

Title	Analyses of Apoptosis in Cultured Cerebellar Granule Neurons and PC12 Cells
Author(s)	久保, 武一
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39918
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	久保武一
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 12326 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	Analyses of Apoptosis in Cultured Cerebellar Granule Neurons and PC12 Cells (培養小脳顆粒細胞および PC12 細胞におけるアポトーシスの解析)
論文審査委員	(主査) 教授 畠中 寛 (副査) 教授 二井 将光 教授 小倉 明彦

論文内容の要旨

生後 9 日齢ラットの培養小脳顆粒細胞は、培地中のカリウム濃度の低下にともないアポトーシスを起こすことが知られており、このアポトーシスは高カリウムによる脱分極刺激で抑制される。この系を用いて、神経栄養因子であるニューロトロフィンの効果を検討したところ、脳由来神経栄養因子 (BDNF) およびニューロトロフィン-4/5 (NT-4/5) が顕著にアポトーシス抑制効果を示した。NT-3 も僅かであるが有意な作用を示したが、神経成長因子 (NGF) は全く効果を示さなかった。BDNF の小脳顆粒細胞に対するアポトーシス抑制効果は、その ED₅₀ の値が約 1 ng/ml であること、および BDNF の添加にともない TrkB のチロシン残基がリン酸化されることから、高親和性レセプターである TrkB を介して発現されていることが強く示唆された。抗 c-Fos 抗体を用いた細胞免疫染色から、BDNF は小脳顆粒細胞に直接作用してそのアポトーシスを抑制するものと考えられた。次に、生存維持効果に必要な細胞内シグナルに関して検討したところ、BDNF および高カリウム培地の生存維持効果は、PI-3' キナーゼの特異的阻害剤であるオルトマニンにより顕著に阻害された。この結果は、小脳顆粒細胞における BDNF および高カリウム培地の生存維持効果が、PI-3' キナーゼを介して発揮されることを示唆している。抗 BDNF 抗体を用いた中和実験や BDNF と高カリウムの生存維持効果の相加性から、小脳顆粒細胞に対する高カリウムの生存維持効果は BDNF を介するものではないと考えられ、したがって異なる 2 つの因子 (BDNF と高カリウム) が、ともに PI-3' キナーゼを介して、小脳顆粒細胞に対して生存維持効果を発揮している可能性が示唆された。

PC12h 細胞は、気相酸素濃度が 50% といった高酸素条件下で死滅することが知られている。そこで高酸素負荷による PC12h 細胞の細胞死が、アポトーシスであるかどうかを検討したところ、細胞死にともなう核の凝集および断片化がみられ、さらに RNA および蛋白質合成阻害剤の添加により細胞死が抑制された。これらのことから、この細胞死はアポトーシスであることが確認された。次に、高酸素負荷による PC12h 細胞のアポトーシスを阻止する因子を検索したところ、すでに報告されている NGF に加えて、高カリウムによる脱分極刺激および cAMP アナログである CPT-cAMP が効果を示した。さらにこのアポトーシスを細胞内で抑制する因子に関する知見を得るため、プロトオンコジーンである *bc1-2* を高発現させた PC12 細胞を用いて実験を行った。その結果、コントロールベクターを導入した PC12 細胞では、50% 気相酸素下で、多くの細胞が死滅したのに対して、*bc1-2* 遺伝子を導入した PC12 細胞では多くの生細胞が観察された。この結果から、細胞内蛋白質である Bc1-2 が高酸素負荷による PC12 細胞のアポトーシスを抑制することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ニューロトロフィンの一種である脳由来神経栄養因子が培養小脳顆粒ニューロンのアポトーシスを抑制することを見いだすと共に、その細胞内情報伝達を明らかとし、また、酸素負荷によるアポトーシスでの栄養因子や Bcl-2 の役割について新しい作用を見いだしたものである。

以上のように、本論文は培養ニューロンを用いたアポトーシスについて、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。