

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	高 慧玲
審査委員	主査 野元 正弘 副査 大西 丘倫 副査 矢野 元 副査 溝上 志朗 副査 森 崇明

論文名 正常および疾患マウスの中樞神経系におけるプロサポシンの発現

審査結果の要旨

本研究は神経栄養因子の一種とされるプロサポシンが正常および疾患モデル（パーキンソン氏病及び筋ジストロフィー）の脳内において、どのように神経栄養因子作用を示すかを検討したものである。プロサポシンの神経栄養因子作用はサポシンCに由来する18個の合成アミノ酸(PS18)で代用出来ることが知られている。

【パーキンソン氏病モデル動物】

パーキンソン氏病モデルは、MPTP投与マウスを用いた。それに対応する培養系実験としてSH-SY5Y神経芽細胞にMPTPの代謝物であるMPP+を加えて神経細胞障害を惹起した。MPTP投与マウスに2.0 mg/kgのPS18を投与すると行動障害を軽減することがopen field試験により明らかとなった。このときチロシン水酸化酵素(TH)陽性神経細胞の減少が押さえられること、黒質のアストロサイトの活性が抑えられることが免疫組織化学により明らかとなった。さらに、PS18はc-Jun, BAX, caspase-3を抑制し、Bcl-2を増加させることによりMPTPにより惹起されたアポトーシスから細胞を保護していることが判明した。一方、SH-SY5Y細胞の培養系では、5mMのPS18投与によりMPP+による核の変形と細胞死が抑制された。また、PS18に蛍光色素であるFAMを結合させ(PS18-FAM)、細胞内動態を可視化しコンフォーカル顕微鏡で追跡した。正常のSH-SY5Y細胞内に取り込まれたPS18-FAMは最初の5分間は小さな顆粒として認められた。15分後には顆粒は大きくなり、30分後に蛍光が最も強くなり、120分後には観察されなくなった。一方、5 m

M の MPP+による障害を受けた細胞では 15 分後には顆粒はむしろ小さくなり、30 分後にはさらに減少し、60 分後には観察されなくなった。このことは MPP+による障害を受けた細胞では PS-18 が細胞の障害を修復するためにすみやかに使用されたものと考えられる。また、培養系においても PS18 は c-Jun, BAX, caspase-3 を抑制し、Bcl-2 を増加させることにより MPP+により惹起されたアポトーシスから細胞を保護していることが判明した。

【筋ジストロフィーモデル】

審査請求者の所属する研究グループではすでに、筋ジストロフィーのモデル動物として用いられている mdx マウスにおいて筋内のプロサポシンが減少していることを報告している。本研究では mdx マウスの中樞神経系でもプロサポシン及び mRNA が減少していることを初めて明らかにした。本研究で用いたプロサポシンに対する抗体は、プロサポシンが切断されてサポシンに変化する際に消失する部分の配列に対して作られており、プロサポシンには反応するが、切断されて酵素として働くサポシン A, B, C, D のいずれとも反応しない特異性の高い抗体である。本抗体を用いて、mdx マウス及び正常の C57BL マウス中樞神経系におけるプロサポシンの分布を免疫組織化学、免疫ブロットにより、さらに in situ hybridization によっても検討した。免疫組織化学、免疫ブロットは上記の特異抗体を用いた常法により行った。プロサポシンは 9bp を含む型 (Pro+9) と含まない型 (Pro+0) が知られている。in situ hybridization はプロサポシンの 2 型を区別出来る放射性同位元素標識プローブを用いて行った。免疫組織化学、免疫ブロットにより、プロサポシンは mdx マウスの海馬、大脳皮質、小脳を含むほとんどの部分で正常動物よりも減少していることが分かった。in situ hybridization でも同様にプロサポシンの mRNA は幼若および成体 mdx マウスで減少していることが分かった。また、その減少は主として Pro+9 型の減少によるものであった。また、mdx マウスにおいて、リン酸化 ERK1/2 が強く活性化されていることも明らかになり、mdx マウス脳内の神経障害は活性化された ERK によるプロサポシンの減少に起因する可能性が示された。さらに、2013 年に発見されたプロサポシン受容体に対する抗体を用いた免疫組織化学により、受容体も mdx マウスで減少していることが判明した。また脳脊髄液内のプロサポシン濃度には違いは観察されなかった。mdx マウス脳内におけるプロサポシン産生が減少しているものの、その受容体も減少しており、結果的に脳脊髄液内のプロサポシン濃度が正常に保たれている可能性もある。プロサポシンとジストロフィンの関係については過去に報告はなく、明確なメカニズムは不明であるが、プロサポシンや受容体の分布から両者の間には深い関係があることが考えられる。上記の 2 つの研究により正常および疾患動物モデルの神経系においてプロサポシンが重要な働きを有することが明らかとなった。

本学位論文の審査会は平成 26 年 2 月 5 日に開催された。発表後、本研究に対して以下のような質疑応答がなされた。プロサポシンの運動神経、特にコリン作動性神経、感覚神経、及び他部位の神経細胞への影響、本研究以外の虚血やアルツハイマー病への PS18 の効果、PS18-FAM の細胞内動態、PS18 の脳内濃度、他の栄養因子との関係、PS18 の臨床応用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。申請者は、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があることを審査員全員一致で確認した。