

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	李 璇
審査委員	主査 荒木 博陽 副査 前山 一隆 副査 松井 誠司 副査 永井 将弘 副査 森 崇明

論文名

カイニン酸投与後のプロサポシンとその受容体の変化

【審査結果の要旨】 本研究はプロサポシン(PSAP)とその受容体である GPR37、GPR37L1 の動態をカイニン酸投与モデルで検討したものであり、プロサポシンのみならず神経栄養因子に関する重要な研究である。

【はじめに】 PSAP は約 66kDa の糖蛋白質でサポシン A, B, C, D の前駆体である。PSAP 及びサポシンは脳、骨格筋、心筋をはじめ全身の様々な組織で広く発現しており、サポシンではなく前駆体 PSAP の状態でも発現している。また、PSAP は精液、胆汁、膵液、母乳及び脳脊髄液等の様々な分泌液中にも含まれている。GPR37、GPR37L1 は G 蛋白結合型受容体であり、4 年前に発見された(Meyer et al., 2013)。カイニン酸はグルタミン酸アナログで、興奮性神経伝達物質の放出を刺激する神経毒性物質である。申請者らは低用量のカイニン酸投与モデルを用いて海馬等の PSAP の研究を行い、興奮性神経のみならず抑制性神経にも大きな変化のあることを報告しており(Nabeka et al., 2014, 2015)、本研究では主要な抑制ニューロンである小脳のプルキンエ細胞での PSAP とその受容体の変化を研究した。

【材料及び方法】 10 週齢の雄 Wistar ラットを用い、低用量のカイニン酸 (5 mg/kg) を投与し免疫組織化学、免疫蛍光染色、in situ hybridization (ISH) を用いて PSAP とその受容体の変化を検討した。ISH には、数個のアミノ酸配列の差も感知出来る RI を用い AS3 (Pro+9) 型と AS4 (Pro+0) 型の PSAP mRNA の発現の差を検討した。

【結果】 イムノブロットでは抗 PSAP 抗体で約 65 kDa の部分に単一のバンドが見られ、カイニン酸投与後に明らかに増加した。免疫組織化学と免疫蛍光染色ではプルキンエ細胞の細胞体に点状の PSAP 陽性反応が見られたが細胞核には見られなかった。分子層ではインターニューロンも同様の PSAP 陽性反応が見られ、カイニン酸投与後に増強していた。ISH では、カイニン酸投与後に AS3 (Pro+9) 型の PSAPmRNA が増加し AS4 (Pro+0) 型の PSAPmRNA は変化が無かった。受容体に対する抗体によるイムノブロットではカイニン酸投与後 1 日で軽度、3 日で明瞭な GPR37 の減少が認められた。GPR37 の免疫組織化学では、プルキンエ細胞の細胞体、その樹状突起や分子層のインターニューロンに陽性反応が見られたが、カイニン酸投与による変化は認められなかった。

【考察】 PSAP は多機能な蛋白であり、サポシン A-D の前駆体として脂質代謝に関与する一方で、プロサポシンのほぼ全長が細胞外に分泌され神経栄養因子作用を示す (Gao et al., 2013)。本研究結果では、PSAP の発現はカイニン酸投与により増加するという以前からの海馬や大脳皮質での結果と同様に、プルキンエ細胞でもカイニン酸投与後に PSAP は増加していた。ISH の結果でもカイニン酸投与により PSAP 産生が増加することが分かったが、AS4 (Pro+0) 型の PSAPmRNA が増加する海馬や大脳皮質とは逆に、小脳では AS3 (Pro+9) 型の PSAPmRNA が増加していた。申請者ら以外の論文では、両型の違いを ISH で示すことは出来ておらず、極めて重要な新知見であるので、中枢神経系内の他領域を詳細に検討し、さらに次の論文作成を進めている。GPR37 と GPR37L1 はオーハン受容体であり 2013 年になりようやく PSAP 受容体であることが判明したが、中枢神経系での発現量の多さと発現部位の広さから重要な物質であることは以前から想定されていた。本研究では GPR37 は約 50kDa に単一バンドとして認められ、この GPR37 のバンドはカイニン酸投与後に減少しているが、免疫組織化学ではその減少は明瞭には捉えられていない。イムノブロットでは組織全体を、一方免疫組織化学ではプルキンエ細胞に注目して検討していることが原因と思われる。しかし免疫組織化学で用いたパラフォルムアルデヒドやパラフィン包埋が反応性の低下を招いている可能性も否定出来ない。GPR37L1 に関しては GPR37 に似た受容体として知られていたが、ほとんど報告が無い。申請者らが産生した 2 種類の抗体と市販の抗体を用いて研究を行ったが、カイニン酸投与による明瞭な変化を捉えられていない。申請者らの作成した抗体の特異性が低い可能性もある。ただし、申請者らの別のグループの研究ではこの抗体により、グリアに関して明瞭な結果が出ており、GPR37 は神経細胞に、GPR37L1 はグリアに特異的に反応する可能性は高い。そのように考えるならば、今回の結果も納得出来る結果であり、これらの問題点も検討しながらさらに研究を続けたい。

審査会は平成 29 年 1 月 30 日に開催された。発表後の質疑応答では、カイニン酸の投与方法と用量、他の領域における PSAP の発現、AS3 (Pro+9) 型と AS4 (Pro+0) 型の PSAPmRNA の発現様式の違い、受容体 GPR37 と GPR37L1 の違い、GABA と PSAP の関係、PSAP の臨床応用、特に創薬の可能性等について多くの質問が出され、申請者はこれらに的確に回答した。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。