

論 文 内 容 の 要 旨

神経細胞は神経伝達を直接担う細胞であり、脳神経系の機能単位である。神経細胞はお互いにネットワークを構成し、機能的多様性を示す。刺激が伝わる軸索の性質や伝達される位置によって最終的な神経伝達の性質が決定され、形成しているネットワークに依存して特異的な情報伝達を行っている。ヒトの脳では数百億個にもものぼる神経細胞が精緻に結び付き、千兆個にも及ぶ巨大なネットワークを形成することにより感情、記憶、学習、認知、思考、言語、運動など、人間にとって最も重要な高次精神機能を司っている。マウス神経芽細胞腫(N18TG-2)とラット神経膠腫(C6Bu-1)のハイブリッド細胞である NG108-15 細胞は神経細胞機能を多く備えており、また十数代の継代中、その生理学的小および薬理学的諸性質が変わらず安定しているため、*in vitro* における有用な神経モデル細胞として神経の発達や分化のメカニズムの研究に使用されている。本研究では神経細胞の発生・分化あるいはシナプス形成などのメカニズムを解明する目的で、NG108-15 細胞を使用し、分化誘導剤である Bt₂cAMP により分化誘導させることにより、神経細胞への分化過程において様々なイオンチャネルや受容体の性質がどのように変化するのかについて検討した。

第 1 章では、神経伝達物質の遊離に關与している電位依存性 Ca²⁺チャネル(VSCCs)が神経細胞への分化過程においてどのような影響を受けるのかについて、細胞内遊離 Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)の変化を指標にして検討した。高濃度 KCl 適用による [Ca²⁺]_i の上昇反応は未分化細胞と比較して分化細胞(Bt₂cAMP 処理細胞)で有意に上昇(約 2 倍)した。しかし、細胞外溶液を低 Ca²⁺濃度条件(2.5mM CaCl₂を 2mM EGTA に置換)にした場合、未分化および分化細胞のいずれも高濃度 KCl 適用による [Ca²⁺]_i の上昇反応が認められなくなった。また、未分化および分化細胞のいずれも高濃度 KCl 適用による [Ca²⁺]_i の上昇反応は CaS(L型 Ca²⁺チャネルブロッカー)により抑制効果を示し、その抑制効果は不可逆的であることが認められた。しかし、ω-CTX GVIA(N 型 Ca²⁺チャネルブロッカー)、ω-Aga IVA(P 型 Ca²⁺チャネルブロッ

氏 名	いほ にし なか し 今 西 孝 至
学位の種類	博 士 (薬学)
学位記番号	薬 第 5 8 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	NG108-15細胞における神経分化に伴うイオンチャネルおよび受容体の機能変化に関する研究
論文審査委員 (主 査)	教授 市 田 成 志
(副主査)	教授 掛 樋 一 晃
(副主査)	教授 西 田 升 三

カー), SNX-482(R 型 Ca^{2+} チャネルブロッカー)による抑制効果は認められなかった。これらの結果から, 分化細胞において認められた高濃度 KCl 適用による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇反応の増大は, 主に L 型 Ca^{2+} チャネルの up-regulation によって生じている可能性が示唆された。

第 2 章では, 活動電位発生など電氣的興奮において重要な役割を担っている電位依存性 Na^+ チャネル(VSSCs)が神経細胞への分化過程においてどのような影響を受けるのかについて, 細胞内遊離 Na^+ 濃度($[\text{Na}^+]_i$)の変化を指標にして検討した。VSSCs のアゴニストである veratridine(Vtd)適用による $[\text{Na}^+]_i$ の上昇反応は分化細胞において有意に増大した。しかし, 高濃度 KCl 適用による $[\text{Na}^+]_i$ の上昇反応は未分化および分化細胞のいずれも $[\text{Na}^+]_i$ の変化は認められなかった。分化細胞で確認できた Vtd 適用による $[\text{Na}^+]_i$ の上昇反応は, 蛍光画像解析法および whole-cell patch-clamp 法のいずれも特異的 VSSCs ブロッカーである tetrodotoxin(TTX)により完全に抑制された。また whole-cell patch-clamp 法により, Vtd 適用による $[\text{Na}^+]_i$ の上昇反応機構は, TTX-感受性 Na^+ チャネルの不活化過程を抑制することにより生じている可能性が示された。これらの結果から, 分化細胞において認められた Vtd 適用による $[\text{Na}^+]_i$ の増大反応は, 主に TTX-感受性 Na^+ チャネルの up-regulation によって生じている可能性が示唆された。

第 3 章では, 神経伝達物質によって生ずる反応性が神経細胞への分化過程において, どのような影響を受けるのかについて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を指標にして検討した。serotonin(5-HT)または bradykinin(BK)適用による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇反応は未分化細胞と比較して分化細胞で有意に上昇し, その効果は 5-HT および BK いずれの場合も濃度依存性を示した。しかし, acetylcholine(ACh), carbachol(CCh), norepinephrine(NE)および L-glutamic acid(Glu)適用では未分化および分化細胞のいずれも $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に変化は認められなかった。5-HT 適用による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇反応は細胞外溶液を低 Ca^{2+} 濃度条件下にすることによりほぼ完全に消失した。一方, BK 適用による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇反応は,

細胞の分化によって細胞外溶液の Ca^{2+} に対する依存度が高くなる傾向が認められた。分化細胞における 5-HT 適用による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇反応は tropisetron(5-HT₃ 型受容体ブロッカー)により完全に抑制された。BK 適用による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇反応は未分化および分化細胞のいずれにおいても Hoe140(BK B2 型受容体ブロッカー)により抑制された。これらの結果から, 分化細胞において認められた 5-HT および BK 適用による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇反応の増大は, 5-HT₃ 型および BK B2 型受容体の up-regulation によって生じている可能性が示唆された。

以上の結果から, NG108-15 細胞を Bt₂cAMP によって分化誘導させると, 神経突起の伸長や神経細胞同士のネットワーク形成など神経細胞に見られる形態学的特徴が観察されるだけでなく, 神経細胞の基本的な役割である興奮の伝導・伝達についての機能的特徴も観察することができた。このことは Bt₂cAMP により, NG108-15 細胞が形態だけでなく機能に関しても神経様細胞に分化していることを証明している。

本研究より, NG108-15 細胞は, 1) 神経細胞の発生・分化あるいはシナプス形成などのメカニズムの解明, 2) 化学療法時の制吐剤として使用されている 5-HT₃ 型受容体ブロッカーの新規医薬品の開発, 3) 喘息や鼻炎患者の気道狭窄や鼻閉の症状改善に重要な BK B2 型受容体ブロッカーの新規医薬品開発, のための有用なツールとなり得る可能性が示唆された。本研究の成果が今後の脳神経科学の分野における未知の部分の解明に少しでも貢献できることを期待している。

論文審査結果の要旨

本研究は神経細胞の発生・分化あるいはシナプス形成などのメカニズムを解明することを目的としている。Bt₂cAMPにより分化誘導させたNG108-15細胞を神経細胞のモデルとして使用することにより、神経細胞機能に重要な役割を担っているカルシウム (Ca²⁺) ならびにナトリウムイオン (Na⁺) チャネルおよび受容体の機能・性質の変化について検討している。

第1章では、高濃度 KCl 適用による細胞内遊離 Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)変化を指標として、神経細胞への分化過程に神経伝達物質の遊離に重要な電位依存性 Ca²⁺チャネル(VSSCs)の機能・性質が変化するかどうかを検討している。そして、分化細胞における高濃度 KCl 適用による[Ca²⁺]_iの上昇反応の増大は、主にL型 Ca²⁺チャネルの up-regulation による可能性を示した。

第2章では、VSSCsのアゴニストである veratridine(Vtd)適用による細胞内遊離 Na⁺濃度([Na⁺]_i)変化を指標として、神経細胞への分化過程に活動電位発生など電気的興奮に重要な電位依存性 Na⁺チャネル(VSSCs)の機能・性質が変化するかどうかを検討している。そして、分化細胞における Vtd 適用による[Na⁺]_iの上昇反応の増大は、主に TTX・感受性 Na⁺チャネルの up-regulation による可能性を示した。

第3章では、神経細胞への分化過程に神経伝導・伝達は重要であることが想像できる。本章では種々の神経伝達物質による[Ca²⁺]_i変化を指標として、神経細胞への分化過程に神経伝達物質の反応性が変化するかどうかを検討している。そして、serotonin(5-HT)および bradykinin(BK)適用による[Ca²⁺]_iの上昇反応は未分化細胞よりも分化細胞において有意に増大したが、他の神経伝達物質による反応は未分化および分化細胞のいずれにおいても認められなかったことを明らかにしている。そして、分化細胞における5-HTおよびBK適用による上昇反応の増大は、5-HT₃型およびBK B₂型受容体の up-regulation による可能性を示した。

本研究により得られた新たな知見は神経細胞の発生・分化あるいはシナプス形成に関するメカニズムの解明およびカルシウム、ナトリウムイオンチャネル、5-HT、BKの果たす生理学的役割について非常に重要であり、当該研究分野においても高い評価が得られるものと考えられる。

氏名	なか じま かず き 中 嶋 和 紀			
学位の種類	博 士 (薬学)			
学位記番号	薬 第 5 9 号			
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 22 日			
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当			
学位論文題目	糖鎖-タンパク質間相互作用に関する研究			
論文審査委員 (主査)	教授	掛	樋	一 晃
(副主査)	教授	池	川	繁 男
(副主査)	教授	市	田	成 志