

氏名	木村 郁夫
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第592号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	中枢神経系において高発現する新規分泌性因子 Neudesin の同定および神経細胞の分化と生存維持における役割

論文調査委員 (主査) 教授 伊藤 信行 教授 中山 和久 教授 根岸 学

論文内容の要旨

神経栄養因子は、その神経保護作用から脳・神経系疾患に対する治療薬への可能性が高く期待されている。また近年、神経細胞に対する生存維持活性だけではなく神経栄養因子は神経分化にも深く関わっていることが明らかとなり神経分化、再生医療の観点からも非常に有用な因子である可能性が示唆されている。よって申請者は脳・神経系に高発現する機能未知な新規分泌性因子 Neudesin を単離・同定し、神経系におけるその機能について詳細な検討を行った。

第一章 新規分泌性因子 Neudesin の同定

DNA database 上より分泌性シグナルを指標として新規分泌性因子をコードすると予想され機能不明な human および mouse 遺伝子を見出し、後に神経栄養活性を持つことがわかったため、Neudesin (neuron-derived secreted neurotrophic factor) と命名した。mouse Neudesin は171アミノ酸からなり、human Neudesin との相同性は90.7%であった。また他の既知のタンパクと homology の存在しないユニークな因子でもあった。さらに Neudesin はその N 末端側に典型的な分泌性シグナル配列を所持していたことから実際に Neudesin タンパクを発現させ、その分泌能を検討した結果 Neudesin は培養上清中に検出され、分泌因子として細胞間の情報伝達になんらかの影響を与えていることが示唆された。

第二章 神経細胞の生存維持に関与する神経栄養因子としての Neudesin

Neudesin が生体のどの部位においてどの時期に機能するかについて検討を行った。結果、mouse 胎児期においては脳、脊髄等の中枢神経系に高発現することがわかった。また、生後の脳発達過程における Neudesin の発現変化を検討した結果、脳全体において発現がみられたがその中でも特に大脳皮質、海馬、視床下部等において強い発現がみられ、その発現は発達を通し常に維持されていた。さらに Neudesin の発現細胞はグリア細胞でなく主に神経細胞であることがわかった。

よって神経細胞に対する Neudesin の活性を mouse 大脳皮質初代培養系により検討した。結果、Neudesin は神経細胞に対し生存維持活性を持つことがわかった。また、Neudesin のグリア細胞に対する影響をアストロサイト、ミクログリア単離培養法を用い検討した結果、これらのグリア細胞に対し Neudesin は細胞増殖活性を持たないことがわかった。次にこの Neudesin の神経栄養活性をもとにこれらの活性に関与する重要な細胞内シグナル経路として知られている MAPK および PI3K 経路の活性化について検討した結果、それぞれの経路に関与する細胞内タンパクである ERK1/2 および Akt のリン酸化が Neudesin 添加により顕著に亢進することがわかった。また Neudesin の生存維持活性は MAPK、PI3K 経路それぞれの阻害剤によって顕著に抑制された。よって Neudesin は MAPK、PI3K 経路を活性化することにより神経細胞に対し生存維持活性を発揮することがわかった。さらにこれらの Neudesin による MAPK 経路の活性化および生存維持活性は Gi/o 型 G 蛋白共役型受容体阻害剤により顕著に抑制された。これより Neudesin は神経細胞に対し Gi/o 型の GPCR を受容体として介する可能性が示唆された。

第三章 神経栄養因子 Neudesin の神経細胞分化に対する影響

mouse 胎児期においても Neudesin が脳および培養神経系前駆細胞に発現していることから未分化神経細胞に対する

Neudesin の影響について検討した。13日目胎児脳より回収した培養神経系前駆細胞を用い検討した結果、Neudesin タンパク処置により神経系前駆細胞の細胞増殖にはほとんど変化がみられなかったが、無処置細胞と比較し顕著に神経細胞の全体に対する割合が上昇していた。さらにこの時、神経分化に関与する転写因子群の上昇も確認されたことから、Neudesin は神経分化を促進することがわかった。また神経細胞時と同様に Neudesin 添加により MAPK, PI3K 経路の活性化が確認された。また cAMP-PKA 経路に関与する転写因子 CREB のリン酸化亢進についても確認できた。さらにこの ERK のリン酸化及び CREB のリン酸化は G_s 型 GPCR に関与すると考えられる PKA の阻害によって顕著に抑制されたが Gi/o 型阻害によってはほとんど抑制されなかった。

以上の結果より、脳・神経系に高発現する新規分泌性因子 Neudesin は GPCR を受容体として介し、未分化神経細胞に対しては G_s 型 GPCR, 神経細胞に対しては Gi 型 GPCR を優勢的に介する可能性が示唆された。また Neudesin は未分化神経細胞に対し、神経細胞への分化を誘導すること、分化後の神経細胞においては、神経栄養活性を持つことがわかった。今後、さらなる Neudesin の機能及び他の因子との相互作用を明らかにすることにより、神経分化、再生、脳・神経系疾患に対する予防・治療薬の開発応用に対し、有用な知見を提供するものと期待される。

論文審査の結果の要旨

神経栄養因子は、その神経保護作用から脳・神経系疾患に対する治療薬への可能性が高く期待されている。また近年、神経細胞に対する生存維持活性だけでなく神経栄養因子は神経分化にも深く関わっていることが明らかとなり神経分化、再生医療の観点からも非常に有用な因子である可能性が示唆されている。よって申請者は脳・神経系に高発現する機能未知な新規分泌性因子 Neudesin を単離・同定し、神経系におけるその機能について詳細な検討を行った。

DNA database 上より分泌性シグナルを指標として新規分泌性因子をコードすると予想され機能不明な human および mouse 遺伝子を見出し、後に、神経栄養活性を持つことがわかったため、Neudesin (neuron-derived secreted neurotrophic factor) と命名した。mouse Neudesin は171アミノ酸からなり、human Neudesin との相同性は90.7%であった。また他の既知のタンパクと homology の存在しないユニークな因子でもあった。さらに Neudesin はその N 末端側に典型的な分泌性シグナル配列を所持していたことから実際に Neudesin タンパクを発現させ、その分泌能を検討した結果 Neudesin は培養上清中に検出され、分泌因子として細胞間の情報伝達になんらかの影響を与えていることが示唆された。

Neudesin が生体のどの部位においてどの時期に機能するかについて検討を行った。結果、mouse 胎児期においては脳、脊髄等の中枢神経系に高発現することがわかった。また、生後の脳発達過程における Neudesin の発現変化を検討した結果、脳全体において発現がみられたがその中でも特に大脳皮質、海馬、視床下部等において強い発現がみられ、その発現は発達を通し常に維持されていた。さらに Neudesin の発現細胞はグリア細胞でなく主に神経細胞であることがわかった。

よって神経細胞に対する Neudesin の活性を mouse 大脳皮質初代培養系により検討した。結果、Neudesin は神経細胞に対し生存維持活性を持つことがわかった。また、Neudesin のグリア細胞に対する影響をアストロサイト、ミクログリア単離培養法を用い検討した結果、これらのグリア細胞に対し Neudesin は細胞増殖活性を持たないことがわかった。次にこの Neudesin の神経栄養活性をもとにこれらの活性に関与する重要な細胞内シグナル経路として知られている MAPK および PI3K 経路の活性化について検討した結果、それぞれの経路に関与する細胞内タンパクである ERK1/2 および Akt のリン酸化が Neudesin 添加により顕著に亢進することがわかった。また Neudesin の生存維持活性は MAPK, PI3K 経路それぞれの阻害剤によって顕著に抑制された。よって Neudesin は MAPK, PI3K 経路を活性化することにより神経細胞に対し生存維持活性を発揮することがわかった。さらにこれらの Neudesin による MAPK 経路の活性化および生存維持活性は Gi/o 型 G 蛋白共役型受容体阻害剤により顕著に抑制された。これより Neudesin は神経細胞に対し Gi/o 型の GPCR を受容体として介する可能性が示唆された。

mouse 胎児期においても Neudesin が脳および培養神経系前駆細胞に発現していることから未分化神経細胞に対する Neudesin の影響について検討した。13日目胎児脳より回収した培養神経系前駆細胞を用い検討した結果、Neudesin タンパク処置により神経系前駆細胞の細胞増殖にはほとんど変化がみられなかったが、無処置細胞と比較し顕著に神経細胞の全体に対する割合が上昇していた。さらにこの時、神経分化に関与する転写因子群の上昇も確認されたことから、Neudesin は

神経分化を促進することがわかった。また神経細胞時と同様に Neudesin 添加により MAPK, PI3K 経路の活性化が確認された。また cAMP-PKA 経路に関与する転写因子 CREB のリン酸化亢進についても確認できた。さらにこの ERK のリン酸化及び CREB のリン酸化は G_s 型 GPCR に関与すると考えられる PKA の阻害によって顕著に抑制されたが Gi/o 型阻害によってはほとんど抑制されなかった。

以上の結果より、脳・神経系に高発現する新規分泌性因子 Neudesin は GPCR を受容体として介し、未分化神経細胞に対しては G_s 型 GPCR, 神経細胞に対しては Gi 型 GPCR を優勢的に介する可能性が示唆された。また Neudesin は未分化神経細胞に対し、神経細胞への分化を誘導すること、分化後の神経細胞においては、神経栄養活性を持つことがわかった。今後、さらなる Neudesin の機能及び他の因子との相互作用を明らかにすることにより、神経分化, 再生, 脳・神経系疾患に対する予防・治療薬の開発応用に対し、有用な知見を提供するものと期待される。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成18年2月27日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。