

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目 血小板活性化因子による神経細胞移動の制御機構

指導教官 清水 孝雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月 入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 徳岡 (三田村) 涼美

(緒言) 血小板活性化因子 (1-O-アルキル-2-アセチル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン、platelet-activating factor ; PAF) は、1972 年にウサギ好塩基球より遊離する血小板を活性化する化学因子として、またほぼ同時期に腎臓由来の降圧脂質として発見された。'79 年に構造が決定され、グリセロール骨格の第 1 位 (*sn*-1 位) にアルキルエーテル、*sn*-2 位にアセチル基、*sn*-3 位にホスホコリンが結合したリン脂質の一種であることが明らかとなった。その後の研究により PAF は血小板活性化以外にも多彩な生物活性を持つことも示されてきた。現在までに知られている主な生物活性としては、好中球やマクロファージ・単球、好酸球の活性化、血管透過性亢進、降圧、気管支収縮、心拍数や心拍出量の変化などがあげられる。PAF をつくる細胞や臓器は、好中球、好酸球、好塩基球、マクロファージ、肥満細胞、血小板、血管内皮細胞、脳や腎臓など、多岐にわたる。また他の生理活性脂質と同様に、細胞を刺激することによって PAF の産生量や放出量が増すこと、作用した後は PAF アセチルヒドロラーゼで速やかに不活性な形へと代謝されることが報告されている。PAF アセチルヒドロラーゼには三種類が報告され、細胞内の I 型酵素は  $\alpha$  サブユニ

ット二分子と $\beta$ サブユニット一分子からなるヘテロ三量体を構成しており、また、この $\beta$ サブユニットはヒト滑脳症遺伝子(Miller-Dieker 症候群)がコードするタンパク質と同一であるなどの事実も明らかとなった。

PAF 受容体は G タンパク質共役型受容体ファミリーに属する細胞膜 7 回膜貫通型の構造を持つ。現時点ではどの動物種においても PAF 受容体のサブタイプは報告されていない。しかし PAF 受容体は複数の G タンパク質と共役することができ、百日咳毒(PTX)感受性、非感受性の各種の G タンパク質を介して、MAP キナーゼを初めとする各種キナーゼ、ホスホリパーゼの酵素活性を上昇させ、またアデニル酸シクラーゼの活性を抑制するなど、様々なエフェクター系を動かすことが明らかになっている。PAF 受容体の欠損マウス(PAFR-KO)を用いた実験によって PAF 受容体が炎症反応やアレルギー反応、急性肺損傷、脳の虚血再灌流障害、神経伝達物質の放出、さらに精子の受精能に関与することが示された。

PAF は脳でも刺激に応じて産生され、ニューロンやミクログリアに受容体が存在し、また、PAF アセチルヒドロラーゼ I 型も脳で最も発現が高いことが知られている。しかし、神経の発生や機能に関する役割については不明の点が多い。本研究では、PAF と PAF 受容体の神経細胞移動における役割を明らかにすることを目的に、PAF 受容体欠損マウスを用いて *in vivo* での小脳形態の観察、さらに *in vitro* での小脳顆粒細胞の移動への影響を解析し、その機構について論じた。

## (方法と結果)

### 1. 胎児小脳の組織学的解析

胎生 14.5 日 (E14.5)、E17.5、生後 0 日目および 1 日目 (P0/P1) のマウス脳の切片を作り、小脳の外顆粒層の厚さを測定した。E 14.5 の時期では、外顆粒層の厚さは野生型 (WT) マウスに比べて PAFR-KO マウスでは有意に薄いことがわかった。E17.5 および P0/P1 においては両者の間に有意差は見られなかった。これらの

結果は外顆粒層の形成の早い時期において、小脳顆粒細胞の移動または分化に対し PAF 受容体が関与する可能性を示唆している。

## 2. *in vitro* 小脳顆粒細胞の移動の解析

P2-P4 の小脳顆粒細胞凝集培養系を用いて WT と PAFR-KO の細胞移動速度を測定すると、WT マウス由来の顆粒細胞に比べて、PAFR-KO 細胞は移動が有意に遅くなっていた。また、PAF 受容体拮抗剤 WEB2086 によって WT 細胞の移動は抑制された。PAF 受容体アゴニストメチルカルバモイル PAF (mc-PAF) に対する反応は WT マウスでも PAFR-KO マウスでも認められたが、その濃度依存性は異なっていた。しかし mc-PAF による低濃度での細胞移動促進効果、および高濃度での抑制効果は WT マウスでも PAFR-KO マウスでも観察された。

## 3. 関連遺伝子、タンパク質発現の解析

P2-P4 のマウス小脳における PAF 受容体の発現および、PAF 産生能をそれぞれ RT-PCR および酵素活性で示した。また、PAFR-KO マウスでの LIS1 および NUDEL の発現量をウエスタンブロットで調べたところ、WT マウスと差が見られなかった。

### (結語)

1. 組織学的解析より、PAF が *in vivo* で E14.5 に顆粒細胞の移動や成熟に関与する可能性が示された。
2. 小脳顆粒細胞の *in vitro* 移動実験により、PAFR-KO マウスは移動速度が WT マウスと比べると遅く、また、WT マウスに PAF 受容体拮抗薬 WEB 2086 を投与すると移動速度が低下することが明らかとなった。PAFR-KO マウスに WEB 2086 は効果を示さなかった。このことは PAF 及びその受容体が顆粒細胞の移動速度を調節していることを示唆する。

3. mc-PAF 投与により、野生型では移動速度が抑制された。これは従来の報告と一致する。また、PAFR-KO マウスでは低濃度の mc-PAF で促進、高濃度で抑制効果を示した。WT マウスでは内因性の PAF によって十分な移動促進効果をもたらされるが、高濃度の PAF 添加で抑制されるのかもしれない。PAFR-KO マウスでは、受容体非依存性の PAF 作用も観察された。
4. 小脳における PAF アセチルヒドロラーゼ  $\beta$  サブユニット (LIS1) やその相互作用分子である NUDEL の発現量には変化は無かった。
5. したがって、PAF は受容体依存的、非依存的に神経細胞の移動または分化を制御し、適切なアゴニスト濃度以外では抑制に働くものを考えられた。
6. 以下の問題が未解決であり、今後の課題である。
  - 1) PAF による神経移動調節の分子機構
  - 2) PAFR-KO マウスが PAF に応答し、刺激と抑制の 2 相性の反応を引き起こす機構
  - 3) PAF が LIS1 や LIS1 と相互作用する分子に与える影響