

論文の内容の要旨

氏名：南 郷 拓 嗣

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：Prostaglandin E₂による運動ニューロン分化誘導に関する神経薬理学的研究

【背景及び目的】

ニューロンが変性・脱落し、神経系の機能が消失する神経変性疾患は、現在まで、根本的治療法は確立されておらず、薬物治療は、症状緩和及び進行遅延にとどまっている。近年、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が樹立され、種々のニューロンを作製することも可能となり、神経変性疾患の根本治療に貢献することが期待される。患者本人の体組織から樹立した iPS 細胞由来のニューロンの使用は、拒絶反応を回避できるという非常に大きなメリットもあり、失われた神経機能を補填する再生医療の実現に向けた研究が精力的に行われているが、解決すべき問題も残されている。筋萎縮性側索硬化症や脊髄性筋萎縮症は、進行が速く、多くの患者が、発症後 5 年以内に死亡する極めて予後不良の運動神経変性疾患である。これらの疾患には、明らかに進行を遅らせる薬物も存在せず、iPS 細胞への期待は非常に大きい。現在、iPS 細胞の運動ニューロンへの分化誘導は、その発生に必須なシグナル分子である Retinoic acid (RA) 処置により行われるが、1 ヶ月以上の時間が必要であり、より短時間で成熟した運動ニューロンへと分化させる誘導法の開発が切望されている。

マウスの神経芽腫細胞と脊髄細胞の融合細胞である NSC-34 は、運動ニューロン様株化細胞で、低血清培地で RA を曝露する (RA 処置) と、増殖停止、突起伸長、Acetylcholine (ACh) の合成・貯蔵促進、HB9 などの運動ニューロン特異的なマーカータンパク質の発現増加といった運動ニューロン特性を有する細胞へと分化する。現在、NSC-34 は運動ニューロンの分化誘導因子の探索やその機構の解明などに汎用されている。

アラキドン酸に由来する Prostaglandin E₂ (PGE₂) は、様々なニューロンに対して細胞傷害性を示すことが報告されてきたが、近年、マウスの大脳皮質や嗅球において、ニューロン分化を促進し、ニューロンの新生や再生を担う Key Factor であることが明らかにされた。PGE₂ の運動ニューロン分化に及ぼす影響は、検証された例が極めて少なく不明であるが、大脳皮質や嗅球で報告された作用から、運動ニューロンにおいても分化誘導因子となる可能性が十分に考えられる。

そこで、本研究では、RA より迅速な運動ニューロン分化誘導法の確立を目指して、NSC-34 において、PGE₂ の運動ニューロン分化に及ぼす影響を形態学的、電気生理学的及び生化学的特性から精査し、RA 処置の場合と比較検討した。

【方法】

NSC-34 は、10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium 中で 37°C、5% CO₂ 条件で培養した。細胞増殖は、[3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium (MTT) 法により評価し、突起伸長作用は、位相差顕微鏡像より全長が細胞体の 2 倍以上の細胞を突起伸長細胞とし、その細胞数 (割合) で評価した。活動電位は Whole-cell patch-clamp 法により、タンパク質の発現は Western blot 法により検討した。ACh 放出量は、High performance liquid chromatography (HPLC) 法により測定した。

【結果及び考察】

1. PGE₂ が NSC-34 の細胞増殖及び突起伸長に及ぼす影響

PGE₂ (1-100 μM) を NSC-34 に 48 時間曝露すると、増殖は、濃度依存的に抑制され、100 μM で有意に抑制された。一方、突起伸長細胞数は、濃度依存的に増加し、10 μM 以上で有意な差が認められた (Fig. 1)。以上より、PGE₂ は、NSC-34 において、ニューロン様の形態変化を誘導することが明らかとなった。

次に、PGE₂ の細胞増殖抑制及び突起伸長作用が、PGE₂ 受容体 (EP) を介するか否かを検討した。EP には、EP1~EP4 の 4 つのサブタイプが存在するが、NSC-34 には、マウス運動ニューロンでの発現に一致して、EP2 及び EP3 が確認された。そこで、EP 作動薬の細胞増殖及び突起伸長に及ぼす影響を検討した。EP2 作動薬の Butaprost (1-20 μM) は、濃度依存的に細胞増殖を抑制し、突起伸長細胞数を増加させた。両作用ともに 10 μM 以上で有意差が認められた (Fig. 1)。一方、EP1/EP3 作動薬の Sulprostone (1-20 μM) は、10 μM

以上で約 80%にまで細胞増殖を抑制したが、濃度依存性は認められず、また、突起伸長には影響を及ぼさなかった (Fig. 1)。PGE₂ (100 μM) による突起伸長細胞数の増加は、EP2 遮断薬の PF-04418948 (80 μM) によって抑制されたが、EP3 遮断薬の L-798,106 (60 μM) では抑制されなかった。以上より、PGE₂による細胞増殖抑制及び突起伸長作用は、EP2 を介していることが明らかとなった。

EP2 は、Gs タンパク質共役型である。そこで、膜透過性 cyclic AMP (cAMP) アナログ dibutyryl-cAMP (dbcAMP) の細胞増殖及び突起伸長に及ぼす影響を検討したところ、dbcAMP (1 mM) は、細胞増殖には影響を及ぼさなかったが、突起伸長細胞の割合を有意に増加させた (Fig. 2)。以上より、EP2 を介した細胞内 cAMP の上昇が、PGE₂の突起伸長作用に少なくとも一部関与することが示唆された。

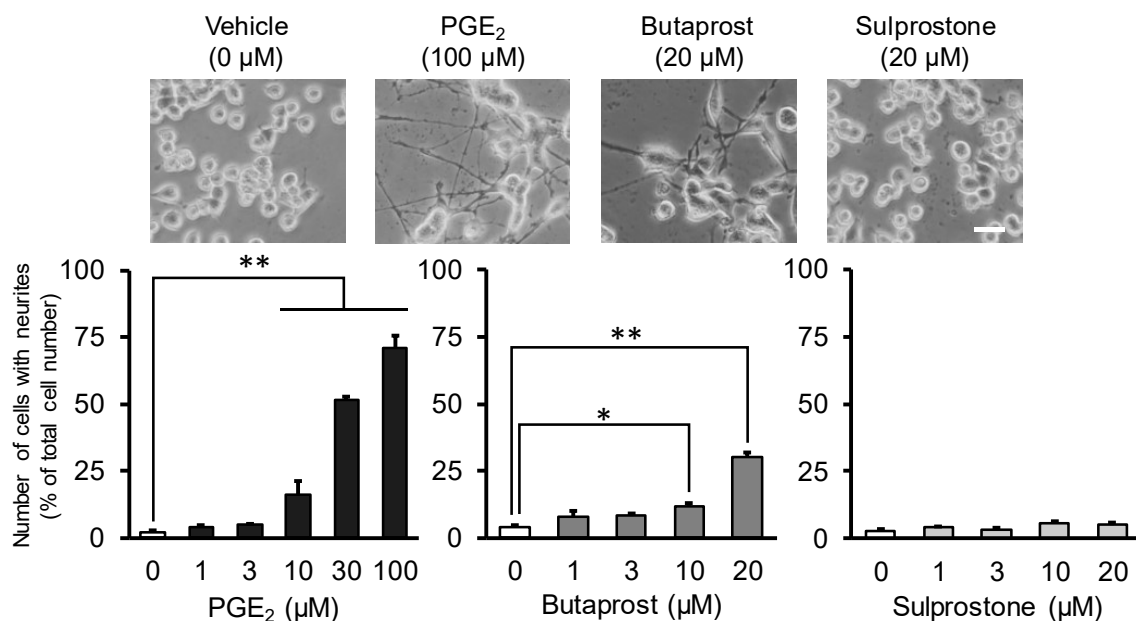


Fig. 1 Effects of PGE₂ and EP agonists on neurite outgrowth in NSC-34 cells.

*P < 0.05, **P < 0.01. Scale bar: 50 μm

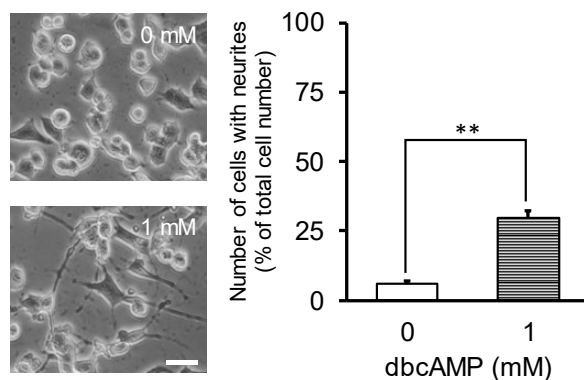


Fig. 2 Effect of dbcAMP on neurite outgrowth in NSC-34 cells.

**P < 0.01. Scale bar: 50 μm

2. PGE₂により突起を伸長した NSC-34 の運動ニューロン特性の評価

NSC-34 は、PGE₂ 処置により、ニューロン様の形態変化を示すことが明らかとなったため、PGE₂ 処置細胞のニューロンとしての特性を RA 処置細胞と比較検討した。まず、PGE₂ 及び RA 処置後の突起伸長細胞数の経時変化を比較した。PGE₂ (30 μM) 処置では、処置 2 日後をピークとした突起伸長細胞の増加が認められた。RA (10 μM) 処置でも、経時的に突起伸長細胞は増加したが、PGE₂ の 2 日処置と同程度になるまでに 7 日間を要した。以上より、PGE₂ は、RA よりも迅速に NSC-34 をニューロン様の形態にすることが明らかとなった。

次に、両処置により形態学的にニューロン様に変化した細胞の機能を電気生理学的に評価した。突起伸長細胞の割合が同程度であった PGE₂ の 2 日間処置及び RA の 7 日間処置細胞でニューロンの特性である活動電位の発生の有無を検討したところ、両処置細胞でともに、活動電位の発生が確認されたが、活動電位の発生に必要な刺激電流の閾値 (閾値電流) は、RA 処置細胞より PGE₂ 処置細胞で有意に低かった (Fig. 3)。これまでに、マウス運動ニューロンにおいて、分化または成熟の進行に伴って閾値電流が低下することが報告されている。したがって、PGE₂ 処置細胞は、RA 処置細胞よりも分化度または成熟度の高い運動ニューロンへ分化していることが示唆された。また、PGE₂ 及び RA 処置細胞両処置細胞の電流密度の増加は、Na⁺ を除去した細胞外液、または電位依存性 Na⁺ チャンネル (Nav) 阻害薬である Tetrodotoxin (1 μM) を添加した細胞外液の還流により完全に消失したことから、活動電位の発生に Nav が関与することが明らかとなった。

さらに、運動ニューロンへの分化度や成熟度を明らかにするため、マーカータンパク質の発現を調べた。ニューロン分化のマーカータンパク質である MAP2c 及び Synaptophysin は、vehicle 処置細胞と比較して、PGE₂ 処置細胞または RA 処置細胞において同程度の発現増加が認められた。また、運動ニューロン特異的に発現するタンパク質である HB9 及び Islet-1 も、両処置細胞において同程度の発現増加が認められた。以上より、マーカータンパク質の発現から両処置細胞が運動ニューロンへと分化していることが明らかとなったが、本検討では RA 処置と PGE₂ 処置による差は認められなかった。次に、成熟運動ニューロンの特性である ACh の合成能及び放出能を比較した。ACh 合成酵素である Choline acetyltransferase (ChAT) の発現は、vehicle 処置細胞と比較して、PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞において有意に増加した。また、PGE₂ 処置細胞の ChAT 発現レベルは、RA 処置細胞の発現レベルと比較しても有意に高かった (Fig. 4A)。さらに、PGE₂ 処置細胞から培養液中への ACh 放出量は、vehicle 処置細胞及び RA 処置細胞と比較して有意に増加したが、RA 処置細胞からの ACh 放出量は、vehicle 処置細胞より減少する傾向を示した (Fig. 4B)。以上より、PGE₂ 処置は、RA 処置よりも成熟度の高い状態へ分化させることが明らかとなった。

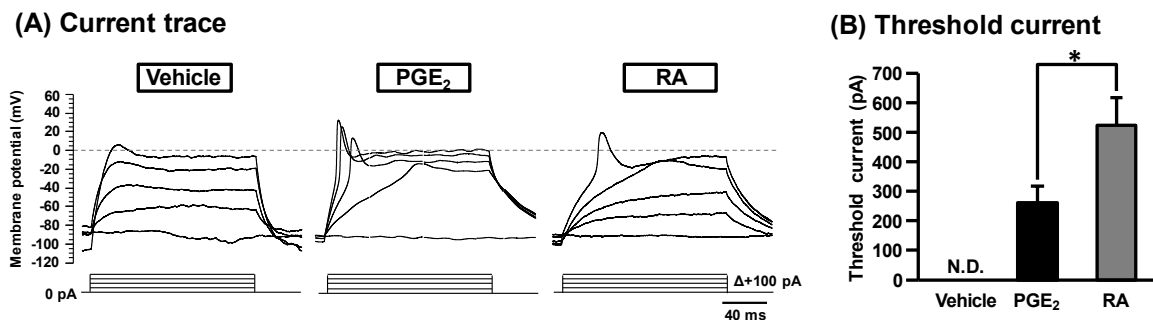


Fig. 3 Representative action potential traces (A) and threshold current (B) in NSC-34 cells.
*P < 0.05. N.D.: not detected.

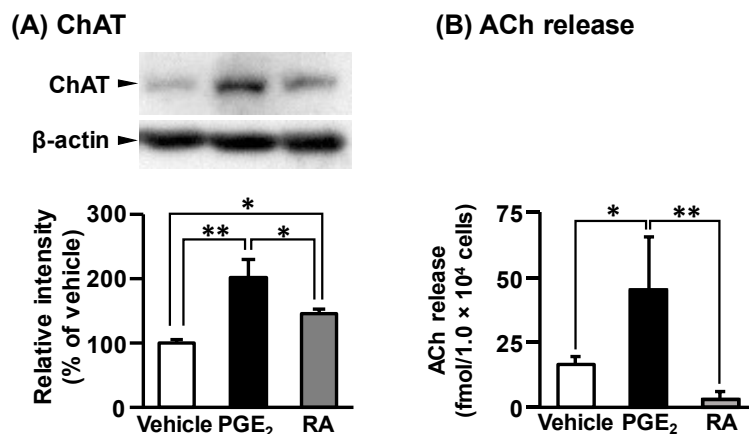


Fig. 4 Expression level of ChAT (A) and release of ACh (B) in NSC-34 cells.
*P < 0.05, **P < 0.01.

【結論】

本研究では、より迅速な運動ニューロン分化誘導法を確立するため、新たな分化誘導因子の同定を目的とし、運動ニューロン様株化細胞 NSC-34 において、PGE₂ の運動ニューロン分化に及ぼす影響を検討し、PGE₂ が、EP2 を介して、RA より迅速に、成熟運動ニューロンの特性を有する細胞へと分化させることを明らかとした。本検討結果は、PGE₂ が、運動ニューロンにおいても分化誘導因子となることを明らかにしたものであり、誘導速度及び成熟度の高さから、RA よりも優れた誘導因子となる可能性を示唆したものである。本研究の成果を今後、iPS 細胞に応用することにより、運動神経変性疾患に対する再生医療実現の一助となることが期待される。