



Title	Chimaerins act downstream from neurotrophins in over coming the inhibition of neurite outgrowth produced by myelin-associated glycoprotein
Author(s)	水野, 龍義
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45481
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	みずの たつ のり 水 野 龍 義
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 3 4 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学 位 論 文 名	Chimaerins act downstream from neurotrophins in overcoming the inhibition of neurite outgrowth produced by myelin-associated glycoprotein (chimaerin は neurotrophin の下流で働き MAG の神経細胞の軸索進展阻害作用を抑制する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠山 正彌 (副査) 教 授 祖父江憲治 教 授 福田 淳

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

脳血管障害、脳外傷、脊髄損傷などの中枢神経系の損傷では神経の再生が起こらないが、その原因の 1 つとして損傷部で gliosis が起き、MAG (myelin associated glycoprotein) や Nogo, OMgp (Oligodendrocyte myelin glycoprotein) などの神経突起伸張抑制物質が glia 系細胞によって産生されることが考えられている。ところが神経細胞をあらかじめニューロトロフィンにより刺激した後に、これらの物質を投与するとその効果は消失する。この現象はニューロトロフィン priming と呼ばれ、その機序については不明であったが、priming によって何らかの蛋白が誘導され、それが神経再生阻害物質に対して拮抗的に働くという機序が想定されていた。

私たちはそのメカニズムを解明するために、マウスの小脳顆粒細胞を BDNF で刺激して誘導される蛋白を DNA microarray によって検索した。約 1 万子の遺伝子を解析した結果、BDNF により数個の遺伝子が誘導されることがわかり、その内に神経細胞の軸索の突起進展に関係があると言われている蛋白をコードする遺伝子があった。この蛋白質は RhoGAP domain を持ち MAG の作用を抑制すると考えられるため、抑制される機序も含めてさらに解析を行った。

[方法ならびに成績]

まず初めに生後 7 日目、マウスの小脳顆粒細胞に BDNF 投与後、18 hr 後に RNA を回収し、DNA microarray を行うことにより発現に差のある遺伝子を同定した。発現の上昇が見られた遺伝子の中に神経細胞の軸索伸張に関係すると報告されている RhoGAP domain をもつ β chimaerin の 3' noncoding region があり、MAG の作用を抑制する遺伝子の候補としさらに検討した。

RT-PCR, Western Blotting で発現を確認したところ、BDNF 投与で経時的に mRNA、および蛋白質の発現上昇を認めた。chimaerin が誘導される経路を調べるため、PKA の阻害剤である KT5720 を小脳顆粒細胞に投与したところ chimaerin の発現が抑制され、Trk の阻害剤を投与しても同様の変化が認められた。以上の結果と BDNF には TrkB

が発現していることから chimaerin は TrkB を介して cAMP-PKA の経路により発現が誘導されると示唆された。

また、chimaerin が持つ RhoGAP が MAG の効果抑制にどのように働いているかを調べるために HEK293T 細胞に α 、 β chimaerin および GAP domain に mutation を挿入した α 、 β chimaerin を transfection し、Rac にて nucleotide labelling を行ったところ α chimaerin を transfection したもののみ Rac の活性が上昇していた。他の small GTPase である Rho の活性も調べたところ α chimaerin のみ減少が見られた。このことから α chimaerin は Rac, Cdc 42 の GAP であるが、cycle を活性化させることにより、Rho の活性を抑制し Rac の活性を上昇させ MAG の作用を阻害すると考えられる。最後に生後 7 日目のマウス小脳顆粒細胞に α 、 β chimaerin および mutant α 、 β chimaerin を transfection し、MAG を付加したところ α chimaerin を transfection したもののみ MAG の効果が抑制され、GAP domain のみの construct を作成し同様の実験を行っても同様の結果が得られた。

[総括]

MAG の作用を抑制する因子として chimaerin が cDNA microarray より見付き、発現の調整が TrkB を介した cAMP-PKA の経路により誘導されていることがわかった。

また、chimaerin は GAP domain を持ち、軸索伸張との関連が報告されている small GTPase である Rac, Rho の活性を制御することにより MAG 存在下でも神経細胞の軸索を伸張させることがわかった。以上のことより chimaerin は中枢神経の再生に関わる有力な因子であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

中枢神経では脳血管障害、脳外傷、脊髄損傷などにより損傷を受けると、神経の再生が起こらないが、その原因の 1 つとして損傷周囲のグリア系細胞より、MAG (myelin associated glycoprotein) や Nogo, OMgp (Oligodendrocyte myelin glycoprotein) などの神経突起伸張抑制物質が産生されることが考えられている。

ところが神経細胞をあらかじめニューロトロフィンにより刺激した後に、これらの物質を投与するとその効果は消失する。この現象はニューロトロフィン priming と呼ばれているが詳しいメカニズムは不明である。

本研究ではこのメカニズムに chimerin が関与しており、Rac が活性化され Rho が不活性化されることにより MAG の作用を解消し神経細胞の軸索を伸張させることが明らかにされた。

したがって、本研究は中枢神経の再生には重要なものであり、学位に値すると考える。