

	り えいびん
氏 名	李 英敏
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第211号
学位授与の日付	平成20年3月24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	ラット個体発生における nerve growth factor-induced gene B- $\beta$ の発現

論文審査委員	主査 教授 内 藤 眞
	副査 教授 高 橋 均
	副査 教授 木 南 凌

#### 博士論文の要旨

**背景** Nerve growth factor-induced gene B- $\beta$  (NGFIB- $\beta$ )は核内受容体ファミリーの一員であり転写因子として細胞分化に重要な役割を果たしている。この受容体は血清中の増殖因子によって誘導され、細胞内シグナル伝達に関与し、内分泌や神経による制御を受けるが、リガンド不明のオーファン受容体である。NGFIB- $\beta$ はほとんど脳に限局して発現し、中脳のドパミン作動性神経細胞の発生に必須な役割を果たす。NGFIB- $\beta$ のノックアウトマウスは中脳のドパミン作動性神経細胞を作ることができず、NGFIB- $\beta$ は中脳の発生過程において神経細胞の成熟、移動、生存に必須であると考えられている。Zetterströmらは *in situ hybridization* によって NGFIB- $\beta$  mRNA が胎児および成熟マウスやラットの中樞神経系に発現することを報告している。しかし、これまで NGFIB- $\beta$  に対するよい抗体がなかったため、NGFIB- $\beta$  発現細胞の詳細な分布や形態は報告されていない。本研究では、新規に作成された抗体を用い、NGFIB- $\beta$  の発現を蛋白レベルで検討した結果、中樞神経系にほぼ特異的に発現すること、および脳と網膜の神経細胞の分化において重要であることを観察したので報告する。

**方法** 新たに作製された抗ヒト NGFIB- $\beta$  抗体を用いて免疫染色を行い、ヒトおよびラットの副腎皮質、網膜細胞、中樞神経系の神経細胞における発現を観察した。さらに神経細胞移動分化における NGFIB- $\beta$  の意義を明らかにするため、ラット発生過程の中樞神経系における NGFIB- $\beta$  蛋白の発現を検討した。

1. 免疫組織化学染色：免疫 2 重染色には ABC 法を用いた。第一抗体には抗 NGFIB- $\beta$  抗体、第二抗体にはマウス抗ラット PCNA 抗体を用いた。切片は脱パラフィン後、オートクレーブ処理によって抗原の賦活化を行い、1% BSA/PBS で 30 分間浸して非特異的反応を阻害した。第一抗体は 4℃ で一晚反応し、次に二次抗体で室温 40 分間反応し、DAB で発色した。その後、その標本を microwave で 20 分間処理

し、抗 PCNA 抗体で 1 晩反応させ、次いで HRP 標識 2 次抗体を反応して、4-chloro-1-naphthol で可視化した。

2. ウェスタンブロット: ヒト NGFIB- $\alpha$ 、NGFIB- $\beta$ 、NGFIB- $\gamma$  の発現ベクターを導入した CHO 細胞およびラットの脳から抽出した蛋白に 300mM の Tris-HCl、10% glycerol、10% sodium dodecyl sulfate、25% mercaptoethanol を含む混合液を添加し、100℃ 3 分間加温した。各蛋白 60  $\mu$ g を SDS-polyacrylamide gel で泳動後、polyvinylidene difluoride membrane に転写した。Membrane は 5% スキムミルクで一晩ブロッキングした。一次抗体としてマウス抗ヒト NGFIB- $\beta$  モノクローナル抗体 ((1: 100 希釈)、二次抗体として抗マウス IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody (1: 2000 希釈) を室温で 30 分間反応させた。enhanced chemiluminescence (ECL) 法によってバンドを検出した。

#### 結果と考察

##### 1. NGFIB- $\beta$ 抗体について

抗ヒト NGFIB- $\beta$  抗体を用いたウェスタンブロットでは CHO 細胞に発現させたヒト NGFIB- $\beta$  蛋白が認識され、さらにラット脳組織抽出蛋白でも同様のバンドが検出された。免疫組織化学染色でもヒト、ラットともに同様の成績を得たことから、本抗体はヒトのみならずラットについても蛋白レベルで NGFIB- $\beta$  を検出できる抗体であることが示された。しかも、本抗体はホルマリン固定パラフィン切片の免疫組織化学染色にも使用できることが明らかにされた。

##### 2. ヒトとラット組織における NGFIB- $\beta$ の発現

ヒトとラット組織の免疫染色では NGFIB- $\beta$  の発現は脳、網膜の神経細胞、副腎皮質の細胞の核内に観察された。脳内の NGFIB- $\beta$  陽性細胞は 大脳、中脳、視床、視床下部に分布したが、小脳には見られなかった。NGFIB- $\beta$  が中脳のドパミン産生細胞の分化に重要な役割を果たしていることが NGFIB- $\beta$  ノックアウトマウスの研究で明らかになっている。しかし中脳以外の各組織における NGFIB- $\beta$  の機能的役割は不明である。NGFIB- $\beta$  が中枢神経系でドパミン産生以外にも特異的に高次機能にかかわることが考えられた。

##### 3. 胎生期および新生児期ラット脳と網膜における NGFIB- $\beta$ の発現

NGFIB- $\beta$  陽性細胞は中脳、視床、視床下部、橋、延髄、脊髄、大脳新皮質にも観察され、生育するにつれて、大脳皮質の下層から上層にかけて NGFIB- $\beta$  発現が著明になった。生後 1 日で大脳皮質全体に陽性細胞が見られるようになったが、陽性神経細胞は II-III 層と IV-VI 層に分布するようになり、生後 7 日までに VI 層に限局し、発現量も減少した。成熟ラットでもわずかな陽性像が観察された。

網膜においては、胎生 18 日に少数の NGFIB- $\beta$  陽性細胞が内顆粒層に出現し、陽性細胞は生後 5-7 日に最多となり、徐々に減少した。成熟するにつれて陽性細胞が少なくなった。脳と網膜組織では NGFIB- $\beta$  陽性細胞は主に分化移動中の細胞に発現し、PCNA 陽性の増殖細胞には NGFIB- $\beta$  の発現は見られなかった。以上の所見から NGFIB- $\beta$  は神経細胞の移動・分化に重要な転写制御因子であると考えられた。

(論文審査の要旨)

Nerve growth factor-induced gene B- $\beta$  (NGFIB- $\beta$ , Nurr1)は核内受容体スーパーファミリーの一員で、リガンドが不明なオーファン受容体である。本研究では新たに作製された抗ヒト NGFIB- $\beta$  抗体を用いて免疫染色を行い、ヒトおよびラットの副腎皮質、網膜細胞、中枢神経系の神経細胞における発現を観察した。さらに神経細胞分化における NGFIB- $\beta$  の意義を明らかにするため、ラット発生過程の中枢神経系における NGFIB- $\beta$  蛋白の発現を免疫組織学的に検討した。胎生早期のラット中脳神経細胞に NGFIB- $\beta$  が発現し、胎生日数の経過につれてさらに大脳皮質、前障、視床、視床下部の神経細胞にも発現した。NGFIB- $\beta$  陽性細胞は網膜では胎生 18 日に発現し、生後 0.5 日には内顆粒層と神経節細胞層に発現した。proliferating cell nuclear antigen (PCNA)を用いた免疫染色から NGFIB- $\beta$  陽性細胞は増殖細胞ではないことが示された。

以上、本研究は NGFIB- $\beta$  は脳や網膜の神経細胞の分裂後の最終分化に重要な因子であることを示唆した点に学位論文としての価値を認める。