

氏 名	あら かわ よし き 荒 川 芳 輝
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2649 号
学位授与の日付	平成 15 年 9 月 24 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	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Control of axon elongation via an SDF-1 α / Rho / mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. (初代培養小脳顆粒細胞における SDF-1 α / Rho / mDia 経路の軸索伸展制御機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大森治紀 教 授 井出千束 教 授 金子武嗣 教 授 橋本信夫

論 文 内 容 の 要 旨

神経細胞の軸索突起形成・伸展は、神経回路網の形成・成熟を規定するために必須な形態変化である。これらの軸索突起形成・伸展、ならびに神経細胞移動、樹状突起形成、成長円錐ガイダンスにはさまざまな細胞内制御機構が働いているが、その一つとして Rho 情報伝達系の果たす役割は非常に大きいと注目されている。しかしながら、Rho シグナルが神経形態を制御する際に、実際に生理的シグナルの下流で活性化されるのか、活性化を受ける Rho 標的分子が存在するのかは、明らかではなかった。そこでマウス生後一日齢初代培養小脳顆粒細胞を用い Rho の上流と下流のシグナル伝達を解明することを試みた。

Rho シグナルの活性化経路としては、ケモカインの Stromal Derived Factor-1 α (SDF-1 α) およびそのレセプター CXCR4 に注目した。なぜなら、SDF-1 α は脳軟膜に多く存在し、かつリガンド・受容体のいずれの欠損マウスにおいても海馬や小脳で顆粒細胞の細胞移動障害・層形成異常が報告されていたためである。そこで SDF-1 α /CXCR4 による小脳顆粒細胞の形態制御と Rho 情報伝達系の関与について検討した。まず小脳顆粒細胞の初期軸索形成・伸展という視点で観察すると、SDF-1 α は低濃度で軸索伸展を増強し、高濃度で軸索形成を抑制することが明らかとなった。次に、これらの作用は Rho を直接阻害する C3 菌体外酵素処理で消失され、Rho 活性依存的な神経細胞に対する SDF-1 α の作用と考えられた。さらに SDF-1 α が低濃度、高濃度においても Rho 活性を上昇させることも明らかにした。このとき Rac 活性の明らかな上昇は認めなかった。

Rho の標的分子である p160ROCK が軸索形成を抑制することが証明されていたため、高濃度 SDF-1 α による軸索形成抑制作用が Rho/ROCK 経路によるものと考えた。実際、ROCK 阻害薬は SDF-1 α の軸索形成抑制作用を解除した。これにより SDF-1 α /CXCR4 経路が Rho の活性化を介し高濃度では軸索形成抑制を行っていることを明らかにした。

さらに、高濃度 SDF-1 α 添加時に、軸索形成抑制を ROCK 阻害薬で解除すると、軸索伸展が著しく増強することを見出した。この現象は低濃度で生じる軸索伸展増強の存在と併せて考えると、Rho の下流に軸索伸展作用を示す標的分子の存在が推定された。このような Rho 下流分子の候補として mDia1 の機能に着目した。mDia1 は、培養系線維芽細胞においてプロフィリンと結合しアクチン重合に働き、アクチン束や微小管の並行化を促し、細胞伸長に寄与していることが示されていた。そこで mDia1 が神経細胞では軸索伸展活性を有するのではないかと考えた。

初代培養小脳顆粒細胞の軸索突起形成に対する mDia1 の機能を解析した。リポフェクション法にて mDia1 およびその変異体を過剰発現し、その表現型を観察した。Rho 結合部位と C 末端を切除した活性型変異体 mDia1- Δ N3 の過剰発現は、突起形成部位にアクチンやチューブリンの異常な集積を生じた。しかし、ROCK 阻害により actomyosin 収縮性を低下させると、逆に対照ベクターに比べ有意な軸索伸展増強を引き起こした。これは、高濃度 SDF-1 α 投与時の ROCK 阻害薬存在下の表現型と類似していた。これに対し、抑制型変異体 mDia1- Δ N3 (Hind III) の発現は、高濃度 SDF-1 α 投与時の突起伸展を有意に阻害した。これらの実験は、SDF-1 α /CXCR4/Rho/mDia1 経路が小脳顆粒細胞の軸索伸展を制御していることを

強く示唆していた。この可能性を mDia1 RNA 干渉法による mDia1 蛋白のノック・ダウンを用いてさらに検証した。mDia1 蛋白のノック・ダウンは SDF-1 α 添加時・ROCK 阻害下の軸索伸展を完全に抑制した。これらの解析により軸索伸展の正の制御に mDia1 が必須であることを証明した。

以上の結果は、Rho 情報伝達系が軸索突起伸展形成に対する負の制御だけでなく、正の制御をも担っていることを示している。すなわち、Rho が ROCK と mDia1 を協調的に制御することで軸索突起形成・伸展がバランスよく生じ、回路網形成のために最適な条件を生み出している可能性を示唆するものである。これらの新たな知見は損傷神経軸索の機能的再生を誘導するための新たな戦略を与えるもので、Rho 伝達経路の操作の臨床応用への可能性を具体的に証明するものである。

論文審査の結果の要旨

低分子量 G 蛋白 Rho は、神経系で軸索形成・伸展などの形態制御の一担を担っているとされるが、この際に Rho 情報伝達系がどのような生理的シグナルで活性化されるのか、また、どのような標的分子に働いてその作用を発揮するのか等についての知見は乏しい。一方、ケモカインである SDF-1 α は神経発生初期に働くことが報告されてきたが、その作用機序も不明である。

申請者は、マウス生後一日齢初代培養小脳顆粒細胞を用い、まず SDF-1 α が濃度依存的に Rho の活性を増加させること、また低濃度では Rho 依存的に軸索伸展を促進させるが、高濃度では逆に促進作用を抑制することを発見した。さらに、この高濃度 SDF-1 α による軸索形成の抑制作用が Rho より標的分子 ROCK に至る経路により行われることを明らかにした。また、ROCK とは異なる Rho 標的分子 mDia1 の活性型及び抑制型変異体を神経細胞に発現させることにより、mDia1 が ROCK と反対に軸索伸展を促進することを示した。さらに RNA 干渉法により mDia1 のノックダウンを行い、これにより SDF-1 α で促進される軸索伸展が完全に抑制されることも示した。以上の結果から、Rho の下流で 2 つの分子 mDia1 と ROCK が神経軸索の形態制御をしていること、前者は促進的に、後者は抑制的に働くこと、この見かけ上対立する作用は、SDF-1 α による Rho 活性化の程度により制御されていることが明らかとなった。

以上の研究は神経細胞の軸索伸展機構の解明に貢献し、神経細胞生物学および神経再生学に寄与するところが多い。

したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成15年6月16日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。