

(第 12 号様式)

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 高 慧 玲

学位論文名 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

学位論文の要約

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】（Gao et al. *Neuroscience*2013, 236:373-393, 主論文 1）
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。また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。免疫プロテオミクスにより MPTP は JNK1 と JNK2 のリン酸化型を増やした。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、5 mM 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 分後には見えなくなった。一方、5 mM 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 分後には見えなくなった。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】（Gao et al. *PLOS ONE* 2013, 8, (1-15), 主論文 2）
我々は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 C57 BL マウス中枢神経系におけるプロサポシンの分布を免疫組織化学、イムノブロット、in situ hybridization により検討した。免疫組織化学、イムノブロットは上記の特異抗体を用いて常法により行った。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を用いて行った。免疫組織化学、イムノ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 ERK 1/2 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が活性化された 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認められなかった。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。

主論文：

1, Attenuation of MPTP/MPP+ Toxicity in vivo and in vitro by an 18-mer Peptide Derived from Prosaposin, H Gao, C Li, H Nabeka, T Shimokawa, S Saito, ZY Wang, Y Cao, S Matsuda, Neuroscience, 236:373-393, 2013

2, Decrease in prosaposin in the dystrophic mdx mouse brain, H Gao, C Li, H Nabeka, T Shimokawa, N Kobayashi, S Saito, ZY Wang, Y Cao, S Matsuda, PLOS ONE, 8: 1-15, 2013.