



Title	Mouse semaphorin HによるPC12細胞突起伸長作用の解析
Author(s)	阪井, 丘芳
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155623
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	坂 井 丘 芳
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 7 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 2 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	「Mouse semaphorin H による PC12細胞突起伸長作用の解析」
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松矢 篤三 (副査) 教 授 栗栖浩三郎 講 師 天野 敦雄 講 師 中川 一路

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

セマフォリン (Semaphorin) は知覚神経軸索の反発因子として見出され、神経系の発達期における軸索誘導に関与する分子として知られている。近年、我々も神経回路形成機構を解明する過程でいくつかのセマフォリン分子を同定し、その一つである Mouse Semaphorin H (MSH) は胎性期より生体内において発現し、知覚神経成長円錐に対して退縮 (collapse) させる作用をもち、軸索に対して反発作用 (chemorepulsion) をもつことを明らかにした。しかしながら、この分子の神経系培養細胞に及ぼす影響およびその情報伝達機構の解析はほとんど行われていない。

本研究では Nerve Growth Factor (NGF) に応答して神経様細胞への分化能を有する PC12細胞 (ラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞株) を用いて、MSH の同細胞へ及ぼす作用および細胞内情報伝達機構について解析した。

【研究方法と結果】

1. MSH の PC12細胞に対する作用

NIH3T3 細胞に MSH アルカリフォスファターゼ (AP) 融合蛋白 (MSH-AP) または AP の発現ベクターを導入した。それぞれの培養上清を回収後、限外濾過し、PC12細胞に添加し、MSH-AP または AP の PC12細胞に及ぼす作用を調べた。その結果、PC12細胞は MSH-AP の添加により NGF と同様に神経突起を伸長したが、AP の添加では神経突起の伸長は認められなかった。この作用は濃度依存性であり、抗 AP 抗体を作用させると神経突起の伸長が阻害されたことから、MSH が特異的な受容体を介して PC12細胞の神経突起伸長を誘導することが示唆された。

2. MSH の作用における細胞内情報伝達機構の解析

1) Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の関与

PC12細胞を MAP kinase kinase (MEK) 1/2 阻害剤である PD98059で前処理したところ、NGF を作用させた場合と同様に MSH 添加による PC12細胞の神経突起の伸長は阻害された。この結果は MSH の情報伝達機構における MAPK の関与を示唆している。そこで、MSH 添加による MAPK の活性化を経時的に測定した。MSH および NGF の刺激を加えた PC12細胞の細胞成分を回収し、電気泳動を行い、抗リン酸化 MAPK 抗体を用いた Western blot 法に

より MAPK の活性化の検出を行ったところ、MSH 添加により MAPK の一過性のリン酸化の亢進が確認された。

2) *ras* 遺伝子産物の関与

Dominant negative 変異体 *ras* 遺伝子を導入した PC12細胞と control vector を導入した PC12細胞に対する MSH-AP および NGF の神経突起を伸長させる作用を検討したところ、いずれも著明に神経突起伸長は抑制された。したがって MSH の情報伝達機構において *ras* 遺伝子産物の関与が考えられた。

3) NGF 受容体 Trk の関与

PC12細胞を TrkA tyrosine kinase 阻害剤 K-252a で前処理したところ、NGF を作用させた場合と異なり、MSH を添加した PC12細胞の神経突起伸長は阻害されなかった。この結果は MSH は NGF と異なり TrkA を介さない情報伝達機構を有していることが示唆された。

4) Protein kinase C (PKC) の関与

PC12細胞を PKC 阻害剤である Calphostin C および Gö6983 で前処理したところ、NGF を作用させた場合と同様に MSH 添加による PC12細胞の神経突起伸長は阻害された。このことから MSH は NGF と同様に PKC を介した情報伝達機構を有していることが示唆された。

5) MAPK のリン酸化に対する細胞外カルシウムの関与

PC12細胞をカルシウムキレート剤 EGTA で前処理したところ、NGF を作用させた場合とは異なり、MSH を添加した PC12細胞の MAPK のリン酸化が阻害された。また、L 型、N 型のカルシウムチャンネル阻害剤で前処理すると、NGF を作用させた場合とは異なり、神経突起伸長は阻害された。以上の結果から MSH による PC12細胞の神経突起伸長の過程に細胞外カルシウムの流入が重要な働きをしていることが示唆された。

【結語】

知覚神経軸索の反発因子である MSH が神経系培養細胞である PC12細胞の突起伸長を誘導することを見出した。また、神経突起伸長を誘導する MSH の情報伝達機構は、Ras, PKC, MAPK の活性化と細胞外カルシウムの流入を必要とすることを明らかにした。本来、神経軸索の反発因子として同定された MSH が神経系培養細胞の突起伸長を誘導することは、この分子が生体内においては複数の機能を有して軸索誘導に働く可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

Mouse Semaphorin H (MSH) は知覚神経軸索に対する反発因子として見いだされたものであるが、その神経系に対する作用や機序については十分解明されていない。本研究はセマフォリンの新たな機能を解明する目的で Nerve Growth Factor (NGF) に応答して神経様突起を伸長する PC12細胞（ラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞株）を用いて、MSH の同細胞に及ぼす影響およびその細胞内情報伝達機構について検討したものである。

その結果、MSH が PC12細胞の突起伸長を誘導することを見出した。また、突起伸長を誘導する MSH の情報伝達機構は、Ras, PKC, MAPK の活性化と細胞外カルシウムの流入を必要とすることを明らかにした。本来、神経軸索の反発因子として同定された MSH が神経系培養細胞の突起伸長を誘導することは、同分子が生体内において複数の機能を有して軸索誘導に働く可能性を示唆している。

本研究はセマフォリンの機能を解明する上で重要な知見を得たものであり、博士（歯学）の学位請求に値するものと認める。