Osaka University Knowledge Archive

Title	Chondroitin Sulfate Proteoglycans Down-regulate Spine Formation in Cortical Neurons by Targeting Tropomyosin-related Kinase B (TrkB) Protein
Author(s)	栗原, 大
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59708
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【50】

氏　　名	栗　原　　大（くり はら だい）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学　位　記　番　号	第　２５８７６　号
学位授与年月日	平成25年３月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科生体生理医学専攻
学　位　論　文　名	Chondroitin Sulfate Proteoglycans Down-regulate Spine Formation in Cortical Neurons by Targeting Tropomyosin-related Kinase B (TrkB) Protein （コンドロイチン硫酸プロテオグリカンはTrkBを脱リン酸化しスパイン形成を抑制する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　山下　俊英 （副査） 教　授　島田　昌一　　教　授　吉森　　保

論 文 内 容 の 要 旨

〔目　的〕
コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）は中枢神経系の細胞外マトリックスを構成する主要分子であり、軸索伸長の阻害や、シナプス形成の阻害など、神経回路形成を抑制する機能を持つことで知られている。特に神経損傷後の再生阻害や、臨界期の終了において重要な働きをするが、CSPGによる神経回路形成抑制の詳細な分子メカニズムは現在のところ明らかになっていない。近年、CSPGの受容体としてProtein Tyrosine Phosphatase σ（PTPσ）が報告された。PTPσは膜貫通型のチロシンフォスファターゼであり、何らかの分子のチロシン残基を脱リン酸化し、神経回路形成を抑制すると考えられているが、PTPσの下流シグナルは依然明らかになっていない。そこで、本研究ではPTPσの下流シグナルを解明し、CSPGによる神経回路形成抑制メカニズムを明らかにすることを目的とした。
本研究では、PTPσの下流の候補として、BDNF-TrkBシグナルに着目した。TrkBは受容体型チロシンキナーゼであり、リガンドの脳由来神経栄養因子（BDNF）の結合により自己リン酸化し、神経回路形成に促進的に作用することが知られている。そこで、CSPG刺激によりPTPσがTrkBを脱リン酸化し、その活性化を阻害することで神経回路形成が抑制されるという仮説を立て、以下の実験を行った。

〔方法ならびに成績〕
始めに、CSPGがTrkBのリン酸化状態に与える影響をウエスタンブロット法により調べた。マウス大脳皮質から初代培養した神経細胞をBDNF、CSPGで処理した結果、BDNF処理により生じるTrkBのリン酸化が、CSPG処理により抑制された。また、PTPσをノックダウンした条件では、このCSPGによるリン酸化TrkBの減少はみられなかった。さらに、TrkBの免疫沈降を行ったところ、PTPσの共沈がみられ、PTPσとTrkBの相互作用が確認された。以上の結果から、仮説通りCSPG刺激によりPTPσがTrkBを脱リン酸化することが示唆された。
次に、神経細胞をBDNF、CSPGで処理し、スパイン密度に与える影響を調べた。その結果、BDNF処理によりスパイン密度が増加し、CSPGによってそのスパイン密度の増加が抑制された。また、PTPσをノックダウンした条件では、このCSPGによるスパイン密度の増加抑制がみられなかった。これらの結果から、CSPGはPTPσ依存的にBDNFによる神経回路形成を抑制するということが示された。また、予想外なことに、CSPG、BDNF両方で処理したときのスパイン密度は、BDNFによる増加分がなくなるだけでなく、コントロールと比較して有意に減少した。本研究では、さらにこのメカニズムに関しても解明を行った。BDNFの受容体にはTrkB以外にp75があり、p75はTrkBとは逆にスパインの刈り込みを引き起こすことが知られている。そこで、p75の関与を確かめるため、抗p75抗体存在下で神経細胞をCSPG、BDNFで処理した。その結果、抗p75抗体非存在下でみられるスパイン密度の減少が抗p75抗体により阻害された。この結果からCSPG、BDNF存在下でみられたスパイン密度の減少はp75に依存することが明らかとなった。

〔総　括〕
本研究では、CSPGはPTPσを介してTrkBを脱リン酸化し、神経回路形成を抑制することを明らかにした。また、CSPG存在下ではTrkBの活性化が抑制される結果、BDNFによりp75の活性化が起こり神経回路の刈り込みが起こる可能性を示した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

上記学生は、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSGP）による神経回路形成抑制の分子メカニズムの解明を目的とし、研究に取り組んできた。学位申請論文において、上記学生はCSPGが受容体であるPTPσを介して神経栄養因子受容体TrkBを脱リン酸化し、神経回路形成を抑制することを明らかにした。また、CSPG存在下ではTrkBの活性化が抑制される結果、TrkBのリガンドであるBDNFがもうひとつの受容体のp75を活性化し、神経回路の刈り込みを引き起こすことを示した。CSPGによる神経回路形成抑制の分子メカニズムは長年明らかになっていなかった課題だが、本研究はその一端を明らかにするものである。また、CSPG存在下ではBDNFが神経回路の刈り込みを引き起こすという結果はこれまでにない知見であり、発生期の神経回路形成に寄与する可能性が考えられる。以上のように、本研究は神経科学研究に新たな展開をもたらすものであり、学位申請にふさわしい研究成果である。