

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 岡田 正康  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 666 号  
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 軸索再生に対する GAP-43 の機能解明 : GAP-43 (Ser96) のリン酸化は軸索再生の分子マーカーとなる.

論文審査委員 主査 教授 柿田 明美  
副査 教授 藤井 幸彦  
副査 教授 五十嵐 道弘

### 博士論文の要旨

【背景と目的】損傷したヒトの中枢神経系の神経軸索は、末梢神経系とは異なり再生しにくいとされる。それには、成体の中枢神経軸索の伸長能力が末梢神経に比較して低く、両者には神経成長関連タンパク質の一つとして知られる 43 kDa growth-associated protein (GAP-43) というタンパク質の発現レベルに違いがあることが、理由の一つとされていた。GAP-43 は軸索伸長時に軸索内輸送が増加するタンパク質として発見されたが、軸索再生に対する GAP-43 の明確な機能は不明であった。申請者の共同研究グループは、タンパク質の機能的な修飾で、しばしば活性化の調節に認められるリン酸化に着目し、生後 1-2 日齢のラットの前脳から調製した成長円錐画分を用いたリン酸化プロテオミクス解析に基づいて、神経成長時に高頻度でリン酸化される部位として GAP-43 の 96 番目のセリン (Ser96) を同定した。軸索再生に対する GAP-43 の機能を解明する目的で、GAP-43 (Ser96) のリン酸化を特異的に認識する抗体 (抗 pSer96 抗体) を作製することに成功した。そこで本研究は、げっ歯類の末梢神経再生モデルを用いて、軸索再生に対する GAP-43 (Ser96) のリン酸化の関与について検討した。

【方法】対象とした実験動物に、マウス (胎仔と成体) を用いた。末梢神経再生モデルとして、回復能力のある軸索断裂を、坐骨神経圧挫損傷実験で再現した。作製した抗 pSer96 抗体を用いた免疫組織化学染色によって、マウスの胎仔発生期の軸索伸長とマウスの成体の坐骨神経圧挫損傷実験の軸索再生における GAP-43 (Ser96) のリン酸化の有無を検証した。坐骨神経圧挫損傷実験から得られた試料をもとに、抗 pSer96 抗体染色を用いたウェスタンブロットや、抗体を用いない質量分析で GAP-43 (Ser96) のリン酸化の有無を生化学的に検証した。また抗 pSer96 抗体による軸索再生の組織学的な定量評価の可能性を検討するため、Shin J.E. ら (Neuron 74, 2012) が使用した「坐骨神経の長軸切片の蛍光像の輝度値解析から軸索伸長を計測する Regeneration Index」を用いて評価した。

【結果】胎仔大脳皮質由来の初代培養神経細胞の染色や胎仔脳の免疫組織化学染色の結果、発生期の軸索伸長において抗 pSer96 抗体反応が陽性であり、GAP-43 (Ser96) は、確かにリン酸化されていた。一方、抗 pSer96 抗体反応は、末梢神経再生モデルから得られた圧挫損傷した坐骨神経では軸索上で陽性となり、非損傷坐骨神経では陰性であった。このことは、軸索再生においても GAP-43 (Ser96) がリン酸化される

ことを意味した。この結果の裏付けとして行ったウエスタンブロットでは、抗 pSer96 抗体反応が、非損傷神経、損傷 1 日後、損傷 3 日後と経時的に上昇した。さらに損傷神経（3 日目）と非損傷神経から得られた試料を質量分析計で分析したところ、損傷神経にのみ GAP-43 (Ser96) がリン酸化されることを確認した。また感覚神経系の軸索再生マーカーとされる抗 SCG10(スタスミン 2)抗体と同様に、Regeneration Index を用いて抗 pSer96 抗体の再生軸索を定量評価できた。

【考察】本研究は、組織学的に、かつ質量分析を含む生化学的な検証により、神経の軸索再生において GAP-43 のリン酸化が、Ser96 で生じることを初めて証明した。今後、GAP-43 が関与する軸索伸長の内因性機構の解明のため、GAP-43 (Ser96) のリン酸化を亢進させる、あるいは不活化させることで、どのように軸索再生が変化するのかを検証し、軸索再生に対する GAP-43 (Ser96) のリン酸化の役割を明確にする必要がある。また作製した抗 pSer96 抗体は、非損傷神経に反応せず、再生軸索にのみ反応するため、定量的な評価に適していると考えたが、実際に定量評価できた。

【結論】げっ歯類の末梢神経圧挫損傷後の軸索再生において GAP-43 (Ser96) はリン酸化され、再生軸索への特異度が高いことから定量性に優れた軸索再生のマーカーとなる。

#### 審査結果の要旨

本論文は、神経成長関連蛋白：43 kDa growth-associated protein (GAP-43) の 96 番目のセリン (Ser96) リン酸化特異抗体を用い、軸索再生に対する同リン酸化の関与について検討したものである。まず申請者は、マウス胎仔脳の初代培養神経細胞における発現や組織を免疫組織化学的に検討し、発生期の伸張軸索では GAP-43 の Ser96 は確かにリン酸化されていることを確認した。次に、マウスの末梢神経再生モデルを用い、圧挫損傷した坐骨神経では軸索上に抗 GAP-43 (Ser96) 抗体で陽性像が得られ、非損傷坐骨神経では陰性であることを見出した。このことは、軸索再生においても GAP-43 (Ser96) がリン酸化されることを示唆していた。ウエスタンブロットでも、抗 GAP-43 (pSer96) 抗体反応が非経時的に上昇した。更に、質量分析による分析では、損傷神経にのみ GAP-43 (Ser96) がリン酸化されることを確認した。また Regeneration Index を用いて抗 GAP-43 (pSer96) 抗体の再生軸索を定量評価することに成功した。

本論文は、神経の軸索再生において、GAP-43 のリン酸化が Ser96 で生じることを初めて証明したものであり、抗 GAP-43 (pSer96) 抗体は再生軸索への特異度が高い、定量性に優れた軸索再生マーカーとなることが示された。このように本論文は、末梢神経軸索再生の分子病態機序の一端を明らかにし、将来の治療法開発に向けた基礎的知見を提供するものである。この点に、学位論文としての価値を認める。