

審査の結果の要旨

氏名 王 力

本研究は細胞内情報伝達において重要な機能をもつと考えられる KIF26A タンパク質の末梢神経における役割を明らかにするため、KIF26A 欠失マウスの行動解析、病理組織学的解析、ならびに一次培養した脊髄神経節ニューロンの生理学的及び細胞生物学的解析を一連のものとして行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. *Kif26a*<sup>+/+</sup>マウスと *Kif26a*<sup>-/-</sup>マウスの Hot Plate Test ならびに Randall Selitto Test による行動解析を行なったところ、*Kif26a*<sup>-/-</sup>マウスでは侵害刺激に対する反応潜時が有意に低下し、通常より過敏な反応が認められた。このことから、*Kif26a*<sup>-/-</sup>マウスは痛覚過敏症の新たなモデルマウスとして利用できることが示された。
2. 切片に対する in situ hybridization 法によって、マウス脊髄神経節ニューロンに有意に KIF26A が発現されていることが示された。また、この脊髄神経節全体の細胞数には大きな異常はなかった。
3. 脊髄神経節ニューロンの切片において、NGF レセプター TrkA を発現している痛覚神経細胞を免疫組織化学法によって染色してみると、KIF26A 欠失マウスでは TrkA ニューロンの細胞体が、有意に肥大化していることが認められた。
4. 同様に免疫組織化学によって皮膚の抗 PGP9.5 染色、手掌の NF160 染色を施行してみると、感覚神経の末梢部が増殖し、また異常な分枝が現われていることが明らかとなった。しかし、脊髄の CGRP, Ret, TrkA 染色では、感覚神経の中核側の形態には特に異常はみられなかった。
5. 脊髄神経節ニューロンの刺激に対する反応性を調べるため、脊髄神経節ニューロンをカバースリップ上に一次培養し、これを新たに組み上げたコンフォーカル顕微鏡のステージ上の灌流システムにマウントし、痛覚刺激物質カプサイシンに対する細胞内カルシウムの反応を記録した。その結果、(1) KIF26A 欠失ニューロンは刺激に対する反応性が有意に上昇しているとともに、(2)カプサイシン洗浄後も細胞内の高カルシウムレベルが持続していることが明らかとなった。このことは、KIF26A の欠失によって脊髄神経節ニューロンの刺激反応性が昂進および異常持続することを示しており cell autonomous な生理学的異常によって上記個体レベルの痛覚過敏を十分に説明できるものである。
6. 脊髄神経節の感覚神経細胞のカプサイシン受容体 TRPV1 の刺激反応性昂進の分子機序

として、過剰なリン酸化の存在が考えられる。そこで、脊髄神経節における TRPV1 の発現量および TRPV1 のリン酸化の程度を生化学的に解析したところ、これらはいずれも有意に上昇していることが示された。

7. 脊髄神経節の感覚神経細胞の細胞内カルシウム上昇の異常持続性の分子機序として、細胞膜上のカルシウムポンプ PMCA の過剰なチロシンリン酸化の存在が考えられる。そこで、脊髄神経節細胞株 F11 細胞において KIF26A のノックダウン系を立ち上げ、その細胞上清から PMCA を免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行なって KIF26A 欠失細胞における PMCA のチロシンリン酸化レベルを測定した。その結果、コントロール細胞に比して KIF26A 欠失細胞では有意に PMCA のチロシンリン酸化レベルが上昇していた。すなわち、KIF26A の欠失により PMCA ポンプが不活性化することによって細胞内カルシウムの除去機構が阻害されることが示唆された。
8. 以上のようなタンパク質リン酸化の上流分子機構として、プライマリー培養脊髄神経節細胞の PI3K 及び MAPK の活性を、抗 pAkt 抗体ならびに抗 pErk 抗体の免疫染色によって定量した。まずカプサイシンで野生型細胞を刺激すると、PI3K 及び MAPK 活性は刺激中一過性に上昇し、カプサイシン洗浄によって速やかにバックグラウンドレベルに復帰した。ノックアウト細胞のカプサイシン刺激中の PI3K/MAPK 活性は、有意に野生型細胞のものより上昇していた。さらにカプサイシン洗浄後も、この高レベルの PI3K/MAPK 活性の異常継続が示された。次に NGF で TrkA 受容体を刺激した場合においても、ノックアウト細胞は野生型に比べて有意に高レベルの PI3K/MAPK 反応を生じることが示された。このことは、受容体結合型ならびに受容体非結合型のチロシンキナーゼ下流のシグナル伝達が KIF26A の欠失によって異常に昂進し、細胞内カルシウムの異常上昇によって痛覚過敏が生じていることを示唆するものである。
9. この PI3K/MAPK 活性異常昂進の分子メカニズムとして、KIF26A は腸管神経系の神経細胞の GDNF/Ret シグナリングにおいて、Grb2 と SHC の結合を競合阻害することでチロシンキナーゼ下流のシグナル伝達を負に制御していることが知られている。この機構の有効性を脊髄神経節細胞で調べるため、NGF 刺激下における SHC-Grb2 の免疫沈降を行ったところ、ノックダウン細胞では有意にこれらの結合能が上昇していることが示された。また、この細胞においても KIF26A と Grb2 は共沈することが示され、この負の制御機構は生体各所においてユニバーサルに働いていることが示唆された。

以上、本論文は KIF26A ノックアウトマウスにおいて、痛覚過敏のモデル系としてのその新しい役割を見出した。本研究は持続性疼痛に関与する脊髄神経節のチロシンキナーゼシグナル伝達における新しい制御因子を、キネシンモーター蛋白の細胞生物学という観点から同定したもので、細胞のシグナル伝達機構ならびに疼痛の病態生理の解明と治療に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。