

論文審査の要旨

報告番号	総論第 41 号	学位申請者	北菌 育美
審査委員	主査	岸田 昭世	学位
	副査	古川 龍彦	副査
	副査	大塚 隆生	副査
			博士 (医学)
			家入 里志
			岡本 康裕

PCP4/PEP19 downregulates neurite outgrowth via transcriptional regulation of Ascl1 and NeuroD1 expression in human neuroblastoma M17 cells

(PCP4/PEP19 は、ヒト神経芽腫 M17 細胞において、Ascl1 および NeuroD1 発現の転写制御を介して神経突起の伸長を抑制する。)

Purkinje cell protein 4/peptide 19 (PCP4/PEP19) はプルキンエ細胞から発見されたペプチドで、抗アポトーシス因子として知られている。神経細胞分化に関与する可能性も示唆されているが詳細は不明であった。学位申請者は、培養ヒト神経芽腫 M17 細胞株を用いて、PCP4/PEP19 が神経細胞分化に及ぼす影響を神経突起の伸長や神経分化マーカーの発現を解析することで検討した。M17 細胞に対して、PCP4/PEP19 の knockdown (KD) や神経分化を誘導する All-trans retinoic acid (AtRA) の投与を行い、各種実験に供した。細胞増殖は WST-8 アッセイで解析し、蛋白、mRNA の発現量および遺伝子転写活性は、それぞれウェスタンブロット、定量的 RT-PCR およびルシフェラーゼレポーターアッセイで解析した。抗 PCP4/PEP19 抗体は、Trigger factor-tagged PCP4/PEP19 でモルモットを免疫して作成し、得られた血清をアフィニティクロマトグラフィーにて精製した。ヒト神経芽腫組織での PCP4/PEP19 の発現は免疫組織化学を用いて検討した。その結果、以下の知見を明らかにした。

1. PCP4/PEP19 の KD では、M17 細胞の増殖は変化せず、M17 細胞ではアポトーシスも誘導していないことが示唆された。
2. β -III tubulin や F-actin 染色による蛍光顕微鏡観察および位相差顕微鏡観察で、M17 細胞での PCP4/PEP19 の KD および AtRA 投与後において、それぞれで有意な神経突起の伸長を認め、伸長効果は相加的であった。神経突起の数は、AtRA 投与のみで有意に増加し、PCP4/PEP19 の KD は神経突起の萌出よりも既に存在する神経突起を伸長することに関与していると考えられた。
3. PCP4/PEP19 に発現が調節されている神経分化マーカーは Ascl1 と NeuroD1 であり、PCP4/PEP19 の KD で、Ascl1 の蛋白や mRNA、遺伝子転写活性は減少し、AtRA 投与で増加した。NeuroD1 の発現は反対に、PCP4/PEP19 の KD で増加し、AtRA 投与で減少した。Ascl1 の KD で PCP4/PEP19 mRNA の発現量は減少し、NeuroD1 の mRNA の発現量は増加した。一方、NeuroD1 の KD では Ascl1、PCP4/PEP19 の mRNA の発現量に変化はなかった。これにより、NeuroD1 は、Ascl1 と PCP4/PEP19 のシグナル伝達経路の下流に存在していることが示唆された。
4. 免疫組織化学ではヒト神経芽腫組織の多くに PCP4/PEP19 発現が見られ (18/21 例)、未分化な細胞では核内に、分化した細胞では細胞質での発現が多い傾向が見られたが、発現の局在と分化度や組織学的悪性度、予後には統計学的な有意差は認められなかった。

培養ヒト神経芽腫 M17 細胞において、PCP4/PEP19 の KD により神経突起が伸長することが示され、これは Ascl1 と NeuroD1 の発現を介している可能性がある。

本研究は、ヒト神経芽腫細胞において、PCP4/PEP19 が神経突起伸長に関与していることを示し、治療標的となりうる可能性を示した点が非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。