

Title	Electron Microscopic Observation of bFGF Immunoreactivity in the Hippocampus
Author(s)	孫, 高歌
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/38918
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	孫 高 歌
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11240 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Electron Microscopic Observation of bFGF Immunoreactivity in the Hippocampus (海馬の bFGF 含有ニューロンの微細構造)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 塩谷弥兵衛 教授 西村 恒彦

論文内容の要旨

[目的]

海馬においては様々な栄養因子が存在し記憶学習等重要な機能に関わっているものと考えられる。とりわけ、海馬における塩基性線維芽細胞成長因子(以下 bFGF という)は培養海馬神経細胞に対し、強い生存及び突起伸展作用を有しており、海馬における重要な栄養因子の一つとして数えられている。しかしながら、その産生、分泌、受容体結合および細胞内取り込みの詳細は現在のところほとんど明らかでない。今回、bFGF 抗体を用い、bFGF 免疫反応産物の微細構造を検討し、特に CA2 錐体細胞における bFGF の存在様式を観察した。その結果、海馬 CA2 には 2 種のタイプの免疫陽性細胞が認められること、内 1 種は bFGF 合成細胞であるが、両者ともに細胞外に存在する bFGF を取り込むことを証明した。

[方法]

Wistar 系雄ラット、体重 200-250g をすべての実験を通じて用いた。

免疫組織化学

モノクローナル bFGF 抗体 (bFM2, UBI) を光顕及び電顕観察のために用いた。抗体を 5% 牛血アルブミン含リン酸緩衝生理食塩水 (BSA-PBS) で $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう希釈し、定法どおり免疫組織化学を行った。また、比較のために bFGF ポリクローナル抗体 (AntibFGF1-12) を用いた。凍結切片を上記抗体希釈液にて 4°C 、一夜インキュベートし、洗浄後、ピオチン化抗マウスモノクローナル抗体、再度洗浄の後、アビジン-HRP をそれぞれ一夜反応させ、最後にジアミノベンチジン反応を行った。光顕用切片は脱水透徹後、エンテランで封入し、電顕用切片はオスミウム処理後、脱水透徹しエボン封入した。電顕用切片はさらに、超薄切片とし日立 H-7000 電子顕微鏡により観察した。

in situ ハイブリダイゼーション組織化学

ジゴキシゲニン標識法を用いて、アルカリ性フォスファターゼ反応により同定した。

金コロイド標識 bFGF の取り込み

ウシ bFGF (R&D) を金コロイドと結合させこれを観察部位近傍の海馬 CA3 にマイクロインジェクションした。一夜放置後、堵殺し海馬 CA2 領域を取り、電顕観察した。

[成績]

光顕及び電顕観察により、CA2領域に2種の神経細胞染色パターンを認めた。1つは核に強く染まり、細胞質には弱い染色性しか認められないもの（Nタイプ）及びもう1つは核は染まらず、細胞質にきわめて強い反応産物が観察されるもの（Cタイプ）である。*in situ*ハイブリダイゼーションのデータよりNタイプは明確なbFGF産生細胞であるが、Cタイプは産生されるかどうか明確ではなかった。詳細な電顕観察により、両タイプは海馬の物質取り込み及び膜再吸収の形態であるとされるマルチベジクラーボディーに一致して陽性反応が見られ、細胞外bFGFの取り込みを予測させた。そのため、金コロイド結合bFGFをCA2近傍のCA3領域にマイクロインジェクションし、CA2錐体細胞への取り込みを観察した。その結果、bFGFはCA2錐体細胞の細胞質、マルチベジクラーボディー、樹状突起の細胞質等に取り込まれていた。最近、bFGF高分子量タイプ（22kD）は核に位置し、低分子量タイプ（18kD）は細胞質に局在することが示されている。今回用いた2種の抗体のうち、AntibFGF1-12は低分子量タイプを主として認識することがこれまでの結果で明らかとなっている。一方、モノクローナル抗体は両者を認識し、従って、2種のニューロン染色パターンが得られたものと思われる。N及びC両ニューロンタイプはともに外因性のbFGF（18kD）を取り込むことが明らかとされ、これは局所的な細胞間連絡の情報因子として働く可能性を意味し、一方、高分子量タイプは細胞内で合成され核移行シグナルを有するため速やかに核に移行するものと思われ、これは細胞内情報因子として働く可能性を示す。

[総括]

- ①bFGF免疫陽性構造の微細構造を明らかとした。
- ②bFGFの海馬領域におけるニューロンの染色性の違いから2種類に分類した。
- ③金コロイドをマーカーとした取り込み実験により外因性のbFGFが海馬錐体細胞に取り込まれることを示した。
- ④その取り込みのためマルチベジクラーボディーを経由するものがあることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

海馬においては様々な栄養因子が存在し記憶学習等重要な機能に関わっているものと考えられる。とりわけ、海馬における塩基性線維芽細胞成長因子（以下bFGFという）は培養海馬神経細胞に対し、強い生存及び突起伸展作用を有しており、海馬における重要な栄養因子の一つとして数えられている。しかしながら、その産生、分泌、受容体結合および細胞内取り込みの詳細は現在のところほとんど明らかでない。今回、bFGF抗体を用い、bFGF免疫反応産物の微細構造を検討し、特にCA2錐体細胞におけるbFGFの存在様式を観察した。その結果、海馬CA2には2種類のタイプの免疫陽性細胞、すなわち核が強く染色されるが、細胞質にはほとんど免疫反応性が見られないもの（Nタイプ）および逆に細胞質が強く染色されるが核にはほとんど陽性反応が見られないもの（Cタイプ）、が認められること、その内1種はbFGF合成細胞であり、両者ともに細胞外に存在するbFGFを取り込むことを証明した。

本研究において初めてbFGFの海馬神経細胞内取り込みが明らかとされ、神経栄養因子の海馬機能研究に対し貢献するところ多く、本論文は学位の授与に値すると思われる。