

学位論文審査結果の要旨

氏名	細田 能希
審査委員	主査 羽藤 直人 副査 上野 修一 副査 矢野 元 副査 福田 光成 副査 尾形 直則

論文名 神経系におけるプロサポシンの局在と mRNA 発現部位
審査結果の要旨

【緒言】プロサポシン(PS)は4種類のスフィンゴ脂質活性化蛋白(サポシンA, B, C, D)をドメインとして含む524個のアミノ酸残基からなる蛋白質である。サポシンは肝臓、脾臓に豊富に存在しているのに対して、PSは脳、筋肉、脳脊髄液などに豊富に存在している。PSは中枢神経系の正常な発育に不可欠であり、特に脳では発生期に豊富に出現し、脳脊髄液等の細胞外液にも豊富に存在するため、神経細胞の分化・保護・生存に関わる神経栄養因子であると考えられている。以前、学位申請者のグループは、サポシンC抗体を用いて中枢神経内でのPSの分布を報告した。本研究では、神経系におけるPSの細胞内局在を免疫電顕法により、PSmRNAの局在をin situ hybridization (ISH)によりそれぞれ同定し、発現細胞およびその発現様式の解析を行った。

【実験方法】8週齢雄ウィスターラットの神経組織をホモジナイズし60℃で10分間加熱、遠心し上清をSDS-PAGEにかけ抗サポシンD抗体でウェスタンブロットを行った。免疫染色ではラットを4%パラフォルムアルデヒドで還流固定し、大脳、三叉神経節、後根神経節を採取しパラフィン切片を作成し、抗サポシンD抗血清を用いた。免疫電子顕微鏡用の試料は還流固定後、三叉神経節、後根神経節、交感神経節、ラセン神経節等を採取し、10%, 20%, 30%のグリセリン溶液に2時間浸漬させた後、冷却無水アルコールで急速凍結した。その後-80℃冷却5%酢酸ウランにより凍結置換し、LR whiteにて重合させた。チタン製メッシュ上の超薄切片の片側を抗サポシンD抗体、15nm金コロイドで標識した。洗浄、乾燥の後に切片の他側を抗カテプシンD抗体と5nm金コロイドで標識した。ISHは定法に従い、凍結切片に希釈した各プローブを200 μ l/slide滴下し、42℃で一晩インキュベートした。暗箱に入れ4℃で3週間感光させ現像し、顕微鏡で検鏡した。

【結果】後根神経節、三叉神経節のウェスタンブロットでは約 66 kDa の単一バンドが見られ PS と考えられた。免疫電顕での二重染色ではほとんど全ての PS 陽性反応はライソゾームマーカーであるカテプシン D 陽性反応と同じ細胞内小器官に存在した。逆にカテプシン D 陽性反応は必ずしも PS と共存しなかった。大脳皮質の免疫反応は、光学顕微鏡ではライソゾーム様構造として認められた。電子顕微鏡では比較的境界明瞭な 200-500nm 程度のライソゾーム内と共に、小型のライソゾームにも PS 反応が認められた。大型ライソゾーム内の PS 反応は不均一で電子密度の高い部分に密集し、低電子密度部分にはほとんど認められなかった。三叉神経節、後根神経節、交感神経節において神経細胞体にハイブリダイゼーションシグナルが認められた。

【考察】抗サポシン B 及び D 抗血清を用いた脳、後根神経節、三叉神経節のウェスタンブロットでは約 66 kDa の場所に単一の PS と思われるバンドが見られた。このことから、神経系ではサポシンはほとんど含まれず、PS の形で存在すると考えられ、本研究での免疫反応はほぼ PS の反応といえる。さらに免疫電顕所見では PS がライソゾーム内に未分解で存在していると考えられ、興味深い現象であり、神経細胞中のライソゾーム内では PS の分解が進まない何らかの機構が有ると考えざるを得ない。血小板では PS がライソゾーム酵素とともに分泌されることが報告されており、神経系においても自己分泌の可能性も高い。PS は神経細胞におけるアポトーシス抑制効果を有する。本研究でも、PS mRNA は主に神経細胞に認められたため、PS は軸索伸長やミエリン形成の促進に加えて、自己分泌機構により神経細胞自身のアポトーシスを防いでいるのではないかと考えられる。本研究結果は、PS が中枢神経系のみならず末梢神経細胞でも産生されることを示した。PS は中枢及び末梢神経傷害時の有効な治療薬となる可能性が示唆された。

本論文は、2007 年に *Cell Tissue Res* (IF3.3) に掲載された。ラット末梢神経の神経細胞質にプロサポシンが局在することを初めて証明しており、明瞭な結果と十分な考察が提示されている。公開審査会は、平成 27 年 1 月 20 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で発表し、以下の内容を含む多くの質問に対し日本語で的確に応答した。1) プロサポシン局在の意義、2) 神経細胞のアポトーシス予防へのプロサポシンの関与、3) ライソゾーム内にプロサポシンが存在する理由、4) プロサポシンの分泌および移送様式、5) 末梢神経障害に対する治療応用への将来展望など。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、本論文が博士（医学）の学位授与に値すると判定した。