

タイトル	Cell permeable p38 MAP kinase protects adult hippocampal neurons from cell death
別タイトル	膜透過型p38MAP キナーゼ活性型蛋白質の海馬神経細胞死抑制作用
作成者(著者)	鳴山, 文子
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 赤羽悟美 / タイトル: Cell permeable p38 MAP kinase protects adult hippocampal neurons from cell death / 著者: Fumiko Shigiyama, Makoto Hamanoue, Masaaki Kobayashi, Ken Takamatsu / 掲載誌: Neuroscience Letters / 巻号・発行年等: 699:115 121, 2019
著者版フラグ	none
報告番号	32661 甲第925号
学位記番号	甲第630号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
DOI	info:doi/10.1016/j.neulet.2019.02.002
メタデータのURL	https://mylibrary.toho.u.ac.jp/webopac/TD90626823

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

嶋山文子より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 630 号

学位申請者 : しぎ 嶋 やま 山 ふみ 文 こ 子

学位論文 : Cell-permeable p38 MAP kinase protects adult hippocampal neurons from cell death

(膜透過型 p38MAP キナーゼ活性型蛋白質の海馬神経細胞死抑制作用)

著者 : Fumiko Shigiyama, Makoto Hamanoue, Masaaki Kobayashi, Ken Takamatsu

公表誌 : Neuroscience Letters 699 : 115-121, 2019

論文内容の要旨 :

[目的]

海馬は記憶の獲得過程に重要な部位と考えられている。海馬神経細胞では、アルツハイマー病では病初期より障害が見られることが知られ、また、脳虚血では極めて脆弱であることが知られている。したがって、海馬神経細胞の細胞死からの保護機構の解明が強く求められている。一方、p38MAP キナーゼは、紫外線や浸透圧ストレスで活性化する細胞内のリン酸化酵素で、大脳皮質神経細胞やオリゴデンドロサイトなどで生存維持活性を有することが知られている。p38MAP キナーゼは海馬神経細胞でも認められるが、これまでの p38MAP キナーゼ化学合成阻害薬を用いた解析では、海馬神経細胞の生存を促進するのか、細胞死を誘導するのかについて定見が存在しない。本研究では、海馬由来神経幹細胞から調整し均一性に優れた高純度培養海馬神経細胞系を確立し、低グルコース条件で誘導した細胞死に対する p38MAP キナーゼの作用について検討した。

[方法]

(1) **海馬由来神経幹細胞と高純度培養海馬神経細胞の調製** : 12 週齢成獣マウスの海馬から細胞を分離し、上皮細胞成長因子 (EGF) と線維芽細胞成長因子 (FGF) を含有する増殖培地で培養しニューロスフェアを形成させた。2 次ニューロスフェアを単離して海馬神経幹細胞をクローン化した。神経細胞への分化は分化培地で 5 日以上培養し高純度の海馬神経細胞を調整した。

(2) **免疫組織化学染色法** : 培養細胞は 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、蛍光標識 2 次抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。神経幹細胞は抗ネスチン抗体、分化誘導した細胞は神経細胞マーカーの抗 β III-チューブリン抗体、成熟神経細胞マ

ーカーの抗 MAP2 抗体、海馬神経細胞に特徴的な抗ヒポカルシン抗体、アストロサイトは抗 GFAP 抗体を用いた。p38MAP キナーゼの発現には抗 p38MAP キナーゼ抗体を用いた。

(3) **細胞死の誘導と検出**：細胞死は、分化した海馬神経細胞を低グルコース培地（グルコース最終濃度、0~100mg/dL）で培養して誘導した。生存細胞と死細胞を可視化するために、カルセイン/ヨウ化プロピジウム溶液（PI）染色法を用いた。

(4) **膜透過型の優性活性型および優性不活性型 p38MAP キナーゼの作製**：膜透過型（PTD）蛋白質用のプラスミドに、活性型（p38WT）、不活性型点変異体（p38KD）、不活性型欠失変異体（p38DK）を組み込んで、大腸菌で発現させ TALON Metal 親和性レジンを用いて精製した。

[結果および考察]

(1) **高純度培養海馬神経細胞系の確立**：ニューロスフェアアッセイと免疫染色法で、自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞であることを確認した。神経幹細胞から海馬神経細胞へ分化させたところ、90%以上の純度であることを免疫染色法で確認した。これらの細胞は p38MAP キナーゼの発現をしていた。

(2) **細胞死アッセイ系の確立**：0~100mg/dL のグルコース条件下で培養したところ、25mg/dL で安定して細胞死が誘導できることから、以下の実験はこの条件で行った。

(3) **細胞死に対する内因性 p38MAP キナーゼの作用**：細胞死誘導下に p38MAP キナーゼ阻害剤を添加したところ、生存率に全く変化は認められなかった。

(4) **細胞死に対する外因性 p38MAP キナーゼの作用**：細胞死誘導下に細胞膜透過活性を有する各種 p38MAP キナーゼを添加した。PTD-p38WT を添加した際に、細胞死を強力に抑制し、既報の FGF と同程度であることを認めた。一方、PTD-p38KD、PTD-p38DK ではこのような細胞死抑制活性は認められなかった。また、PTD-p38WT の細胞死抑制活性は p38MAP キナーゼ阻害薬を添加することで抑制された。以上より、低グルコース濃度で誘導した海馬神経細胞死を、細胞膜を透過して導入された p38MAP キナーゼが、キナーゼ活性をもって抑制することが明らかになった。

[結論]

高純度培養海馬神経細胞系を用いた細胞死アッセイ系を確立し、この系を用いて膜透過型 p38MAP キナーゼ優性活性型蛋白質は、海馬神経細胞死を抑制することを明らかとし、新しい治療戦略の可能性を示した。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 630 号	氏 名	鳴 山 文 子
学位審査担当者	主 査	赤 羽 悟 美
	副 査	杉 山 篤
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	船 戸 弘 正
	副 査	榊 原 隆 次

学位論文の審査結果の要旨 :

海馬は記憶の獲得過程に重要な部位と考えられている。海馬神経細胞は脳虚血に対して極めて脆弱であり、その障害は記憶と認知機能の低下をもたらすことが知られていることから、海馬神経を細胞死から保護する機構の解明は重要な課題である。p38MAP キナーゼは、ストレス刺激によって活性化する蛋白リン酸化酵素であり、大脳皮質神経細胞やオリゴデンドロサイトにおいて生存維持活性を有することが報告されている。一方、海馬神経細胞における p38 の役割については細胞死を誘導するという報告もあり、見解が定まっていない。そこで本研究では、海馬神経細胞における p38 の役割を明らかにすることを目的として、海馬神経幹細胞由来高純度培養海馬神経細胞系を確立し、虚血を模した低グルコース条件で誘導した細胞死に対する細胞膜透過型 p38 および p38 阻害剤の作用を検討した。【方法】 12 週齢成獣マウスの海馬から海馬由来神経幹細胞を単離し、海馬神経幹細胞をクローン化し、高純度の培養海馬神経細胞を調整した。分化した海馬神経細胞を低グルコース培地で培養（グルコース最終濃度 25mg/dL、16 時間）することにより細胞死を誘導した。野生型 p38、不活性型点変異体 p38、不活性型欠変異体 p38 を PTD (protein transduction domain) と融合することにより膜透過型とした (PTD-p38WT、PTD-p38KD、PTD-p38DK) (Fig. 2)。【結果および考察】 高純度培養海馬神経細胞系を確立した (純度 90%以上)。これらの神経細胞は p38 を発現していた (Fig. 1(a))。低グルコース条件で誘導した細胞死に対して、内在性 p38 を p38 阻害剤で阻害しても影響は認められなかった (Fig. 1(b, c))。これに対して、細胞死誘導下に細胞膜透過型 p38 を添加したところ、PTD-p38WT は細胞死を抑制し、既報の FGF と同程度の効果を示した。一方、PTD-p38KD、PTD-p38DK、または融合蛋白でない p38WT では細胞死抑制活性は認められなかった (Fig. 3(a, b), Fig. 4(a, b))。また、PTD-p38WT の細胞死抑制活性は p38MAP キナーゼ阻害薬の添加により抑制された (Fig. 3(c), Fig. 4(c))。以上より、細胞膜を透過して導入された p38 が、そのキナーゼ活性を介して低グルコース濃度で誘導した海馬神経細胞死を抑制することが明らかになった。膜透過型 p38 の細胞内取り込み量は遺伝子導入による強制発現に比較して低いことから、膜透過型 p38 による低レベルの p38 活性化が神経細胞死に対して保護的に働くと考えられる。本研究の成果は、膜透過型 p38MAP キナーゼを介した新たな治療戦略の可能性を示すものである。

学位審査会は平成 31 年 3 月 27 日 (水) 13 時~14 時に開催された。出席者は杉山教授、中野教授、赤羽、書面審査は船戸教授、榊原教授であった。審査委員からは、膜透過型 p38 の細胞内への導入効率について、低グルコース条件で誘導される細胞死のメカニズムは何か、細胞死抑制に関わる p38MAP キナーゼの標的分子は何か、細胞死誘導と膜透過型 p38 適用のタイミングについて、グリア細胞等の存在下での有効性について 等々多数の質問があった。申請者は、個々の質問に対して本研究の限界を踏まえて的確に回答した。以上より、本研究は海馬神経細胞死を抑制する新たな治療標的の解明に向けて重要な新規の知見をもたらすものであり、審査委員全員一致の下、学位に値する論文であると結論した。