

氏 名	かわもと やすひろ 河 本 恭 裕
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1864 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 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain (成熟ラット脳における脳由来神経栄養因子の免疫組織学的局在)
論文調査委員	(主 査) 教 授 水 野 昇 教 授 柴 崎 浩 教 授 木 村 淳

論 文 内 容 の 要 旨

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、後根神経節に対する栄養因子としてブタ脳より単離されたアミノ酸 119個からなる塩基性蛋白質である。BDNF は中枢神経系の種々のニューロンに作用し、ラット脳において BDNF mRNA が広範囲かつ豊富に発現していることが報告されている。我々は、BDNF の中枢神経系における役割を明らかにするために、特異的な抗体を作製し、ラット脳における蛋白としての局在を免疫組織化学的方法を用いて検討した。

BDNF に特異的なアミノ酸配列をもつ合成ペプチド (EKVPVSKGQL) を、0.8%グルタルアルデヒドにより bovine thyroglobulin と 1:3 の割合で結合させ、これを家兎に免疫することによりポリクローナル抗体を得た。抗体の特異性は、dot blot 法と Western blot 法にて評価した。

dot blot 法では、抗原ペプチドを 4 倍希釈で順にニトロセルロース膜にスポットし、抗血清と反応させた。1 万倍希釈の抗血清は 3.91 pmol の抗原ペプチドまで認識したが、免疫前の血清では反応は認められなかった。Western blot 法では、ラット脳ホモジェネートを電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、抗血清と反応させた。BDNF のモノマーの分子量に相当する位置に 1 本のバンドが認められ、あらかじめ抗血清を適量の抗原ペプチドと反応させておくとこのバンドは消失した。以上より、作製した抗体は、高力価で BDNF を認識していると考えられた。

免疫組織化学では、ウィスターラットを 4%パラホルムアルデヒドと 0.2%ピクリン酸を含む 0.1 M リン酸緩衝溶液で灌流固定後、脳を取り出し同液で浸漬固定し、20 μ m の浮遊凍結切片を作製し、アフィニティ精製した抗体を用いて ABC 法にて免疫染色した。

大脳皮質では、主に 3 層から 5 層にかけて細胞体と突起近位部が dot 状に強く染色されるニューロンが散在していた。さらにニューロピルに多数の陽性線維が認められた。海馬では、顆粒細胞層と錐体細胞層のニューロンが染色され、歯状回門や分子層を中心に多数の陽性神経線維が認められた。嗅球では、糸球体層と顆粒層に BDNF 様免疫活性 (BDNF-LI) が観察された。線条体では、pencil fiber の線維束と一

部の小型から中型のニューロンの細胞体に染色性が認められた。前脳基底部では、内側中隔核・ブローカーの対角帯核・マイネルト基底核の中型から大型のニューロンの細胞体が強く染色された。視床では、手網核や室傍核など内側の一部の神経核に陽性ニューロンが認められた。視床下部で多くの神経核に BDNF-LI が認められ、特に視索上核と室傍核の中型のニューロンの細胞体が非常に強く染色された。中脳では、上丘・動眼神経核・滑車神経核・赤核・黒質のニューロンに BDNF-LI が認められ、下丘には細胞体と突起近位部が dot 状に強く染色されるニューロンが散在していた。橋では、脳神経諸核と橋核・網様核・青斑核・縫線核・台形体核・外側毛帯核・上オリブ核のニューロンに染色性が認められた。延髄では、孤束核・迷走神経背側運動核・舌下神経核・下オリブ核・網様核のニューロンに BDNF-LI が観察された。小脳では、プルキンエ細胞と小脳核のニューロンが染色され、顆粒層に多数の陽性神経線維が認められた。

今回の結果において、mRNA の発現の無いニューロンにも染色性が認められ、又多数の神経線維が染色されたことより、ラット脳において一部のニューロンでは、BDNF は軸索輸送されていると考えられた。さらに広範囲に BDNF-LI が観察されたことより、BDNF がラット脳において広汎に栄養因子として機能している可能性が示唆された。BDNF は、ラットとヒトではアミノ酸配列は全く同じである。ヒトの中樞神経においても、BDNF が広範囲に影響を及ぼしていることが推測され、変性疾患を含め様々な神経疾患への治療面での応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

脳由来神経栄養因子 (BDNF) はブタ脳より単離された栄養因子で、中枢神経系のニューロンへの作用が報告されている。当申請者は BDNF に特異的な抗体を作製し、ラット脳における蛋白としての局在を免疫組織学的手法を用いて検討した。

BDNF に特異的なアミノ酸配列をもつ合成ペプチド (EKVPVSKGQL) で家兔を免疫し、ポリクローナル抗体を得た。抗体の特異性は、dot blot 法と Western blot 法にて評価した。dot blot 法では 1 万倍希釈の抗血清が 3.91 pmol の抗原ペプチドまで認識し、Western blot 法ではラット脳のホモジェネートにおいて BDNF のモノマーの分子量に相当して 1 本のバンドが認められた。

以上の immunoblot 法の結果は、作製した抗体が高力価で BDNF を認識していることを意味する。免疫組織化学では、ウィスターラットを 4%パラホルムアルデヒドと 10.2%ピクリン酸を含む 0.1 M リン酸緩衝液で灌流固定後同液で浸漬固定し、20 μ m の浮遊凍結切片を ABC 法にて免疫染色した。大脳皮質・海馬・嗅球・線条体・前脳基底部・視床下部・脳幹・小脳のニューロンの細胞体が染色され、ニューロピルには線条体の pencil fiber を含む多数の陽性神経線維が認められた。この所見は BDNF がラット脳において広汎に栄養因子として機能しており、一部のニューロンでは軸索輸送されている可能性を示唆する。

以上の結果は BDNF の中枢神経系における役割の解明に貢献し、ヒトの変性疾患の治療開発に寄与する。

従って本論文は博士 (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 9 年 1 月 24 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。