

Florin Floricel 学位論文審査要旨

主 査 畠 義 郎
副主査 難 波 栄 二
同 大 野 耕 策

主論文

Antisense suppression of TSC1 gene product, hamartin, enhances neurite outgrowth in NGF-treated PC12h cells

(TSC1遺伝子産物ハマルチンのアンチセンスによる抑制は神経成長因子処理されたPC12h細胞の神経突起の形成を促進する)

(著者：Florin Floricel、檜垣克美、牧廣利、難波栄二、二宮治明、大野耕策)

平成19年 Brain & Development 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

Antisense suppression of TSC1 gene product, hamartin, enhances neurite outgrowth in NGF-treated PC12h cells

(TSC1遺伝子産物ハマルチンのアンチセンスによる抑制は神経成長因子処理されたPC12h細胞の神経突起の形成を促進する)

結節性硬化症は知的障害、てんかん、顔面の血管繊維種、その他の組織の過誤腫性病変を特徴とし、TSC1（遺伝子産物Hamartin）とTSC2（遺伝子産物Tuberin）の2つの原因遺伝子が知られている。TSC1とTSC2の2つの原因遺伝子変異による患者での明らかな症状の違いや2つの遺伝子機能の機能的相違は明らかでない。本学位論文では、PC12h細胞におけるHamartinとTuberinの発現と神経分化について検討し、PC12h細胞での神経成長因子（NGF）刺激後の神経突起形成の過程で2つの蛋白質の働きが異なる可能性を見出した。

方 法

実験にはラット褐色細胞腫由来のPC12h細胞を用いた。神経分化誘導に当たっては神経成長因子(NGF) 50 ng/mlを含む無血清培地で行った。抗Hamartin抗体および抗Tuberin抗体で免疫蛍光染色を行って両蛋白質の局在を観察し、ウエスタンブロッティングにより発現量を測定した。HamartinおよびTuberinの発現抑制は、ラットTSC1およびTSC2アンチセンスオリゴヌクレオチド(AS)をリポフェクタミンにより細胞へ導入して行なった。BrdU標識によりDNA合成細胞を検討し、神経突起の定量は位相差顕微鏡下で細胞体より長い突起を持つものの細胞の割合を数えた。

結 果

NGF刺激後、PC12h細胞でのTuberinは1分後から急速に増加し72時間後まで高いレベルを保った。一方、Hamartinはゆっくりとごくわずかに増加した。低血清条件下(0.5%血清)で培養した場合、通常血清条件下(5%胎児子牛血清/5%馬血清)の半分以下までBrdUの取り込みが顕著に減少したがASでHamartinおよびTuberinの発現を抑制すると、通常血清条件下で培養した場合と同じ程度にDNA合成をおこなう細胞を認めた。一方、TSC1AS導入後NGFで刺激した場合は神経突起の形成促進が見られたが、TSC2AS導入後NGF刺激をした場合には神経突起の形成が抑制された。TSC1は細胞接着と関係するezrin-radixin-moesinと結合し、アクチン

の制御と関係するRhoの活性化と関係していることが知られている。TSC1ASの場合RhoAの不活性化によって神経突起の形成促進がおこっている可能性を考え、RhoAの恒常的活性化型を強制発現させ、TSC1ASを導入し、NGFで刺激した場合には、神経突起の形成促進が見られなくなった。

考 察

現在、Tuberin/Hamartinは複合体を形成し、この複合体は、お互いを安定化させ、ヒトのmammalian target of rapamycin (mTOR)を活性化するRheb (Ras homolog enriched in brains) 特異的なGAP活性を持つことが知られている。TSC1またはTSC2遺伝子の欠陥によりmTORシグナルが活性化することで、結節性硬化症に見られる細胞学的な異常—過誤腫性病変の形成、細胞の巨大化、細胞の移動障害—などを説明できると考えられている。しかし、Hamartinはこれまで報告されたヒト遺伝子との相同性が乏しく、独立した機能の可能性も考えられている。

本論文では第1に、NGF刺激後のPC12h細胞ではHamartinとTuberinの発現が異なることを明らかにした。第2に、TSC2を抑制した場合は、DNA合成が促進され、神経突起の形成が抑制され、Tuberinがなくなることで神経細胞の分化が抑制され、患者で見られる大脳結節の神経細胞が分化の異常をきたしている事実とよく一致している。一方、TSC1を抑制した場合、DNA合成はTSC2ASと同じように促進されたが、神経突起の形成が促進され、同時にアクチン繊維が細胞表面に増加していた。これらのことはTSC1の抑制でRhoAの不活性化が起こっていると考えた。そこで、恒常的に活性化されたRhoAを強制発現させたところ、この神経突起の促進が正常化した。

結 語

NGF刺激後のHamartinとTuberinの発現様式には大きな違いがあり、さらにNGF刺激後の神経突起の形成がTSC1の抑制では促進され、TSC2の抑制では抑制されるという大きな表現型の違いを見出した。この神経突起形成に対するこの2つの遺伝子の機能の違いは、TSC1がアクチン結合蛋白を制御するRhoの活性化という独自の機能を有することによる可能性が示唆された。