

氏 名 (本籍)	すず 鈴 木 ひろ 博 よし 義
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医 第 2 2 6 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 年 9 月 12 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
最 終 学 歴	昭 和 59 年 3 月 17 日 東 京 慈 恵 会 医 科 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業
学 位 論 文 題 目	ヒト及びラット中枢神経系における神経細胞内ラ ミン様物質の局在の検討
論 文 審 査 委 員	(主 査) 教 授 岩 崎 祐 三 教 授 京 極 方 久 教 授 小 暮 久 也

論文内容要旨

細胞外マトリックス物質であるラミニンは培養系では著明な神経突起伸張促進作用や神経細胞の生存期間を延長する作用が認められる。生体でも神経系の形成に重要な役割をはたしているとされ、神経系の再生、可塑性が研究において注目されている。最近、ラミニン様免疫反応 (LLI) が中枢神経細胞内に見いだされるという報告がなされている。しかし、この物質の神経系での働きは不明であり、その分布に関しても報告は少なく、基底膜ラミニンとの性質の相違の検討も充分には行われていない。また、ヒトの神経系についての報告はない。本論文ではヒト、成熟ラットおよびラット発生段階の中枢神経系における神経細胞内LLIの局在を免疫組織学的に検討した。また、脳ホモジェネート可溶性分画のイムノブロットによる検索を行い基底膜ラミニンとの分子量および加熱還元に対する性質の異同を検討した。

【方 法】

1) 検索対象としては成熟ラット中枢神経の検索には体重250g Wistarラット雄、雌同数合計24匹、ラット発生段階の検索にはWistarラット10日目の胎児 (E10), E14, E16, E21及び生後1日目 (N1) からN3, N5, N7, N14, N21を使用した。ヒト中枢神経の検索には神経疾患のない剖検脳11例 (生後12日~81歳) を検索した。2) 抗体 ラットの検索には抗EHS肉腫ラミニンウサギ血清を用い、ヒトの検索にはEHS肉腫ラミニンでアフィニティー精製したヒト胎盤ラミニンウサギ抗体を使用した。3) 免疫組織化学 固定はラットでは4%パラフォルムアルデヒドを用い、ヒト剖検脳は10%ホルマリンで固定されたものを検索した。ヒトおよび成熟ラット脳は40~50 μm の切片とし、浮遊切片法で染色し、発生段階の検索には14 μm の凍結切片をスライドガラスに張り付けて染色した。4) 脳ホモジェネートのイムノブロット 未固定のヒト脳4例及びラット脳6匹を検討した。蛋白分解酵素阻害剤を含む緩衝液で1分間脳をホモジェネートし、これを20,000xg, 20分間または105,000xg, 1時間遠心後の上清を用いてイムノブロットを行った。上清は1%ジチオスレイトール存在下100°C, 1分間加熱還元をしたものとししないものを比較した。対照としては、EHS肉腫ラミニンを同様に加熱還元して用いた。

【結 果】

成熟ラットでは胞体内にびまん性LLIが認められる神経細胞 (LLI-1型)、顆粒状LLIが認められる神経細胞 (LLI-2型) および全く反応が認められない神経細胞 (LLI-3型) の3種類の反応パターンが見られた。大脳皮質、視床、海馬、線条体、小脳皮質、迷走神経背側核、脊髄後

角の神経細胞はLLI-1型であり、一方、内側中隔核、無名質、赤核、黒質緻密層、脳幹部運動神経核、脊髄前角細胞等ではLLI-2型であった。小脳顆粒細胞、乳頭体核、内側手綱核の神経細胞はLLI陰性であった。ラットの発生段階の検討ではまずLLI-1型の反応がE18の海馬、古皮質、基底核、視床に認められ始め、LLI-2型の神経細胞はそれより遅れてN14より出現した。N28には神経細胞内LLIの分布は成熟ラットと同じになった。ヒト中枢神経ではLLI-2型神経細胞は認められず、LLI-1型、LLI-3型の神経細胞のみ認められた。LLI-1型神経細胞の分布はラット神経系でのLLI-1型神経細胞の分布にはほぼ一致していたが、ヒトでは無名質、内側中隔核の神経細胞もLLI-1型であった。ラットのLLI-2型に対応する神経細胞の大部分はLLI-3型であった。ヒト、ラットいずれにおいてもEHS肉腫ラミニンで抗体を前吸収すると神経細胞内の陽性反応は完全に消失した。脳ホモジェネート上清のイムノブロットでは非還元状態の上清中にヒト及びラットに共通して約180kDの陽性バンドが認められた。ラットではこの他に約380kDの細いバンドが存在した。これらのバンドは上清を加熱還元する事で完全に消失した。

【考 察】

本研究からヒトおよびラットの中枢神経細胞の細胞質内に細胞外マトリックス蛋白であるラミニンのエピトープの一部が常に存在する事が示された。神経細胞内LLIは新皮質、旧皮質、基底核、脳幹部、脊髄に広く分布しており、特定の運動系、知覚系に限られた機能を持っているとは考えにくかった。ラットではLLI-2型神経細胞群の多くはLLI-1型の神経細胞群に遠心性投射を持っていた。LLI-1型の神経細胞はこれまでの報告でラミニン様物質を産生しておりLLI-2型神経細胞は逆行性軸索流を介して細胞外から取り入れている可能性があり、発生段階の検討でもLLI-1型神経細胞の分布が完成した後にLLI-2型の神経細胞が出現した。ヒト脳ではLLI-2型神経細胞は認められなかったが、ラットLLI-2型細胞をラミニン様物質非産生細胞と考えれば、ヒトでもLLI-1型とLLI-2型神経細胞間ではラットと同様の関係が認められた。この事より、神経細胞内ラミニン様物質は神経細胞間の線維連絡の形成またはそれを介した情報伝達の機能を担う分子であろうと推測された。イムノブロットでは脳可溶性分画には基底膜ラミニンとは性質の異なったラミニン様物質が複数存在している事が分かった。この物質は最近報告されたラミニンサブセットの1つである可能性がある。このような物質はラミニンの持つ広い生物学的活性を研究して行く上でも、神経系への作用を検討する上でも興味深い物質と考えられる。

審査結果の要旨

ラミニンは分子量約百万の細胞外基質の主要成分の一つで、中枢神経の発生過程において細胞構築の形成、神経細胞の分化に大きな役割を果たしている事が推測されている。また成熟神経組織の損傷に際しては、その再生における役割が最近注目されている。しかし神経組織でのラミニンの局在は今までほとんど明らかにされていなかった。本研究はいままで不明であったこの物質のヒト中枢神経組織における局在を明かにするとともに、ラット胎児をもちいて発生期のラミニンの神経組織での発現を主として免疫組織学的手法により明かにしようとしたものである。

免疫組織学的検索にもちいる抗体を得るために、まずヒト胎盤よりラミニン分画を抽出、これに対する抗体をEHS肉腫由来のラミニンをもちいたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。ヒト脳におけるラミニンの局在の免疫組織学的検索には死後3時間以内に剖検された生後12日から81歳までの脳11検体を、またラットについては胎生10, 14, 16, 21日目の胎児と生後1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 23日目の脳を検索の対象とした。

ヒトおよびラットの成熟脳で血管周囲の基底膜の他に神経細胞の胞体に明確な抗ラミニン抗体に対する反応性を認めた。特にラットでは二種類の反応様式を識別することができた。ひとつは神経細胞の胞体に瀰漫性に反応が見られるもので、新皮質の神経細胞、海馬、線状体、淡蒼球、視床、黒質緻密体、小脳プルキニエ細胞、脊髄後角に高度な反応性を示す細胞が局在していた。この他に胞体に顆粒状の反応物質がみられる神経細胞があった。この反応様式を示す細胞は新皮質の大型の錐体細胞層、無名質、マイネルト核、黒質網状体、赤核、脳幹網様体、小脳深部核、脊髄前角などにみられた。一方、小脳顆粒細胞層、乳頭体では全く反応が認められなかった。

ヒトでもラミニン抗体に瀰漫性に反応する神経細胞が見られ、これらの細胞はラットに類似の分布を示していた。しかし、ラットで顆粒状の反応産物をもつ細胞に対応する細胞はヒトではすべて反応陰性であった。

発生期のラットでは胎生16日目に、はじめて海馬、脳幹の神経細胞内に反応が認められるようになり、21日目にはentorhinal cortex, piriform cortexなどにも強い反応が見られるようになった。大脳皮質では生後に層構造が明確になるにつれて、錐体細胞の反応性が増強していた。抗ラミニン抗体の反応性はEHS肉腫ラミニンによる前処理により消失、更に、Western blotで脳組織にラミニン抗体に反応する180kDの物質が存在していることも確認している。この論文はラミニンの脳での局在を明確に示した最初の論文で学位授与に価するものである。