

氏 名 (本籍)	渡 邊 康 子 (新 潟 県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第72号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学 位 論 文 題 目	神経回路網形成に関する基礎的研究
審 査 委 員	主査 岩手大学 教授 首 藤 文 榮 副査 帯広畜産大学 教授 齊 藤 篤 志 副査 岩手大学 教授 谷 口 和 之 副査 東京農工大学 教授 山 根 義 久 副査 岐阜大学 教授 外 崎 肇 一

論 文 の 内 容 の 要 旨

中枢神経系で生じる機能障害は、日常生活に支障をきたし、回復まで長期にわたることが多く、老化に伴って発生率が上昇することから、社会的にも重要な問題となっている。また、伴侶動物の平均寿命が長くなるにつれ、動物の神経機能障害も増加し、獣医学の分野でも大きな問題になっている。したがって、神経機能障害の治療法の確立は、医学および獣医学の領域を通じて重要な課題である。中枢神経細胞は多くの神経細胞突起により回路網を形成しており、この回路網が、情報受容から個体応答に至る一連の機能を担っている。神経回路網形成は、神経の情報処理機能の発現にとって非常に重要である。したがって、中枢神経系の機能を維持するためには、神経細胞死を抑制しながら、神経細胞間の回路網の形成を促進し、それを長期にわたって維持することが必要である。そのためには神経細胞の機能発現の誘導が必須であり、機能発現を誘導する方法を開発することが最も重要となる。機能を失った神経細胞において新たな神経回路網の形成を促進するためには、まず個々の神経細胞の分化を誘導することが必要であると考えられる。

本研究では、神経細胞に分化を誘導し、新たな神経回路網の形成を促進する因子として、外因性のボツリヌス菌体外酵素C3を候補因子とし、C3酵素が神経細胞に引き起こす機能的な変化について調べ、C3酵素は神経細胞に対する外因性の分化誘導因子として利用可能であるかどうかを検討した。

第一章では、初代培養神経細胞のC3酵素による形態変化を確かめ、形態変化を起こした神経細胞について、生存に最も深く関わっているエネルギー代謝系に変化が見られるかどうかを検討した。

C3酵素処理により、24時間以内に、初代培養神経細胞は分化と思われる、神経突起の伸長、細胞間連絡の形成などの形態変化を起こした。72時間後には、細胞内のエネルギー代謝で重要な機能を果たしているLDHのアイソザイムパターンが変化し、LDH1、LDH2が減少し、LDH4とLDH5が増加した。これは細胞内のエネルギー代謝が低酸素消費の状態に移行したことを示唆している。また、DBcAMPあるいはNGFでは、C3酵素とは全く逆の変化が誘導された。これらの結果から、神経細胞でのエネルギー代謝系がRhoを介するシグナル伝達経路によっても調節されていることが示された。

C3酵素により細胞内は低酸素消費状態が誘導されるから、虚血のような嫌氣的な状態で機能的な神経細胞突起を形成させようとするとき、C3酵素による分化誘導はより効果的であると考えられる。

第二章では、C3酵素により分化様の形態変化を起こした神経細胞が機能的な異常を起こしているかどうかを、神経興奮物質に対する感受性を指標にして検討した。

神経細胞を高濃度のカリウムで刺激したときに見られる細胞内のカルシウム濃度の変化を蛍光シグナルで調べたところ、C3酵素で処理したものとしなかったものとの間に差が見られなかった。したがって、C3酵素で形態変化を誘導しても、脱分極機能は阻害されていないと考えられる。

つぎに、グルタミン酸、アスパラギン酸、カイニン酸、GABA、ムスカリンおよびアセチルコリンを用いて、形態変化を起こした神経細胞の神経興奮物質に対する感受性が変化していないかどうかを調べた。その結果、どの神経興奮物質においても、C3酵素処理による感受性の変化はほとんどみられなかった。したがって、C3酵素により誘導された突起を持つ神経細胞でも、通常の初代培養神経細胞の分化によるものとほとんど同様の興奮伝導能や反応性が維持されていると考えられる。さらにこのことは、C3酵素により分化が誘導された神経細胞が、機能的な神経回路網を形成し得ることを示唆している。

以上の結果から、C3酵素は今までにない新しいタイプの外因性神経細胞分化誘導因子として、高いポテンシャルを持っていると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

中枢神経系の機能障害の修復は、人および動物の医療において最も困難な課題の一つである。中枢神経細胞は、多くの樹状突起および軸索により回路網を形成し、情報の伝達を行っている。したがって、障害により失われた機能を回復するためには、新たに神経回路網を形成させることが必要であり、そのためには、シグナル伝達機能を持った神経突起の発現と伸長を誘導することが必要である。

この研究では、申請者は、神経細胞の分化を誘導し、新たな神経回路網の形成を促進する因子として、*Clostridium botulinum* C型およびD型菌によって産生される菌体外酵素（C3酵素）に着目している。この研究で申請者は、まず最初に、C3酵素を初代培養神経細胞に添加して形態的变化が起こるかどうかを確かめ、ついで、形態変化を起こした細胞の代謝系の変化を明らかにし、さらに、各種の神経興奮剤に対して感受性を持っているかどうかを解析した。それらの結果を基に、C3酵素が神経細胞に対する外因性分化誘導

因子としてのポテンシャルを持っているかどうかを検討している。

第一章では、C3酵素により引き起こされる神経細胞の形態的变化と、それに伴うエネルギー代謝系の変化を明らかにしている。

C3酵素を初代培養神経細胞に添加すると、24時間以内に、細胞体の球形化、神経細胞突起に類似した突起の形成とその伸長などの形態的变化が観察された。また、細胞内エネルギー代謝の変化の指標として乳酸脱水素酵素 (LDH) のアイソザイムパターンの変化を調べたところ、72時間後には、LDH1とLDH2の減少およびLDH4とLDH5の増加が見られた。この変化は、細胞が低酸素の状態におかれたときに見られる変化と同じであり、C3酵素処理を受けた神経細胞の細胞内が低酸素消費の状態になっていることを示唆している。このことから、C3酵素は、虚血のような嫌氣的な状態、もしくは内因性因子の欠乏状態で神経突起を形成を必要とするときに有効であると考察している。

第二章では、C3酵素により形態変化を引き起こした初代培養神経細胞の、神経興奮物質に対する感受性を明らかにしている。

高濃度カリウムイオンの刺激に対する細胞内のカルシウムシグナルの経時的変化において、C3酵素処理神経細胞とNGF処理神経細胞との間に違いは観察されなかった。さらに、数種類の薬物（グルタミン酸、アスパラギン酸、カイニン酸、GABA、ムスカリン、アセチルコリン）の刺激に対する細胞内のカルシウムシグナルの経時的変化でも、C3酵素処理による変化はほとんど認められなかった。したがって、C3酵素によって誘導された突起の興奮伝導能は維持され、C3酵素で分化誘導された神経細胞も、初代培養神経細胞の分化によるものとほとんど同様の生理機能を持つと考えられる。

以上の結果をもとに、C3酵素が神経細胞に対する外因性の分化誘導因子としてのポテンシャルを持っていると評価している。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として充分価値あるものとして認めた。

基礎となる学術論文

1. Watanabe, Y., Morimatsu, M. and Syuto, B. (2000)
Botulinum C3 enzyme changes the lactate dehydrogenase isozyme pattern of primary culture of neurons. J.Vet.Med.Sci.(in press).
2. Watanabe, Y., Morimatsu, M. and Syuto, B. (2000)
The evaluation of the potential of botulinum C3 enzyme as an exogenous differentiation-inducing factor to neurons. J.Vet.Med.Sci.(in press).

既発表学術論文

1. Inanami, O., Watanabe, Y., Syuto, B., Nakano, M., Tsuji, M. and Kuwabara, M. (1998)
Oral administration of (-)-catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil. Free Rad.Res.29:359-365.