

Title	Functional inhibition of the p75 receptor using a small interfering RNA
Author(s)	樋口, 晴久
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43926">https://hdl.handle.net/11094/43926</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	樋口晴久
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17673 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Functional inhibition of the p75 receptor using a small interfering RNA (siRNA を用いた神経栄養因子受容体 p75 の機能阻害)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 秀樹 (副査) 教授 遠山 正彌 教授 吉峰 俊樹

#### 論文内容の要旨

##### [ 目 的 ]

NGF に代表されるニューロトロフィン<sup>1</sup>はニューロンの生存、分化、突起伸展、アポトーシスに<sup>2</sup>関与することが知られており、そのシグナルを細胞内に伝達するために Trk 受容体と p75 受容体を利用する。Trk 受容体は細胞内領域にチロシンキナーゼ活性を持つ<sup>3</sup>のに対して p75 受容体は細胞内領域に既知の酵素活性領域や蛋白結合領域を持たない<sup>4</sup>ためにそのシグナル伝達機構についてはあまりよく<sup>5</sup>解明されていなかった。最近のノックアウトマウスを用いた実験の結果、ニューロトロフィンによって活性化された p75 受容体は低分子量 G 蛋白質 Rho を不活性化することによって神経突起の伸展に<sup>6</sup>関与することが示された。またシュワン細胞においては JNK を活性化することによってアポトーシスに<sup>7</sup>関与することが示された。我々は NGF による p75 受容体の活性化には、Protein kinase A (PKA) によるセリン残基のリン酸化が必要であり、その結果 p75 受容体が脂質ラフトに移動することがシグナル伝達に重要な役割を果たすことを示してきた。一方、我々は中枢神経の再生阻害因子である Myelin associated glycoprotein (MAG) が p75 受容体を介して、ニューロトロフィンとは逆に Rho を活性化することによってシグナルを伝えることを明らかにし、<sup>8</sup>脊髄損傷などの中枢神経損傷の治療において p75 受容体の重要性が注目されている。しかしながらこれらの研究で用いられた細胞は発生段階から p75 受容体を欠損するために、明らかとなった p75 受容体の機能がその直接的関与によるものか間接的関与によるものかについては判定できない。そこで我々は p75 受容体を標的とした small interfering RNA (siRNA) を野生型細胞に導入し p75 受容体の発現を選択的にノックダウンすることによって、p75 受容体が直接的に関与する生物学的機能について検討した。

##### [ 方法ならびに成績 ]

マウス p75 受容体遺伝子のエクソン 2 を標的とする 23 塩基対の二重鎖 RNA を 3' 端に 2 塩基のオーバーハングを付加して合成した (p75-siRNA)。これを陽イオンリポソーム法を用いてマウス培養シュワン細胞と、マウス培養後根神経節細胞に導入した。p75-siRNA を導入することによってこれらの細胞における内因性 p75 受容体が効率よく発現抑制されることを蛋白レベルで確認した。NGF 添加によるシュワン細胞のアポトーシスは p75-siRNA を導入す

ることによって効果的に抑制されたことから、このシグナルにはp75受容体が直接的に関与していることが示された。また、MAG添加による後根神経節細胞の神経突起退縮もp75-siRNAを導入することによって効果的にブロックすることができたことから、このシグナルにもp75受容体が直接的に関与していることが示された。

[ 総 括 ]

p75-siRNAを導入することによって内因性のp75受容体の発現を抑制することがほ乳類神経細胞で可能になった。また、後根神経節細胞に導入することでニューロンはMAGに不応性になり、旺盛な突起伸展を示した。p75受容体はMAGを始めとするいくつかの中枢神経再生阻害物質のシグナル伝達に関与することで注目されているが、生体内においてp75-siRNAを神経細胞に効率よく導入させることが可能になれば脊髄損傷などの中枢神経損傷に対して再生を促進する効果を期待することができる。

論文審査の結果の要旨

本研究は神経細胞においてsiRNAを用いたp75受容体蛋白の発現抑制が可能であることを示した。これまでのp75受容体の機能解析はノックアウトマウス由来の組織、細胞を用いた報告が多いが、本研究の結果は、siRNAを導入することによってより直接的なp75受容体の機能解析が可能になることを示唆するものである。中枢神経が再生しない原因の一つは中枢神経に存在する神経再生阻害物質とされるが、p75受容体は多くの神経再生阻害物質のシグナルを伝える受容体として注目されている。本研究はsiRNAによるp75の発現抑制が脊髄損傷など中枢神経損傷における治療法となりうる可能性を示唆した研究であり、学位に値するものと考えられる。