

論文内容の要旨

申請者氏名 何 小萍

中枢神経系の損傷に引き続き、神経細胞やグリア細胞の変性、細胞外マトリックスの分解、炎症反応、貪食反応及びそれに続く脱髄や再髄鞘化などの様々な現象が生じる。この病態の理解は、中枢神経障害に対する治療法の開発に必須である。組織型プラスミノゲンアクティベータ(tPA)をはじめとするプロテアーゼは、中枢神経障害時に必須の機能を果たしている。ニューロプシンは、トリプシン型のセリンプロテアーゼで、通常は、海馬の錐体細胞を始めとする大脳辺縁系の神経細胞に特異的に発現し、学習記憶やキンドリングなどの神経可塑性に関与していることが明らかとなっている。しかし、ニューロプシンの病態での機能は明らかとなっていない。そこで、本研究では、中枢神経系の障害時にニューロプシンの発現、機能について明らかとすることを目的とした。

実験にはddY, C57BL/6系のマウスおよび、ニューロプシン遺伝子ノックアウトマウスを用いた。中枢神経に対する障害として、マウス海馬にカイニン酸の注入(1.5 nmolもしくは0.6 nm)および視神経切断を行った。ニューロプシン遺伝子発現は凍結切片に対しin situハイブリダイゼーション法にて観察した。ニューロプシンの免疫染色は抗ニューロプシンモノクローナル抗体、B5を用いた。

まず、マウス海馬にカイニン酸を注入して、ニューロプシンmRNAの発現を観察した。カイニン酸により海馬の錐体細胞の細胞死が生じ、錐体細胞でのニューロプシンmRNA発現は当然のことながら消失した。しかしながら、海馬の線維束である白板に新たにニューロプシンmRNAを発現する細胞が4-8日後をピークに現れた。ニューロプシンmRNA陽性細胞の77.9%がproteolipid protein (PLP) mRNA陽性であり、成熟オリゴデンドロサイトがニューロプシンmRNAを新たに発現するようになることが明らかとなった。さらに、軸索損傷とニューロプシン発現について検討するために視神経切断を行い、切断後の視神経におけるニューロプシンmRNAと蛋白質の発現を観察した。ニューロプシンmRNAは視神経切断後4日後をピークとして視神経のオリゴデンドロサイトに発現した。免疫組織化学法による検討で、海馬内カイニン酸投与後、白板を始めとする線維層と切断後の視神経においてニューロプシン免疫陽性細胞が観察された。免疫電子顕微鏡法でオリゴデンドロサイトの細胞体および陽性細胞周囲のミエリンに免疫陽性反応が認められた。精製したミエリンにリコンビナントニューロプシンを作用させた結果、ミエリン塩基性蛋白質がニューロプシンにより分解を受けることが明らかとなった。ニューロプシンノックアウトマウスの視神経切断を行うと野生型のマウスのものに比べミエリンが有意によく保存されていることが明らかとなった。

以上の結果より、ニューロプシンは中枢神経損傷後にオリゴデンドロサイトに特異的に発現しミエリン塩基性蛋白質等のミエリン関連蛋白質を分解することで脱髄に関与していることが強く示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 何 小萍

中枢神経系の損傷には脱髄が伴う。ミエリンには軸索伸長を抑制する因子が存在することはよく知られており、損傷後の中枢神経の再生の上で極めて重要なステップであると考えられる。これまで、脱髄のメカニズムは外来性のマクロファージの貪食によるものと漠然と考えられてきたが、中枢神経系内の細胞の積極的な関与を示す知見はほとんどなかった。また、ミエリンは様々なプロテアーゼによる分解を受けることという報告はこれまでも見られたが、いずれもトリプシンなど脳内には存在しないプロテアーゼであり、どのよなメカニズムで脱髄が生じているかの具体的な知見には乏しかった。この様な中で本研究は中枢神経損傷後にのみオリゴデンドロサイト特異的に発現するプロテアーゼであるニューロプシンを見いだした。さらに発現時期が脱髄がはじまるとされる損傷後2-4日後にピークがあることを明らかとし、また、プロテアーゼ蛋白質の局在がオリゴデンドロサイトの細胞体のみならずミエリン自身にもあることを光学顕微鏡および電子顕微鏡レベルでも示し、脱髄への関与の可能性を示した。さらに、生化学的検討により、ニューロプシンがミエリンの主要構成蛋白質のミエリン塩基性蛋白質を選択的に分解する活性があることも明らかとした。本研究について特記すべきことはこの様なin vitroのデータのみだけでなくノックアウトマウスを用いたin vivo 実験においてニューロプシンの有無で脱髄の程度に明らかな差異が生じていることを示している点である。すなわち、ニューロプシンノックアウトマウスでは視神経切断によっても脱髄が著しく抑制されることを示した。これらの結果をもとに、ニューロプシンの特異的な作用の考察を行った。

以上のように、本論文は中枢神経損傷時にオリゴデンドロサイトに特異的に発現するプロテアーゼを世界ではじめて同定し、その発現と機能をin vivo でも明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値のあるものと認めた。