

氏 名	増田 千明
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第712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26年 9月10日
学位論文題目	Immunohistochemical localization of an isoform of TRK-fused gene-like protein in the rat retina (ラット網膜における TRK 融合遺伝子亜型様蛋白の免疫組織化学的局在)
審査委員	主査 教授 宇田川 潤 副査 教授 工藤 基 副査 教授 永田 啓

論文内容要旨

※整理番号	718	(ふりがな) 氏名	増田 千明
学位論文題目	Immunohistochemical localization of an isoform of TRK-fused gene-like protein in the rat retina (ラット網膜におけるTRK融合遺伝子亜型様蛋白の免疫組織化学的局在)		
<p>【研究の目的】</p> <p>TRK融合遺伝子(<i>TFG</i>)は、ヒト乳頭状甲状腺癌において、<i>NTRK-1</i>遺伝子のキメラ型として、最初に同定された。この遺伝子は様々な癌遺伝子の融合遺伝子として発現し、癌の発生に関与することが推測されている。一方、正常組織においてもTRK融合遺伝子は単独で発現しているが、正常組織における局在や機能はほとんどわかっていない。わずかに、造血システム、上皮細胞、神経系に発現する<i>SHP-1</i>の陰性調節と関係している、あるいは線虫で小胞体輸送に関与するという報告がある。このように<i>TFG</i>は古くから<i>TRK</i>座位との染色体転座を起こす遺伝子として報告されてきたが、近年、日本に多い遺伝性の運動ニューロン病である近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチーの原因遺伝子として同定され、運動ニューロン病との関連が注目されている遺伝子である。</p> <p>我々は、ラット網膜から同定され、脳や網膜などの中枢神経系で多く発現している<i>TFG</i>アイソフォーム(以下<i>rTFG</i>)に着目し、その遺伝子産物の網膜における局在を免疫組織学的法で解析した。</p> <p>【方法】</p> <p>抗体はラット<i>rTFG</i>特異的なエピトープを含むアミノ酸配列を抗原とし、ウサギに免疫し作製した。免疫後に得られた血清はアフィニティ精製後、ELISAによる検定を行った(抗体の作製からアフィニティ精製、ELISAによる検定まではMBL社に委託した)。本研究ではWistar系オスラットを用いた。ウエスタンブロット法に用いる網膜は、ラットを深麻酔下で生理食塩水含有10 mMリン酸緩衝液(PBS)灌流による放血後、採材した。免疫組織化学用採材においては、PBS灌流後、さらに4% PFA/0.1M リン酸緩衝液(PB; pH7.4)による灌流固定を行った。摘出した眼球は4% PFA/0.1 M PBで後固定を行い、15%ショ糖溶液/0.1M リン酸緩衝液(pH7.4)に浸漬した。眼球はクライオスタットで20 μm厚に薄切した。切片は使用まで0.3% TritonX-100添加0.1 M PBS (PBST)に浸漬、4℃で保存した。</p> <p>免疫組織化学法はアビジン-ビオチン-コンプレックス(ABC)法を用いた。切片中の内因性ペルオキシダーゼを不活化後、1次抗体である<i>rTFG</i>抗体と反応させた。発色にはニッケル増感</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

ジアミノベンジジンを用いた。抗体の特異性についてはペプチド吸収試験により検証した。蛍光免疫二重染色法では、rTFG陽性細胞の属する細胞群について代表的なマーカー抗体(水平細胞; Calbindin D-28K, アマクリン細胞; SyntaxinI, 神経節細胞; Brn3a) もしくは代表的な神経伝達物質のマーカー抗体 (グリシン作動性神経細胞; グリシントランスポーター1 (GlyT1)、GABA作動性神経細胞; グルタミン酸脱炭酸酵素 65もしくは67 (GAD65, GAD67)、アセチルコリン作動性神経細胞; コリンアセチル基転移酵素(ChAT)、ドーパミン作動性神経細胞; チロシン水酸化酵素 (TH))と反応させた。rTFGの分子量はrTFG強制発現293細胞もしくはラット網膜を用いて、ウエスタンブロット法(以下WB)により確認した。

【結果】

rTFG強制発現WB法の結果では、約42 kDaと24 kDaのバンドが検出され、ラット網膜では、約24 kDaのバンド(rTFG様タンパク質24 kDa)が検出された。

網膜における蛍光免疫二重染色の結果では、rTFG抗体の免疫反応性は、視細胞内節、全てのcalbindin D-28K陽性水平細胞、約半数のsyntaxin-1陽性アマクリン細胞で認められた。さらに、アマクリン細胞については神経伝達物質に着目して詳細な検討を進めたところ、多数のGlyT1陽性グリシン作動性の細胞、少数のGAD65もしくは67陽性GABA作動性の細胞で免疫反応性を認めた。また、ChAT, THは陰性であった。さらに、神経節細胞層におけるrTFG抗体陽性細胞は、syntasin-1、Brn-3aともに陰性であった。

【考察】

WB法においてラット網膜で検出されたrTFG様タンパク質24 kDaは、rTFGのN末端が切断されたフラグメントである可能性が示唆される。

蛍光免疫二重染色では、rTFG様タンパク質24 kDa陽性細胞は、水平細胞、約半数のアマクリン細胞のようにGABAやグリシンを神経伝達物質として利用していることから、網膜における抑制性介在神経細胞の機能に関与している可能性が考えられる。

【結語】

我々の同定した rTFG 様タンパク質 24 kDa は、網膜における抑制性介在神経細胞の機能に関与している可能性がある。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	718	氏名	増田 千明
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、様々な癌遺伝子の融合遺伝子として発現し、癌の発生に関与することが推測されている。一方、正常組織における TFG の局在や機能は殆ど明らかになっていない。そこで、ラット網膜において同定された TFG アイソフォーム (rTFG) に対する抗体を作成し、網膜における rTFG の局在を免疫組織化学法により検討して、以下の点を明らかにした。</p> <p>1) rTFG は視細胞内節、全ての calbindin D-28K 陽性水平細胞、約半数の syntaxin-1 陽性アマクリン細胞、および神経節細胞層に発現が認められた。</p> <p>2) アマクリン細胞のうち、多数のグリシン作動性細胞および少数の GABA 作動性細胞は rTFG 陽性であったが、アセチルコリン作動性細胞およびドパミン作動性細胞には rTFG の発現が認められなかった。</p> <p>3) Brn3a 陽性神経節細胞に rTFG の発現は認められなかった。</p> <p>4) 以上より、rTFG 様タンパク質陽性細胞は、水平細胞や約半数のアマクリン細胞のように GABA やグリシンを神経伝達物質として利用していると考えられる。したがって、rTFG は網膜における抑制性介在神経細胞の機能に関与していると考えられる。</p> <p>本論文は、ラット網膜における rTFG の局在と機能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596字)</p> <p style="text-align: right;">(平成26年 9月 1日)</p>			