



BDNF potentiates spontaneous Ca^{2+} oscillations in cultured hippocampal neurons

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 酒井, 直人 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1558

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 281号	学位授与年月日	平成10年 6月 5日
氏 名	酒 井 直 人		
論文題目	BDNF potentiates spontaneous Ca^{2+} oscillations in cultured hippocampal neurons (培養海馬ニューロンにおける BDNF の自発的カルシウムオシレーション増強作用)		

博士(医学) 酒 井 直 人

論文題目

BDNF potentiates spontaneous Ca^{2+} oscillations in cultured hippocampal neurons
(培養海馬ニューロンにおけるBDNFの自発的カルシウムオシレーション増強作用)

論文内容の要旨

〔目的〕

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、ニューロンの分化、成熟、生存維持作用を持つことが知られている。最近、BDNF の新しい作用としてシナプス可塑性に関わる事が示されるようになった。シナプス可塑性の重要なシグナルのひとつに細胞内カルシウムの変動があり、自発的カルシウムオシレーションの頻度がニューロンの突起伸展やニューロトランスミッターの発現を調節するという報告もある。本研究では、ラット培養海馬ニューロンを用いて BDNF の作用をカルシウム蛍光指示薬 (Fluo-3) を用いて共焦点レーザー顕微鏡下に観察し、その細胞内カルシウム制御、特にカルシウムオシレーションに対する作用について検討した。

〔方法〕

胎生18-19日齢のラット (Wister ST) から顕微鏡下に海馬を摘出し、ポリエチレンイミンでコートしたカバーガラス上にフレキシバームディスクを用いて9-13日間完全無血清培地下に分散培養を行い実験に用いた。培養細胞がニューロンであることを確認するために抗 MAP2抗体を用いて、BDNF の受容体である trkB を発現していることを確認するために抗 trkB 抗体を用いて免疫染色を行った。混在するグリア細胞を確認するために抗 GFAP抗体を用いて免疫染色を行った。さらにBDNFのシグナルがtrkBを介して細胞内に伝わっていることを確認するために、免疫沈降法とウェスタンブロッティング法を用いてtrkBとその下流に存在するMAPキナーゼ、ホスホリパーゼC- γ のチロシン磷酸化を観察した。細胞内カルシウムの観察に際してカルシウム蛍光指示薬である Fluo-3 AM10 μM を基本塩溶液 (130mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl_2 , 0.8mM MgCl_2 , 5.5mM glucose, 0.1% (w/v) bovine serum albumin, 20 mM HEPES-NaOH, pH7.4) に溶解し30分間37°Cで細胞に負荷した後、これを完全に基本塩溶液に置換して24-26°Cに15分間置いた後、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon, RCM8000) を用いて細胞内カルシウムの変動をモニターした。Fluo-3は、1励起1波長の蛍光指示薬であるのでカルシウムの変動は蛍光比で表わした。カルシウムオシレーションは蛍光比1.2以上のものを1回として数えた。

〔結果〕

免疫染色の結果、ほとんどの培養細胞がMAP2陽性のニューロンであり、このうち約70% ($72.3 \pm 6.1\%$, mean \pm SEM, $n=4$) が trkB 陽性細胞であった。GFAP 陽性のグリア細胞は1%以下であった。培養細胞にBDNF (100ng/ml) を添加することで5分以内にtrkB、MAPキナーゼ、ホスホリパーゼC- γ のチロシン磷酸化を観察した。このことは培養細胞の多くが機能的な trkB 受容体を発現し、外部から投与したBDNFに速やかに反応することを示唆している。BDNFの細胞内カルシウムに対する効果は、細胞内カルシウムの自発的なオシレーションを示すニューロン群とオシレーションを示さない静止したニューロン群で異なった反応が観察された。BDNF は静止したニューロン群の細胞内カルシウムにはほとんど影響を与えなかった (97%, 32/33, $n>300$)。この実験条件においては、機能的なシナプスを

形成していると考えられるニューロン群の同調したカルシウムオシレーションが観察できる。BDNFは、これらニューロン群の同調したオシレーションを顕著に増強した。共焦点レーザー顕微鏡の焦点を樹状突起にあわせることで、BDNFのオシレーションに対する効果を安定して観察することができた。樹状突起のオシレーションは、TTXとCNQXで顕著に抑制された。MgCl₂を含んだ基本塩溶液では、APV（NMDAアンタゴニスト）はオシレーションを抑制しなかったが、MgCl₂を除いた基本塩溶液では抑制した。BDNFの樹状突起のオシレーションに対する効果を、その頻度と振幅において解析した。BDNFはオシレーションの頻度、振幅とともに顕著に増強した（ $n=20$, $p<0.005$, t -test）。BDNFの作用は、振幅よりも頻度により優位にみられた。この作用は、trk受容体に関連するチロシンキナーゼの選択的阻害剤であるK-252aを前処理することで完全に抑制された（ $n=13$ ）。BDNFの作用は、APVで有意に抑制された（ $n=28$, $p<0.005$, t -test）。BDNFのオシレーションに対する作用は、MgCl₂を除いた基本塩溶液では観察されなかった。

〔考察〕

本研究によって、BDNFは静止した培養海馬ニューロンの細胞内カルシウムにはほとんど変化を及ぼさないが、自発的カルシウムオシレーションを呈するニューロン群に対してはその頻度と振幅を増強させることが明らかとなった。この作用は樹状突起において再現性よく観察された。BDNFの効果は振幅よりも頻度により顕著にみられ、最近我々が液体クロマトグラフィーを用いて観察したBDNFによる培養ニューロンからのグルタミン酸の放出増強作用の結果とも一致した。BDNFの作用はAPVを前投与することで有意に抑制され、NMDA受容体からのカルシウムの流入が亢進しているMgCl₂を除いた基本塩溶液中では観察されなかったことから、NMDA受容体を介するカルシウム流入を増強すると考えられた。この作用はK-252aで抑制されたことからtrkBを介すると考えられた。

〔結論〕

BDNFは自発的カルシウムオシレーションを呈するニューロン群に対してtrkBを介してグルタミン酸の放出を促し、樹状突起においてNMDA受容体からのカルシウムの流入を増強させ、カルシウムオシレーションの頻度と振幅を増強させる。

論文審査の結果の要旨

脳由来神経栄養因子（BDNF）は、神経細胞の分化や成長を司る物質が脳内に在るであろうという予測のもとに探索され、見いだされた物質である。この物質は、実際には、すでに見つけられている神経栄養因子（NGF）に比べて神経細胞の成長を促進させる作用は小さいものの、神経細胞死やシナプス伝達に関わる作用を持っているという報告がなされ、注目を集めている。申請者は、脳外科医として神経細胞の機能回復を求める立場から、BDNFの損傷神経細胞に対する回復作用を期待してその結果を検討した。

海馬より単離した神経細胞を培養し形態的な側面と機能的側面での効果を調べた。まず、MAP2抗体を用いた免疫染色により細胞が神経であること証明した。BDNFの投与は神経細胞の形態に対しては効果を持たなかった。次にBDNFのレセプターであるtrkBに対する抗体を用いた免疫染色によりそれらの細胞にレセプターが存在することを証明した。レセプターに連なる細胞内信号系がBDNF投与によって

活性化されることを、MAPキナーゼとホスホリパーゼC- γ それぞれのチロシン磷酸化の定量をすることにより確認した。細胞内信号系の共通因子として働くCaイオン濃度の上昇を、Caイオン指示色素であるFluo-3を細胞内に入れてその蛍光強度分布を共焦点顕微鏡を用いて調べたところ、BDNFの投与によって明確にはCaイオン濃度の上昇が引き起こされることがわかった。しかし、神経間の機能的結合の結果生じる自発性のCa振動に対しては、これを促進させ、数分で振幅と頻度を増大させる効果を持つことがわかった。この効果はシナプスが多数形成されていると考えられる樹状突起領域において特に顕著であった。BDNFのこの作用はtrkBのブロッカーであるK-252aによって阻害された。これらのことから、申請者は、BDNFは形態的には神経細胞の成長修復を促進する効果を現わさず、共通細胞内信号であるCa反応も引き起こさないものの、シナプス機能の増進には有効であることを結論した。

審査委員会は、BDNFの海馬神経細胞のシナプス伝達に対する促進的効果を発見したことを高く評価し、また、神経細胞の機能を増進させることが将来的に臨床応用できる可能性を開いたことを評価した。

上記のような申請者の論文の示説に対し、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) ホスホリパーゼCはtrkBの活性化によってリン酸化されるか
- 2) Ca振動の生理的意義について
- 3) Ca振動に関与するCaチャネルはどのようなものか
- 4) 海馬神経細胞に多く発現しているレセプターはどのようなものか
- 5) BDNFの脳内における分布について
- 6) 海馬カルビンディンの細胞障害保護機能はどのようなものか
- 7) BDNFはどのような遺伝子に作用するか
- 8) BDNF存在下でのグルタミン酸毒性はどのように発揮されるか
- 9) テトロドトキシンはなぜCa振動を抑えるのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 寺 川 進

副査 教授 市 山 新 副査 教授 藤 田 道 也