

## 高酸素気相下での培養ニューロンの生存維持と機能修復

### High oxygen atmosphere in neural cell culture

代表研究者	大阪大学蛋白質研究所教授 Prof., Inst. for Protein Res., Osaka Univ. Hiroshi HATANAKA	畠 中 寛
協同研究者	群馬大学医学部教授 Prof., School of Medicine, Gunma Univ. Yoshiaki KOMIYA	小 宮 義 璋

Under physiological conditions, cells are constantly exposed to a variety of circumstances that effect their survival and death. Recent studies have shown that several types of cell death take place during the life of the organism. Programmed cell death (or apoptosis) is the most well-known type of cell death, and it can be found in normal development, metamorphosis, tissue turnover and tumor regression. In many cases, this type of cell death shows characteristic features indicate that it is mediated by an intracellular active death program. That is, protein and RNA synthesis inhibitors can block cell death, and the fragmentation of chromosomal DNA into multimers of about 180 base pairs (called a "DNA ladder") are frequently observed.

Programmed cell death has long been recognized in the PNS and CNS. This phenomenon takes place at specific stages during the development of embryonic neurons, *e.g.*, the period immediately after the arrival of axons in the postsynaptic target fields. Several types of programmed cell death has been reported in the nervous system. In most cases, the survival of neurons during the period of cell death is regulated by two important factors, the receipt of target-derived trophic factors, and the receipt of afferent innervation. From these facts, it is believed that programmed cell death plays an essential role in forming the neuronal architecture of the developing nervous system.

Moreover, it is speculated that this death program in normal development may be expressed at other times, such as in neurodegenerative disorders and aging. However, although many efforts have been made to understand the mechanisms of programmed neuronal death not only *in vivo* but also *in vitro*, the cellular and molecular mechanisms of neuronal degeneration that occur normally, as well as under a variety of experimental conditions, are not well-known. Furthermore, most of our knowledge concerning the mechanisms of programmed cell death comes from work in the PNS, and it is not certain whether the same principles apply in the CNS. Although programmed cell death has been observed in many CNS structures, very little is known about the mechanisms underlying the process. We now report that the neuronal death induced by oxygen toxicity is mediated by an active death program in cultured rat hippocampal neurons. These results suggest that the oxygen molecule, which is one of the best energy sources utilized by CNS neurons, can mediate apoptosis and will expand the potential for investigating its mechanisms in CNS neurons.

When embryonic rat hippocampal neurons were cultured in a 50% oxygen atmosphere, neurons gradually died after 20 hr in culture. This death pattern was found to be mediated by an intracellular active death program, so called apoptosis, as follows: 1) Cycloheximide and actinomycin-D, protein and RNA synthesis inhibitors, respectively, prevented cell death, indicating that cell death required new protein biosynthesis. 2) DNA fragmentation (called a "DNA ladder"), a specific biochemical marker of apoptosis, was detected during the course of cell death. 3) Depolarization with high  $K^+$  medium (26~50 mM) prevented cell death. This effect was suppressed by some dihydropyridine derivatives, L-type Ca channel blockers, such as nifedipine and nicardipine. These results indicate that increased levels of oxygen activate an apoptotic mecha-

nism in the cultured hippocampal neurons, and suggest that neuronal activity may protect the neurons from oxygen-induced apoptosis.

## I. はじめに

細胞を死へと導くメカニズムの解明は、発生過程でみられる細胞増殖や分化の制御機構のみならず、分化・成熟をとげた細胞のもつさまざまな細胞障害からの防御機構を知るうえでも重要である。中枢ニューロンは、脳血管障害によるエネルギー代謝異常や細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ホメオスタシスの破綻などによって容易に変性、脱落することが知られている。このような過程でみられる神経細胞死の機構解明は、酸素代謝障害に起因する多くの神経疾患や脳虚血障害の治療のみならず、非分裂細胞であるニューロンの長期生存能力を知る上でも何らかの手がかりを与えるものと期待される。

哺乳類の脳は、酸素とグルコースを用いた好氣的なエネルギー代謝によって、中枢機能を支えるために必要な多量のエネルギーを効率よく獲得している。例えばヒトでは、脳は全体重の2%にすぎないが、その酸素消費量は身体全体の約20%にも及ぶことが知られている。それらは主として、神経伝達を円滑に行うのに不可欠な細胞膜内外のイオン勾配を維持するためのエネルギーとして用いられている。また筋肉や肝臓の細胞とは異なり、脳はエネルギーの貯蔵がほとんどできない。このため、脳には極めて複雑な血管系が張り巡らされ、循環血液を介して常に細胞へエネルギーが供給できるような構造が発達している。

しかしながら、一見無駄なく見えるこれらの仕組みは、以下に述べるようにニューロンにとって両刃の剣ともいべきいくつかの問題をもたらすことになる。まず第一に、非分裂細胞であるニューロンは、その長い一生を通して絶えず酸素代謝に伴って生じる酸素ストレスに曝されることになる。これにより、細胞内に遍在的な細胞障害が生じることが予想される。第二に、虚血性脳血管障害（これは脳卒中などの大規模なものに限らず、より局所的で小規模なものも含まれる）では、酸素供給の遮断およびその回復時に細胞内の酸素

代謝の平衡が破れ、この時ニューロンは活性酸素侵襲などの酸素ストレスを受けることになる。以上のことは、たとえ短期間では脳機能障害として現れてこないとしても、時間経過とともにニューロンの機能低下、さらにはその死を引き起こす要因として十分なものになると考えられる。このことは、脳の老化過程でみられるさまざまな精神疾患の要因の一つとして考えることもできるであろう。酸素代謝と神経疾患との関わりでは、パーキンソン病の原因とされている黒質線条体経路のドーパミン作動性ニューロンの脱落が挙げられる。この場合、ミトコンドリア内呼吸鎖の障害によるエネルギー産生系の異常と活性酸素による細胞障害によるものであるとの説が有力な候補として挙げられている。

本研究は、最近、明らかにされつつあるこれらの酸素代謝障害によって誘導される中枢神経細胞死の発症機構、およびそれらの修復に関わる細胞内メカニズムについて、神経栄養因子によるニューロンの損傷修復、および生存維持作用との関わりに注目しながら行ったものである。また研究の過程で、中枢神経系ニューロンの死のアポトーシスモデルの一つを見いだした。

## II. 酸素代謝異常によるニューロン死について

ニューロンに備わる最も特徴的な性質の一つに、その非分裂性と長期生存能力が挙げられる。もちろん、心筋細胞なども非分裂細胞として知られるが、中枢機能における最も重要な役割、すなわち高度な情報処理能力とその保存のメカニズムを考えてみれば、その特性の重要さは容易に理解できるであろう。一般にニューロンは分化発達の早い時期に分裂を止め、その後二度と分裂しないことが知られている。すなわち、脳はその一生の中でも早くから構成メンバーを固定されてしまうことになる。したがって一たびそれらが脱落してしまうと、部分的には新たなシナプス結合によって代償されるとしても、脱落数が多くなれば神経

機能は不可逆的に低下は避けられない。このことが脳神経系における細胞死の最も深刻な点であると同時に、多くの研究者の関心を集める理由でもある。

酸素代謝異常によって生じる脳神経細胞死の研究は、そのほとんどが臨床的な側面から研究が進められてきたものである。特に虚血性脳血管障害後に見られる中枢神経細胞壊死は、古典的な神経病理学の問題として既に19世紀より知られていた。この障害で見られる神経細胞死の原因は、主としてニューロンが低酸素侵襲に曝されることが引き金になっていると考えられている。またその特徴として、①脳の部位によって低酸素侵襲に対する耐性に差がみられること、②神経細胞死のタイプが、虚血障害を受けた後速やかに起こるもの(急性壊死)と、いったんニューロン活動が正常に戻るものの再び死に至るもの(遅発性神経壊死)の二つに分けられることなどが挙げられる。①についてはこれまで比較的障害を受けやすい部位は、海馬CA1錐体細胞、小脳プルキンエ細胞、大脳皮質3,5層錐体細胞など脳内でも可塑性の高い部位であることが知られている。②については急性壊死は、主として血流低下が長期に及んだ結果、細胞内のエネルギーが枯渇して起こるものと考えられている。一方、遅発性神経細胞壊死は、虚血後の血流およびエネルギーレベルが正常に復帰したにも関わらず上に挙げた脆弱なニューロンで見られる特異的な神経細胞死として、近年その発症機構解明に多くの努力がなされている。遅発性神経細胞壊死の原因として有力なものに、脳内グルタミン酸濃度上昇による細胞内Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシスの破綻が挙げられている。これによって細胞内のプロテアーゼであるカルパイン、ホスホリパーゼCなどの脂質分解酵素あるいはプロテインキナーゼCなどが活性化し、ニューロンの死が誘導されるというものである。最近、このような様な機構以外にも、細胞内の蛋白質、あるいは遺伝子群が神経細胞死の直接的な原因に関与する物質として注目を集めている。すなわち、虚血侵襲を受け易い海馬CA1部位などではストレス蛋白である熱ショック蛋白質70(HSP70)などの発現が他の

部位に比べて低いことが報告されている。また、c-fosなどの遺伝子群が虚血障害に先立って発現してくるとの報告もあり、これと障害の受け易さとの関連がとり沙汰されている。これ以外に、興味深い知見として、細胞内自殺プログラムが虚血侵襲後スイッチオンの状態になり遅発性神経細胞壊死が生じるとの知見がある。このことは、海馬CA1錐体細胞の遅発性神経細胞壊死が、シクロヘキシミドやアニマイシンなどの蛋白質合成阻害剤によって抑制されるなどの結果から示唆されている。また、末梢神経細胞においてプログラム細胞死を抑える働きをもつ神経成長因子(NGF)、あるいは塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)などの神経栄養因子によってもそれらの神経細胞死が抑えられるとの報告があり、今後これらの栄養因子による脳損傷修復作用の機構解明もかねた研究が進むことが予想される。

### Ⅲ. 高酸素気相下培養におけるニューロンの挙動

我々は胎仔期だけでなく、これまで極めて困難であった生後のラット中枢ニューロンの初代培養系を確立することにより、それらに対する神経栄養因子の分化誘導および生存維持作用に関する研究を行ってきた。この実験系が最も有効なのは、第一に中枢ニューロンの発達に伴う分化形質の変化が培養下で観察可能になること、第二にそれらの生化学的、遺伝学的な解析が*in vitro*において可能になる点である。そこで、これらの系を用いることにより、神経栄養因子による神経細胞への酸素ストレスからの損傷修復作用を調べる実験を行うことにした。

中枢ニューロンにおける酸素およびエネルギー代謝量は、脳の分化・発達に伴って著しく上昇することが知られている。このことは、前脳や脳切片を使った実験によって確認されている。しかしながら、逆にこのような酸素消費の増加に伴い、ニューロンの受ける酸素ストレスも大きくなることが予想される。もしそうであるなら、酸素ストレスに対する耐性もこの時期に併せて上昇することが考えられる。このような作業仮説のもと、我々は手始めとして培養下のラット中枢ニューロンとPC12h細胞を用い、酸素ストレスがそれら

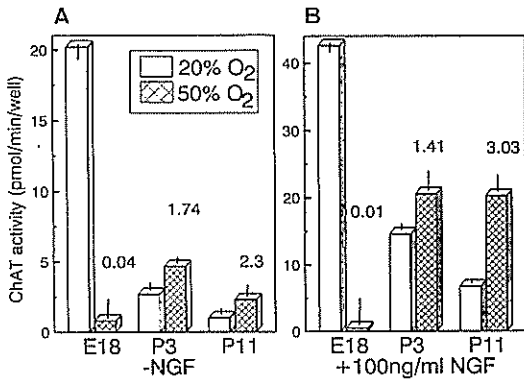


図1. ラット脳の成熟に伴う酸素ストレスに対する耐性の変化。

胎仔18日(E18)と生後3日および11日齢(P3およびP14)のラット中隔野・Broca対角帯核垂直部領域のニューロンをポリエチレンイミンコートしたプレート上にまき、翌日100 ng/mlのNGFを添加した後、6日間培養をおこなった。20および50% O<sub>2</sub>で培養した時のアセチルコリン合成酵素(ChAT)活性の差は、それぞれの酸素濃度で培養した時にプレート内に生存しているコリン作動性ニューロンの数を示している。カラムの上の数字は50% O<sub>2</sub>でのChAT活性に対する20% O<sub>2</sub>の比。脳の発達に伴ってこの値は大きくなる。すなわち高酸素負荷に対する耐性が上昇していることを意味する。

の細胞の生存に与える影響を調べることにした。

酸素ストレスとしては、培養に用いたインキュベータ内の気相酸素濃度を調節することにより、培地中の溶存酸素濃度変化に伴う酸素負荷を加え、この時の細胞の生存と形態の変化を観察した。気相酸素濃度変化に応じた培地中の溶存酸素濃度は、気相酸素濃度がそれぞれ10, 20, 50%の時、135, 157, 284 mmHgであった。溶存炭酸ガス濃度およびpHの値は、3日ごとの培地交換の間でそれぞれ約40 mmHgと7.4に一定しており、通常培養時の20% O<sub>2</sub>の場合とで差はみられなかった。

胎仔18日目から生後14日目までの前脳基底野コリン作動性ニューロンの高酸素負荷(50% O<sub>2</sub>)に対する耐性変化を調べた。その結果、脳の成熟が進むにつれて上昇していることがわかった(図1)。特に胎仔18日のニューロンと生後3日

齢のそれとでは高酸素負荷に対する耐性に顕著な差が生じていることがわかった。さらにこの耐性は、コリン作動性ニューロンの分化、生存維持に作用する神経成長因子(NGF)によって増強された。同様の性質は、コリン作動性ニューロンにのみ当てはまるものでなく、この時培養したニューロン全体の性質として観察された。これらの結果は、中枢ニューロンにおける酸素要求性の変化が、培養下でも観察可能なことを示している。また、脳の発達が進むにつれ、特に出産の前で酸素ストレスに対する耐性が著しく上昇していることを示唆している。

#### IV. 酸素ストレスによる中枢ニューロン障害と神経栄養因子による損傷修復・生存維持作用

近年、神経栄養因子によるニューロンへの分化誘導および生存維持効果は、末梢のみならず中枢のニューロンにまでおよぶことが知られている。本特集の他の総説でも述べられているように、現在まで神経栄養因子によるニューロンの生存維持作用は、細胞内の自殺プログラムを介した死への過程(アポトーシス)を抑えることでなされているとの見方が強まってきている。しかしながら、これらの結果は末梢神経系のニューロンを用いて得られたものであり、中枢ニューロン系においては、明らかにアポトーシスを誘導する要因は未だ明らかではない。そこで、我々は酸素による培養中枢神経細胞死が、神経栄養因子によって防がれるものであるか、さらに細胞死の誘導機構がどういったものであるかについて研究を行うことにした。まず、ニューロンのモデル細胞であるPC12h細胞を50% O<sub>2</sub>で培養した時に観察される細胞死が、NGFなどの神経栄養因子添加によって防がれることを明らかにしている。これらの結果は、NGFやbFGFには酸素障害によって誘導されるPC12h細胞の死を回避するための機構を誘導する作用があることを意味している。

高酸素負荷による胎仔中枢ニューロンの死に対しても、神経栄養因子の一つであるbFGFが効果的に働くことを明らかにした。bFGFの中枢神経系における作用は、脳が外傷や虚血などの障害を受けた後にあるとされている。特にbFGFは障害

部周辺のニューロンやグリア細胞に局在することが知られるようになり、その神経栄養因子としての作用が主として脳損傷修復過程でみられることが示唆されている。我々の得た結果は、細胞内の酸素ストレスによるニューロンの障害およびその死を bFGF が抑えることを示すものであった。

用いた実験系は、胎仔 20 日目 (E20) の前脳基底野など中枢ニューロンである。パパイン分散したニューロンをカルチャープレート上にまき ( $6 \sim 8 \times 10^5$  細胞/cm<sup>2</sup>)、それぞれ 9%、20% (通常培養時の O<sub>2</sub> 濃度) および 50% 気相酸素に設定した炭酸ガスインキュベータ内で 4 日間培養した。培養は、血清中に含まれる未知因子やニューロン以外の細胞 (アストログリア細胞など) の影響を防ぐため、細胞増殖阻害剤である 5 μM のシトシンアラビノシドを含む完全合成無血清培地 (TIP/DF 培地) を用いた。培養 3 日後に生存している細胞をニューロンの特異的なマーカーである抗微小管結合蛋白質 2 (MAP2) 抗体で染色し、その数を比較した。その結果、気相酸素濃度が高くなるにつれてニューロンの生存率は低下するようすが観察され、通常培養時の 20% O<sub>2</sub> に比べて 9% O<sub>2</sub> では約 1.5 倍の生存ニューロンが観察された。一方、50% O<sub>2</sub> では 5% 以下のニューロンしか生存していなかった。細胞死に伴うニューロンの形態変化を観察したところ、時間経過とともに神経突起は断片化し、細胞体は凝縮して接着性を失う様子が観察された。50% 気相酸素下でのニューロン死の時間経過を観察したところ、細胞は培養 1 日目あたりからいっせいに死滅しはじめ、培養 3 日後では培養開始時の 2~5% しか生存していなかった。なお、インキュベータ内気相酸素濃度を 50% にしたときの培地中の溶存酸素濃度は約 300 mmHg であり、培養開始後 2~3 時間でプラトーに達した。また、溶存炭酸ガスおよび pH の値は、実験期間中それぞれ約 40 mmHg と 7.4 に一定しており、通常培養時 (20% O<sub>2</sub>) の場合とで差はみられなかった。

ラット前脳基底野ニューロン (E20) を培養し、種々の神経栄養因子による生存維持効果を調べた。その結果、酸素負荷によるニューロン死は、

NGF, EGF および IGF II では抑えられなかった。一方、bFGF を添加した場合、その濃度に依存したニューロンへの生存維持効果が観察された。50% O<sub>2</sub> で 3.5 日間培養した後の生存ニューロン数は、コントロール群では 2% 以下であるのに対し、100 ng/ml の bFGF 添加群では培養開始時の約 55~65% が維持された。また、bFGF の ED<sub>50</sub> 値は 12 ng/ml であった。

さらに、bFGF による生存維持効果が、ニューロンへの直接の作用によるものか、あるいは bFGF に応答するアストログリア細胞を介したものであるかを調べるために、100 ng/ml の bFGF 添加後、3.5 日間培養した時のウェル中のアストログリア細胞を抗グリア繊維性酸性蛋白質 (GFAP) 抗体で染色したところ、その割合はコントロール群と bFGF 添加群とでそれぞれ、1.9% ± 0.2 および 1.3% ± 0.3 で差が見られないことから、bFGF による作用はニューロンに直接働くものと考えられた。また、bFGF による生存維持効果は 20% O<sub>2</sub> では観察されないことから、それらは主として、障害を受けたニューロンに対して働くと考えられた。

次に、障害を受けたニューロンへの NGF および bFGF による機能修復効果を比較した。指標として、神経伝達物質の一つであるアセチルコリン合成酵素 (ChAT) 活性を測定した。その結果、50% O<sub>2</sub> で培養 2 日後のコントロール群、NGF 添加群および bFGF 添加群での ChAT 活性はそれぞれ  $1.3 \pm 0.4$ ,  $3.4 \pm 0.8$  および  $6.6 \pm 1.2$  pmol/min/well であった。このことは、bFGF がニューロンの機能修復にも働くことを示しており、その作用は上述の生存維持効果の結果と合わせ、ニューロンの種類によらない、非特異的なものであることを意味していた。これに対し、NGF による作用は、現在まで知られるように前脳基底野コリン作動性ニューロンに限定されたものであることが予想された。

脳内の異なる部位のニューロンについて、酸素毒性に対する耐性と bFGF による生存維持効果に違いがみられるかを、次に調べた。その結果、高酸素負荷によるニューロン死の生じやすさには

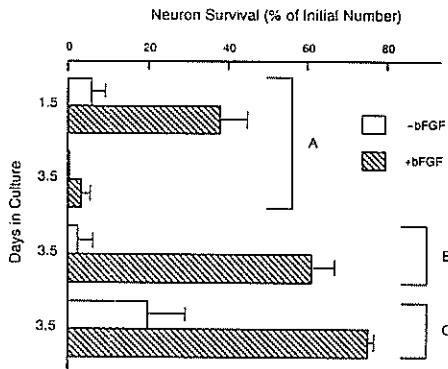


図2. 中枢神経系の種々領域からの培養ニューロンに対する高酸素気相の影響と bFGF の効果  
胎仔 20 日目 (E20) の脳より、新皮質 (A)、前脳基底野 (B) および海馬 (C) を切り出し、パバイン分散をした後、高酸素 (50%) 濃度下で培養した。カルチャープレート上には  $6 \sim 8 \times 10^5$  細胞/cm<sup>2</sup> でまき、50% 気相酸素に設定した炭酸ガスインキュベータ内で 1.5 および 3.5 日間培養した。培養は、血清中に含まれる未知因子やニューロン以外の細胞 (アストログリア細胞など) の影響を防ぐため、細胞増殖阻害剤である 5  $\mu$ M のシトシンアラビノシドを含む完全合成無血清培地 (TIP/DF 培地) を用いた。培養後に生存している細胞をニューロンの特異的なマーカーである抗微小管結合蛋白質 2 (MAP2) 抗体で染色し、その数を比較した。

部位特異性がみられることがわかった。すなわち、新皮質、前脳基底野および海馬から得たニューロンを 50% O<sub>2</sub> で培養したところ、培養 3.5 日後の生存率は、高い順に海馬、前脳基底野、新皮質となった。また、bFGF によるニューロン死の阻止はそれぞれの部位で観察されたが、新皮質に対する効果は他の領域に対するそれに比べ弱いものであった (図2)。これらの違いに関しては、今後、ニューロンの種類やそれらが担う神経機能と酸素ストレスに対する障害の受けやすさ、さらにはそれぞれの部位に作用する神経栄養因子の特異性などを比較しながら、研究を進めていく必要がある。

以上の結果から、酸素ストレスを受けた中枢ニューロンの機能修復および生存維持に神経栄養因子が重要な役割を果たしていることが示された。このことから、酸素ストレスに起因するさま

ざまな神経疾患や、脳の老化過程でみられる精神障害の治療に神経栄養因子が有効な手段となることが期待される。また、本研究で用いた実験系は、神経細胞死研究における最大の問題点、すなわち分子レベルの解析に必要な、量としてのニューロンを得ることを可能にした点で、中枢ニューロン死の細胞内メカニズムのみならず、非分裂細胞であるニューロンに備わる、ストレス応答のメカニズムを調べる上でも有効な実験系となることが期待される。

#### V. 酸素障害による中枢ニューロン死はアポトーシスである

ここまで報告してきたニューロン死が細胞内の自殺プログラムを介したアポトーシスであることを次に明らかにした。すなわち、①ニューロン死の誘導には *de novo* の蛋白質や RNA 合成を必要とする、②細胞死の過程で核内 DNA の断片化が観察される、高濃度カリウムによる脱分極刺激によって L-タイプのカルシウムチャンネルを介した細胞死の阻止が観察された。これらの結果を受け、現在、*bcl-2* 遺伝子によるニューロンへの生存維持効果を調べると共に細胞死の過程で特異的に誘導される蛋白質および遺伝子群について解析を行っている。

プログラムされた細胞死あるいはアポトーシスは、最もよく知られた細胞死の形態の一つであり、個体発生、変態、組織のターンオーバーあるいは  $\gamma$  線の照射に伴う細胞障害時に、細胞内の能動的なプログラムを介して誘導されることが知られている。このタイプの細胞死は、多くの場合、細胞死の誘導に *de novo* 蛋白質および mRNA 合成を必要とすることや、細胞死の過程で約 180 塩基対からなる核内 DNA の断片化などの生化学的な特徴が観察されることが知られている。

末梢および中枢神経系におけるプログラムされた細胞死は、他の臓器とは異なり、主として最終分裂を終え、標的細胞との間にシナプス結合を形成する時期にみられる。この時期のニューロンの生と死は、神経栄養因子およびニューロン間のシナプス結合によって生じる神経活動の二つの因子によって制御されていると考えられている。その

特徴としては、核内 DNA の断片化や蛋白質および RNA 合成阻害剤による細胞死の阻止が観察されるほか、神経栄養因子や高濃度カリウムによる脱分極刺激によってもニューロンの生存が維持されることが知られている。しかしながら、神経系におけるプログラム細胞死の細胞内メカニズムに関しては、ニューロンが非分裂細胞であるがゆえに、分子レベルでの実験に必要な、量としての細胞を得ることが極めて困難であること、さらにはニューロンが極めて多くの種類の細胞からなるヘテロな集団であることなどの理由により、ほとんど研究は進んでいない状況にある。

## VI. おわりに

本研究では、培養下においたラット中枢ニューロンを材料とし、酸素負荷によって誘導されるニューロン死の生化学的な性質を調べた。脳は生体内で最もエネルギー消費の多い臓器の一つであり、それらは酸素とグルコースを用いた好氣的なエネルギー代謝に唯一依存している。このことは非分裂細胞であるニューロンはその長い一生のなかで絶えず酸素ストレスに曝されていることを意味すると同時に、それらを回避するための特別な機構がニューロンに備わっていることを示唆している。また、酸素ストレスは、脳血管障害やパーキンソン病などさまざまな神経疾患の原因となることが示されている。さらに最近、家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) に特異的な運動ニューロンの脱落が、ラジカル消去酵素である Cu/ZnSOD の変異によるとの報告もなされている。このような背景のもと、我々は培養時のインキュベータ内気相濃度を 50% に上げたときに観察されるニューロン死の現象をもとに、酸素ストレスによる神経細胞障害について研究を行ってきた。その結果、

- ① 酸素ストレスに対する耐性は出生の前後で上昇する、
- ② 高酸素負荷による中枢ニューロンおよび PC12h 細胞の死は NGF や bFGF などの神経栄養因子によって防がれることが示された。
- ③ 酸素毒性による培養海馬ニューロンの死が細胞内の能動的なプログラムを経て誘導され

るアポトーシスである。

以上を明らかにした。

最初に述べたように、中枢ニューロンにおける細胞死は、老化や神経疾患に伴う脳の機能低下さらには精神障害の最大の原因の一つに挙げられている。近年、免疫系におけるプログラム細胞死研究が進むにつれ、遺伝的に制御された細胞死に多くの関心が集まってきている。また、免疫系と中枢神経系の類似性から中枢ニューロンでも同様な細胞死の過程が存在することは十分に考えられる。しかしながら、末梢ニューロンならいざ知らず、中枢ニューロンにおける生理的な死が果たしてプログラムされた細胞死なのか、それを裏付けるようなデータは未だ得られていない。中枢ニューロンに対して明らかにアポトーシスを引き起こす要因すら報告されていない状況にある。こうした中で、本稿で紹介したいくつかの中枢ニューロン障害を神経栄養因子が防ぐという知見は、それらの原因にアポトーシスが関わっている可能性を示している点で非常に興味深い。研究が進むにつれ、これ以外の条件でアポトーシスによる中枢神経細胞障害が明らかになることも考えられる。もちろん、新しいニューロン死の形態が中枢神経系においてみつかるとも知れない。中枢神経細胞死の研究は、まだその途についたばかりの状況にある。今後、本稿で紹介したような *in vitro* の実験系が、それらに対する貴重な手がかりを与えてくれることを期待している。

## 発表論文リスト

- 1) Y. Kushima, H. Tsukui, Y. Enokido, C. Nishio and H. Hatanaka (1990): High oxygen atmosphere for neuronal cell culture with nerve growth factor. I. Primary culture of basal forebrain cholinergic neurons from fetal and postnatal rats. *Brain Res.*, 536, 16-22.
- 2) Y. Enokido and H. Hatanaka (1990): High oxygen atmosphere for neuronal cell culture with nerve growth factor. II. Survival and growth of clonal rat pheochromocytoma PC12h cells. *Brain Res.*, 536, 23-29.
- 3) Y. Enokido, Y. Akaneya, M. Niinobe, K. Mikoshiba and H. Hatanaka (1992): Basic fibroblast growth factor rescues CNS neurons from cell death caused by high oxygen atmosphere

- in culture. *Brain Res.*, **599**, 261-271.
- 4) Y. Kushima and H. Hatanaka (1992): Culture of neuronal cells from postnatal rat brain: Application to the study of neurotrophic factors. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. and Biol. Psychiat.*, **5**, 617-633.
  - 5) Y. Enokido and H. Hatanaka (1992): Neurotrophic factors rescue neuronal cell death caused by oxygen toxicity in culture. In *Neurotrophic Factors*, ed. by Y. Tsukada and E. Shooter, Japanese Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 97-108.
  - 6) Y. Enokido, and H. Hatanaka (1993): Apoptotic cell death occurs in hippocampal neurons cultured in a high oxygen atmosphere. *Neurosci.*, in press.
  - 7) Y. Akaneya, Y. Enokido, M. Takahashi and H. Hatanaka (1993): *In vitro* model of hypoxia: Basic fibroblast growth factor can rescue cultured CNS neurons from oxygen deprived cell death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **13**, 1029-1032.
  - 8) Y. Akaneya, M. Takahashi, H. Tsukui and H. Hatanaka (1994): Enhancement of choline acetyltransferase activity in coculture of rat septal and hippocampal neurons. *Brain Res.*, in press
  - 9) M. Yamada and H. Hatanaka (1994): Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Brain Res.*, in press.
  - 10) 畠中 寛 (1991): 神経細胞死と神経栄養因子—神経細胞死概論として—。代謝, **28**, 891-899.
  - 11) 榎戸 靖, 畠中 寛 (1991): 酸素毒性と神経細胞死—培養中枢ニューロンとPC12を用いたモデル系での解析。代謝, **28**, 923-931.
  - 12) 九島洋一, 西尾チカ, 畠中 寛 (1992): 機能細胞の培養とその応用 II, 8) 神経細胞。代謝, **29**, 751-762.
  - 13) 榎戸 靖, 畠中 寛 (1992): 酸素代謝と脳神経細胞死。実験医学, **10**, 2079-2085.
  - 14) 畠中 寛 (1992): ニューロン物語—脳神経系の形成と維持における生と死。科学, **62**, 768-776.
  - 15) 畠中 寛著: 「神経成長因子ものがたり」, 羊土社, 東京, 1992.