



Title	Expressed-sequence-tag approach to identify differentially expressed genes following peripheral nerve axotomy
Author(s)	田邊, 勝久
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41785">https://hdl.handle.net/11094/41785</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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	田邊勝久
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第15312号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Expressed-sequence-tag approach to identify differentially expressed genes following peripheral nerve axotomy (軸索損傷運動神経cDNAライブラリーを用いた損傷運動神経関連遺伝子の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 秀樹  (副査) 教授 越智 隆弘 教授 遠山 正彌

## 論文内容の要旨

## 【目的】

整形外科領域の神経損傷には末梢神経損傷及び脊髄損傷が挙げられるが、どちらも十分な機能回復は望めない症例が多いのが現状である。そこで新しい治療法の開発が望まれるが、その基礎研究として神経再生機構の分子メカニズムの解明が重要である。末梢神経は中枢神経とは異なり、軸索損傷を受けても再生する能力を持つ。これは、末梢神経損傷時に、様々な特異的な分子群の発現が誘導され、再生を促進させているためであると考えられる。このような神経再生を促進させる因子の同定は神経再生メカニズムの解明、さらには新たな治療法の開発に必須である。現在までいくつかの神経再生に重要な物質が同定されているが、未だ不十分であり未知物質の同定が不可欠である。本研究の目的は、末梢神経軸索損傷時に発現変化を示す遺伝子を同定し、その遺伝子の機能を解析し、神経軸索再生のメカニズムを明らかにすることである。

## 【方法ならびに成績】

約1000匹のラットの片側舌下神経を切断後5日目に、術側の舌下神経核を顕微鏡下で切り出し、損傷舌下神経核のcDNAライブラリーを作成した。損傷側舌下神経核ライブラリーのうちランダムに750個の遺伝子をクローニングし、DNA塩基配列を解読した。DDBJ (DNA database of Japan) のDNAデータベースと比較すると、229クローンは既知の遺伝子と一致した。また、複数個得られた遺伝子が115個あった。これらの遺伝子の内103クローンをを用いてリポプローブを作製し、in situ ハイブリダイゼーション法にて、損傷側と健常側舌下神経核でmRNAの発現に差が認められるかを検討した。神経切断によって、27クローン(26%)の発現は上昇し、6クローン(5.8%)の発現は低下した。これらの発現変化を示したクローンには、既知のものとしてエネルギー代謝(Phosphofructokinase C: 上昇、Mitochondrial malate dehydrogenase: 低下)、細胞骨格(Gamma-actin: 上昇、Alpha-tubulin: 上昇、Glial fibrillary acidic protein: 上昇、Neurofilament-H: 低下)、蛋白合成/分解(Ribosomal proteins: 上昇、Elongation factor 1 alpha: 上昇、Cystatin C: 上昇、Proteasome RN 3 subunit: 上昇)、免疫応答(TRPM-2: 上昇、CD59: 上昇)などに関連しているものがみられた。複数個得られた遺伝子群と、1個しか得られなかった遺伝子群で、発現上昇した遺伝子の割合を比較したが、明らかな差はみられなかった。

未知遺伝子については4クローンの発現が上昇し、1クローンの発現が低下した。発現上昇のみられた遺伝子のうち、一つの遺伝子の翻訳領域を同定したところ、Rhoファミリー蛋白質の一つであるTC10が得られた。他のRhoファミリー

ミリー蛋白質 (Cdc42、Rac1、RhoA) についても、舌下神経損傷後の発現変化を調べたところ、これらは若干の発現上昇しか示さなかった。これに比べ、TC10の発現上昇はきわめて著明であった。TC10のラットの脳における発現はCdc42、Rac1、RhoAの強い発現に比して、Embryo及びAdult共に低レベルであった。TC10の活性型変異体cDNAの組換えアデノウイルスベクターを作製し、神経系の継代培養細胞(PC12細胞、N1E-115細胞)に感染させたところ、糸状足、板状足、さらには神経突起様の構造物が観察された。また、接着斑の形成も見られた。同アデノウイルスベクターを培養後根神経節細胞に感染させたところ、神経突起の伸長効果が認められた。以上の結果から、TC10は、末梢神経再生時特異的に、他のRhoファミリー蛋白質と協調して成長円錐の運動を制御し、軸索の伸長に関与していると考えられた。

#### 【総括】

軸索損傷運動神経cDNAライブラリーを作成し、それを用いてランダムにクローニングすることにより、運動ニューロン軸索損傷後に発現している遺伝子を比較的効率良く同定できることが明らかとなった。目的遺伝子の一つであるTC10の機能解析を行ったところ、神経成長円錐の形態制御及び神経突起の伸長促進作用が観察され、末梢神経損傷後の軸索再生を促進することが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究では、神経軸索再生に関連する分子を得るために、末梢神経軸索損傷時に発現変化を示す遺伝子の同定を行った。軸索損傷舌下神経核のcDNAライブラリーを新たに作成し、これを用いて目的遺伝子の同定を行っている。ランダムにクローニングした遺伝子の内、27個(26%)に発現上昇が見られ、効率良く多数の目的遺伝子をクローニングしている。しかも、その中には、今まで神経損傷における報告の見られない多数の既知遺伝子及び未知遺伝子も含まれていた。このような遺伝子の同定及び解析は、神経再生メカニズム解明の研究に大きく貢献すると考えられる。さらに、このようにして得られた分子の発現を制御することにより、神経損傷の新たな治療法の開発にも結びつくと考えられる。以上から本論文は、博士(医学)の学位授与に値する。