



## Expression of human GFR $\alpha$ -1 (GDNF receptor) at the neuromuscular junction and myelinated nerves

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 麻子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1630">http://hdl.handle.net/10271/1630</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 353号	学位授与年月日	平成13年12月27日
氏 名	小 林 麻 子		
論文題目	<p>Expression of human GFR <math>\alpha</math>-1(GDNF receptor) at the neuromuscular junction and myelinated nerves  (神経筋接合部および有髄線維におけるヒト GFR <math>\alpha</math>-1 (GDNF 受容体) の発現)</p>		

博士(医学) 小林 麻子

## 論文題目

Expression of human GFR $\alpha$ -1(GDNF receptor) at the neuromuscular junction and myelinated nerves  
(神経筋接合部および有髄線維におけるヒトGFR $\alpha$ -1(GDNF受容体)の発現)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

グリア細胞株由来栄養因子(GDNF)は、ラットグリア細胞株B49培養上清中の神経栄養因子として1993年に単離・同定された。その後GDNFはラットやマウスの運動ニューロンに対して強力な生存活性をもつことが実験的に証明され、筋萎縮性側索硬化症をはじめとする運動ニューロン疾患に対する治療法としてその可能性が期待されるようになった。以前、申請者らは、GDNFがヒト骨格筋で著明に発現していることを報告し、運動ニューロンの標的組織である骨格筋で産生されたGDNFが、下位運動ニューロンに対する生存活性を発揮している可能性を示唆した。GDNFは生存活性を発揮する際に、膜表面受容体であるGFR- $\alpha$ 1との結合を介して、受容体型チロシンキナーゼであるRetを活性化することが知られている。そこで申請者らはヒト下位運動ニューロンに対するGDNFの生存活性作用についてより詳細に検討する目的で、GDNF受容体GFR- $\alpha$ 1の発現と局在をヒト成人骨格筋で検討した。

### 〔材料ならびに方法〕

免疫組織化学：成人ヒト骨格筋の凍結生検標本から6 $\mu$ mの連続切片を作成した。抗GFR- $\alpha$ 1抗体と抗GDNF抗体で交互に隣接切片を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で免疫組織化学的に両者の局在を検討した。また全ての標本で同時に $\alpha$ -bungarotoxinで染色を行い、GDNFおよびGFR- $\alpha$ 1と神経筋接合部との位置関係を検討した。2)RT-PCRおよびsouthern blotting：ヒト脊髄の凍結生検標本から50 $\mu$ m切片を作成し、脊髄前角の運動ニューロン部分を18ゲージ針で抜き出して同部位のmRNAを抽出した。次にヒト骨格筋凍結標本からもmRNAを抽出した。これらのmRNAからGDNFおよびGFR- $\alpha$ 1のprimer setを用いてRT-PCRによりcDNAを増幅した。cDNAは電気泳動の後nylon membraneに転写し、<sup>32</sup>PラベルしたGDNFおよびGFR- $\alpha$ 1のprobeを用いてsouthern blottingを行った。

### 〔結果〕

抗GFR $\alpha$ -1ポリクローナル抗体による免疫染色の結果、GFR $\alpha$ -1は成人骨格筋線維においては筋線維内部には発現を認めず、神経筋接合部および骨格筋組織内の有髄神経線維に強い発現を認めた。また骨格筋の隣接切片をGDNFとGFR $\alpha$ -1の抗体で各々染色したところ、同一の神経筋接合部にGDNFとGFR $\alpha$ -1が共存していることが観察された。また、有髄神経線維を詳細に観察すると、GFR $\alpha$ -1の発現は特にシュワン細胞で著明であった。また、GFR $\alpha$ -1のmRNAを脊髄前角細胞と筋組織の両方で解析したところ、先に報告したGDNFのmRNAとは対照的に、GFR $\alpha$ -1のmRNAは脊髄前角細胞で発現しており、骨格筋組織では発現していなかった。

### 〔考察〕

GFR $\alpha$ -1の蛋白レベルの発現がGDNFと同一の神経筋接合部にあったこと、一方そのmRNAが脊髄前角細胞に発現していたことから、GFR $\alpha$ -1は脊髄前角にある運動ニューロンで産生されて有髄神経軸索内を末梢側に輸送され、神経筋接合部でligand binding componentとしてGDNFと結合していると考えられた。このことはGDNFが神経筋接合部から運動ニューロンにuptakeされるという申請者らの推論を裏付けるものである。

#### 〔結論〕

GDNFの受容体であるGFR $\alpha$ -1のヒト有髄線維における発現を免疫組織化学的に解析したところ、神経筋接合部およびシュワン細胞で著明に発現していた。また、RT-PCRによるmRNAの解析からGFR $\alpha$ -1は脊髄前角の運動ニューロンで産生されていることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

グリア細胞株由来栄養因子(GDNF)は、ラットグリア細胞株B49培養上清中の神経栄養因子として1993年に単離・同定された。その後GDNFはラットやマウスの運動ニューロンに対して強力な生存活性をもつことが実験的に証明されている。以前、申請者らは、GDNFがヒト骨格筋で著明に発現していることを報告し、運動ニューロンの標的組織である骨格筋で産生されたGDNFが、下位運動ニューロンに対する生存活性を発揮している可能性を示唆した。GDNFは生存活性を発揮する際に、膜表面受容体であるGFR- $\alpha$ 1との結合を介して、受容体型チロシンキナーゼであるRetを活性化することが知られている。そこで申請者らはヒト下位運動ニューロンに対するGDNFの生存活性作用についてより詳細に検討する目的で、GDNF受容体GFR- $\alpha$ 1の発現と局在をヒト成人骨格筋で検討した。

成人ヒト骨格筋の凍結生検標本から6 $\mu$ mの連続切片を作成した。抗GFR- $\alpha$ 1抗体と抗GDNF抗体で交互に隣接切片を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で免疫組織化学的に両者の局在を検討した。また全ての標本で同時に神経接合部のマーカー蛋白である $\alpha$ -bungarotoxinで染色を行い、GDNFおよびGFR- $\alpha$ 1と神経筋接合部との位置関係を検討した。また、ヒト脊髄の凍結生検標本から50 $\mu$ m切片を作成し、脊髄前角の運動ニューロン部分を18ゲージ針で抜き出して同部位のmRNAを抽出した。次にヒト骨格筋凍結標本からもmRNAを抽出した。これらのmRNAからGDNFおよびGFR $\alpha$ -1のprimer setを用いてRT-PCRによりcDNAを増幅した。cDNAは電気泳動の後nylon membraneに転写し、<sup>32</sup>PラベルしたGDNFおよびGFR $\alpha$ -1のprobeを用いてsouthern blottingを行った。

抗GFR $\alpha$ -1ポリクローナル抗体による免疫染色の結果、GFR $\alpha$ -1は成人骨格筋線維においては筋線維内部には発現を認めず、神経筋接合部および骨格筋組織内の有髄神経線維に強い発現を認めた。また骨格筋の隣接切片をGDNFとGFR $\alpha$ -1の抗体で各々染色したところ、同一の神経筋接合部にGDNFとGFR $\alpha$ -1が共存していることが観察された。また、有髄神経線維を詳細に観察すると、GFR $\alpha$ -1の発現は特にSchwann細胞で著明であった。また、GFR $\alpha$ -1のmRNAを脊髄前角細胞と筋組織の両方で解析したところ、先に報告したGDNFのmRNAとは対照的に、GFR $\alpha$ -1のmRNAは脊髄前角細胞で発現しており、骨格筋組織では発現していなかった。

GFR $\alpha$ -1の蛋白レベルの発現がGDNFと同一の神経筋接合部にあったこと、一方そのmRNAが脊髄前角細胞に発現していたことから、GFR $\alpha$ -1は脊髄前角にある運動ニューロンで産生されて有髄神経軸索内を末梢側に輸送され、神経筋接合部でリガンド結合受容体としてGDNFと結合していると考えられた。このことはGDNFが神経筋接合部から運動ニューロンにuptakeされるという可能性を裏付けるものである。

本研究においては、GDNFを分泌する組織とその受容体の発現している組織を、形態学的・分子生物学的に確定した点、及び、筋萎縮性側索硬化症をはじめとする運動ニューロン疾患に対するGDNFの臨床応用への基礎的知識を与える点を評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) GDNFの骨格筋における産生はどのような調節を受けているのか
- 2) Retは生体内でどこに発現しているのか
- 3) 運動神経細胞の疾患の場合に、GDNFを投与しても受け手であるGFR $\alpha$ -1の発現がその運動神経細胞で低下していれば効果が無いのではないのか
- 4) 運動神経細胞に対して、GDNFは他の因子に比べてどれくらい効果的なのか
- 5) Retの下流のシグナル伝達はどうなっているのか
- 6) オリゴデンドロサイトにGFR $\alpha$ -1は発現しているのか
- 7) GDNFは骨格筋でリガンド以外の働きをしているのでは無いか
- 8) GDNFとGFR $\alpha$ -1の関係を解析するためのin vitroの系を作れるか
- 9) 筋ジストロフィーの場合のGDNF、GFR $\alpha$ -1、Retの発現はどうなっているのか
- 10) GDNF、GFR $\alpha$ -1、Retのそれぞれのknock out mouseではどのような表現形があらわれるのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	佐藤康二			
	副査	筒井祥博	副査	西澤	茂