

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	浅井 眞人
学位論文題目 Modification Mechanism of MCC-257 and Fatty Acids on Neurite Outgrowth -The Relation with Gene Expression of Epidermal Fatty Acid-Binding Protein (E-FABP)- MCC-257 および脂肪酸による神経突起成長の修飾機構 －上皮性脂肪酸結合蛋白質(E-FABP)の遺伝子発現と関連して－ 共著者名 上堀勢位嗣、伊藤博史、牧野 勲 未公表 研究目的 nerve growth factor (NGF)は神経細胞の増殖、形態形成、神経突起成長に関与し、NGF のレセプターである tyrosine kinase receptor for neurotrophins (TrkA)の二量体化を高め、さらに extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)のリン酸化を強め、上皮性脂肪酸結合蛋白質(Epidermal-Fatty Acid Binding Protein; E-FABP)などの軸索構成蛋白に関与する遺伝子を発現させ、神経突起の成長を促進することが報告されている(引用文献 1)。 最近になって糖脂質である gangliosid GM1 の分子模倣物質である MCC-257 が開発され、本物質は NGF-TrkA signaling の促進作用を有することが注目されている(Sekimoto S, et al, unpublished data, 1999)。 一方、神経細胞の突起成長に対して、n-3 脂肪酸の Docosahexaenoic acid (DHA)は突起長を伸長させ、n-6 脂肪酸の Arachidonic acid (AA)は伸長を抑制することが明らかにされている(引用文献 2)。しかし、脂肪酸による神経突起成長に対する分子生物学的な機構については断片的な報告が多く、不明な部分が少なくない。とりわけ脂肪酸による E-FABP 遺伝子発現様相については報告がない。E-FABP は元来、グリア細胞やニューロンの細胞質内に存在し、細胞質内で脂肪酸の運搬を行うが、一方で脂肪酸比を調節することによって膜組成の変化、神経突起の成長に関与すると考えられている(引用文献 3)。 そこで本研究は PC 12 細胞の神経突起の伸長様相を MCC-257、DHA、AA について比較検討し、併せて E-FABP 遺伝子発現を取り巻く細胞内情報伝達系の機構を明らかにすることを目的とした。			

材料・方法

1) 細胞と培地

細胞は末梢神経の研究に広く用いられているラット副腎髄質クロム親和性細胞 (rat pheochromocytoma cell; PC12 細胞) を用いた。基本培地は Dulbecco's MEM (Low) 培地に 5% 牛胎児血清、5% 馬血清、50U/mL Penicillin G、50 μ g/mL Streptomycin を添加したものを使用した。

2) 試薬

PC12 細胞の分化誘導には神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) を使用した。MCC-257 (MW; 692.97) は三菱ウエルファーマ社から提供されたものを使用した。MCC-257 の培地濃度は 10 μ mol/L に統一した。本研究で用いた脂肪酸は Docosahexaenoic acid (DHA)、Arachidonic acid (AA) である。基本培地に対する脂肪酸の濃度は 150 μ mol/L に統一した。

3) 神経突起長の測定操作

IWAKI 社製 Type I collagen-coated G. B. Dish with 55 μ m grid/8mm glass に PC12 細胞を 5×10^3 cells/ m^2 の細胞数で培養し、MCC-257、脂肪酸、さらに脂肪酸に MCC-257 を加えた培地に交換後、NGF (75ng/mL) を加え、3、6、9 日目に光学顕微鏡で神経細胞の形態変化を写真に撮影した。神経突起長の計測は 55 μ m グリッド上で視野における細胞同士接着の無い細胞を 10 個無作為に選択した。1 個の細胞から出る神経突起をすべて実測し、総突起長を突起数で割り算して神経 1 個あたりの平均神経突起長を算出し、10 個の平均を算出した。同様な操作を異なる 5 視野で繰り返し測定した。

4) 定量的 RT-PCR 法による E-FABP mRNA の測定

神経突起長の測定時と同一条件で 6 日間培養した PC12 細胞における、E-FABP 発現量の変化を検討した。AGPC 法により RNA を抽出し、Random Primer 法を用いて c-DNA 作成した。Genbank; S83247 を参考にして作成した E-FABP primer で PCR 反応を行い、E-FABP mRNA の発現量を測定し、各条件における E-FABP mRNA 発現量を比較した。

5) E-FABP mRNA 発現調節に関わる細胞内情報伝達系機構の検討

細胞は NGF で分化させた PC12 細胞を用いた。基本培地、MCC-257 および DHA 添加培地で 12 時間培養した後、extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) の inhibitor である U0126 (10 μ mol/L) を加え、古典的 MAPK 系のシグナル伝達を抑制し、経時的に E-FABP mRNA 発現の変化を定量的 RT-PCR 法により測定した。

6) 統計

一元配置分散分析で検定を行い、各組み合わせについて多重比較検定を行った。 $P < 0.05$ (有

意水準 5%) をもって統計学的な有意差ありと判定した。

成績

1) MCC-257、DHA、AA による神経突起成長の変化

対照群を含めいずれの添加群も培養日数の経過により神経突起長の伸長が認められた。

MCC-257、DHA 単独添加群、さらに MCC-257 と DHA 併用添加群は培養 3、6、9 日目においては対照群に対して有意に突起伸長を認め、その程度は三群とも比肩するものであった。しかし、各培養日の突起伸長率を突起長の平均値で計算すると、培養初期の 3 日目における突起伸長率は対照群に比し MCC-257 単独群 84.8%、MCC-257 と DHA 併用群 108.0%であり、MCC-257 は培養初期に作用効果が著しいことをうかがわせた。

AA 単独添加群では神経突起成長は抑制され、MCC-257 と AA の併用添加群では MCC-257 による AA の抑制効果を改善するには至らなかった。

2) MCC-257、DHA、AA による E-FABP mRNA 発現様相

培養 6 日目の E-FABP mRNA 発現量は MCC-257、DHA 単独添加および、MCC-257 と DHA 併用添加により有意に増加するのを認めた。

一方、AA 単独群での E-FABP mRNA 発現量は低下を認めたが、AA と MCC-257 併用添加では対照群との間に有意差を認めなかった。これらの所見は E-FABP mRNA の発現が突起伸長の程度と正の相関を有することを示唆している。

3) U0126 による E-FABP mRNA 発現の抑制

U0126 で ERK1/2 活性を抑制し、基本培地、MCC-257 ないし DHA 添加培地における E-FABP mRNA 発現量を経時的に測定した。基本培地、DHA 添加培地に U0126 を加えると、E-FABP mRNA 発現量は 2 日目より徐々に低下し、6 日目には 1/2 程度に減少するが、消失までには至らなかった。一方、MCC-257 添加は抑制が遅れて 4 日目から認められた。これらの所見は MCC-257 が初期段階より効果発現するためなのかもしれない。以上の所見から MCC-257 および DHA による E-FABP mRNA 発現シグナル伝達は ERK1/2 を介する MAPK 系であり、DHA の活性部位は ERK1/2 より上流であることをつきとめた。

考案

今回の研究から三菱ウエルファーマ社により開発された ganglioside 様作用を有する MCC-257 には神経突起の伸長能と E-FABP mRNA の発現誘導能を認め、その程度は DHA の場合と比肩するものであった。しかし、突起伸長率から見ると、MCC-257 単独および MCC-257 と DHA 併用添加による突起伸長率は添加培養初期の 3 日目に効果が著しく、本所見は MCC-257 の特徴を示している可能性がある。NGF による神経突起の伸長にはこれまで TrkA が NGF との結合により活性化され、mitogen-activated protein kinase (MAPK) のスーパーファミリーである

ERK1/2 の持続的なリン酸化を生じ、軸索構成蛋白や E-FABP に関する遺伝子発現により軸索が形成されると考えられている。今回の研究から、MCC-257 の神経突起の成長は上記 MAPK 系シグナル伝達経路を介するものと思われるが、一方で DHA 添加による E-FABP 誘導機構も ERK1/2 を介するシグナル経路が利用されており、その活性部位は ERK1/2 かそれより上流である。しかし、ERK1/2 抑制実験で E-FABP 遺伝子発現の消失に至らなかったことより、それ以外の経路による遺伝子発現の調節機構が関与している可能性がある。したがって脂肪酸の細胞内伝達機構の解析は更なる検討が必要である。

結論

MCC-257 と DHA は E-FABP mRNA の発現誘導を高め、古典的 MAPK 系シグナル伝達を介して末梢神経の分化を促進する物質として有益であり、特に MCC-257 は末梢神経障害の治療薬として利用しうる可能性がある。

引用文献

1. Laura J. Klesse, Luis F. Parada. Trks: signal transduction and intracellular pathways. *Microscopy research and technique*. 1999; 45: 210-216
2. Atsushi Ikemoto, Tetsuyuki Kobayashi, Shiro Watanabe, Harumi Okuyama. Membrane fatty acid modifications of PC12 cells by arachidonate or docosahexaenoate affect neurite outgrowth but not norepinephrine release. *Neurochem. Res.* 1997; 22: 671-678
3. Aukje W. Zimmerman, Jacques H. Veerkamp. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002; 59: 1096-1116

参考論文

1. 上堀勢位嗣、伊藤博史、宮内和誠、石関哉生、浅井真人、柏谷朋、牧野勲：頻回の嘔吐を伴う糖尿病性胃不全麻痺にドンペリドン坐剤が著効した 1 例. *糖尿病* 2002 45 巻 8 号 : 605-611

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	浅 井 眞 人
<u>審査委員長 吉 田 成 孝 ㊞</u> <u>審査委員 牧 野 勲 ㊞</u> <u>審査委員 谷 口 隆 信 ㊞</u>			
学 位 論 文 題 目			
Modification mechanism of MCC-257 and fatty acids on neurite outgrowth (MCC-257 および脂肪酸による神経突起成長の修飾機構)			
本論文の概要 本論文はガングリオシド様薬物である MCC-257 の神経突起伸長作用をそのメカニズムと共に検討したものである。 研究方法の適切性 本論文は神経細胞分化能をもつ褐色細胞腫由来の PC12 細胞を培養しこれに神経成長因子 (NGF) を添加して神経細胞に分化したものに、MCC-257、arachidonic acid (AA)、docosahexaenoic acid (DHA) および U0126 を添加して突起の長さの測定、RT-PCR による E-FABP mRNA 半定量を行った。いずれも確立した手法であり、統計処理も適切に行われている。			

新規性

以前に得られていた本研究に関連する主な知見は次の通りである：(1) gangliosides は trk を介する神経成長因子の突起伸長を促進する；(2) gangliosides の突起伸長促進作用は MAP キナーゼ系である ERK1/2 を介する。本論文ではこれらに加え以下の知見を示した：(1) ganglioside 様分子 MCC-257 は PC12 細胞に対し突起伸長促進効果があった。；(2) 脂質分子 DHA は MCC-257 と同様の突起伸長促進効果があったが AA は突起伸長を抑制した。；(3) これらの分子による突起伸長への作用には脂質結合タンパクである E-FABP mRNA の変化が伴った。(4) E-FABP の変化は ERK1/2 の阻害剤である U0126 添加により阻害された。以上の様に本論文により PC12 細胞の軸索伸長に対して MCC-257 の関与を示す新たな重要な知見が加えられた。

科学的小よび医学的意義

本論文は MCC-257 の神経突起伸長作用を明らかとし、末梢神経障害の治療への展開に重要な論文と判断できる。

論文の構成

本論文は適切に考察され構成も適当である。

論文提出者に対して本論文および関連領域に関する試問に対し適切な応答が得られ十分な学力を有することが示された。

以上より、本審査委員会は本論文を学位論文として適切なものであると判断した。