



Title	Cytoplasmic p21Cip1/WAF1 inhibits Rho-kinase activity and enhances functional recovery after spinal cord injury in rats
Author(s)	田中, 啓之
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45515
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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	たなかひろゆき 田中啓之
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19325 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 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Cytoplasmic p21 ^{Cip1/WAF1} inhibits Rho-kinase activity and enhances functional recovery after spinal cord injury in rats (細胞質 p21 は Rho キナーゼ活性を抑制し、ラット脊髄損傷後の機能回復を促進する)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 秀樹 (副査) 教授 高井 義美 教授 吉峰 俊樹

論文内容の要旨

〔目的〕

末梢神経とは異なり、成体哺乳類では中枢神経は再生しないものとされてきた。その一因としてグリア細胞由来の軸索再生阻害物質の存在が挙げられるが、近年の研究によりそれらを抑制することにより中枢神経においても軸索再生が認められることがわかってきた。一方、胎児期の脊髄などの幼若な神経細胞は分化した神経細胞とは異なり、軸索再生阻害物質に対して抵抗性を示し、軸索を伸展させることが知られている。そこで幼若な神経細胞が軸索再生阻害物質に対して抵抗性を示すメカニズムの解明を目的として研究を進めた。さらにその結果をラット脊髄損傷モデルへと応用することによって中枢神経損傷後の機能回復が認められるかどうかの検討を行った。

〔方法ならびに成績〕

神経細胞に限らず細胞の分化時には細胞周期が停止するが、その際には核内蛋白質であるサイクリン依存性キナーゼインヒビターが働くことはよく知られている。その中の一つである p21 は、単球細胞においては分化後に核内から細胞質へとその局在を移行させ、細胞質にて細胞周期停止とは別の働きをすることが報告されている。そこでこの p21 が神経細胞においては分化時の形態変化、すなわち神経突起伸展に関与することにより、幼若神経細胞が高い突起伸展能力をもつことができるのではないかと考えた。神経細胞発生時期として知られている胎生 5 日目の鶏の網膜組織では p21 の発現が上昇していた。さらに同時期の網膜神経細胞の初代培養を行ったところ、まず核内に p21 の発現が上昇し、その後神経突起を伸展させ分化が進むにつれて p21 の局在が細胞質へと移行することがわかった。マウスニューロブラストーマ細胞株である N1E-115 細胞の分化時にも、p21 はまず核内にて発現が上昇し、その後神経突起を進展させるにつれてその局在を細胞質へと移行させた。そこで細胞質での p21 の働きを解明するために、C 末端に存在する核移行シグナルを欠損させた p21 プラスミドを作成し、細胞質へと p21 を強制発現させることにより実験を進めた。N1E-115 細胞の細胞質へと p21 を強制発現させると、分化後の細胞の様に神経突起を長く伸張させた細胞が多く見られるようになった。また同様にラット海馬神経細胞の初代培養においても細胞質 p21 により有意な神経突起伸展が認められた。これらの神経突起伸展作用は細胞質 p21 が神経突起退縮作用を持つ Rho キナーゼと直接結合

し、その活性を抑制することによるものであることが示された。

次にこの細胞質 p21 によりラット脊髄損傷モデルにおいて中枢神経損傷後の軸索再生、および機能回復が認められるかどうかを調べた。細胞質 p21 の生体内導入方法として、HIV-1 ウイルス由来の TAT 蛋白質を用いた。この TAT 蛋白質に結合した細胞質 p21 は、*in vitro*、*in vivo*にて容易に細胞内に取り込まれ、ラット海馬神経細胞の初代培養において、この TAT 結合細胞質 p21 蛋白質を加えることにより神経突起伸展作用が認められた。そこでラット脊髄損傷モデルとして、第 10 胸椎レベルでの脊髄背側半切断モデルを用いて、持続浸透圧ポンプにて TAT 結合細胞質 p21 蛋白質の 2 週間の損傷部局所持続投与を行った。ラット脊髄損傷後の運動機能評価として BBB score を用いたところ、TAT 結合細胞質 p21 蛋白質投与群では有意な機能回復が認められた。また神経細胞用トレーサーを大脳皮質運動野に打ち込み、切断された皮質脊髄路再生の評価を行ったところ、脊髄損傷中心部のやや頭側から 5 mm 尾側にかけて有意な再生軸索の増加が認められた。電気生理学的検査として下肢筋電図測定も行った。下肢屈筋、伸筋の協調運動、および両下肢間の協調運動を筋電図にて評価したところ、TAT 結合細胞質 p21 蛋白質投与群では非協調的な異常筋収縮の有意な減少が認められた。また、ラット脊髄損傷後に通常認められる脊髄内空洞形成に関しても、TAT 結合細胞質 p21 蛋白質投与群において有意な減少が認められた。

〔総括〕

従来より核内蛋白質であるとされてきたサイクリン依存性キナーゼインヒビター p21 が、神経細胞分化段階にてその局在を核内から細胞質へと変化させ、さらに Rho キナーゼとの結合によりその活性を抑制し、神経突起伸展作用を担うことが明らかになった。またラット脊髄損傷モデルに細胞質 p21 を投与することにより、損傷軸索の再生や機能回復が認められることも示された。以上より、細胞質 p21 は神経細胞を分化段階の幼若な状態へと変化させる可能性があり、今後のさらなる研究により中枢神経損傷後の有効な治療法の一つとなりうる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究はサイクリン依存性キナーゼインヒビター p21 の神経細胞における新しい働きを解明したものである。神経細胞分化時にはまず核内に p21 の発現が上昇するが、その後分化が進むにつれて細胞質へとその局在を移行させ、神経突起退縮作用を持つ Rho キナーゼと直接結合することによりその活性を抑制し、その結果神経突起伸展を促進させた。さらにこの細胞質 p21 をラット脊髄損傷モデルに投与することにより、脊髄損傷後の有意な機能回復、損傷軸索の再生、および脊髄内空洞形成の抑制が認められた。

以上のように、従来より核内蛋白質であるとされてきた p21 が細胞質にて突起伸展に関わるということ、また細胞質 p21 によりラット脊髄損傷モデルにおいて機能回復が促進するということは新しい知見であり、細胞質 p21 が今後の中枢神経損傷に対する有効な治療法となりうる可能性を示唆した研究である。したがって、本研究は学位論文に値するものと認める。