

氏名	いちかわまさき 市川正樹
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第695号
学位授与の日付	平成15年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	新規網膜神経タンパクPTB-like proteinの神経分化・再生における役割に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 赤池昭紀 教授 佐藤公道 教授 伊藤信行

論文内容の要旨

悪性腫瘍随伴網膜症cancer-associated retinopathy (CAR) は悪性腫瘍に随伴する網膜変性疾患であり、直接的な腫瘍の転移や浸潤によらず遠隔効果によって引き起こされることが知られている。CARは最終的には失明に至る重篤な疾患であり、その発症機構としては癌が何らかの機序により網膜に対する自己抗体を産生する自己免疫機序が指摘されている。しかし、その詳細には不明の点が多く、有効な治療方法も確立されていない。そこで、著者は、CAR患者の血清を用いて自己免疫反応にかかわる新たな網膜神経タンパクの検索を行い、polypyrimidine tract binding protein (PTB) の新規ホモログPTB-like protein (PTBLP) を見いだすとともに以下の新知見を得た。

第一章 新規神経特異的RNA結合タンパクPTBLPのクローニング

CAR患者の血清と反応する網膜由来抗原についてラット新生仔網膜のcDNAライブラリーを用いて検索した結果、新規な網膜由来タンパクとしてPTBLPのクローニングに成功した。PTBLPは532アミノ酸からなり、RNA結合タンパクであるPTBと73.5%の相同性を有し、機能ドメインとして核局在シグナルおよびRNA認識モチーフ(RRM)を有していた。全長のPTBLP(PTBLP-L)は4つのRRMを有していた。一方、そのスプライスバリエーションであるPTBLP-Sでは2つのRRM(RRM3とRRM4)が欠如しており、RNA結合能もPTBLP-Lと比較して顕著に弱いものであった。RT-PCR解析によりPTBLP mRNAの発現を検討したところ、網膜と脳で発現が確認されたのに対して、肝臓、腎臓、膵臓、肺などの他の臓器での発現は認められず、神経系に特異的なタンパクであると考えられた。そこで、ウサギより調製した抗PTBLP抗体を用いて免疫染色を行った結果、成熟ラット網膜においては神経節細胞層および内顆粒層に強い発現が認められた。ラット出生後の発現推移の解析により、網膜、脳ともに出生直後にはPTBLPが強く発現しておりその後成長とともに減少するが、網膜では成熟動物でも一定の発現が維持されるのに対して脳では発現がほとんど認められなくなることが明らかになった。これらの結果より、PTBLPは、網膜を含む中枢神経系のニューロンの分化・成長に関与し、特に視覚情報を網膜から脳に伝える網膜神経節細胞においては成長後の機能維持にも関与するRNA結合タンパクであると推定された。

第二章 網膜虚血再灌流モデルにおける成熟ラット海馬由来神経幹細胞(AHSC)の移植

CAR患者血清中に含まれる網膜タンパクに対する自己抗体は網膜視細胞および網膜神経節細胞と反応することが知られており、これら網膜神経細胞が変性・死滅する結果として不可逆性の視覚障害に至ると考えられている。視覚障害を回復させる有力な手段の1つとして移植再生治療が考えられているが、網膜細胞を移植しても宿主側の網膜に侵入できないなどの理由により、治療法として実現されるに至っていない。また、CARの適当な病態モデルがないこともこの種の研究を遅らせてきた一因と言える。網膜虚血再灌流モデルでは、主に網膜神経節細胞および内網状層に障害が惹起され、虚血の程度に応じて障害の度合いを変化させることができ、神経細胞死を抑制する薬物によりその障害が抑制された。すなわち、CARの病態の一部を反映する実験モデルと考えられた。神経幹細胞であるAHSCを硝子体に移植すると、虚血再灌流により障害された網膜神経節細胞層から内網状層にAHSCが侵入し周辺細胞と神経ネットワーク様の構造を呈し、神経マーカ

一であるMAP2を発現していた。これらの結果より、障害を受けた網膜部位にAHSCは侵入し神経細胞に分化し得ることが示唆された。AHSCは未分化状態では神経細胞としての特徴を有していないにも関わらず、神経細胞に特異的であるPTBLPが発現していた。したがって、AHSCの神経細胞への分化にPTBLPが関与すると推定され、網膜の移植再生治療の実現を図る上でも、PTBLPの解析が重要な基礎的資料を提供すると考えられた。

第三章 神経の分化・成長過程におけるPTBLPの機能解析

神経の分化・成長過程におけるPTBLPの機能を解明する目的で、PC12細胞を用いた研究を行った。未分化PC12細胞ではPTBLPは細胞核に限局していたが、神経成長因子（NGF）により神経に分化させると細胞核のみならず細胞質にもPTBLPが分布することが免疫学的手法により明らかとなった。この神経分化過程においてPTBLP-Sの発現が一過性に亢進した。PTBLPの機能を詳細に検討する目的でPC12細胞にPTBLP-LとPTBLP-Sを強制発現し、NGFによる神経分化に対する影響について細胞形態を指標に検討した結果、NGFの神経分化作用はPTBLP-Lの強制発現により顕著に抑制されたが、PTBLP-Sは影響を及ぼさなかった。神経分化マーカーであるニューロフィラメント（NF）の発現を指標とした同様の検討でも、PTBLP-Lの強制発現によりNGFによるNF発現亢進が顕著に抑制されることが確認された。PTBLP-LがNGFの分化誘導に影響を及ぼすのに対してNGFによる神経分化過程で発現が変化するのはPTBLP-Sであったことから、PTBLP-SがPTBLP-Lに対する制御因子として働くことが推定された。そこで、PTBLP-LとPTBLP-Sを共発現させPTBLP-Lの分化抑制に及ぼす影響を検討したところ、未分化PC12細胞ではPTBLP-LとPTBLP-Sがいずれも細胞核に共局在するが神経分化によりPTBLP-Lのみが細胞質全域に広がり神経突起の先端部にも分布すること、さらに、PTBLP-SがPTBLP-Lの神経分化抑制作用に対して拮抗的に働くことが明らかになった。これらの結果より、PTBLP-Lは未分化時に細胞核において神経分化に対して抑制的に働き、NGFによる神経分化時にPTBLP-Sが一過性に誘導されるとPTBLP-Lは細胞質に移動して神経分化を促進すると結論された。

以上、著者は、CAR患者血清を用いて新規神経特異的RNA結合タンパクPTBLPを見だし、その機能としてRNA結合能と細胞内局在の変化による神経分化制御作用を明らかにした。本研究の成果は、神経分化・成長におけるPTBLPの機能解明に重要な知見を提供するとともに、CARの発症機序の解明および網膜への神経幹細胞移植治療のための重要な基礎的資料を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

悪性腫瘍随伴網膜症cancer-associated retinopathy (CAR)は悪性腫瘍に随伴する網膜変性疾患であり、その発症機構としては癌が何らかの機序により網膜に対する自己抗体を産生する自己免疫機序が指摘されている。本論文は、CAR患者の血清を用いて自己免疫反応にかかわる新たな網膜神経タンパクの検索を行い、polypyrimidine tract binding protein (PTB)の新規ホモログPTB-like protein (PTBLP)を見出し、神経の分化・成長過程におけるPTBLPの機能解析を行ったものである。

CAR患者の血清と反応する網膜由来抗原についてラット新生仔網膜のcDNAライブラリーを用いて検索した結果、新規な網膜由来タンパクとしてPTBLPのクローニングに成功した。PTBLPは532アミノ酸からなり、RNA結合タンパクであるPTBと73.5%の相同性を有し、機能ドメインとして核局在シグナルおよびRNA認識モチーフ（RRM）を有していた。全長のPTBLP（PTBLP-L）は4つのRRMを有していた。一方、そのスプライスバリエントであるPTBLP-Sでは2つのRRM（RRM3とRRM4）が欠如しており、RNA結合能もPTBLP-Lと比較して顕著に弱いものであった。RT-PCR解析によりPTBLP mRNAの発現を検討したところ、網膜と脳で発現が確認されたのに対して、肝臓、腎臓、膵臓、肺などの他の臓器での発現は認められず、神経系に特異的なタンパクであると考えられた。そこで、ウサギより調製した抗PTBLP抗体を用いて免疫染色を行った結果、成熟ラット網膜においては神経節細胞層および内顆粒層に強い発現が認められた。これらの結果より、PTBLPは、網膜を含む中枢神経系のニューロンの分化・成長に関与し、特に視覚情報を網膜から脳に伝える網膜神経節細胞においては成長後の機能維持にも関与するRNA結合タンパクであると推定された。

次いで、網膜虚血再灌流モデルにおける成熟ラット海馬由来神経幹細胞（AHSC）の移植とAHSC細胞の分化におけるPTBLPの役割を検討した。ラット網膜虚血再灌流モデルでは、主に網膜神経節細胞および内網状層に障害が惹起され、虚

血の程度に応じて障害の度合いを変化させることができ、神経細胞死を抑制する薬物によりその障害が抑制された。神経幹細胞である AHSC を硝子体に移植すると、虚血再灌流により障害された網膜神経節細胞層から内網状層に AHSC が侵入し周辺細胞と神経ネットワーク様の構造を呈し、神経マーカーである MAP2 を発現していた。AHSC は未分化状態では神経細胞としての特徴を有していないにもかかわらず、神経細胞に特異的である PTBLP が発現していたおり、AHSC の神経細胞への分化に PTBLP が関与すると推定された。

そこで、神経の分化・成長過程における PTBLP の機能を解明する目的で、PC12 細胞を用いた研究を行った。未分化 PC12 細胞では PTBLP は細胞核に局限していたが、神経成長因子 (NGF) により神経に分化させると細胞核のみならず細胞質にも PTBLP が分布し、この神経分化過程において PTBLP-S の発現が一過性に亢進した。PTBLP の機能を詳細に検討する目的で PC12 細胞に PTBLP-L と PTBLP-S を強制発現し、NGF による神経分化に対する影響について細胞形態を指標に検討した結果、NGF の神経分化作用は PTBLP-L の強制発現により顕著に抑制されたが、PTBLP-S は影響を及ぼさなかった。そこで、PTBLP-L と PTBLP-S を共発現させ PTBLP-L の分化抑制に及ぼす影響を検討したところ、未分化 PC12 細胞では PTBLP-L と PTBLP-S がいずれも細胞核に共局在するが神経分化により PTBLP-L のみが細胞質全域に広がり神経突起の先端部にも分布すること、さらに、PTBLP-S が PTBLP-L の神経分化抑制作用に対して拮抗的に働くことが明らかになった。これらの結果より、PTBLP-L は未分化時に細胞核において神経分化に対して抑制性に働き、NGF による神経分化時に PTBLP-S が一過性に誘導されると PTBLP-L は細胞質に移動して神経分化を促進すると結論された。

以上、著者は、CAR 患者血清を用いて新規神経特異的 RNA 結合タンパク PTBLP を見出し、その機能として RNA 結合能と細胞内局在の変化による神経分化制御作用を明らかにした。本研究の成果は、神経分化・成長における PTBLP の機能解明に重要な知見を提供するとともに、CAR の発症機序の解明および網膜への神経幹細胞移植治療のための重要な基礎的資料を提供するものである。

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15年4月25日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。