

氏 名	竹 内 成 子
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 5 6 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 4 年 3 月 9 日
学 位 論 文 題 目	Immunohistochemical mapping of TRK-fused gene products in the rat brainstem (ラット脳幹における TRK 融合遺伝子産物の免疫組織科学的分布)
審 査 委 員	主 査 教 授 岡 部 英 俊 副 査 教 授 松 浦 博 副 査 教 授 宇 田 川 潤

論文内容要旨

*整理番号	661	(ふりがな) 氏名	たけうち しげこ 竹内 成子
学位論文題目	Immunohistochemical mapping of <i>TRK</i> -fused gene products in the rat brainstem (ラット脳幹における <i>TRK</i> 融合遺伝子産物の免疫組織化学的分布)		
<p>【研究の目的】 <i>TRK</i> 融合遺伝子 (TFG) は、染色体転座により神経成長因子受容体 (<i>TRK</i>) 遺伝子に融合した新しい遺伝子として、リンパ腫と軟組織腫瘍で発見された。TFG 単独では、正常組織でも発現が報告されている。これまでに、TFG はリン酸化チロシン特異的ホスファターゼの活動制御、小胞体からゴルジ体へのベシクル輸送に関わっているという報告がされているが、その詳細な機能については未だ解明されていない。我々は最近、ラットの TFG タンパク質に特異的な抗体を作製してラット脳を検索したところ、TFG が神経細胞に局在しており、TFG 陽性神経細胞が脳幹に多く分布していることを見出した。そこで本研究では、この TFG 抗体を用いて免疫組織化学法でラット脳幹部の TFG 陽性神経細胞の分布図を作成した。</p> <p>【方法】 <u>ラットからの組織採取</u> 200-300g のラットを 80mg/kg のペントバビタル麻酔下で左心室から 10mM リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) を灌流して脱血し、ついで 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を含む固定液を流して灌流固定した。ついで、脳と脊髄を取り出し、24 時間から 48 時間の後固定をした後、15%蔗糖液でクライオプロテクションを行い、クリオスタットで 20μM の組織片を作製した。</p> <p><u>抗体</u> 我々は、TFG ペプチドをウシ血清アルブミンに結合させたハプテン抗原でウサギを免疫し、TFG に対する抗血清を得た。一部は、TFG ペプチドを結合させたアフィニティークロマトグラフィーにより、精製ウサギポリクローナル抗体 (0.1μg/ml) を作製した。ウェスタンブロット法と吸収テストにより、その特異性を確認した。</p> <p><u>免疫組織化学</u> 脳幹・小脳・脊髄の組織片を抗 TFG ウサギ血清 (5,000-20,000 希釈) 又は精製ウサギポリクローナル抗体 (0.1μg/ml) に 4$^{\circ}$C で、1-4 日間反応させた後、ABC 法と DAB を用いて免疫染色した。一部の組織は TFG 抗体とマウスモノクローナルセロトニン抗体を組み合わせ、蛍光二次抗体を用いた免疫二重染色を施行した。</p> <p><u>TFG 陽性細胞分布地図の作成</u> Paxinos & Watson のラットブレインアトラスを用いて、TFG 陽性細胞の分布図を作成した。</p>			

【結果】

ラットの脳幹部では TFG 陽性神経細胞は縫線核、巨大細胞網様核、青斑核及び三叉神経核、内耳神経核、迷走神経背側運動核といった脳神経核、小脳のプルキンエ細胞や脊髄前角の運動神経に観察された。縫線核では特に多くの TFG 陽性細胞が見られ、背側縫線核ではセロトニン陽性細胞との共局在は 3 割程度であった。TFG 陽性細胞の 42% がセロトニン陽性細胞であり、セロトニン陽性細胞の 44% が TFG 陽性細胞であった。正中縫線核では 5%、パラメディアン縫線核では 16% ほどしか TFG とセロトニンの局在神経細胞は観察されなかった。脊髄では頸髄、胸髄、腰髄を調べたところ、いずれの領域でも前角の運動神経に TFG 陽性反応が観察された。

【考察】

本研究では、我々が作製したラット TFG 特異的抗体を用いた免疫組織化学法で TFG 免疫陽性神経細胞の分布図を作成し、ラットの脳幹部、脊髄での TFG の発現分布を明らかにした。TFG の免疫染色が強くみられた縫線核では、TFG 陽性細胞の一部がセロトニン陽性細胞であることを TFG 抗体とセロトニン抗体による免疫二重染色法で確認した。加えて、TFG 陽性細胞の一部はセロトニン陰性細胞でもあることを確認した。TFG 免疫反応は細胞質と細胞突起近位部で観察された。細胞質での TFG の局在は、既に報告されている TFG が小胞体で機能しているという結果と一致している。一部の神経細胞では細胞突起近位部とパルクソン線維に観察されていることから、TFG は中枢神経系では小胞体での機能以外にも働きがあると考えられる。TFG 陽性細胞が脳神経核の運動神経細胞を含む神経核に観察されたことと、脊髄前角の運動神経に観察されたことから、TFG が脳幹から脊髄全長にわたる運動神経の機能に関わっている可能性が示唆された。TFG のより明確な機能を調べる上では、モデル動物を用いた実験など、今後の検討が必要である。

【結論】

本研究では、ラットの中脳、橋、延髄、小脳、脊髄での TFG 免疫陽性神経細胞の分布を調べた。TFG 免疫陽性神経細胞は縫線核、巨大細胞網様核、青斑核及び三叉神経核、内耳神経核、迷走神経背側運動核といった脳神経核、小脳のプルキンエ細胞や脊髄前角の運動神経に観察された。本研究の結果は、脳における TFG 機能を明らかにするうえで神経解剖学的な情報を提供するものである。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	661	氏名	竹内成子
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>TRK 融合遺伝子 (TFG) は、染色体転座により神経成長因子受容体 (TRK) 遺伝子に融合した新しい遺伝子として、リンパ腫と軟部組織腫瘍で発見された。その後、TFG は単独で正常組織に発現していることが明らかとなった。TFG は中枢神経系でも発現しているが、中枢神経系における TFG の機能や局在についてはよく分かっていない。本研究では、TFG に対する抗体を作製し、ラット脳幹部、小脳、脊髄における TFG の分布図を行った。その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) TFG 免疫反応は特定の脳領域に存在する神経細胞の細胞体と神経突起に認められた。 2) TFG 免疫陽性神経細胞は、縫線核、巨大細胞網様核、青斑核、三叉神経核、内耳神経核、迷走神経背側運動核、小脳のプルキンエ細胞や脊髄前角の運動神経に観察された。 3) 背側縫線核ではセロトニン陽性細胞の 44% が TFG 陽性細胞であった。 4) 脊髄では頸髄、胸髄、腰髄を調べたところ、いずれの領域でも前角の運動神経に TFG 陽性反応が観察された。 <p>以上の結果は、TFG がセロトニン神経系、ノルアドレナリン神経系、運動神経系、小脳神経回路において重要な働きをしていることを示唆している。</p> <p>本論文は、中枢神経系における TFG の局在について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 578 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 24 年 1 月 24 日)</p>			

最終試験の結果の要旨

整理番号	661	氏名	竹内成子
論文審査委員			
<p>(最終試験の結果の要旨)</p> <p>最終試験において以下の試問を行なった。</p> <ol style="list-style-type: none">1. 哺乳動物細胞における TFG の機能について2. TFG のサブタイプについて3. TFG の ER-Golgi での小胞輸送の働きについて4. 癌化にはチロシンキナーゼ活性が重要とされているが、TFG がリン酸化チロシン特異的ホスファターゼ活性を増強する事が、癌化に伴うチロシンリン酸化とどのような関係になっているのか。5. TFG が融合すると報告されている NOR1/ALK の中枢神経系での発現パターンと TFG の発現パターンとの関係について6. TFG の発現が中枢神経系で多い理由について。7. TFG をノックアウトしたらどのようなことが生じるか。8. TFG と TFG サブタイプを生じる分子機構について。 <p>上記にいずれの質問に対してもほぼ適切な解答が得られた。</p> <p style="text-align: right;">(平成 24年 1月24日)</p>			