を抑制することで、生体内の神経ネットワーク構築を制御する分子群であると位置づけられている。脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)、NT-4/5は神経成長因子(NGF)と高い相同性のある神経栄養因子群であり、ニューロトロフィンと総称されている。レセプター型チロシンキナーゼであるtrk遺伝子ファミリーは、これらニューロトロフィンの機能的レセプターであり、trk A, trk B, trk CがそれぞれNGF, BDNF(およびNT-4/5), NT-3のレセプターである。末梢神経系におけるニューロトロフィンとtrk遺伝子ファミリーの発現分布や機能などの研究は古くから精力的に進められ、詳細な知見が得られつつある。一方、中枢神経系においてもニューロトロフィンとtrk遺伝子ファミリーの存在がわかり、特にBDNFとNT-3は成熟後に高発現が見られると同時にそれらのレセプターであるtrkB, trkCも広範囲に発現していることが明らかとなってきた。ところが、末梢ニューロンとは対照的に、中枢ニューロンにおけるニューロトロフィンの機能、特にNGF以外の因子についての解析は始まったばかりである。私はニューロトロフィン、特にBDNFとNT-3の中枢ニューロンにおける機能に興味を持ち、以下のような解析を行なった。

1. 前脳基底野コリン作動性ニューロンはそのNGFとBDNF依存性から3種類に分けられる

前脳基底野コリン作動性ニューロンは *in vitro* および *in vivo* において、NGFとBDNFの両方に応答することが知られている中枢ニューロン群である。我々は生後ラットからの中枢ニューロンの初代培養系を確立し、NGFとBDNFの機能がともにコリン作動性ニューロンのシナプス形成の前後で、分化促進型から生存維持型へとシフトすることを見いだした。このように複数のニューロトロフィンが同様に作用するコリン作動性ニューロンにおいて、NGFとBDNFが全く同一のニューロンに働くのか、それとも別々のニューロン群に作用するのかといった、空間的にみた詳細な役割の相違について検証した。実験では、シナプス形成終了期である生後2週齢ラットからの培養ニューロンを用いた。その結果、前脳基底野コリン作動性ニューロンはNGFやBDNFの他にNT-4/5によっても生存の促進がみられたが、NT-3は何の効果も観察されなかった。培養ニューロンからNGFを除去することで生じる細胞死がBDNF処理によって防がれ、逆にBDNF除去がNGF添加で補うことがわかった。この結果はNGFとBDNFに応答するニューロンは同一であることを示唆する。一方、NGFとBDNFの同時処理により、それぞれ単独に添加したときと比べて、わずかではあるが明らかにコリン作動性ニューロン数の増加がみられた。これ

らの結果から、コリン作動性ニューロンにはNGFとBDNFの両方に応答しうる多数の細胞群と、各々単独にのみ応答する少数の細胞群が存在し、NT-3応答性のものは存在しないことが示唆される。同一のニューロンが複数のニューロトロフィンにその生存を依存しているという結果は、神経栄養因子とその依存細胞群が明確に1対1に対応しているという末梢ニューロンでの知見と対照的である。中枢ニューロンはその栄養因子依存の冗長性が特徴的であり、神経機能構築のための補償となっていると思われる。

2. 前脳基底野、海馬ニューロンにおいてNT-3は最初期遺伝子*c-fos*を誘導しても生存維持作用は示さない

もう一つのニューロトロフィンであるNT-3は、その中枢での機能はいまだ明らかではない。そこで、NT-3の中枢ニューロンに対する栄養因子効果を探る手がかりとして、前脳基底野ニューロンに対する応答を最初期遺伝子*c-fos*の誘導を指標に調べた。抗*Fos*タンパク質抗体を用いた免疫染色から、BDNFによって約20%のニューロンに応答がみられたことと対応して、顕著なMAP2(microtubule-associated protein-2)陽性ニューロンの生存促進が観察された。しかし、NT-3によって約10%のニューロンが応答したにもかかわらず、生存促進は全く見られなかった。それぞれBDNF、NT-3の高親和性レセプターであるB、Cと共に高発現している海馬ニューロンについて同様の実験を行ったところ、BDNF、NT-3により多くのニューロンが*Fos*誘導を起こしたにもかかわらず、生存維持効果を全く示さなかった。この結果は、ニューロトロフィンの成熟中枢ニューロンにおける生物応答は、これまで考えられていた生存維持作用とは異なる何らかの応答があるものと考えられる。

3. 小脳顆粒細胞を用いた、BDNFとNT-3の細胞内シグナル伝達経路の解析

BDNFとNT-3の細胞内シグナル伝達系の解析のため、大量に均一のニューロンを調製できる生後9日齢ラット小脳顆粒細胞系を利用した。この時期の小脳顆粒細胞の生存はBDNFによってなされているが、NT-3は影響を与えたかった。しかし、免疫沈降法と抗ホスホチロシン抗体によるイムノプロットからそれぞれBDNF、NT-3に伴うTrkB、TrkCの自己リン酸化及びその下流に位置する分子群であるSHC、MAPキナーゼ(mitogen-activated protein kinase)のリン酸化は確認された。即ち、MAPキナーゼ系の活性化のみでは生存維持作用は説明できないと考えられる。そこでPLC γ (phospholipase C γ)抗体による免疫沈降を行ったところ、BDNFでのみPLC γ のリン酸化が起こっていた。これまでの結果より、BDNFによる生存維持効果にはMAPキナーゼ系とPLC γ 系の両方が必要であることが示唆される。一方、NT-3はMAPキナーゼ系を介した、既知の生存維持作用以外の生理活性が想像される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ニューロトロフィンの培養中枢ニューロンにおける役割について行ったものであり、前脳基底野コリン作動性ニューロンの生存維持に対するNGFとBDNF(あるいはNT-4/5)依存性を明らかにした。また、NT-3の海馬および小脳顆粒ニューロンへの新しい作用も見いだした。

以上のように、ニューロトロフィンの培養中枢ニューロンにおける役割について、新しい知見を得ており、博士(理学)の学位論文として充分価値のあるものと認める。