

氏 名	寫岡 成佳
(ふりがな)	(しまおか しげよし)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 1159 号
学位審査年月日	令和 3 年 1 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	Lactoferrin-like immunoreactivity in distinct neuronal populations in the mouse central nervous system (マウス中枢神経系の特定神経細胞集団におけるラクトフェリン様免疫反応の局在)
論文審査委員	(主) 教授 荒若 繁樹 教授 鰐淵 昌彦 教授 小野 富三人

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

高親和性鉄結合蛋白であるラクトフェリン (Lf) は主に乳汁や子宮腺分泌液などの外分泌液や好中球の二次顆粒に含まれており、鉄要求性の細菌に対する感染防御に関わることが知られている。中枢神経系においては、Alzheimer 病、Parkinson 病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の病変部位および老化脳に発現することが報告されており、Lf が脳内の有毒な鉄をキレートすることによって神経細胞をフリーラジカルから保護する可能性が推定されている。しかし、正常時の中枢神経系における Lf の詳細な分布や機能については不明である。本研究では、正常中枢神経系における Lf の分布を明らかにするために、マウス Lf 特異的抗血清を新規作製し、正常マウスの中枢神経系における Lf の局在について免疫組織化学的に解析を行った。

《方 法》

マウス Lf 特異的オリゴペプチドを合成し、ウサギに免疫することで抗 Lf 抗血清を作製した。オリゴペプチドはマウス Lf の 39-54 アミノ酸残基に対応する部位で、トランスフェリンと相同性が無い部位を選んで作製した。抗血清の特異性は 10 週齢の雄性 ICR マウスの脳から抽出したタンパク質を試料として、ウェスタンブロット法により確認した。この抗血清を用いて 10 週齢の雄性 ICR マウスの脳および脊髄について免疫組織化学染色を行い、Lf タンパクの局在を解析した。

《結 果》

今回新規作製した抗 Lf 抗血清はウェスタンブロット法によりマウス脳における特異性を確認した。分子量約 80kDa 付近に陽性バンドが確認でき、免疫前血清、および Lf 抗原ペプチドで吸着した抗血清では陽性バンドは確認されなかった。また、この抗血清を用いた免疫組織化学染色により、Lf の発現が知られている子宮腺における Lf 様免疫反応

(lactoferrin-like immunoreactivity: Lf-LI) を確認した。中枢神経系においては、神経細胞の細胞体と軸索に Lf-LI を認めた。グリア細胞は Lf-LI 陰性であった。Lf-LI 陽性神経細胞は脳と脊髄の全域にわたる特定の神経細胞集団に局在していた。強い Lf-LI は、嗅球、視床下部、嗅内野、脳幹の諸神経核の神経細胞で観察された。小脳のプルキンエ細胞では細胞体以外に一部樹状突起にも陽性であった。大脳皮質、海馬、線条体の大多数の神経細胞は Lf-LI 陰性であった。脊髄灰白質では全ての層で散発的に Lf-LI 陽性神経細胞がみられたが、前角の大型運動神経細胞での陽性像が目立った。

《考 察》

本研究ではマウス脳に特異的な新規 Lf 抗血清を作製し、中枢神経系において Lf-LI が幅広く分布し、特定の神経細胞集団で陽性であることを初めて確認した。Lf 受容体はリンパ球、血小板、小腸細胞、乳癌細胞株などに存在し、中枢神経系においては血液脳関門に Lf 受容体が存在することが報告されている。本研究の追加実験において in situ hybridization

法と定量 PCR 法を用いて Lf 遺伝子の発現を解析したところ、中枢神経系では Lf 遺伝子の発現はみられなかった。したがって、少なくとも若年成獣マウスの中枢神経系では Lf は合成されるのではなく、血液から取り込まれることが考えられた。その意義は不明だが、Lf が中枢神経系に広範に存在するにも関わらず、中枢神経系では合成されていないことは興味深い。Lf の中枢神経系への移行が末梢組織から何らかの情報を運んでいる可能性も考えられる。また、本研究において、神経変性疾患の責任病巣となる部位や虚血に対して脆弱な部位である新皮質、海馬、線条体、および黒質の大部分で Lf-LI は比較的弱かった。一般に Lf は鉄結合蛋白質として機能し、その高いキレート能によって細胞を酸化ストレスから保護することが想定されていることから、Lf 局在の多寡がこれら神経細胞の脆弱性を説明できるのかもしれない。また、視床下部や脳幹の運動神経系の神経核における豊富な Lf の分布からは、Lf が内分泌系の調節やエネルギーを必要とする組織における鉄の安定供給に関与している可能性が考えられた。脳内の鉄結合蛋白質としてはトランスフェリンやフェリチンがグリア細胞に発現しており、その機能も比較的明らかになっている。しかし、Lf の正常脳における役割、および加齢や神経変性疾患における Lf 蓄積の病的意義等、中枢神経系における Lf の本態については今後、解明していく必要がある。また、末梢組織での Lf は鉄結合蛋白質として以外にも免疫調節物質や転写因子としての機能が示唆されている。中枢神経系においても多機能分子としての Lf の役割を検討する必要があるだろう。本研究はこれから中枢神経系の Lf 研究を展開するための基礎的資料としての意義をもつと考える。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

乳汁や好中球に含まれる鉄結合蛋白質であるラクトフェリン (Lf) は、鉄イオンのキレーターとして細菌感染からの生体防御等に関わることが知られている。神経系においては、Alzheimer 病や Parkinson 病などの神経変性疾患の病変部位で Lf の発現が報告されており、これら疾患の病態における Lf 発現の関連が考えられている。しかし、正常な神経系における Lf の局在や機能について不明な点が多く残されている。

申請者らは、中枢神経系における Lf の局在を明らかにするため、マウス Lf 特異的ペプチドに対する抗血清を新規作製した。抗血清の Lf に対する特異性をウェスタンブロット解析にて確認した後、免疫組織化学染色によりマウスの脳および脊髄における Lf の詳細な分布を調べた。正常な若年成獣マウスの中枢神経組織全域において特定の神経細胞集団で Lf 様免疫反応が陽性であり、その細胞質および神経線維に陽性像がみられた。特に嗅球、嗅内野、および視床下部や脳幹の諸神経核の神経細胞に強い染色性を認めた。一方で、神経変性疾患の責任病巣となる部位や虚血に対して脆弱な部位である新皮質、海馬、線条体、および黒質の大部分で Lf の染色性が比較的乏しいことを見出した。神経細胞の脆弱性が Lf の多寡に関連している可能性が示唆された。

中枢神経系において Lf は鉄結合蛋白質として機能しているのか、それとも、末梢組織で報告されているような免疫調節物質や転写因子として機能しているのかについて、今後さらに研究を行っていく必要がある。マウス正常中枢神経系における Lf 様免疫反応の詳細な局在を明らかにした本研究の成果は、種々の中枢神経疾患モデルマウス等を用いて展開していく上で Lf 研究のための重要な基礎資料になると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Acta Medica Okayama, in press