

氏 名	やま くに ひさ し 山 國 尚 志
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 676 号
学位授与の日付	平 成 14 年 9 月 24 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	ラット中枢神経系における leukemia inhibitory factor およびその受容 体の発現と機能に関する分子薬理学的研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 公 道	教 授 市 川 厚	教 授 伊 藤 信 行
--------	----------------------	-----------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

Leukemia inhibitory factor (LIF) は、種々の細胞の増殖、分化、生存に影響を与える多機能なサイトカインであり、神経系においては、感覚神経と運動神経の生存を促進すること、培養交感神経細胞をアドレナリン作働性からコリン作働性に転換する分化誘導因子として働くことが明らかにされている。一方、中枢神経系においては LIF mRNA 発現報告はされてはいるものの、その発現調節や産生細胞、あるいはその受容体の分布や発現細胞等は殆ど不明のままである。そこで著者は、ラット脳内における LIF の発現調節およびその産生細胞、LIF 受容体 mRNA の発現細胞および LIF の機能に関する研究を行い、以下の新知見を得た。

第一章 ラット由来培養神経細胞およびグリア細胞における LIF mRNA 発現調節

中枢神経系では、正常ラット脳において LIF mRNA 発現が認められ、さらにカイニン酸投与や脳損傷によってその発現量が著明に増大することが報告されている。この LIF mRNA の発現増加は、神経興奮による神経伝達物質の遊離や損傷した神経から漏出する物質によって誘導されている可能性が考えられる。ラット由来の培養アストロサイト、ミクログリアおよび神経細胞を用いて、LIF mRNA 発現に対する acetylcholine, dopamine, isoproterenol, serotonin, glutamic acid, NMDA, kainic acid, ATP および GABA (各 1 mM, 1 時間処置) の作用についてノザンプロット解析により検討したところ、培養アストロサイトへの ATP 処置によって非常に強い LIF mRNA 発現が認められた。培養ミクログリアおよび神経細胞では、各々、ATP および glutamic acid によって弱い LIF mRNA 発現がみられた。培養アストロサイトでの ATP (100 PM) による LIF mRNA 発現誘導は処置 1 時間で最大となり、4 時間では消失していた。また、培養アストロサイトでの LIF mRNA 発現に対する ATP およびその加水分解物の作用強度は、ATP > ADP > AMP = adenosine > inosine であり、ATP の効果がその加水分解物ではなく、ATP 自身によるものであることが示された。ATP, UTP および類縁化合物を用いて培養アストロサイトでの LIF mRNA 発現誘導の強度を検討し、ATP の作用は主として P2Y₂ および P2Y₄ プリン受容体を介していることを明らかにした。また、RT-PCR 法により培養アストロサイトでのこれら受容体 mRNA の発現を確認した。

第二章 LIF 受容体 mRNA の脳内における発現の検討

脳内で発現する LIF の役割を明らかにするためには、その作用点である受容体の発現部位および発現細胞を検討する必要がある。ラット LIF 受容体 cDNA の部分配列 (約 900 塩基) を RT-PCR 法にてクローニングしたところ、既に報告されているマウス LIF 受容体 cDNA の対応する塩基配列との間に、86% の相同性が認められた。次いで、このラット LIF 受容体 cDNA の部分配列を利用して、脳内 LIF 受容体の発現分布を in situ hybridization 法で検討したところ、LIF 受容体 mRNA 発現は脳内で広範囲に観察された。特に、顔面神経核、三叉神経運動核、赤核、疑核および脊髄運動神経などの運動系に関連する脳部位ならびに三叉神経主知覚核、蝸牛神経腹側核および後根神経節などの感覚系に関連する部位に特に強く発現していた。また、大脳皮質や海馬などでも中程度の発現が見られた。さらに、LIF 受容体 mRNA のシグナルの大部分は、ニッスル染色で薄く染まる大型の核を持つ、神経細胞と推測される細胞上に観察されたので、脳内では LIF が神経

細胞に対して作用する可能性が示唆される。

第三章 ラット大脳皮質由来神経細胞に対する LIF の作用

脳内 LIF 受容体 mRNA の発現が神経細胞に認められたことより、ラット胎仔から調製した大脳皮質由来神経細胞を用いて、LIF の作用について検討した。培養神経細胞における LIF 受容体 mRNA の発現は非常に強いものであるが、LIF の添加はそれをさらに増強した。培地から血清を除去することによって誘発される生存細胞数の減少に対して、LIF は影響を及ぼさなかった。神経伝達物質合成酵素および神経ペプチド前駆体の遺伝子発現に対する効果を RT-PCR 法により検討したところ、choline acetyltransferase, GAD₆₅, GAD₆₇, enkephalin, dynorphin, substance P, somatostatin, galanin の各 mRNA 発現には影響を与えず、nociceptin mRNA 発現だけを特異的に増加させた。これらの結果から、LIF が神経細胞上の受容体に作用して少なくとも nociceptin の生合成を特異的に調節していることが明らかとなった。

本研究結果は、興奮した神経細胞から遊離した、あるいは傷害をうけた神経細胞から漏出した ATP がアストロサイトに作用して LIF を産生・遊離させ、その LIF がニューロン上に存在する受容体に作用して、少なくとも nociceptin の産生を特異的に調節する可能性を示している。本成果は、脳内において生理的あるいは病態生理的に重要な役割を果たしていると考えられる神経細胞とアストロサイトとの細胞間相互作用の物質的基盤の一端を明らかにしたものである。

論文審査の結果の要旨

脳内で協役的存在と考えられていたグリア細胞は、最近、ニューロンの機能を積極的に調節する役割を担っていて、ニューロン・グリアの相互連関が神経機能にとって重要であると考えられるに至っている。一方、免疫系・造血系細胞で産生され、細胞増殖・分化などを調節する情報伝達分子として研究されてきたサイトカイン類が、神経系においても機能を発現していることが次第に明らかにされつつある。その一つである leukemia inhibitory factor (LIF) は、当初マウス骨髄性白血病細胞株 M1 細胞の増殖を抑制して好中球への分化を誘導する因子として同定され、その後末梢神経系に対して神経栄養因子/分化誘導因子としても作用することが判明したが、中枢神経系での産生細胞や発現調節、その受容体の発現分布や発現細胞などはほとんど不明のままであった。そこで著者は LIF の脳での生理的/病態生理学的役割の解明を目指し、これらの諸点について検討を加え、以下の如き新知見を得た。

第一章 ラット由来培養神経細胞およびグリア細胞における LIFmRNA 発現調節

正常ラット脳では LIFmRNA 発現が認められ、さらに癌薬投与や脳損傷によりその発現が著明に増大することが知られているので、そのような場合に遊離あるいは漏出する神経伝達物質または関連物質の LIFmRNA 発現に対する影響をラット由来の培養アストロサイト、ミクログリアおよび神経細胞を用いて調べた。アセチルコリン、ドパミン、イソプロテレノール、セロトニン、グルタミン酸、NMDA、カイニン酸、GABA、ATP の各 1mM を 1 時間処理したところ、培養アストロサイトでは ATP によってのみ非常に強い LIFmRNA 発現が認められたが、培養ミクログリアおよび神経細胞では ATP およびグルタミン酸により弱い発現が見られたのみであった。培養アストロサイトでの ATP (100 μ M) による LIFmRNA 発現誘導は、処置 1 時間で最大になり、4 時間では消失した。さらに、ATP のこの作用は、ATP 自身によるものであり、ATP の受容体サブタイプのうち主として P2Y₂ および P2Y₄ を介していることを示した。

第二章 LIF 受容体 mRNA の脳内における発現の検討

ラット脳内での LIF 受容体 mRNA の発現分布を in situ hybridization 法で調べた結果、運動系の顔面神経核、三叉神経運動核、赤核、脊髄前角など、感覚系の三叉神経主知覚核、後根神経節などに特に強く発現していること、大脳皮質や海馬などでも中程度に発現していることが判明した。さらに、LIF 受容体 mRNA のシグナルの大部分は神経細胞と考えられる細胞上に観察された。すなわち、脳内では LIF は神経細胞に作用する可能性が示唆される。

第三章 ラット大脳皮質由来神経細胞に対する LIF の作用

ラット胎仔から調整・培養した大脳皮質由来神経細胞には LIF 受容体 mRNA が強く発現していた。この培養細胞において血清除去により誘発される細胞死に対して LIF は保護効果を示さなかった。また、アセチルコリン合成酵素 (アセチルトランスフェラーゼ)、GABA 合成酵素 (GAD₆₅, GAD₆₇)、およびエンケファリン、ダイノルフィン、サブスタンス P、ソマトスタチン、ガラニンの各前駆体蛋白質の mRNA 発現に対して LIF は影響を与えなかった。しかし、LIF はノシセプ

チン前駆体蛋白質 mRNA を著明に発現誘導した。

以上、著者は、興奮したニューロンから遊離あるいは傷害を受けた神経細胞から漏出した ATP がアストロサイトに作用して LIF を産生・遊離させ、その LIF がニューロン上に発現している受容体に作用し、少なくともノシセプチンの産生を調節することを明らかにした。本成果は、生理学的あるいは病態生理学的に重要な神経細胞—アストロサイト間相互作用の物質的基礎の一端を明らかにしたものである。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成14年7月22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。