

氏 名	こ ばやし 小 林 か お り
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1857 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 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 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type IV in chick retinal pigment epithelium (ニワトリ網膜色素上皮における, 17ベーターハイドロキシステロイドデハイドロゲナーゼ4型の発現)
論文調査委員	(主 査) 教 授 淀 井 淳 司 教 授 井 出 千 東 教 授 本 田 乳 士

論 文 内 容 の 要 旨

網膜色素上皮細胞とグリア細胞は、神経網膜と複雑な相互作用を果たしている。これらの細胞に特異的な分子を検索することは、機能の解明に重要な役割を果たすと考えられる。そのため、特定の細胞を認識するモノクローナル抗体を作製し、それらの抗体が認識する抗原の同定及びその性状の解析を試みた。

3b5 モノクローナル抗体は、ニワトリ胚網膜色素上皮を特異的に認識し、75kDa の蛋白質を認識した。3b5 抗体の認識する抗原をコードする遺伝子の単離を試みた。ニワトリ10日目胚網膜色素上皮の遺伝子ライブラリーを作製し、3b5 抗体を用いて検索した。3b5 抗体が認識する抗原をコードする遺伝子の全長が得られた。得られた遺伝子 p3b5 のホモロジー検索を行い、p3b5 の推定アミノ酸配列は、ヒト17ベーターハイドロキシステロイドデハイドロゲナーゼ4型と72%の相同性が認められ、p3b5 は、ニワトリ17ベーターハイドロキシステロイドデハイドロゲナーゼ(17 β -HSD) 7型をコードする遺伝子と考えられた。各組織の mRNA の発現を調べるためにノーザンブロット法を行い、網膜色素上皮、肝臓、心臓、砂嚢、脳、皮膚、精巣において2.9 kb の mRNA の発現が認められた。ニワトリ胚網膜の凍結切片を用いた間接蛍光抗体法によって、3b5 抗体が認識する抗原の局在を、共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。3b5 抗体は、神経網膜とは反応しなかったが、網膜色素上皮の細胞質内の粗な顆粒と反応した。in situ ハイブリダイゼーションでは、p3b5 の発現は、網膜色素上皮には、強く認められたが、神経網膜においては、特異的な発現はなかった。ニワトリ胚網膜内では、網膜色素上皮に、17 β -HSD 4型が発現していると考えられた。17 β -HSD は、エストラジオールをエストロンに変換する酵素で、多くの臓器に存在することが解明されている。その発現は、組織内で細胞特異性があるとされ、ニワトリ胚網膜において、網膜色素上皮に特異的に存在することと一致する。近年、中枢神経における性ホルモンの機能的役割の多様性が示されている。17 β -HSD 4型の網膜色素上皮における発現は、網膜内におけるエストロジェンの機能的役割が示唆され、性ホルモンの眼内において果たす役割の解明が、今後重要であると考えられる。

網膜内グリア細胞のひとつであるアストロサイトに特異的に発現される分子を同定し、その性状の解析を試みた。正常ヒト網膜をマウスに免疫し、ヒト網膜アストロサイトを特異的に認識する KK1 モノクローナル抗体を得た。KK1 抗体は、マウス脳内で白質のアストロサイトを認識したが、灰白質では反応しなかった。抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) モノクローナル抗体との二重染色を行い、KK1 抗体の認識する抗原は、GFAP 発現細胞の一部に存在し、KK1 抗体の認識する抗原と従来の抗 GFAP 抗体の認識する抗原の細胞内分布は異なっていることが明らかになった。GFAP ノックアウトマウスの脳を用いた KK1 抗体の間接蛍光法では、KK1 抗原の発現は認められなかった。KK1 抗体は、従来の抗体とは異なる GFAP のエピトープを認識することによって、ヒト網膜のアストロサイトを特異的に認識し、マウス脳内のアストロサイトのサブタイプを区別すると考えられる。

網膜色素上皮、網膜アストロサイトを認識するモノクローナル抗体を作製し、細胞に特異的に発現される分子を同定し、その性状を解析した。これらの細胞の新たな機能の解明に役立つと思われる。

論文審査の結果の要旨

網膜色素上皮細胞及びグリア細胞の一つであるアストロサイトは、神経網膜と複雑な相互作用を行い、増殖性硝子体網膜症等の疾患に関与している。これらの細胞に特異的な分子の検索は、機能の解明に重要である。本研究では、網膜色素上皮を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、その抗原を同定し、解析した。ニワトリ胚網膜色素上皮に対する抗体 (3b5) の抗原をコードする cDNA (p3b5) を単離し、この遺伝子は735個のアミノ酸からなるタンパク質をコードすると推定される。p3b5 の推定アミノ酸配列は、ヒト、ブタ、マウスの17β-ヒドロキシステロイドデハイドロゲナーゼ (17β-HSD) 4 型と70%以上の相同性があり、p3b5 はニワトリ17β-HSD 4 型をコードにする遺伝子であると考えられた。またノーザンブロットによって、網膜色素上皮、肝臓、心臓、砂嚢、脳、皮膚、精巣に2.9 kb の p3b5 の mRNA の発現が認められ、in situ ハイブリダイゼーション及び免疫組織化学的に、17β-HSD 4 型は網膜内では網膜色素上皮に特異的に発現していることを示した。以上の結果から、網膜内におけるエストロジェンの機能的な役割が示唆され、性ホルモンの眼内における機能の第一歩であると考えられた。

以上の研究は、網膜色素上皮の新たな機能の解明に貢献し、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9年1月28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。