

氏 名	か げ ま こ と 鹿 毛 眞 人
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2459 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学位論文題目	Acidic fibroblast growth factor (FGF-1) in the anterior horn cells of ALS and control cases (筋萎縮性側索硬化症患者と対照例の脊髄における酸性線維芽細胞成長因子(aFGF, EGF-1)の発現と局在に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 福 山 秀 直 教 授 井 出 千 東 教 授 柴 崎 浩

論 文 内 容 の 要 旨

運動ニューロンの生存・維持に関わる神経栄養因子を明らかにすることは、運動ニューロン疾患の病態解明と治療法の開発にとって重要である。酸性線維芽細胞成長因子(aFGF, FGF-1)は、中胚葉性および神経性外胚葉性由来の細胞群に対する成長因子であるが、脳や網膜などの中枢神経系に豊富に発現していることから、神経栄養因子およびグリア増殖因子としての作用が注目されてきた。ラット脳では、aFGFは主として皮質下のニューロンに局在している。さらにaFGFはニューロンの生存・維持機能を有するとともに、アセチルコリン合成酵素であるコリンアセチル基転移酵素(choline acetyltransferase; ChAT)の活性を上昇させる。最近 Kerhoff H. らは、aFGFがヒト脊髄前角のニューロンに局在していることを報告した。しかし運動ニューロン(コリン神経)がaFGFを含有している直接的な証拠はまだ得られておらず、ALS患者でのaFGF陽性ニューロンの詳細な検討もなされていない。そこで本研究では、免疫二重染色法とRT-PCR法を用いてALS患者と対照例の脊髄におけるaFGFの発現と局在、コリン神経との関連について検討した。

対照例およびALSの剖検後の脊髄を4%ホルマリンで浸潤固定したのち、20 μ mの薄切切片にし、3種類のaFGFモノクローナル抗体(AF-152, AF-IC10, AF-114)を用いて免疫組織化学的に検討した。運動ニューロンの同定にはChATポリクローナル抗体(AB114-P)を用い、aFGFモノクローナル抗体と組み合わせ、免疫二重染色法を行った。aFGFの発現量は、脊髄から総RNAを抽出し逆転写酵素を用いてcDNAを作成した後、aFGF遺伝子を特異的に増幅するプライマーを用いたRT-PCR法で検討した。

対照例では、脊髄前角のニューロンに限局してaFGF蛋白を検出した。aFGF陽性ニューロンの分布はChAT陽性の運動ニューロンの分布とほぼ一致していた。aFGFとChATの免疫二重染色法の結果、ChAT陽性の運動ニューロンの95.9%がaFGF陽性であった。一方、aFGF陽性ニューロンのうちの98.0%がChAT陽性であった。ALS例ではaFGF陽性ニューロンの数が著減するとともに、残存ニューロンに局在するaFGF免疫染色の強度も著明に低下していた。aFGF遺伝子をRT-PCR法で解析したところ、aFGF陽性バンドは対照例では全例で検出されたがALS例の脊髄ではほとんど検出されなかった。

本研究において、aFGFはヒト脊髄の前角の運動ニューロンに局在していることが証明された。ヒト脊髄ではaFGF陽性ニューロンのうちの98.0%がコリン神経であり、aFGFがコリン神経の機能に深く関わっていることを示唆している。またラットでは、aFGFは脳神経の運動核や前脳基底部のコリン神経に対し強力な栄養作用を有していることが報告されており、ヒト脊髄においてもaFGFはコリン神経の生存や機能維持に関わる栄養因子として作用している可能性がある。ALSにおいては、aFGF陽性の神経細胞は著明に減少するとともにaFGF mRNAの発現が著減する。免疫組織化学の結果は、残存する運動ニューロンにおいてもaFGFの発現が低下していることを示唆している。しかしながらaFGF発現の著明な低下が1次的なものか2次的なものか判断することは困難である。この問題を明らかにするために家族性ALSの原因遺伝子であるSOD1変異遺伝子のトランスジェニックマウスを用いて研究することが今後の課題である。

論文審査の結果の要旨

酸性線維芽細胞成長因子 (aFGF, FGF-1) は中枢神経系に豊富に存在する神経栄養因子・グリア増殖因子である。ラットでは、aFGF は一部のニューロンによって産生され、ニューロンの生存・維持機能を有するとともに、コリンアセチル基転移酵素 (choline acetyltransferase; ChAT) の活性を上昇させる。これらの結果は、aFGF がアセチルコリン作動性神経 (コリン神経) の内因性の神経栄養因子のひとつである可能性を示唆している。しかしながら、ヒト脊髄の運動ニューロン (コリン神経) における検討はほとんどなされていない。

そこで本研究では、免疫二重染色法と RT-PCR 法を用いて、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者と対照例の脊髄における aFGF の発現と局在、およびその運動ニューロンとの関連について検討した。

本研究の結果、aFGF はヒト脊髄前角の運動ニューロンに局在しており、ALS においては、aFGF 陽性の神経細胞は著明に減少するとともに、aFGF mRNA の発現が著減することが証明された。これらの結果は、aFGF がヒト運動ニューロンに存在する栄養因子であり、aFGF の発現低下が運動ニューロン疾患の病態に関わっている可能性を示唆している。

以上の研究は運動ニューロンの生存・維持に関わる神経栄養因子の解明に貢献し、運動ニューロン疾患の病態解明と治療法の開発に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成14年2月4日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。