

(44)

氏名(生年月日)	ムラカミ ヨシヒロ 村 垣 善 浩
本 籍	
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第1772号
学位授与の日付	平成9年7月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors (TrkA 受容体を発現させた髄芽腫培養細胞における神経成長因子による Apoptosis の誘導)
論文審査委員	(主査) 教授 高倉 公朋 (副査) 教授 小林 慎雄, 川上 順子

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

神経成長因子(nerve growth factor: NGF)を初めとする neurotrophin は神経系の前駆細胞, 未分化神経細胞, ある種の神経系腫瘍細胞などの分化や生存を促進している。そこで我々は, 神経成長因子とその受容体でチロシンキナーゼをもつ TrkA (最初に発見された Trk であり, 他に TrkB, TrkC がある) が, 未分化神経外胚葉性腫瘍で代表的な小児脳腫瘍の髄芽腫においてどのような働きをしているかを *in vitro* で検討した。

〔対象および方法〕

髄芽腫細胞株の D283 と DAOY に TrkA 遺伝子を組み込んだ retrovirus を感染させ選択した後, 高発現している細胞(それぞれ D283trk, DAOYtrk とする)を用いた。NGF は mouse 顎下腺由来のものを使用し, 阻害試験に抗 NGF 抗体と TrkA 蛋白のリン酸化阻害物質の K-252a を用いた。TrkA の自己リン酸化を, 抗リン酸化チロシン抗体でみた。NGF 添加後の定量的な細胞生存の測定に MTS assay を用いた。細胞死の同定に, Hoechst33342 染色による核の断片化と DNA ladder の確認を行った。更に時間圧縮ビデオによる顕微鏡撮影で細胞死までの過程をとらえた。NGF 添加後の細胞周期変化を flow cytometry で解析した。

〔結果〕

D283trk 細胞, DAOYtrk 細胞とも TrkA 蛋白を高

発現していた。TrkA 蛋白は細胞表面に存在し, NGF 添加5分後に自己リン酸化が認められ, 導入 TrkA が受容体機能をもつと考えられた。驚くべきことに, NGF 添加後 TrkA 導入細胞は分化や増殖でなく著明な細胞減少と多数の細胞死を示し, この細胞死は抗 NGF 抗体や K252a で阻害された。

p75NGFR (低親和性 NGF 受容体) 導入細胞, ベクター導入細胞, TrkC (Trk family でニューロトロフィン3と結合) 導入細胞は変化を認めなかった。細胞減少は NGF 濃度依存性で, この現象は血清を必要としなかった。細胞死がアポトーシスであることを, 核の断片化, DNA ladder, 細胞膜の膨隆現象で示した。また細胞周期では, S 期細胞数の減少が著明であった。

〔考察および結論〕

NGF は, 基本的に細胞の増殖, 生存, 分化を促進すると考えられている。しかし結果は, NGF による TrkA 細胞の細胞死を示し, 従来の NGF 除去がアポトーシスを誘導する報告と相反するものである。また NGF の受容体には, チロシンキナーゼをもつ TrkA といわゆる death domain をもつ p75NGFR があり, NGF のシグナル伝達には TrkA が重要とされ, 神経系細胞のアポトーシスには p75NGFR の関与を示唆する報告が多い。今回 p75 導入細胞は細胞死を起こさず, TrkA を介する新しい細胞死伝達機構の可能性はある。S 期細胞の減少は DNA 合成とアポトーシスの

密接な関係を示した過去の報告に合致する。更に神経芽腫、髄芽腫の予後がそれぞれ TrkA と TrkC の mRNA 発現量と相関していたという臨床報告は、本研究結果と関連を示唆した。

本研究により、NGF/TrkA 系が髄芽腫細胞株にお

いて、アポトーシスを誘導することを示し、そのシグナル伝達が神経外胚葉前駆細胞や小児脳腫瘍においてアポトーシスによる細胞死プログラムを活性化する可能性が示唆された。

論文審査の要旨

小児悪性脳腫瘍である髄芽腫は未分化神経外胚葉性腫瘍と考えられている。本研究は、この髄芽腫における神経成長因子 (NGF) とその受容体である Trk の作用を細胞株を用いて検討した。従来、神経細胞の分化と生存に必要と考えられている NGF/Trk が、髄芽腫においてアポトーシス型細胞死を誘導したという全く逆の驚くべき実験結果をいくつかの手法で慎重に示した。また細胞周期に関して、S 期特異的細胞減少を明らかにした。血清添加下でおこる神経系細胞死を初めて示し、神経系アポトーシスにおけるモデルシステムを提示した学術的に価値の高い論文である。また臨床的にも髄芽腫に対する遺伝子治療の可能性を示唆した。今後、本システムにおける分子レベルでの細胞死シグナル伝達の解明が待たれる。

主論文公表誌

Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors (TrkA 受容体を発現させた髄芽腫培養細胞における神経成長因子による Apoptosis の誘導)

Journal of Neuroscience Vol 17 No 2
530-542頁 (1997年1月15日発行) Muragaki Y,
Chou TT, Kaplan DR, Trojanowski JQ, Lee
VM-Y

副論文公表誌

- 1) Expression of *trk* receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system (ヒト中枢および末梢神経系における *trk* 受容体の発現). *J Comp Neurol* 356 : 387-397 (1995) Muragaki Y, Timothy N, Leight S, Hempstead BL, Chao MV, Trojanowski JQ,

Lee VM-Y

- 2) Neurotrophin and neurotrophin receptor proteins in medulloblastomas and other primitive neuroectodermal tumors of the pediatric central nervous system (髄芽腫とその他の未分化神経外胚葉腫瘍における Neurotrophin とその受容体蛋白の発現). *Am J Pathol* 148(3) : 929-940 (1996) Washiyama K, Muragaki Y, Rorke LB, Lee VM-Y, Feinstein SC, Radeke MJ, Blumberg D, Kaplan DR, Trojanowski JQ
- 3) The cellular and molecular biology of medulloblastoma (髄芽腫の分子生物学). *Curr Opin Neurol* 8 : 437-440 (1995) Peringa J, Fung KM, Muragaki Y, Trojanowski JQ
- 4) 転移性脳腫瘍の頭蓋内圧亢進症. *癌と化療* 24(3) : 297-302 (1997) 村垣善浩, 久保長生, 高倉公朋