

末梢神経系におけるセリン合成酵素 (3PGDH) の 発現局在および損傷後の発現増強

学位論文内容の要旨

【緒言】 L-セリンは非必須アミノ酸の一つである。このアミノ酸は蛋白質合成の材料となるばかりではなく、グリシンやシステイン、D-セリン等他のアミノ酸合成、ホスファチジルセリンやスフィンゴ脂質など細胞膜の構成脂質合成、核酸塩基合成のための炭素や窒素の供給体としても重要である。L-セリンは解糖系の糖代謝の中間体である 3-ホスホグリセリン酸より生合成されるが、この過程の第1段階の酵素が3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素(3PGDH)である。最近の小脳プルキンエ細胞や海馬神経細胞を用いた培養実験から、L-セリンが顕著な神経栄養効果を有することがわかった。また、マウス脳における遺伝子発現の解析により、3PGDHは神経細胞には発現せず、星状膠細胞と嗅神経被覆グリアに選択的に発現している事実が判明した。この結果は、脳では神経細胞はL-セリン合成能を持たず、グリアにその合成と供給を委ねていることを意味している。今回、末梢神経の経路におけるL-セリン合成系を明らかにする目的で、ラット脊髄および坐骨神経を用い、3PGDH発現細胞の同定を行った。さらに、末梢神経損傷とその後の治癒再生におけるL-セリン合成能の変化についても検討を加えた。

【材料と方法】成獣ラットを使用し、一部には坐骨神経に挫滅損傷を加えた。In situ ハイブリダイゼーションにはラット3PGDH cDNAに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブを用い、³⁵S-ATPとターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いてオリゴヌクレオチドの放射標識を行った。免疫組織化学にはウサギ抗ラット3PGDH抗体を用いた。蛍光抗体法では3PGDH抗体と細胞マーカー抗体との二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また酵素抗体法では免疫電子顕微鏡法も行った。

【結果】アフィニティー精製を行ったウサギポリクローナル抗3PGDH抗体を用い、ウエスタンブロットを脊髄、後根神経節、坐骨神経で行ったところ、いずれの組織においても抗体は57 kDaの単一蛋白バンドを認識した。これは予測されている分子量と一致する値で、これらの組織で抗体が特異的に3PGDHと結合していることが示された。

坐骨神経では、3PGDHはニューロフィラメント(NF)陽性の神経軸索とは重ならず、S-100陽性のシュワン細胞と共陽性を示した。また、免疫電顕法で観察すると、

3PGDHの免疫反応はシュワン細胞に加え、その周囲の線維芽細胞にも認められた。坐骨神経の知覚神経線維の起始ニューロンが存在する後根神経節では、3PGDH陽性反応はS-100陽性のシュワン細胞と衛星細胞に認められ、軸索や神経節細胞の細胞体は陰性であった。坐骨神経を通る運動神経線維の起始である脊髓前角の大型運動ニューロンの細胞体や、脊髓の灰白質・白質を通過するNF陽性軸索は3PGDH陰性であった。脊髓前角における3PGDH陽性反応は、神経細胞周囲のGFAP陽性の星状膠細胞と、PLP mRNA陽性の乏突起膠細胞に認められた。

次いで、末梢神経損傷に伴う3PGDHの発現変化を調べる目的で、挫滅損傷を加えた坐骨神経をIn-situハイブリダイゼーション法と蛍光免疫法により解析した。3PGDH mRNAの発現レベルは、対照側と比べると創部およびその末梢側で発現増強が観察された。蛋白レベルにおいても、創部およびその末梢側での蛍光強度の増強が観察された。損傷後も3PGDH陽性細胞はNF陰性のままで、3PGDHとS-100の共存も保たれていた。また、損傷神経に進入している多数のED-1陽性マクロファージを観察したが、3PGDHの発現は陰性であった。

【考察】末梢神経系では3PGDHは神経細胞には発現せず、その周囲のグリア細胞や線維芽細胞などの支持細胞に選択的に発現することを確認した。この細胞発現特性はマウス脳での3PGDH発現パターンと基本的に一致している。従って3PGDHの発現は神経細胞では抑制され、周囲の支持細胞で選択的に誘導されており、これが神経系に共通した発現調節であることが明らかとなった。

シュワン細胞は末梢神経系における髄鞘形成細胞で、多彩な栄養因子やサイトカインを産生する。また、シュワン細胞を損傷脊髓に移植すると本来再生しないとされてきた脊髓神経細胞の伸張が促進されることが知られている。これらの所見から、シュワン細胞は細胞間のメディエーターの発現調節を介して、軸索の発達や再生を制御していると考えられている。今回、坐骨神経の損傷により3PGDHの発現が創部およびその末梢側において増強することが転写レベルと蛋白レベルの両面から確認されたが、細胞膜の構成脂質合成におけるL-セリンの重要性を考え合わせると、L-セリンの合成と供給を介してシュワン細胞が軸索の形成・維持・再生を積極的に支援している代謝的關係が示唆される。また神経線維間に介在する線維芽細胞にも3PGDHが発現していることが免疫電顕で確認されたが、この2種の支持細胞が共同して末梢神経内でのL-セリン合成を担当し、軸索への供給源となっている可能性が考えられる。

神経が損傷を受けると、マクロファージは速やかに損傷神経に浸潤し、変性軸索およびミエリンを除去する。活性化されたマクロファージは盛んに分裂をしているため、蛋白合成、細胞膜合成、核酸合成に要するL-セリンの需要も増大していることが予測される。しかし、マクロファージは3PGDHを発現していないことから、マクロファージに対しても、シュワン細胞と線維芽細胞によるL-セリンの合成と供給が必要な役割を果たしていることが推測される。

ニューロン周囲には髄鞘を形成しない乏突起膠細胞が存在することが古くから指摘されてきたが、その機能についてはほとんど不明なままであった。今回これらの細

胞体にも 3PGDH の発現が確認できたことから、髄鞘非形成性の乏突起膠細胞にも L-セリン合成能が備わっており、神経細胞への供給機能を持つものと考えられた。

なぜ神経細胞は L-セリン合成能を失ってしまったのかという疑問に対して、次のように考えられる。L-セリンは解糖系中間体を材料として合成されるため、L-セリン合成には、エネルギー産生のための基質の損失を伴う。神経細胞は低エネルギー状態に極めて脆弱な細胞であるが、そのような細胞が 3PGDH を発現していれば、エネルギー代謝と同化代謝の両方にグルコースが消費され、特に同化代謝の亢進している神経再生時には細胞生存が危機に陥ることが予想される。神経細胞や軸索の生存・再生を安全かつ効率良く行うために、ニューロンはグルコースを専らエネルギー代謝に利用し、同化代謝に必要な L-セリンは周囲の支持細胞からの供給に委ねるようになったのではないかと推測している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 井 上 芳 郎

副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

末梢神経系におけるセリン合成酵素 (3PGDH) の 発現局在および損傷後の発現増強

L-セリンは非必須アミノ酸の一つで、蛋白質合成の材料となるばかりではなく、他のアミノ酸合成、細胞膜の構成脂質合成、核酸塩基合成のための炭素や窒素の供給体としても重要である。L-セリンは解糖系糖代謝の中間体 3-ホスホグリセリン酸より生合成されるがこの過程の第1段階の酵素が 3PGDH である。最近の培養実験から L-セリンが顕著な神経栄養効果を有することがわかった。またマウス脳では 3PGDH は神経細胞には発現せず星状膠細胞と嗅神経被覆グリアに選択的に発現している事実が判明した。この結果は、脳では神経細胞は L-セリン合成能を持たず、グリアにその合成と供給を委ねていることを意味している。今回末梢神経経路における L-セリン合成系を明らかにするため、ラットを用いて 3PGDH 発現細胞の同定および末梢神経損傷後の L-セリン合成能の変化について検討を加えた。坐骨神経では 3PGDH はニューロフィラメント陽性の神経軸索で陰性で、S-100 陽性のシュワン細胞と共陽性を示した。また、免疫電顕法で観察すると 3PGDH の免疫反応は線維芽細胞にも認められた。後根神経節ではシュワン細胞と衛星細胞が 3PGDH 陽性で、軸索や神経節細胞の細胞体は陰性であった。脊髓前角の運動ニューロンの細胞体や脊髓の灰白質・白質を通過する軸索は 3PGDH 陰性であった。脊髓前角における 3PGDH 陽性細胞は GFAP 陽性の星状膠細胞と PLP mRNA 陽性の稀突起膠細胞であった。次いで損傷に伴う 3PGDH の発現変化を調べるため、挫滅損傷を加えた坐骨神経を In-situ ハイブリダイゼーション法と蛍光免疫法により解析した。3PGDH mRNA の発現レベルは対照側と比べると創部とその末梢側で発現増強が観察され、蛋白レベルでも同様の発現増強が観察された。また、損傷神経部の ED-1 陽性マクロファージを観察したが 3PGDH の発現は陰性であった。以上から、3PGDH の発現は末梢神経

系では神経細胞で抑制され、周囲の支持細胞で選択的に誘導されていることが明らかとなった。シュワン細胞と線維芽細胞は多彩な栄養因子やサイトカインを産生する。またシュワン細胞を損傷脊髄に移植すると本来再生しないとされてきた脊髄神経細胞の伸張が促進されることが知られている。これらの所見から、この2種の支持細胞は細胞間のメディエーターの発現調節を介して軸索の発達や再生を制御していると考えられ、その一つとしてL-セリンの合成、軸索への供給を担当している可能性が考えられる。また、神経損傷により3PGDHの発現増強が確認されたが、細胞膜の構成脂質合成におけるL-セリンの重要性を考え合わせると、L-セリンの合成と供給を介して神経周囲の支持細胞が軸索の形成・維持・再生を積極的に支援している代謝的關係が示唆された。

この論文に対して、3PGDHの発現における有髄繊維と無髄繊維の違いについて、シュワン鞘の最外層と最内層での3PGDH発現の違いについて、末梢神経における3PGDHのシュワン細胞と線維芽細胞以外の細胞での発現の有無について、神経細胞が3PGDHを発現していない理由について、血中などにもL-セリンは存在するのに神経周囲の支持細胞が3PGDHを強く発現する理由について、損傷の違いによる3PGDH発現の差についての質問があった。さらに今回の実験の臨床応用の可能性についての質問があった。これらの質問に対して、申請者は、坐骨神経では3PGDHはシュワン鞘と線維芽細胞のみに発現しており、有髄神経と無髄神経でその発現に差がないこと、有髄の場合にはミエリン鞘の内側のシュワン細胞質部にも外層と同様3PGDH発現は認められることを述べた。次に3PGDHの発現局在について、神経細胞は虚血に伴う低血糖や低酸素状態に対して極めて脆弱な細胞であるが、そのような細胞が3PGDHを発現していればエネルギー代謝とL-セリン合成の同化代謝の両方にグルコースが消費されるため、細胞の生存と再生を安全かつ効率良く行うために神経細胞はグルコースを専らエネルギー代謝に回し、同化代謝に必要なL-セリンを周囲の支持細胞から獲得するようになったと推測していると述べた。次に、損傷の違いによる3PGDH発現に差異はないことを述べた。また臨床応用として、障害神経へのセリン補充療法について述べた。

この論文は、末梢でのセリン合成酵素の局在を確認した初めての論文として、またその実験手技、特に免疫組織化学的手法の技術、論理的な考察内容で高く評価され、今後の臨床応用の可能性についても期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。