

氏名(本籍)	塚田信吾(埼玉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第1886号
学位授与年月日	平成14年12月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	NO(一酸化窒素)によるラット後根神経節細胞の神経突起の成長促進作用に関する研究
主査	筑波大学教授 医学博士 吉田 薫
副査	筑波大学教授 医学博士 豊岡 秀訓
副査	筑波大学助教授 理学博士 志賀 隆
副査	筑波大学講師 医学博士 山本 三幸

論文の内容の要旨

(目的)

これまでNOは突起伸長の阻害物質であると考えられてきた。しかし、後根神経節細胞(DRG neuron)は、発達期及び再生時に神経突起(neurites)を伸長する際に、その先端にNO産生酵素(nNOS)を発現することが知られている。そこで、本研究では培養DRG neuronを使ってNOがneuritesの成長にどのような影響を及ぼすかを調べた。

(対象と方法)

生後5～7日目のラットから採取したDRG neuronを36時間器官培養あるいは分散培養し、neuritesを伸長させた。マイクロピペットを用いてNOのドナー(NOR3)を局所的に投与し、neuritesに及ぼす変化を顕微鏡下に観察することによりNOの作用部位を調べた。また、NOのドナー(SNAP)を3時間投与し、neuritesが伸長する距離を計測した。さらにNOに関連する酵素系の関与を薬理学的手法によって調べた。NeuritesにおけるPKAの活性化状態を、PKAの蛍光プローブであるARIIを用いて測定した。

(結果)

免疫染色の結果、培養したDRG neuritesの先端部にnNOSの発現が認められた。Neuritesの先端部分においてNOが産生されていることがNOプローブ(DAF2)を使った蛍光測定の結果から明らかとなった。NOドナー(SNAP)を、器官培養したDRGに投与し、neuritesの伸長した長さを測定した。その結果0.1mM以下の濃度域ではSNAPの濃度に依存してneuritesの伸長は増加した。一方、0.3mM以上の濃度ではneuritesの伸長は減少した。SNAPの作用は、NOのスキャベンジャーであるヘモグロビンを投与した場合には認められなかったことから、neuritesの伸長はSNAPから放出されたNOによって促進されたと考えられた。NOの伸長促進作用は、マイクロピペットからneuritesの先端部分にNOドナー(NOR3)を投与した場合にも観察されたことから、NOはneuritesの先端に作用していると考えられた。

NOによる伸長促進作用は、guanylate cyclaseの阻害剤(ODQ, LY83583)によって抑制された。また8Br-cGMPの投与によってneuritesの伸長は促進された。興味深いことにNOによる成長促進作用は、PKGの阻害薬(KT5823)

では抑制されず、PKAの阻害薬（KT5720やRp-cAMPS）によって抑制されることがわかった。

PKAの蛍光指示薬であるARIを用いて、neuritesにおけるPKAの測定を行った結果、NOの投与によってneuritesのPKAが活性化されることが明らかとなった。このPKAの活性化はguanylate cyclaseの阻害剤によって抑制された。さらにcaged cGMPを用いてneuritesのcGMP濃度を上昇させた場合にも、PKAの活性化が生じることが確認された。

PKAの活性化機序を解明するために、cGMP濃度の上昇によりPKAを活性化させる特徴を持つ、PDE III（cGMP inhibited phosphodiesterase）の関与を調べた。PDE IIIの阻害薬（milrinone, trequinsin）により、DRG neuritesのPKAが活性化されることがPKAの測定の結果から明らかとなった。さらに、PDE III阻害薬によってDRG neuritesの成長は促進された。以上の結果から、NOによるPKAの活性化と成長促進作用に、PDE IIIが関与していることが示唆された。

（考察）

NOはDRG neuritesの成長を促進する作用を有しており、成長阻害作用を生じる濃度よりも低い濃度において成長促進作用を発揮することが明らかとなった。このNOによる成長促進作用は、guanylate cyclaseの活性化に伴うcGMP濃度の上昇を介して生じていると考えられた。NO cGMPの下流においてはPKGよりもむしろPKAが関与していることが示唆され、実際にNOによってPKAの活性化が生じることが確認された。さらにNOによるPKAの活性化と伸長促進作用にPDE IIIが介在していることが示唆された。すなわちNOによってDRG neuritesのcGMP濃度が上昇し、これに伴いPDE IIIによるcAMPの消去速度は低下し、細胞内cAMP濃度が上昇することによってPKAが活性化され、成長促進作用を生じると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、NOが神経突起の成長にどのような影響を及ぼすかを、綿密かつ統計的な実験により解析した意欲的な研究である。培養したラット後根神経節細胞の（DRG neuron）を用い、神経突起先端部においてNOが産生されていること、NOは高濃度では神経突起の伸長を阻害するが、低濃度では伸長を促進することを明らかにした。また、NOによる伸長促進作用が、細胞内のcGMPの濃度上昇とPKAの活性化を介して発現することを示すとともに、このPKAの活性化機序にPDE IIIが関与することを阻害実験により示唆した。NOによる神経伸長の促進作用とその機序の一端を明らかにした意義は高く、神経の再生・発達にNOが関与することを示唆した重要な研究である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。