

氏名(本籍)	井佐原 ^{いさばら} 京 ^{きょう} 子 ^こ (茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第1,563号		
学位授与年月日	平成8年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	神経系での発生分化過程における血管内皮細胞由来の接着因子に関する研究 —EC1プロテオグリカンの分子生物学的及び機能的考察—		
主査	筑波大学教授	医学博士	岡戸信男
副査	筑波大学教授	医学博士	岡野栄之
副査	筑波大学教授	薬学博士	後藤勝年
副査	筑波大学客員教授	薬学博士	増保安彦
副査	筑波大学助教授	医学博士	八木沼洋行

論文の要旨

(目的)

神経細胞はその分化過程で、神経線維を特定の経路で伸長させ、標的に向かうことで、複雑で精巧な神経回路網を形成する。この時間、接着分子が神経線維の伸長方向を決定することは以前から知られており、発生分化過程では周辺組織との相互作用が重要であることも知られている。しかし、神経細胞が接着分子を介して周辺組織から受ける作用についての詳細な研究は少ない。

本研究の目的は、第1に、脊髄神経節をモデルとし、これとほとんど一致して発生してくる周囲の血管に注目し、神経細胞が、接着分子を介して血管内皮細胞から受ける作用について調べることである。第2に、そのような作用を担う接着分子を同定し、分子の性質を明らかにし、作用メカニズムを解明することである。

(方法)

1. ブタ胸部大動脈の血管内皮細胞(AEC)に発現している接着分子を調べるため、AECの免疫組織化学を行った。AECを培養し、細胞外マトリックスタンパク質の抗体で、及びラット胎仔脳を免疫源として作製したAECに対するモノクローナル抗体(EC1抗体)で、細胞表面を免疫染色した。また、EC1抗体を用いたウエスタンブロットで、抗原の局在を調べた。
2. AEC、精製タンパク質、及びグリコサミノグリカン(GAG)の神経突起伸長に対する影響を見るため、それぞれの上で後根神経節(DRG)を器官培養し、神経突起伸長を計測した。AECは、培養後、乾燥固定し基質とした。器官培養する際、上記の抗体(中和抗体を使用)、合成ペプチド等を加えることにより、あるいはGAGの分解酵素でAECを処理することにより、突起伸長作用を有する接着分子の同定と作用メカニズムを調べた。
3. AEC無血清培養上清から、EC1抗体の抗原分子(EC1プロテオグリカン)を精製するため、DEAEカラムを用いて陰イオン交換HPLCを行い、EC1プロテオグリカンを濃縮分離した。このEC1画分をSDS-PAGEにより分離し、ゲル切りだし法により、EC1プロテオグリカンを精製した。この精製品をヘパリチナーゼで完全消化し、EC1抗体によるウエスタンブロット解析を行い、EC1プロテオグリカンのコアタンパク質を同定するとともに、N末端のアミノ酸配列を気相シーケンサーで解析した。また、EC1画分をプロテアーゼで完全消化することにより、EC1プロテオグリカンのGAG鎖を調べた。

(結果と考察)

1. AEC 上で、DRG の神経突起が伸長した観察結果より、AEC が神経突起伸長作用を有することが明らかとなった。この伸長作用に関与する AEC の接着分子は、抗体による阻害実験から、ビトロネクチンと EC 1 抗原であった。ビトロネクチンは、RGD 接着部位を介した作用により、EC 1 抗原は、ヘパラン硫酸鎖を介した作用により、神経突起を伸長することが示唆された。EC 1 抗体を用いたウエスタンブロット解析により、EC 1 抗原は、ヘパラン硫酸鎖をもったプロテオグリカン (EC 1 プロテオグリカン) であることがわかった。また、この分子は胎生期のラットの DRG と脊髄に局在していた。EC 1 抗体は、フィブロネクチンやビトロネクチン上の DRG の突起伸長も阻害した。これらのことから、発生過程にある脊髄神経節の突起伸長に、その周囲にある血管内皮細胞の接着分子であるビトロネクチンや EC 1 プロテオグリカンを介した作用が働いている可能性が考えられる。

2. EC 1 プロテオグリカンは、DEAE イオン交換 HPLC で NaCl の直線濃度勾配により EC 1 画分を濃縮分離した。この EC 1 画分から、EC 1 プロテオグリカンを SDS-PAGE 上で精製した。この精製品をヘパリチナーゼ、及びコンドロイチナーゼ ABC で処理することにより、EC 1 プロテオグリカンのコアタンパク質は、GAG 鎖がついた分子量とはほぼ同じで、約 300 kD であり、GAG 鎖はヘパラン硫酸のみであることが明らかとなった。さらに、この精製品を自動気相シーケンサーを用いて、アミノ酸配列の解析を行ったところ、EC 1 プロテオグリカンの N 末端アミノ酸配列、7 残基が得られ、その配列は、LPFEQKA であった。この EC 1 プロテオグリカンは、発現パターンや、分子の性質、及び N 末端のアミノ酸配列より、おそらく既知のプロテオグリカンではないことが推測された。

審 査 の 要 旨

発生過程における末梢神経突起伸長に対する周囲組織からの影響を調べることを目的とし、本研究では、特に血管系との相互作用について解析を行った。その結果、血管内皮細胞が末梢神経に対して突起伸長作用を有することを見いだした。また、この内皮細胞に対するモノクローナル抗体 (EC 1) を作製し、EC 1 の抗原分子が突起伸長に関与していること、抗原分子はヘパラン硫酸プロテオグリカンであることを同定した。さらに、この分子の神経系における局在等から、生体内でも、神経突起伸長に役割を果たすことが示唆された。著者は、この EC 1 分子の精製によって、糖鎖の性質を決定し、コアタンパク質について、N 末端のアミノ酸配列等の分子的側面を明らかにした。本研究は、周辺組織からの影響として、血管内皮細胞由来の接着分子の作用を調べ、末梢神経系の分化のメカニズムを探った研究であり、特に、ヘパラン硫酸鎖をもつ新しいプロテオグリカンの今後の解析に対する基礎となる研究である。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。