Osaka University Knowledge Archive

Title	Distribution of GAP-43 (B50/F1) mRNA in the adult rat brain by in situ hybridization using an alkaline phosphatase labeled probe
Author(s)	姚, 桂蘭
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39001
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【1】

氏　　名	姚（よう）　桂蘭（けいらん）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11753　号
学位授与年月日	平成7年3月23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	Distribution of GAP-43 (B50／F 1) mRNA in the adult rat brain by in situ hybridization using an alkaline phosphatase labeled probe **(成熟ラット中枢神経系における成長関連蛋白（GAP-43）mRNA の発現局在)**
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　三木　直正

論文内容の要旨

【目的】

Growth Associated Protein GAP-43は神経特異的に分布するカルモジュリン結合蛋白で，神経成長円錐に極めて多く存在すること，さらに発生の過程において発現量が多いことなどから，神経突起の成長に関連した蛋白であると考えられている。今までに，免疫組織化学を用いて脳内のGAP-43の分布が報告されているが，この蛋白は主に軸索突起に存在するため，脳内のどの神経細胞がGAP-43を合成しているか，その詳細は不明であった。我々はこの点を明らかにするため，ラット中枢神経系において，in situハイブリダイゼーション法によりGAP-43 mRNAの脳内分布の検索を行った。また，GAP-43は神経突起の伸展に関与することから，神経再生時にも重要な働きをしている可能性があると考えられた。そこで，舌下神経に切断やクラッシュなどの損傷を与えた成熟ラットをモデルとして用い，神経再生過程におけるGAP-43 mRNA発現の変化を検討した。さらに，ステロイドなどが末梢神経の軸索再生を促進するという報告が知られているので，舌下神経損傷後，glucocorticoidであるDexamethasone（DEX）の投与によるGAP-43 mRNAの発現量の変化とそれに伴う神経再生促進現象に関して検討を加えた。

【方法】

GAP-43 mRNAの検出には，38merのオリゴデオキシヌクレオチドプローブを作成し，これにアルカリフォスファテース1分子を結合させたものをプローブとして用いた。約150 g オスラット脳の新鮮凍結切片を作成し，オーバーナイトでハイブリダイゼーションを行い，1 xSSCにて洗浄後，NBTとBCIPを基質として，アルカリフォスファテースの発色を行った。又，片側の舌下神経切断或いはクラッシュした成熟ラットを神経損傷モデルとして用い，術後経時的に脳の新鮮凍結切片を作成し，同じくin situハイブリダイゼーションを行った。DEXの投与に関しては，神経切断の直後に神経の断端に約3週間一定濃度のDEXを放出するペレットを埋め，一定の時間経過後，in situハイブリダイゼーション或いは逆行性トレサーFluorogoldを舌に注入し，GAP-43 mRNA発現量の変化と神経再生に要する時間の変化を検討した。

【結果】

1）成熟ラット中枢神経系においても，GAP-43 mRNAは多くの領域で発現しているが，特に前脳において多く発現し下位脳幹においてはあまり発現していなかった。前脳の中でも特に終脳には強いハイブリダイゼーションシグナルを有するものが多く認められ，嗅球の僧帽細胞，Frontal cortexやCingulate cortexの第5層の錐体細胞，

Piriform cortex に存在した。また中から低レベルのシグナルを有する細胞が高密度に分布する領域としては，視床及び視床下部の正中に位置する核群があった。一方，下位脳幹における分布の特長は，ドーパミン細胞の存在するA10やA 9，ノルアドレナリン細胞の存在する青斑核，セロトニン細胞の分布する背側縫線核，ヒスタミン細胞の存在する乳頭体に強い陽性細胞の発現を認めた。

2）成熟ラットの舌下神経を切断後，強い GAP-43 mRNA シグナルが術側の舌下神経核に術後 1 日目から発現され，約 1 週間で発現はピークレベルに達し，その後，神経再生に伴って陽性シグナルが弱くなり，術後53日には正常レベルに戻ることが認められた。一方，クラッシュでは，陽性シグナルは術後 5 - 9 日にピークレベルに達して，切断モデルより 2 週間早く正常レベルに戻った。

3）DEX 投与に関しては，神経再生過程の後期において，DEX 投与後のラットはコントロールより GAP-43 mRNA 陽性シグナルの増加を認めた。一方，迷走神経背側核では mRNA 発現の変化が認められなかった。逆行性トレサー Fluorogold の注入によってDEX 投与による神経再生の促進が認められた。

【結論】

1）成熟ラットにおいて，GAP-43 mRNA は脳内に広く発現しており，特に大脳皮質や海馬などの終脳に多く認められた。このことから GAP-43が成熟脳内で高次機能を担っていると予想される大脳皮質や海馬において，何らかの可塑性や学習に関与していると考えられた。さらに，モノアミン含有細胞に強い GAP-43 mRNA 陽性反応が認められた。これらの結果は GAP-43がアミン放出に関与するという報告を支持する。

2）末梢運動神経再生時に，一時的な GAP-43 mRNA の発現が認められ，この発現量は損傷の程度に比例し再生の終了とともに発現が認められなくなった。このことから，GAP-43は神経再生時に重要な役割を果たしていると同時に神経再生の良いマーカーとなることが明らかとなった。

3）神経再生後期において DEX 投与により GAP-43 mRNA の発現量の増加が認められ，同時に神経再生の促進が認められた。これは DEX により mRNA の安定性が増加したため GAP-43量が増加し，これが再生の促進へとつながったと考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は，成熟ラット中枢神経系における GAP-43 mRNA の発現局在を in situ ハイブリダイゼーション法により検出し，さらに末梢神経損傷後の発現変化及びグルココルチコイド投与後の mRNA の発現量の変化と，それに伴う神経再生現象の促進に関する検討を行ったものである。

成熟ラットにおいて，GAP-43 mRNA は脳内に広く発現しており，特に大脳皮質や海馬などの終脳に多く認められた。また，末梢運動神経再生時の GAP-43 mRNA 発現の動態変化はGAP-43が神経再生時に重要な役割を果たしていると同時に神経再生の良いマーカーとなることが明らかとなった。さらに，グルココルチコイド投与により神経再生後期において GAP-43 mRNA の発現量の増加が認められ，同時に神経再生の促進が認められた。

本研究はグルココルチコイドが in vivo で GAP-43 mRNA レベルを増加させることを初めて証明し，その結果神経再生促進が認められることも示したもので，学位論文として充分価すると認められる。