



Effect of tyrosine kinase inhibitors on neurite outgrowth and elongation in chick embryo dorsal root ganglia

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 周, 平 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1119

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 266号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏 名	周 平		
論文題目	Effect of tyrosine kinase inhibitors on neurite outgrowth and elongation in chick embryo dorsal root ganglia (ニワトリ胚脊髄神経節の神経軸索成長と伸長に対するチロシンキ ナーゼ阻害剤の影響)		

博士(医学) 周 平

論文題目

Effect of tyrosine kinase inhibitors on neurite outgrowth and elongation in chick embryo dorsal root ganglia

(ニワトリ胚脊髄神経節の神経軸索成長と伸長に対するチロシンキナーゼ阻害剤の影響)

論文内容の要旨

〔目的〕

タンパク質チロシンキナーゼ阻害剤 (PTKI) のニワトリ胚脊髄神経節 (DRG) の軸索伸長への影響についてはほとんど報告がない。複数の観察は広範な分類の PTKI が軸索伸長に影響を与えることを示唆している。これらの観察はチロシンキナーゼ阻害剤 (PTKI) が軸索伸長で演じる重要な役割を暗示している。Genistein は単層3T3細胞の上で培養した小脳神経細胞と神経細胞に分化したPC12細胞の軸索伸長のスピードを増大する。それはまた成長円錐の形態をも変化させる。対照的にerbstatin analog即ちmethyl-2, 5-dihydroxycinnamateはerbstatinの安定な類似物で小脳神経細胞の軸索伸長を阻害するが、阻害は培養条件により異なる。Lavendustin Aは小脳神経細胞の軸索成長に影響を与えない。Herbimycin Aは低濃度でPC12細胞と小脳顆粒細胞の軸索成長を促進する。これらの知見はPTKの神経成長に関与するしかたが単一ではないことを示している。その上そのような過程が細胞特異的であることを示しているように思われる。今回複数の PTKI についてそれらが NGF の存在下で培養したニワトリ胚脊髄神経節 (DRG) の初代培養における軸索伸長に及ぼす影響を調べた。

〔方法〕

ニワトリ胚 (E7-12) から実体顕微鏡下で硬膜、結合組織を剥いで脊髄神経節 (DRG) を無菌的に取り出し、ラミニンを塗ったカバーガラス上で (NGF存在下、10%ウシ胎児血清を含むmodified Eagle's medium 中) 炭酸ガスインキュベーターで37℃初代培養する。PTKI の効果を2種類の濃度すなわち高濃度 (10 μ g/ml) と低濃度 (1 μ g/ml) で検討する。培養開始後24時間と48時間後に神経線維のDRG表面における出現部位から成長円錐の先端までの距離を測定する。1培養につき10本以上 (10-20培養) の神経繊維について得た結果の平均をとり対照との差を統計処理し $P < 0.05$ を有意とした。

〔結果〕

1 μ g/ml の genistein は48時間を通じて軸索伸長を刺激した。しかし、10 μ g/ml では対照と比較して、ほとんど促進がみられなかった。1 μ g/ml の lavendustin A による刺激の程度は24時間における genistein のその約1/2であった。1 μ g/ml の ST638 は24時間では効果がほとんどみられなかった。しかし、48時間では見かけ上刺激効果を示した。この効果は24時間以後にはコントロールの軸索伸長速度が低下する結果のように思われる。他方、10 μ g/ml の ST638 は明らかに促進的で、48時間における促進効果は genistein 1 μ g/ml と比べてもより大きい。Erbstatin analog は1 μ g/ml で明らかに阻害的で10 μ g/ml では神経成長を完全に阻害した。Herbimycin A はどちらの濃度においても神経成長を完全に阻害した。この知見は herbimycin A が細胞毒である可能性を示している。

〔考察と結論〕

今回の研究で低濃度では genistein がもっとも促進作用が強いことがわかった。Genistein は『特異的かつ一般的な』PTKIであることが知られている。

Genistein は PC12 細胞において NGF 媒介の軸索伸長を阻止する。他方、Miller らは同じ細胞について genistein が成長速度を増加させることをみている。

ST638 による阻害は基質タンパクと PTK 結合部位を競合することによって引き起こされることが知られている。報告によれば genistein と lavendustin A は培養網膜神経細胞の軸索伸長を阻害する。しかし、同じ著者が毛様体神経節細胞については逆の効果を見いだしている。Williams らは小脳神経細胞について genistein と lavendustin A が全く作用がないことを報告した。Erbstatin analog は初期に EGF 受容体に付随する PTK を *in vitro* で阻害することがみつけれられたが、NGF に対する小脳神経細胞の反応をも阻害する。今回の研究で NGF で誘導させた軸索成長が erbstatin analog によって阻害されることがわかった。報告によれば erbstatin analog は細胞接着因子で誘導される軸索成長をも抑制する。

Herbimycin A は pp60v-src の自己リン酸化及び他者リン酸化作用を不可逆的に阻害することが知られている。pp60c-src は神経成長円錐の細胞下分画の中に多いことが見いだされている。Herbimycin A は網膜の神経細胞の軸索伸長を阻害する。しかし、PC12 細胞については相反する報告もある。それらの細胞の軸索成長は herbimycin A によって促進されたり、阻害されたりする。今回の研究では herbimycin A は神経細胞の軸索成長を完全阻害した。これらの報告に述べられている PTKI の神経軸索成長と伸長に対する両極端の効果は PTK によるこれらの過程の媒介が神経細胞のタイプや発生段階によって異なることを示唆している。つまり、発生段階が異なればそれに応じて細胞内信号伝達系も異なる可能性が高いからである。したがって、神経成長円錐の形成と軸索伸長における PTK の役割を明かにするにはさらに詳細な知識を持つことが必要であると思われる。

論文審査の結果の要旨

複数のタンパク質チロシンキナーゼ阻害剤 (PTKI) が神経軸索の伸長を修飾することが知られている。例えば従来の報告では、PTKI の genistein は単層 3T3 細胞上で培養した小脳神経細胞と、神経細胞に分化した PC12 細胞の軸索伸長のスピードを増大する、erbstatin analog、すなわち methyl-2,5-dihydroxycinnamate は小脳神経細胞の軸索伸長を阻害する、また lavendustin A は小脳神経細胞の軸索伸長には影響を与えない、herbimycin A は低濃度で PC12 細胞と小脳顆粒細胞の軸索成長を促進するなどである。これらの報告は、PTKI が軸索伸長に重要な役割を有していることを示唆しているが、同時にその関与の仕方が一定でないことも示している。そこで申請者は複数の PTKI を用い、従来報告のないニワトリ胚脊髄後根神経節 (DRG) の初代培養における軸索伸長に対する PTKI の影響を明らかにしようとした。

ニワトリ胚 (E7-12) から DRG を取り出し、神経成長因子 (NGF) 存在下ラミネン塗布カバーガラス上で初代培養した。PTKI の効果は高濃度 (10 μ g/ml) と低濃度 (1 μ g/ml) の 2 種類を用いて、培養開始後 24 時間と 48 時間に神経線維の DRG 表面における出現部位から成長円錐の先端までの距離を測定し判定した。1 μ g/ml の genistein は観察期間中を通じて軸索伸長を刺激した。しかし 10 μ g/ml では対照と比較して差がなかった。1 μ g/ml の lavendustin A では genistein の 24 時間伸長の 1/2 であった。1 μ g/ml の ST638 は 24 時間では効果が認められなかったが 48 時間では見かけ上の刺激効果を示した。これはコントロールの 24 時間以降の軸索伸長速度が低下する結果と考えられた。一方 10 μ g/ml の ST638 は明らか

に促進的で、48時間における促進効果はgenistein 1 μ g/mlよりも大きかった。Erbstatin analogは1 μ g/mlでは明らかに阻害的で、10 μ g/mlでは神経成長を完全に阻害した。Herbimycin Aはいずれの濃度でも神経成長を完全に阻害した。この結果はherbimycin Aが細胞毒であることを示唆している。

なおgenisteinとlavendustin AはATPとの競合作用でチロシンキナーゼを阻害する物質として、erbstatin analogとST638はEGFレセプターのチロシンキナーゼ阻害物質として発見され、またherbimycin Aはsrcのシステイン残基のSH基と反応してチロシン活性を阻害する。

以上の結果から、PTKIの作用はきわめて複雑で、細胞の種類、発達の時期、PTKIの濃度などにより異なる結果が得られると考えられ、審査委員全員は本研究がPTKIの多様性を明らかにした点を高く評価した。

申請者の発表に対し次のような質疑が行われた。

- 1) PTKIに共通する構造は何か
- 2) ラミニンを塗布する理由
- 3) NGF を添加しない場合の神経の伸長はどうか
- 4) 細胞のviabilityをどのように評価したか
- 5) Genisteinが癌細胞を阻害する機序
- 6) 神経伸長の評価をどのように行ったか
- 7) NGF以外の成長因子を用いるとどうなるか

以上の質問に対する申請者の解答はおおむね適切であり、研究内容も博士（医学）の学位論文としての水準に達しているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 金子 榮 藏

副査 教授 堀 内 健太郎 副査 助教授 龍 浩 志