

氏名（本籍）	秋山 雅博（山梨県）
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 7168 号
学位授与年月	平成26年11月30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	人間総合科学研究科
学位論文題目	低分子量G蛋白質 ADP-ribosylation factor 6 によるミエリン鞘形成制御

主査	筑波大学教授	博士（医学）	梶 正幸
副査	筑波大学助教	博士（医学）	新開 泰弘
副査	筑波大学助教	博士（理学）	水野 智亮
副査	筑波大学教授	博士（理学）	松本 正幸

論文の内容の要旨

（目的）

低分子量G蛋白質の1つである ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) は細胞膜に局在し、エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、アクチン細胞骨格の制御などを介して多様な細胞機能に関与する。Arf6 は脳での発現が多く、神経軸索の伸長、樹状突起の分岐、スパイン形成、神経伝達物質の放出に関与することが *in vitro* の実験で示されているが、生体内での働きは不明である。そこで、本研究では遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いて Arf6 の神経機能を個体レベルで明らかにすることを目的とした。

（対象と方法）

Arf6 KO マウスは胎生致死であるため、本研究では Arf6^{fllox/fllox} マウス（既に作製済み）と各種の Cre recombinase 発現マウスを交配して作製したコンディショナル KO マウスを用いた。神経幹細胞、ニューロン、グリア（オリゴデンドロサイト）で特異的に遺伝子を破壊するために、各々 Nestin-Cre、Tau-Cre、CNP-Cre マウスとかけ合わせたマウス（各々 B-Arf6-CKO、N-Arf6-CKO、O-Arf6-CKO と呼ぶ）を用いた。脳の異常を調べるために切片を作製し、HE 染色、luxol fast blue (LFB) 染色、電子顕微鏡観察を行った。オリゴデンドロサイトの発生、遊走を調べるために、BrdU を投与し、免疫染色を行った。細胞遊走能を調べるために Boyden chamber アッセイを行った。

（結果）

B-Arf6-CKO では、海馬采と脳梁の低形成が見られた。LFB 染色で染色強度が低下し繊維のサイズも

小さくなっていることから、ミエリン髄鞘形成不全が示唆された。電子顕微鏡で観察したところ、髄鞘を持つ軸索が減少していた。興味深いことに、大脳脚や小脳ではこのような異常は観察されなかった。

B-Arf6-CKO の海馬采と脳梁におけるオリゴデンドロサイトの数を調べたところ、コントロールに比べて顕著な減少が観察された。BrdU 標識を用いてオリゴデンドロサイトの発生と遊走を調べたところ、脳室周辺で誕生した細胞の数は正常であったが、海馬采と脳梁に到達した細胞の数が減少していた。

ニューロン特異的に遺伝子を破壊した N-Arf6-CKO では、海馬采と脳梁の低形成、ミエリン髄鞘形成不全、オリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走障害が見られたが、O-Arf6-CKO では観察されなかった。

以上の結果から、オリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走を誘導する標的神経細胞由来の因子の異常が示唆された。そこで、Boyden chamber アッセイを用いて、培養海馬組織片から放出される遊走因子について調べたところ、N-Arf6-CKO マウスの海馬培養上清はコントロールに比べてオリゴデンドロサイト前駆細胞の誘引数が少なかった。最後に培養上清中の誘導因子について調べたところ、N-Arf6-CKO マウスの海馬で fibroblast growth factor (FGF-2) の放出が減少していることが分かった。

(考察)

Arf6 が海馬采と脳梁のミエリン髄鞘形成に必要なことが分かった。そのメカニズムとしては、Arf6 がオリゴデンドロサイト前駆細胞の誘引因子の 1 つである FGF-2 放出過程に関与していることが明らかとなった。FGF-2 の放出は、unconventional secretion pathway を介して起こり、FGF-2 が細胞膜上のホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP2) に結合することが必要である。Arf6 は細胞膜上で phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K) を活性化し PIP2 産生を制御することから、Arf6 が PIP5K を介して FGF-2 放出を制御している可能性が考えられる。

審査の結果の要旨

(批評)

低分子量G蛋白質 Arf6 が海馬采と脳梁のミエリン髄鞘形成に必要なことを明らかにした研究である。神経幹細胞、ニューロン、グリアで特異的に Arf6 遺伝子を破壊できるコンディショナル KO マウスを駆使して、海馬神経細胞からのオリゴデンドロサイト誘引因子の放出が障害されている分子機構を解明しており、初めて個体レベルで Arf6 の役割を明らかにした優れた研究であると評価できる。

平成 26 年 9 月 24 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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