

## 審査の結果の要旨

氏名 坂上 秀 樹

グリセロホスホコリン(GPC)はグリセロール骨格の $\alpha$ 位にリン酸基を介しコリンが結合した化合物であり、生体内において細胞内、細胞外に広く存在している。GPCは細胞内の浸透圧調整物質(オスモライト)として機能していることが知られているが、細胞外のGPCについてはその機能は不明である。坂上は修士課程において Nucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase (NPP) family に属する新規分子 NPP6 がコリン特異的ホスホジエステラーゼであることを発見した。NPP6 は細胞外に活性部位を持つエクソ型の酵素であり、GPC に対し高い親和性を示したことから NPP6 は生体内で GPC の代謝を介し何らかの機能を発揮している可能性が示唆された。

本研究において、坂上は、NPP6 の発現部位の同定と機能解析を行い、NPP6 が中枢神経系においてオリゴデンドロサイトに特異的に発現しており、細胞外の GPC を分解し細胞の生存・成長に必須な因子であるコリンを供給する可能性を見出した。

### NPP6 は腎臓および脳に高発現している

坂上は、まず NPP6 の特異的モノクローナル抗体を作成し、Western blotting 法を用いてマウスにおける NPP6 発現臓器を解析した。その結果、NPP6 は腎臓および脳に高発現していることが分かった。このうち腎臓においては近位尿細管および細いヘンレの下降脚に特異的に発現していた。

### NPP6 は中枢神経系においてミエリンに発現している

次に、坂上は NPP6 の脳における発現を免疫組織染色によって調べた。その結果、NPP6 はミエリンのマーカである Myelin Basic Protein (MBP) と同様の染色像を示すことが分かった。染色像を詳しく観察したところ、繊維状の染色像が見られ細胞体の染色は見られなかった。このことから、NPP6 は脳において神経軸索を取り囲み絶縁体を形成するミエリンに発現していることが分かった。一方、NPP6 は大腿神経などの末梢神経系には発現が見られなかった。従って、NPP6 は中枢におけるミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトである。

ドロサイトに特異的に発現しているものと考えられた。

#### NPP6 はオリゴデンドロサイトの分化の初期段階にて発現し始める

坂上がマウスの発達段階の脳における発現を Western blotting 法によって調べたところ、NPP6 は生後 4 日以後により発現し始め、14 日まで発現が上昇し、その後一定の発現を保つことが分かった。NPP6 が発現し始めるこの時期はマウスにおいてミエリン形成が始まる時期に当たる。そこで、ミエリン形成の後期のマーカーである Myelin Associated Glycoprotein (MAG) と MBP の発現を同時に調べたところ、NPP6 の発現はいずれのマーカーよりも早いことが分かった。これらことから NPP6 がオリゴデンドロサイトの分化において比較的初期段階にて発現し始めると坂上は予想した。

坂上は NPP6 の発現時期を細胞レベルで詳細に調べるため、初代培養オリゴデンドロサイトにおける NPP6 の発現を調べることにした。その結果、NPP6 はオリゴデンドロサイトへの分化が進み、オリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーである NG2 の発現が陰性になると発現し始めること、また、分化の後期マーカー MAG は NPP6 に続いて発現し始めることを見出した。このことから、NPP6 がオリゴデンドロサイトへの分化の初期段階に発現する新規分化マーカーとなることが明らかになった。一方、オリゴデンドロサイトへの分化過程におけるいくつかのコリン関連遺伝子（コリントランスポーター [CHT1, CTL1]、スフィンゴミエリン合成酵素[SMS2]) の発現変動を調べたところ、どの遺伝子も分化の進行と共に発現が上昇し、その変動パターンが NPP6 と類似していることがわかった。

#### NPP6 陽性オリゴデンドロサイトは GPC をコリン源として利用できる

坂上は、NPP6 はコリン特異的ホスホジエステラーゼであることから、NPP6 を発現したオリゴデンドロサイトは細胞外のホスホジエステルを分解しコリン源として用いていると仮説を立てた。この仮説を検証するため、坂上はまず NPP6 の生理条件下での基質を決定することにした。一般的な培養細胞はコリンを含まない培地中では増殖することが出来ない。また、コリンの代わりに PC や LPC などの様々なコリンホスホジエステルを加えても、そのままではほとんどコリン源として利用されることはない。そこで、NPP6 を強制発現させることで細胞がそれらをコリン源として用いることが出来るようになるかどうかを細胞増殖を指標に調べ、NPP6 の生理的基質を決定した。Neuro-2a にレトロウィルスを用いて NPP6 を発現させたところ、NPP6 の発現により GPC があればコリンを含まない培地であっても細胞が増殖できるようになることが分かった。このことから NPP6 を発現した細胞が GPC をコリン源として用いることが出来ることが明らかになった。

オリゴデンドロサイトの初代培養系において、分化前のオリゴデンドロサイト前駆細胞

(OPC) は NPP6 を発現していないが、分化誘導後 24hr の時点では NPP6 の発現がみられた。そこで、坂上は分化前後で培地中のコリンを GPC へ置換し、MAG の発現を指標にオリゴデンドロサイトの分化を評価した。培地よりコリンを除くと OPC は分化を停止し、MAG の発現上昇が観察されなかった。一方、分化後においても培地よりコリンを除くと MAG の発現上昇は見られなかったが、GPC を加えることによって MAG の発現上昇が見られた。このことから NPP6 を発現したオリゴデンドロサイトは GPC をコリン源として用いることが出来ることが明らかになった。

#### オリゴデンドロサイトが GPC をコリン源とするには NPP6 が必要である

NPP6 陽性オリゴデンドロサイトが GPC をコリン源として利用できることがわかったが、これが NPP6 によって GPC が分解されたためであることを確認するため、坂上は NPP6 の RNAi 系を構築した。増殖性細胞である OPC に shRNA 発現レトロウィルスを感染させ、NPP6 に対する shRNA を発現させた。その状態でオリゴデンドロサイへ分化誘導することにより、NPP6 の発現上昇を抑えた。分化誘導後の MAG の発現を調べたところ、コリン含有培地で培養する限り mock ベクターを感染させた細胞と同様に NPP6 抑制細胞においても MAG の発現上昇が観察され、NPP6 の発現抑制そのものがオリゴデンドロサイトの分化にそれほど影響を与えないことが分かった。そこで、分化誘導後 24hr の時点で培地中のコリンを GPC へ置換し、GPC をコリン源とすることが出来るかどうかを調べた。すると、mock ベクター感染細胞では MAG の発現上昇が見られるものの、NPP6 抑制細胞では MAG の発現上昇が見られなくなった。このことから、NPP6 陽性オリゴデンドロサイトが GPC をコリン源として利用するためには NPP6 が必要であることが明らかになった。

以上のように、本研究において坂上は、コリン特異的ホスホジエステラーゼ NPP6 が中枢神経系においてオリゴデンドロサイトに特異的に発現しており、新規分化マーカーとなることを見だし、NPP6 が脳脊髄液中に存在する GPC を分解することで、オリゴデンドロサイトへのコリン供給系の一端を担っている可能性を示した。

肝臓以外の細胞は十分量のコリンを合成できないため、細胞外の遊離コリンを、コリントランスポーターを介し取り込んでいる。コリンは遊離コリンとしてだけでなく、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、リゾホスファチジルコリン、GPC、ホスホコリンなどの形で生体内に存在するが、これらのコリン前駆体が細胞に利用されるためには、遊離コリンまで代謝される必要がある。しかし、コリン前駆体の代謝経路ならびに代謝酵素の実態は未解明であった。本研究によって、坂上は NPP6 を介した細胞外の GPC の機能として、脳内におけるコリン源としての新たな可能性を見出した。GPC はアルツハイマー病な

どの神経疾患で脳内の濃度が変動し、病態との関連が示唆されている。今後 NPP6 の研究を通じオリゴデンドロサイトにおける GPC の重要性が明らかになるとともに、これらの疾患との関連などを含め、脳内の GPC の機能が解明されていくものと期待される。

本研究は、NPP6 の生体内における発現、機能を解析し、NPP6 を介した GPC の脳内におけるコリン源としての可能性という新しい概念を提唱したことから、薬学（博士）に十分値するものと判断した。