

氏 名（本 籍）	田 中 達 英（滋賀県）
学 位 の 種 類	博 士（工学）
学 位 授 与 番 号	甲第 335 号
学 位 授 与 日 付	平成 20 年 3 月 25 日
専 攻	物質工学専攻
学 位 論 文 題 目	グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）遺伝子の発現誘導 メカニズムの解析 (Analysis of regulatory mechanisms of glial cell-line derived neurotrophic factor GDNF gene expression)
学位論文審査委員	（主査） 教 授 木 内 一 壽 （副査） 教 授 西 川 一 八 教 授 吉 田 敏 教 授 松 居 正 樹

論文内容の要旨

急性脊髄損傷初期において、ミクログリアなどの免疫系細胞ではグリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF) は急速に誘導されることが明らかにされている。しかし、この損傷においては、どのような因子が *GDNF* 遺伝子の発現誘導に係わっているのか未だ解明されていない。学位申請者である田中達英さんは、従来からよく研究されているアストログリアと対比しつつ、ミクログリアあるいはマクローファージにおける *GDNF* 遺伝子の発現誘導機構を培養細胞レベルで明らかにすることを目的とし、次に示す二つの点でオリジナルな研究を行った。

一点は、ラットミクログリア及びアストロサイト初代培養細胞を用いて、リポ多糖体 (lipopolysaccharide; LPS) 刺激による *GDNF* 遺伝子の発現誘導機構を初めて明らかにしたことである。LPS は自然免疫で重要な役割を果たしている Toll 様受容体 4 に結合し、MyD88 依存的に炎症性サイトカインの誘導に係わる経路や、IRF-3 を活性化しインターフェロン産生を誘導する経路を活性化することが報告されている。LPS 刺激によりミクログリアとアストロサイトに *GDNF*、*iNOS*、*TNF- α* の各 mRNA 発現量が有意に上昇することを確認したうえで、上記活性化経路において転写因子 NF- κ B の活性化が関与するかどうか検討を加えた。NF- κ B 阻害剤である MG132 処理により、従来から知られている LPS 誘導性の *iNOS*、*TNF- α* mRNA 発現量が抑制されるのに対し、*GDNF* mRNA 発現量は変化しないことを見出した。一方で、MAP キナーゼ経路の関与を検討するため、MEK1/2、JNK、p38 MAPK の阻害剤を用い、ミクログリアでは LPS 誘導性 *GDNF* mRNA 発現は JNK 経路が関与していること、アストロサイトではいずれの MAP キナーゼカスケードも関与していないことを明らかにした。これらの結果を踏まえて、急性脊髄損傷における LPS 誘導性の *GDNF* 遺伝子発現上昇の可能性を示唆し、この遺伝子誘導は NF- κ B 非依存的な経路を介し、ミクログリアでは JNK 経路が重要な役割を果たしていることと結

論づけている。

もう一点は、マクロファージ様細胞 RAW264.7 において、LPS 刺激による *GDNF* mRNA の発現誘導を解析する過程で、既知の *GDNF* mRNA とは異なり、エキソン 4 とその 5' 上流のみで構成される新たな *GDNF* mRNA の存在を見出したことである。この新規 *GDNF* mRNA (Ex4 *GDNF*) 発現は初代培養アストロサイト、ミクログリア、マクロファージにて LPS 刺激により誘導されること、マウス脳組織では無刺激下で発現しており、特に嗅球と線条体で発現量が高いこと、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y でも類似の *GDNF* mRNA が存在していることを明らかにしている。一方で、PKC の賦活剤 phorbol 12-myristate 13-acetate や小胞体ストレスを引き起こす thapsigargin は、ラット C6 グリオブラストーマにて既知の *GDNF* mRNA の発現を上昇させるが、RAW264.7 細胞ではこれらの薬剤は Ex4 *GDNF* mRNA の発現を誘導しないことも示している。さらに、Ex4 *GDNF* タンパク分子の細胞内での翻訳後修飾および培地中への分泌について解析しており、Ex4 *GDNF* 遺伝子を過剰発現させたヒト胎児腎臓細胞由来細胞株 HEK293 では、既知の *GDNF* とは異なる分子量であること、糖鎖修飾はされていないこと、PMA 刺激により培地中への分泌は僅かだが増えることを見出している。Ex4 *GDNF* タンパク質分子は細胞質内に存在する可能性があり、その生化学的役割の解明が急務であると述べている。

以上、これら二つの研究成果は *GDNF* 遺伝子の発現誘導の分子メカニズムに新たな知見を加えたもので、特に、新規の Ex4 *GDNF* mRNA の LPS 刺激による免疫細胞での発現は興味深いものである。

論文審査結果の要旨

学位論文は平明に書かれており、該当分野で先端を行く内容であった。審査した論文の新規性及び独創性に関する評価は次の通りである。

- ・免疫細胞系のミクログリア及びマクロファージ初代培養細胞を用いて、リポ多糖体 (lipopolysaccharide; LPS) 刺激による *GDNF* 遺伝子の発現誘導メカニズムを初めて明らかにしている。これまでは、アストログリアでの *GDNF* 遺伝子発現に関する研究が多く、中枢神経系損傷時のミクログリアやマクロファージでの *GDNF* 遺伝子の発現誘導に焦点を当てて、その誘導メカニズムの解析を行ったことは独創的である。

- ・自然免疫系では Toll 様受容体ファミリーがインターフェロンを始めとする各種サイトカインの発現に重要な役割を果たしているが、神経栄養因子である *GDNF* が同様にこの受容体の活性化を介して誘導されることは興味深い発見である。

- ・LPS 刺激による Toll 様受容体 4 を介する複雑な細胞内シグナル伝達系において、*GDNF* 遺伝子の発現は NF- κ B 非依存的な経路を介し、初代培養ミクログリア細胞では JNK 経路が関与していることを初めて明らかにしたことは、この論文の新規性を示す結果の一つである。

- ・LPS 誘導性 *GDNF* 遺伝子の発現上昇は、初代培養アストログリア細胞では同様に NF- κ B 非依存的経路を介しているが、ミコログリアとは異なる経路に依存することを明らかにしており、同じ刺激に対して細胞により *GDNF* 遺伝子の発現調節機構に差異があること

を示したことは意義深いことである。

- ・マクロファージ様細胞株 RAW264.7 にて LPS 刺激により新規の *GDNF* (Ex4 *GDNF*) mRNA を発見している。5'-RACE 法により cDNA をクローニングし同定したもので、分子生物学関連の高度な技術手法を身につけているものと考えられる。この Ex4 *GDNF* mRNA が single exon gene の範疇に入ることを示したことは新規性があり、ヒト *GDNF* 遺伝子でも同様の mRNA が発現することを確認した点は評価できる。

- ・Ex4 *GDNF* mRNA の存在をノーザンブロッティング法でも証明しようと試みており、実験結果の信憑性を高めようとする研究者としての素養がうかがえる。

- ・マウス脳内においても Ex4 *GDNF* mRNA が発現していることを明らかにしており、生体内での存在を示したことは、この翻訳物の生理的意義を考慮するうえで重要なデータであると考えられる。

- ・この研究では Ex4 *GDNF* mRNA の翻訳物についても解析を行っている。従来から知られている *GDNF* タンパク分子が糖鎖修飾されているのに対し、Ex4 *GDNF* mRNA 由来のタンパク分子はオリゴ糖が付加されていないことを見出している。新規の *GDNF* タンパク分子が細胞質中に存在する可能性を述べており、興味を持たれる実験結果である。

- ・考察は過去の論文をよく吟味して選出した上で書かれている。また、この論文の内容は中枢神経系の機能再生に対して少なからず貢献するものと思われる。

以上の審査結果を踏まえて、本論文は学位論文としての内容を有し、質的に高いものと判定した。

最終試験結果の要旨

(1) 公表論文について

学位論文の骨子となる原著論文（筆頭著者）2 報は査読審査のある国際専門誌（英文）に掲載あるいは受領されていることを、学位論文に添付されている資料により確認した。これらの原著論文が掲載されたあるいは掲載予定の専門誌、*Neuroscience Letters* 及び *Neuroscience Research* は、いずれも該当分野では良く知られており、Impact factor の合計は 4.045 であった。協議の結果、学位論文の基本となる公表論文 2 報は学位授与に値する内容を有していると判断した。

(2) 単位取得について

工学研究科博士後期課程物質工学専攻の修了に必要な単位数の取得を学業成績証明書にて確認した。

(3) 審査及び試験について

公聴会においては、学位申請に係わる論文の説明は分かり易く丁寧なものであった。また、主査、副査及び公聴会出席者の質疑に対し、的確な応答を行っていた。公聴会終了後、審査委員により申請者田中達英君が学位を授与するに値するか審議を行った。そ

の結果、研究対象である GDNF 遺伝子に係わる知識、研究を進める上での問題解決のための戦略、得られた結果に対する考察の論理的展開など、いずれも優秀であり、博士の学位を授与するのに相応しい人物であると認定した。最終試験の課題として、中枢神経系における GDNF の役割、及び、Toll 様受容体を介する分子メカニズムの概要についての設問を与え、これらに対する解答は博士後期課程を修了するに相応しい一定レベル以上のものであった。

以上の結果を踏まえて、審査委員会では田中達英君は最終試験に「合格」と判定した。