

氏 名 (本 籍) 岩 見 美 香 (京都府)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 (論) 第 3 1 5 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 Demonstration of fibroblast growth factor receptor-1 in rat adrenal gland as revealed by reverse transcription-polymerase chain reaction and immunohistochemistry

(ラット副腎における線維芽細胞増殖因子受容体-1 の RT-PCR および免疫組織化学による証明)

審 査 委 員 主 査 教 授 岡 部 英 俊

副 査 教 授 野 田 洋 一

副 査 教 授 新 井 良 八

論文内容要旨

*整理番号	318	氏名 (よりがな)	いわみ みか 岩見 美香
学位論文題目	<p>Demonstration of fibroblast growth factor receptor-1 in rat adrenal gland as revealed by reverse transcription-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. (ラット副腎における線維芽細胞増殖因子受容体-1のRT-PCRおよび免疫組織化学による証明) Acta Histochemica et Cytochemica 36 (4) 353-359, 2003. 著者名: Mika Iwami, Ikuo Tooyama, Ayae Kinoshita, Akinori Matsuo, Yutaka Oomura, Kazuo Sasaki and Hiroshi Kimura.</p>		
<p>【目的】 線維芽細胞増殖因子 (FGF) は、中胚葉および神経外胚葉由来の様々な組織において細胞の分化や増殖を制御するポリペプチドである。副腎においては、皮質の球状帯と束状帯外側、および髄質のクロム親和性細胞に塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) が発現している事がラットで報告され、我々もラット副腎髄質のアドレナリン産生細胞に酸性線維芽細胞増殖因子 (FGF-1) が発現している事を報告した。このように副腎に選択的に発現するFGFの役割を解明するためには、その受容体の分布を明らかにする必要がある。本研究は、ラット副腎を用いて逆転写PCRおよびウェスタンブロット解析によりFGF-1, 2の双方に親和性の高い受容体FGFR1の発現やその型を調べると共に、免疫組織化学的手法によりその局在を調べ、副腎でのFGF-1, 2の標的を明らかにする事を目的とした。またこれらの結果より、FGFR1が副腎機能にどのように関わっているのかを過去の文献も合わせて考察した。</p> <p>【方法】</p> <p>1) mRNA解析; Wister ratをペントバルビタールで麻酔後、灌流して両側副腎を摘出し、顕微鏡下に皮質と髄質に分離して、それぞれよりRNAを抽出、逆転写を行ってcDNAを作成し、PCRに使用した。FGFR1遺伝子は選択的スプライシングによって多様な受容体蛋白を作り出すが、細胞外に免疫グロブリン様構造を3つ (長鎖型) もしくは2つ (短鎖型と分泌型) 持っており、この領域を検出するプライマーを使用した。髄質のクロム親和性細胞に含まれるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) のmRNAのPCRも同時に行い、副腎の分離が正確かを検証した。またポジティブコントロールとしてβアクチンのPCRも実施した。PCR産物は3%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。</p> <p>2) ウェスタンブロッティング解析; 前述と同様に摘出した副腎をホモジネートして可溶性膜分画を分離し、7.5%のSDS-PAGEに電気泳動して膜に転写し、抗FGFR1血清 (FR237、当センターでウサギを免疫して作成した抗体で、全てのFGFR1に共通の酸性領域を認識する) とアルカリペルオキシダーゼ標識の抗ウサギIgGポリマーで免疫染色し、DAB-Niで発色させた。</p> <p>3) 免疫組織化学; Wister ratをペントバルビタールで麻酔後、灌流固定して両側副腎を摘出し、20μmの凍結切片を作成した。前処理にて内因性ペルオキシダーゼ様活性を中和した切片を、FR237、ビオチン化抗ウサギIgG、ABC (abiding-biotin-peroxydase complex) で染色し、DAB-Niで発色させた。ネガティブコントロールとして免疫前のウサギ血清や、FGFR1ペプチドに吸収させた抗血清でも同様の染色を行った。</p> <p>4) 二重免疫蛍光標識; 前述同様に前処理をした切片を、FR237および抗THマウスモノクローナル抗体で反応させた後、Texas Red 標識の抗マウスIgGヤギ抗体とAlexa488標識抗ウサギIgGヤギ抗体に反応させて染色し、共焦点レーザーสキャン顕微鏡で観察した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、
 2千字程度でタイプ等で印字すること。
 2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】

1) β アクチンのmRNAのプライマーでは259 bpのバンドが副腎皮質、髄質に同等の濃さで検出された。THのmRNAのプライマーでは646 bpのバンドが髄質にのみ検出された。FGFR1のmRNAのプライマーでは426 bpと160 bpの2本のバンドが双方に検出され、それぞれ3つおよび2つの免疫グロブリン様領域の塩基数に合致した。

2) ウェスタンブロッティングでは可溶性膜分画に130 kDおよび75 kDの2本のバンドが検出され、これらは長鎖型および分泌型のFGFR1の分子量に合致した。

3) 免疫染色では、主に副腎の皮質球状帯および髄質にFGFR1陽性細胞が分布し、被膜も染色されていた。髄質ではほぼ全ての細胞がFGFR1陽性であった。これらは、事前にFGFR1ペプチドに吸収させた抗血清では染色されなかった。

4) FGFR1およびTHの二重染色では、副腎皮質のFGFR1陽性細胞はTHには陰性であった。副腎髄質細胞は双方に陽性で、FGFR1とTHが共存していると考えられた。

【考察】

逆転写PCRの結果、ラット副腎の皮質および髄質で、長鎖型および短鎖型の両サブタイプのFGFR1が発現していた。ウェスタンブロッティングの結果より、ラット副腎のFGFR1は長鎖型および短鎖型に属する分泌型であると考えられた。免疫組織化学では、FGFR1陽性は主に皮質球状帯と髄質および被膜にみられ、その分布が明らかになった。被膜の線維芽細胞がFGFR1を発現しFGF-2により増殖する事は知られている。ラットの副腎皮質球状帯でもFGF-2は検出されており、発達期および成獣ラットの副腎でFGFR1とFGF-2のmRNAの分泌の推移が一致しているとの報告や、培養系にてFGF-2が副腎皮質細胞の分裂を強力に促進するという報告などを考え合わせると、FGF-2は副腎皮質細胞の自己分泌型の増殖因子であるとの説が支持される。また皮質球状帯は下垂体を介する中枢支配を受けて水分代謝機能を担っているが、視床下部のバゾプレッシン含有神経細胞にもFGF-2の存在が報告されており、バゾプレッシンと共に遠方の標的である皮質球状帯に作用し、水分調節などの生理学的役割に関与する可能性も考えられる。一方、副腎髄質でのFGFR1はTH陽性のカテコラミン細胞に共存していたが、牛の副腎髄質細胞ではFGF-2とFGFR1の応答によりTH遺伝子が活性化されたとの報告があり、FGFR1がTH遺伝子の発現を調節する可能性が示唆される。免疫蛍光染色にて副腎皮質、髄質の両方でFGFR1は細胞内および表面に観察されたが、細胞内での正確な局在については免疫電顕による検討が必要である。

【結論】

長鎖型および分泌型のFGFR1がラット副腎の皮質および髄質の両方で発現している。FGFR1蛋白は、被膜に加え、皮質では主に球状帯に存在し、髄質ではTH陽性のカテコラミン細胞に局在していた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	318	氏名	岩見 美香
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>線維芽細胞増殖因子1型受容体(FGFR1)は、aFGF(FGF-1)およびbFGF(FGF-2)に共通する高親和性受容体として、発生・分化・増殖に重要な役割を担う。副腎にはFGFR1が発現する事が報告されているが、その局在やサブタイプについては不明である。</p> <p>本研究は、副腎におけるFGFおよびFGFR1の機能的意義を明らかにする目的で、RT-PCR法、ウエスタンブロット法、免疫組織法を用いて、ラット副腎におけるFGFR1の局在とサブタイプを検討したものである。その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) ラット副腎の皮質と髄質の双方に長鎖型と分泌型の2種のサブタイプのFGFR1が発現しており、長鎖型が優位である。 2) FGFR1陽性細胞の多くは、被膜、皮質球状帯、髄質に存在しており、束状帯と網状帯の陽性細胞は少数であった。 3) チロシン水酸化酵素(TH)との二重免疫蛍光染色の結果、髄質のFGFR1はTH陽性のカテコラミン産生細胞に共存していた。 <p>本研究は副腎におけるFGFR1の局在とサブタイプについて初めて明らかにし、副腎におけるFGFの機能を解明する上で重要な知見を与えるものであり、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>尚、本学位申請者は、平成16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。</p>			
(平成 16年 2月 13日)			