



Proteolysis of NCAM by the tissue plasminogen activator-plasmin system after kainate injection in the mouse hippocampus

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 遠藤, 哲 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1129

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 276号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏 名	遠 藤 哲		
論文題目	Proteolysis of NCAM by the tissue plasminogen activator – plasmin system after kainate injection in the mouse hippocampus (マウス海馬におけるカイニン酸投与後の組織型プラスミノーゲンアクチベーター・プラスミンシステムによる NCAM の分解)		

博士(医学) 遠藤 哲

論文題目

Proteolysis of NCAM by the tissue plasminogen activator-plasmin system after kainate injection in the mouse hippocampus

(マウス海馬におけるカイニン酸投与後の組織型プラスミノゲンアクチベーター・プラスミンシステムによるNCAMの分解)

論文内容の要旨

[はじめに]

組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) はプラスミノゲン (plasminogen) を活性型プラスミン (plasmin) に変える分泌性セリンプロテアーゼであり細胞外マトリックスの代謝に関与している。中枢神経系において tPA は、神経活動を伴う薬理的刺激および電氣的刺激により海馬に一過性に誘導され excitotoxin に誘導される神経細胞死等に関与することが報告されている。また excitotoxin の1つであるカイニン酸は、神経細胞死を誘導し、カイニン酸の側脳室投与により海馬 CA 3 領域の神経細胞死を誘導する事が知られている。一方、NCAM は膜糖蛋白で分子量により180kD、140kD、120kD の3つのアイソフォームがあり同一の細胞外ドメインを持っている。中枢神経において NCAM は、細胞-細胞間の認識および細胞構築の維持に重要な役割を果たしている。しかし、中枢神経における NCAM の代謝経路および tPA の役割は、解明されていない事が多い。そこで、今回の研究では、マウスへのカイニン酸の側脳室投与により tPA が海馬 CA 3 領域に誘導され、それによって活性化された tPA-plasmin システムにより細胞外マトリックスの構成要素の1つである NCAM が分解されるであろうという仮説を検討した。

[材料ならびに方法]

8週齢 C57BL/6J mice をネンブータル麻酔下で、生理食塩水にて灌流後、全脳を取り出しホモジナイズし、ヒト tPA (70nM) およびヒト plasminogen (2 μ M) の存在および非存在下で、37℃にてインキュベーションの後、NCAMの分解をウエスタンブロッティングを用いて検討した。次にネンブータル麻酔下で、8週齢 C57BL/6J mice の両側側脳室にカイニン酸4.0nmol 投与し7時間後、ネンブータル麻酔下で生理食塩水にて灌流し、全脳を取り出し tPA 活性の変化をザイモグラフィにて、神経細胞の変化をヘマトキシリン染色にて、NCAM陽性反応の変化を免疫組織化学にて検討した。

[結果]

1. ヒト tPA、ヒト plasminogen の存在下で、NCAM 分解を in vitro で認めた。またその分解は、プラスミンのインヒビターであるアプロチニンにより抑制された。
2. 4.0nmol のカイニン酸の両側側脳室投与7時間後、海馬 CA 3 領域で tPA 活性の上昇を認めた。
3. 4.0nmol のカイニン酸の両側側脳室投与7時間後、海馬 CA 3 領域で神経細胞の萎縮を認め、さらに NCAM 陽性反応の減少を認めた。

[考察]

NCAM は、中枢神経において細胞-細胞間の認識および細胞構築の維持に重要な役割を果たしていると

言われているが、その代謝経路については解明されていない。今回の研究の結果、*in vitro*においてNCAMはtPA-plasminシステムの基質となる事が証明された。またカイニン酸などの excitotoxin により引き起こされる神経細胞死にtPAが関与することが報告されているが、今回の研究で示されるように、カイニン酸の側脳室投与の結果、海馬CA3領域においてtPA活性の上昇、神経細胞の萎縮、NCAMの陽性反応の減少を認めたという事実から、カイニン酸の側脳室投与により海馬CA3領域でtPA活性が上昇し、その結果tPA-plasminシステムが活性化され、NCAMの分解を介した神経細胞の変性が生じる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

分泌型セリンプロテアーゼである組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) はプラスミノゲンを活性型プラスミンに変え、細胞外マトリックスの代謝に関与すると考えられている。excitotoxin の1つであるカイニン酸の投与により、海馬にtPA mRNAの発現とCA3領域の神経細胞死が誘導されることから、tPAがexcitotoxinによる過剰興奮性神経細胞死に関与することが示唆されている。一方、膜糖蛋白のNCAMは、中枢神経系において細胞-細胞間の接着や細胞構築の維持に重要な役割を果たしている。しかし、中枢神経系におけるNCAMの代謝経路やtPAの役割、特に両者の関係はまだ十分に解明されていない。そこで申請者は、カイニン酸の側脳室投与によりtPAが海馬CA3領域に誘導され、それによって活性化されたtPA-plasminシステムにより細胞外マトリックスの構成要素の1つであるNCAMが分解されるであろうという仮説を立てそれを検討した。

8週齢C57BL/6J miceの全脳をネブタール麻酔下に摘出、ホモジナイズし、ヒトtPA (70nM) およびヒトプラスミノゲン (2 μ M) の存在下あるいは非存在下で、37℃でインキュベーションの後、ウェスタンブロッティング法を用いてNCAMの分解を検討した。その結果ヒトtPA、ヒトプラスミノゲンの存在下で、NCAMの180kD、140kD、120kDの3つのアイソフォームすべての分解を認め、その分解は、プラスミンのインヒビターであるアプロチニンにより抑制された。

ネブタール麻酔下で、8週齢C57BL/6J miceの両側側脳室にカイニン酸4.0nmolを投与し7時間後に全脳を摘出し以下の検討を加えた。ザイモグラフィーにてtPA活性の変化を検討したところ海馬CA3領域でtPA活性の上昇を認めた。神経細胞の形態的变化をヘマトキシリン染色にて検討した結果、海馬CA3領域で神経細胞の萎縮を認めた。さらに、NCAMの変化を免疫組織化学法にて検討したところ、同部位でNCAM陽性反応の減少を認めた。

以上の結果から、*in vitro*においてNCAMは、tPA-plasminシステムの基質となる事が証明された。さらに、カイニン酸の側脳室投与により海馬CA3領域でtPA活性が上昇し、その結果tPA-plasminシステムが活性化され、NCAMの分解を介した神経細胞の変性が生じる可能性が示唆された。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) tPA活性上昇とNCAM分解、神経細胞変性の因果関係はこの結果からだけで言えるのか
- 2) 神経細胞の萎縮と核の濃染はアポトーシスを示唆しているのか、それを証明するためにタネル染色等は行ったか
- 3) 細胞障害が先に起こりその結果として破壊された細胞からtPAが放出された可能性はないか
- 4) 一次的な神経障害によって二次的に集積したグリアがtPAを放出し、死滅神経細胞を除去するため

のNCAM分解である可能性はないのか

- 5) カイニン酸投与によりけいれんは全例に起こるのか、けいれんによる細胞障害といえるのか
- 6) 全例にけいれんが起こるような強いストレスがかかった場合、血液由来の tPA- プラスミン系が脳内に入り神経細胞障害を起こした可能性はないのか
- 7) 3種の NCAM アイソフォームの細胞外ドメインのどこがどの様な時間経過でプラスミンにより分解されるのか
- 8) 海馬を実験に対象部位とした理由は何か
- 9) インビボが実験になぜアプロチニンや抗 tPA 抗体を用いなかったのか、また、インビトロの効果も図の写真からははっきりしないのではないか
- 10) プラスミンの生成そのものを定量的にアッセイすることはできなかったのか
- 11) tPA のノックアウトマウスではカイニン酸による神経細胞死は起こらないのか
- 12) CA 3 のどの部分に NCAM が多いのか、そこにはどのタイプのグルタミン酸受容体が多いのか
- 13) プラスミンの濃度が高すぎると非特異性に蛋白を分解してしまわないか、ネガティブコントロールとしてプラスミンの基質以外のものを用いる必要はないか
- 14) CA 3 以外に乳頭体視床路で tPA 活性上昇がみられているがその理由はどう考えるか
- 15) 細胞脆弱性の高い CA 1 ではなく CA 3 に障害が現れた理由、カイニン酸でなくグルタミン酸を用いるとどうなるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 福 田 敦 夫

副査 教授 寺 川 進 副査 教授 中 原 大 一 郎