

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 石毛 久美子

（副査） 教授 木澤 靖夫

教授 小林 俊亮

筋萎縮性側索硬化症や脊髄性筋萎縮症は、極めて予後不良の神経変性疾患で根本的治療はなく、人工多能性幹細胞（iPS細胞）から調製した運動ニューロンによる再生医療への期待が高まっている。iPS細胞は、Retinoic acid (RA) により運動ニューロンへ分化することが報告されているが、治療応用に向けては、解決すべき課題も多い。本論文は、RAより優れた運動ニューロン分化誘導因子の同定を目的として、運動ニューロン様株化細胞であるNSC-34において、Prostaglandin E₂ (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の場合と比較検討したものである。

1. PGE₂のNSC-34の細胞増殖及び突起伸長に及ぼす影響

NSC-34において、PGE₂ (1~100 μ M) は、48時間曝露により、濃度依存的な増殖抑制と突起伸長細胞数増加を示し、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。そこで、その誘導機構について、PGE₂受容体 (EP) のうち、NSC-34における発現が明らかとなったEP2及びEP3に焦点をあてて検討した。EP2作動薬のButaprost (1~20 μ M) 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が、EP1/EP3作動薬のSulprostone (1~20 μ M) は、高濃度でわずかに細胞増殖を抑制したものの突起伸長を誘導しなかった。また、PGE₂ (100 μ M) による突起伸長細胞数の増加は、EP2遮断薬のPF-04418948 (80 μ M) で抑制されたが、EP3遮断薬のL-798,106 (60 μ M) では影響を受けなかった。EP2は、G_s共役型受容体であるが、dibutyryl-cyclic AMP (1 mM) の曝露は、細胞増殖抑制と突起伸長細胞数増加を示した。以上より、PGE₂は、NSC-34において、EP2を刺激し、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。

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

PGE₂ (30 μ M) を処置したNSC-34のニューロンとしての特性をRA (10 μ M) 処置の場合と比較した。突起伸長細胞数の増加は、PGE₂処置では2日後にピークとなりその後減少したが、RA処置では、2日後はPGE₂処置より低く、7日後に同程度になった。そこで、以下の検討には、PGE₂は2日処置、RAは7日処置の細胞を用いた。まず、電気生理学的特性を評価した。両処置細胞において、活動電位の発生が認められたが、閾値電流は、PGE₂処置細胞の方が低かった。また、これらの電位変化に電位依存性Na⁺チャネルが重要な役割を演ずることが明らかとなった。これらより、PGE₂またはRA処置は、電気生理学的にもニューロン様に分化させることが明らかとなった。また、PGE₂は、RAより迅速にニューロンに分化させ、その成熟度も高いことが示唆された。次に、生化学的特性を評価した。ニューロン分化マーカー (MAP2c及びSynaptophysin) 及び運動ニューロン特異的マーカー (HB9及びIslet-1) は、いずれも、両処置細胞で同程度の発現増加が認められた。Acetylcholine (ACh) 合成酵素 (Choline acetyltransferase) も両処置細胞で発現が増加したが、PGE₂処置細胞の発現レベルは、RA処置細胞より有意に高かった。また、培養液中へのACh放出量は、PGE₂処置細胞で増加したが、RA処置細胞では増加しなかった。以上より、PGE₂及びRA処置細胞は、生化学的観点からもニューロンに分化していること、及び、PGE₂処置細胞は、ACh放出能を備えており、RA処置細胞より成熟度が高いことが明らかとなった。

上記1及び2の結果により、PGE₂が、運動ニューロンへの新たな分化誘導因子となることが明らかとなった。また、併せて、PGE₂は、これまで分化誘導に用いられてきたRAよりも優れた誘導因子となる可能性が強く示唆された。これらの知見は、今後、運動神経疾患の再生医療実現に大きく寄与するものと考えられる。

よって、本論文は、博士（薬学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上