

Title	ラット大脳皮質由来Neurosphereとアストロサイトの分化・増殖に対するPACAPおよび小胞体カルシウムの調節
Author(s)	荒川, 尚久
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44160
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	荒川尚久
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 17767 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	ラット大脳皮質由来 Neurosphere とアストロサイトの分化・増殖に対する PACAP および小胞体カルシウムの調節
論文審査委員	(主査) 教授 馬場 明道 (副査) 教授 八木 清仁 教授 松田 敏夫 教授 土井 健史

論文内容の要旨

従来、高等哺乳動物の脳において、発生後新しい神経細胞は作られないというのが定説であった。そこで、中枢神経系の損傷に対しては神経細胞死をいかに防ぐかという観点から研究が進められてきた。ところが、Reynolds らによって神経幹細胞がその選択的培養法により同定され、発生後も脳神経細胞のごく一部(神経幹細胞)は増殖することが見い出されて以来、傷害をうけた神経細胞を補充し、中枢神経系の再生・再構築を行うアプローチが理論上では可能となった。こうした中枢神経系の再生医療を考える上で最も重要になるのが「必要なニューロンを大量に得る」ことと、その分化増殖制御を可能にすることである。実験的に得ることができる神経幹細胞としては増殖因子を用いた neurosphere 法によるものがある。しかしながらこの neurosphere についてもその増殖性の制御、分化機構などは不明な点が多く残されている。一方、アストロサイトは神経幹細胞から分化した後もその増殖性を維持するグリア細胞である。事実、脳損傷などの神経細胞障害時にはその増殖性が高まると共に、反応性アストロサイトと呼ばれる活性化されたものに分化し種々の生理活性因子を産生する。従って、その増殖性の制御は脳病態の改善において重要であると考えられている。

PACAP は、vasoactive intestinal polypeptide : VIP と高い相同性を有するペプチドホルモンで、その受容体には少なくとも 3 種類のサブタイプが存在している。PACAP およびその受容体は、発達過程のラット脳において神経新生が持続して起こる部位に強く発現が観察されることから、PACAP は神経新生や細胞運命の決定過程において、重要な役割を果たすことが示唆されている。一方、thapsigargin は小胞体 Ca^{2+} -ATPase を阻害することでその Ca^{2+} プールを枯渇させる作用を持つ薬物で、種々の細胞において本薬物による細胞増殖制御、あるいはアポトーシスが検討されている。従って、本研究において神経幹細胞系列としての neurosphere の培養を確立し、その増殖、分化に対する PACAP 並びに thapsigargin の作用を検討した。さらに、アストロサイトについても同様に検討した。

まず本培養系における neurosphere 形成の条件設定を行なった。胎生 14 日のラット大脳皮質から調製した細胞は、bFGF 存在下 7 日間培養すると neurosphere を形成すること、大部分の細胞は神経幹細胞の選択的マーカー、nestin 陽性であることを確認した。RT-PCR 法を用いた解析から、PACAP および PAC1 受容体の発現に比べ、VIP、VPAC1 受容体、VPAC2 受容体の発現は低レベルであることを確認した。

次に PACAP が細胞増殖に与える影響を $[^3H]$ -thymidine 取り込み量、5-Bromo-2-deoxy-uridine (BrdU) 染色、

neurosphere 形成率の3手法を用いて解析したところ、PACAP はいずれの手法においても bFGF 処置によって起こる細胞増殖を用量依存的に減少させた。PACAP と高い相同性を示す VIP は、PACAP よりも弱い増殖抑制作用を示した。また、PACAP は用量依存的に cAMP 産生を促進し、VIP の処置では、PACAP より高濃度において cAMP 産生が認められた。さらに、アデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリンと膜透過性 cAMP アナログである dibutyryl-cAMP (DbcAMP) を処置により、PACAP と同様の細胞増殖抑制作用が観察された。以上の結果から、PACAP による細胞増殖抑制作用は、細胞内 cAMP 濃度上昇が関与していることが示唆された。PACAP はシグナル伝達の経路として細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こすことが知られている。そこで、本培養系での細胞増殖に Ca^{2+} イオンが与える影響を検討した。bFGF による細胞増殖に対して、 Ca^{2+} キレーター EGTA、小胞体 Ca^{2+} ストアを枯渇させる小胞体 Ca^{2+} ATPase 阻害薬 thapsigargin は細胞増殖を有意に抑制した。 Ca^{2+} シグナル系、特に小胞体 Ca^{2+} ストアが neurosphere 培養系での細胞増殖に重要であることを示唆した。

神経幹細胞から生じる神経細胞はほとんど増殖しないことから、PACAP の増殖抑制作用が、神経細胞への分化促進によって起こっている可能性がある。免疫染色法にて細胞分化の解析を行ったところ、PACAP、フォルスコリンは神経細胞への分化誘導作用を持つことを明らかとした。以上の結果から、PACAP および cAMP シグナルが増殖サイクルを止め、神経細胞分化の方向に向かわせるシグナルであることを示唆した。

前述のように、アストロサイトの増殖性の制御は脳病態の改善において重要であると考えられている。まず、PACAP がアストロサイトの増殖に与える影響を検討した。PACAP は低濃度では増殖促進、高濃度では増殖抑制という二重性の反応を示した。さらに、DbcAMP の検討から低濃度で細胞増殖促進作用を持つことを示した。さらにアストロサイトの細胞増殖において、thapsigargin の作用を検討した。アストロサイトにおいて、thapsigargin は $0.01 \mu\text{M}$ の濃度から有意な増殖抑制をみせた。以上、PACAP-cAMP シグナルがアストロサイトの増殖を調節する因子であることを示した。さらに Ca^{2+} シグナル系、特に小胞体 Ca^{2+} ストアがアストロサイトの細胞増殖に重要であることを示唆した。

小胞体 Ca^{2+} プールを枯渇させる thapsigargin の処置により neurosphere やアストロサイトの細胞増殖性が変化するが、実際の細胞内 Ca^{2+} 動態との関連は不明である。小胞体を介した Ca^{2+} シグナリングのなかには、小胞体 Ca^{2+} ストアの枯渇が引き金となって、細胞外からの持続的な Ca^{2+} 流入が起こる容量性 Ca^{2+} 流入 (Capacitative Ca^{2+} entry; CCE) という現象がある。そこで、小胞体 Ca^{2+} ATPase 阻害剤による Ca^{2+} 動態の変化をアストロサイトにて検討した。CPA は thapsigargin 同様、CCE を引き起こす薬物として一般的に用いられている。CPA 処置により一過性の Ca^{2+} 濃度上昇の後、細胞外液の Ca^{2+} イオン依存性の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観察され、アストロサイトにおける CCE の存在が確認された。次に、その分子実体を明らかにする目的で薬理的な検討を行った。そのうち、細胞内 Ca^{2+} 濃度調節分子の一つである Na^+ - Ca^{2+} 交換系 (NCX) の選択的阻害薬として使用されている KB-R7943 が CCE を用量依存的に抑制することを明らかにした。当研究室は大正製薬株式会社との共同研究により、世界で初めて特異的な NCX 阻害剤 SEA0400 の開発に成功している。SEA0400 は $10 \mu\text{M}$ の濃度まで CCE に影響を与えなかった。SEA0400 の NCX 阻害活性は $\text{IC}_{50}=28 \text{ nM}$ なので、NCX は CCE の実体分子では無いことが明らかとなった。

本研究で得られた情報より、PACAP は成体脳に存在する増殖性細胞の増殖・分化を制御する内因性のシグナルであることが示唆された。これはすでに報告されている、PACAP の脳機能障害に対する保護的な役割を示すものと考えられる。さらに、一連の NCX 阻害薬が CCE に対して親和性を持つことを見出したが、本成績が CCE をターゲットとした新規薬物開発の手がかりとなると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は成体脳に存在する増殖性細胞、神経幹細胞とアストロサイトの増殖に対する下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド、pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) と小胞体 Ca^{2+} の役割を検討

したものである。

その結果、ラット胎仔脳から神経幹細胞系列の **neurosphere** の培養を確立し、その分化の検討から、**PACAP-cAMP** シグナルが増殖サイクルを止め、神経細胞分化の方向に向かわせるシグナルであることを明らかにした。また、アストロサイトの増殖において、**PACAP** は低濃度で増殖促進作用を、高濃度では増殖抑制作用を示し、その作用が **cAMP** 系を介する可能性を示した。一方、これら増殖性細胞での増殖制御に小胞体カルシウムが関与することを見出した。又、これに併せて、アストロサイトにおいて、容量性 Ca^{2+} 流入系の存在を明らかにした。

以上は、脳増殖性細胞の増殖制御に新たな知見を見出したものであり、博士（薬学）の授与に充分値するものと判定した。