



Title	Localization of mRNAs for trkB Isoforms and p75 in Rat Retinal Ganglion Cells
Author(s)	鈴木, 昭
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41651
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	鈴 木 昭
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 0 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 11 月 30 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	Localization of mRNAs for trkB Isoforms and p75 in Rat Retinal Ganglion Cells (ラット網膜神経節細胞における神経栄養因子受容体 trkB, p75の発現)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福 田 淳 (副査) 教 授 津 本 忠 治 教 授 三 木 直 正

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

脳由来神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は、種々の神経細胞の生存に関わっている。この BDNF に対する receptor として、full-length trkB, truncated trkB, p75 (または low-affinity nerve growth factor receptor) が知られている。full-length trkB は細胞内の tyrosine kinase domain を介してシグナル伝達を行い、細胞の生存促進に働くことが以前より知られているのに対し、最近、truncated trkB, p75が逆に生存抑制や細胞死に関与していることを示唆する報告がなされている。BDNF を、軸索切断された成体ラットの網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell, RGC) に投与すると、部分的にはあるが RGC の細胞死 (アポトーシス) を阻止できることが知られている。そこで、これら3つのタイプの BDNF receptor について、ラット網膜における発現パターンを解析し、RGC の生存あるいは細胞死との関わりを検討した。

〔方法ならびに成績〕

麻酔した成体雄 Wistar ラットより取り出した大脳、網膜、または生後1-2日ラットより取り出した小脳より RNA を抽出した。RT-PCR 法により、大脳由来の RNA から full-length trkB と truncated trkB の cDNA 断片 (ラット full-length trkB 塩基配列2,213-2,602, truncated trkB. T1 塩基配列1,843-2,174) を単離し、小脳由来の RNA から p75 の cDNA 断片 (ラット p75塩基配列376-872) を単離し、pBluescript KS(-) にサブクローニングした。Northern blot 法により、これらの cDNA 断片から作成されるプローブがそれぞれの特異的配列を認識していることを確認した。3種の BDNF receptor のうち truncated trkB は成体網膜での発現の有無がまだ報告されていないので、成体網膜由来の RNA について RT-PCR 法で対応するバンドを検出し、このバンドの塩基配列を確認し、成体網膜での truncated trkB の発現を示した。in vitro transcription により DIG-labeled RNA probe を作成し、ラット網膜切片において in situ hybridization を行った。成体ラット網膜切片において、full-length trkB の antisense probe を用いて in situ hybridization を行った場合、ganglion cell layer (GCL) と inner nuclear layer (INL) において、陽性シグナ

ルが観察できた。GCLにおいて細胞体の直径と full-length trkB mRNA に対する陽性シグナルの有無を記録し、そのヒストグラムを作成した (n=323)。直径が13 μm よりも大きい範囲では80%の細胞が、10-12 μm の範囲では63%の細胞がシグナル陽性だった。成体ラット網膜切片の GCL において、直径が13 μm より大きい細胞はすべて RGC であり、直径が10-12 μm の細胞のほとんど(約90%)が RGC であるというこれまでの報告と考え合わせると、full-length trkB は RGC のある subpopulation で発現していることが示唆された。成体ラット網膜切片において、truncated trkB の antisense probe を用いて *in situ* hybridization を行った場合、GCL と INL において陽性シグナルが観察できた。同様に、細胞体の直径と truncated trkB mRNA に対する陽性シグナルの有無についてヒストグラムを作成した (n=358)。直径が13 μm よりも大きい範囲ではすべての細胞が、13 μm よりも小さい範囲では74%の細胞がシグナル陽性だった。直径が10-12 μm の範囲では91%の細胞がシグナル陽性だった。また、シグナル陰性の細胞は 7-9 μm をピークに13 μm よりも小さい範囲の分布を示した。この分布より、シグナル陰性細胞のほとんどが displaced amacrine cell に対応することが示唆された。これらのことより、truncated trkB はほとんどすべての RGC で発現していることが示唆された。成体ラット網膜切片において、p75 の antisense probe を用いて *in situ* hybridization を行った場合、GCL と INL において陽性シグナルが観察できた。同様に、細胞体の直径と p75 mRNA に対する陽性シグナルの有無についてヒストグラムを作成した (n=376)。直径が13 μm よりも大きい範囲では80%の細胞が、10-12 μm の範囲では63%の細胞がシグナル陽性だった。これらのことより、p75 は RGC のある subpopulation で発現していることが示唆された。

次に、RGC の細胞死 (アポトーシス) が起こる発生期において *in situ* hybridization 法と TUNEL 法を用いて、truncated trkB の発現とアポトーシスとの関連をみた。まだ GCL が形成されていない胎生17日ラットの網膜切片では、truncated trkB の陽性シグナルは認められず、また TUNEL 陰性だった。RGC の分化が進み GCL が明瞭に形成される胎生19日ラットになって初めて truncated trkB の陽性シグナルが GCL 全体で検出された。この時、TUNEL は陰性だった。GCL が RGC のアポトーシスのため薄くなる生後0日ラットでは、truncated trkB の陽性シグナルが GCL 全体で検出でき、さらに TUNEL も陽性だった。RGC のアポトーシスが胎生20日に始まり生後0日頃にピークに達し生後7日まで続くことを考えると、truncated trkB の発現に引き続いて RGC のアポトーシスが起こるという時間的相関が示された。

[総括]

本研究では、ラット網膜における3種の BDNF receptor の発現パターンを解析することにより、以下の4点が明らかになった。(1)成体ラット網膜において full-length trkB は、RGC のある subpopulation で発現している。(2)成体ラット網膜において truncated trkB は、ほとんどすべての RGC で発現している。(3)成体ラット網膜において p75 は、RGC のある subpopulation で発現している。(4)発生期のラット網膜において、truncated trkB の発現に引き続いて RGC のアポトーシスが起こるという時間的相関がある。これらの結果より、RGC における truncated trkB や p75 の発現が、軸索切断後の RGC に対する BDNF の効果が部分的であることのひとつの原因である可能性が示唆された。さらにこれは、truncated trkB や p75 の遺伝子を操作して、軸索切断後の RGC の細胞死を抑制できる可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

BDNF は、網膜神経節細胞の生存に関わっていることが知られている。本研究は、分子生物学的手法を用いて、3種の BDNF receptor のラット網膜における発現パターンを細胞レベルで明らかにし、BDNF receptor が網膜神経節細胞の生存あるいは細胞死に関わっていることを示唆した。特に、full-length trkB とは対照的に、細胞生存抑制あるいは細胞死の方向に働くとされている truncated trkB や p75 の成体ラット網膜神経節細胞における発現が明らかにされたことにより、これらの receptor が BDNF の効果を減少させている可能性が示唆された。truncated trkB や p75 の遺伝子発現を制御することにより、軸索切断後の網膜神経節細胞のアポトーシスを抑え、生存率を上げることが期待できる。以上、本研究は中枢神経細胞の生存・再生促進の研究に新しい方向性を示したものとして学位論文に値する。