

氏名(本籍)	吉田 忍 (滋賀県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博士(論)第304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15年3月27日		
学位論文題目	Malignant Rhabdoid Tumor Shows Incomplete Neural Characteristics as Revealed by Expression of SNARE Complex (SNARE関連因子発現検索による悪性横紋筋様腫瘍の神経系形質の検討)		
	審査委員	主査 教授	大久保 岩 男
		副査 教授	佐藤 浩
		副査 教授	岡部 英俊

論文内容要旨

【目的】

近年、細胞内メンブランチラフィック機構の解明を通じて、神経伝達物質放出の過程に働く分子システムが明らかとなってきている。そのうちのひとつがSNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor) であり、この複合体はゴルジ体間メンブランチラフィックにおいて膜融合装置として働くものとして提唱された。SNAREの中で、輸送される小胞に存在するものはvesicle-SNARE (t-SNARE)、小胞が融合する標的となる膜に存在するものはtarget-SNARE (t-SNARE) と呼ばれている。これらv-SNARE/t-SNAREが複合体を形成することによりシナプス小胞とシナプス前膜が融合するというモデルが想定されている。

Malignant rhabdoid tumor (MRT) は小児期にみられる比較的稀な悪性腫瘍であり、化学療法、放射線療法に抵抗性で極めて予後不良である。腫瘍組織起源については様々な報告があるが、現時点ではmultiphenotypicな性質を持つ特異な腫瘍であると考えられている。MRTの細胞生物学的特性については不明な点が多く、神経分化の特性に関してSNAREを用いた検討を行った。悪性腫瘍の神経分化の比較対照として神経芽細胞腫を用い、SNAREの発現の差異を検討した。

【方法】

5つのMRT細胞株 (TM87-16, STM91-01, TTC642, TTC549, TTC1240及びYAM-RTK1) と5つの神経芽細胞腫 (IMR-32, NH-12, SCCH26, TGW及びNB-1) を使用した。SNARE関連因子において、v-SNAREであるsynaptotagmin, synaptophysin, VAMP-2、t-SNAREであるsyntaxin-1A, SNAP-25A, SNAP-25Bについて、mRNAの発現をreverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法およびin situ hybridization法を用いて、synaptotagmin, synaptophysinについては蛋白の発現を免疫細胞化学染色法、Western blot法にて検討した。また、分化誘導剤であるTPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) を添加することでそれぞれの細胞株を分化誘導し、誘導前後で前述したSNARE関連因子のmRNAの定量をcompetitive PCR法にて行った。

【結果】

MRT細胞株のうち、TM87-16, TTC642はTPA添加により形態学的に神経突起様構造物を形成した。またこれら2つのMRT細胞において、synaptotagmin, synaptophysin, SNAP-25Aの発現を認めた。SNAP-25BはすべてのMRT細胞株で発現を認めなかった。また神経芽細胞腫に比べて、MRT細胞におけるsynaptotagmin, synaptophysin, SNAP-25AのmRNA発現は低かった。

TM87-16, TTC642において、TPA添加でsynaptotagmin, SNAP-25Aのup-regulationを認めたが、synaptophysinはこれに反してdown-regulationし、SNAP-25Bは発現を確認できなかった。SyntaxinはTPA添加前後で差を認めなかった。また、synaptotagmin, synaptophysinはMRT細胞株において発現の低下がみられた。

【考 察】

従来の報告によると、神経分化においてsynaptotagminはsynaptogenesisに深く関与し、SNAP-25は神経突起萌芽に必要と考えられている。またこれらは他のv-SNARE, t-SNAREと複合体を形成し、密接に関連していることが示唆されている。MRT細胞株ではTM87-16, TTC642がTPA添加により神経突起様細胞突起の萌芽をきたすが、SNARE因子の発現は神経芽細胞腫とは異なり、synaptophysinはdown-regulationし、SNAP-25Bは発現を認めなかった。MRT細胞株の神経系への分化能は不完全で極めて未熟であることが示唆された。

【結 語】

神経分化の過程において、synaptotagminは軸索延長に必要であり、またMRTは不完全な神経分化能しか持っていないため、synaptophysinがdown-regulationするものと考えられた。SNAP-25Aはsynaptogenesisの前段階において、SNAP-25Bはsynaptogenesisが起こる段階で必要であることが示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

SNAREはメンブランチラフィックにおける膜融合装置として働くものとして提唱されたタンパク質である。これには輸送小胞に存在するv-SNAREとこの小胞が標的とする膜に存在するt-SNAREがある。Malignant rhabdoid tumor(MRT)の神経系分化能の特性に関して、neuroblastomaとの比較検討を、SNAREを用いて行った。従来、MRTはmultiphenotypic diversityがあり、neural phenotypeを持つものと持たないものが報告されたきた。Neural phenotypeを持つMRTの神経分化能はSNAREの発現レベルからみると神経芽腫より未分化で、初期段階の限定的なものであった。

本研究は、SNAREの発現をneuroblastomaと比較することで、MRTの神経系への分化能の特性と、あわせて神経分化におけるSNARE complexの働きを示したもので、博士（医学）授与に値するものと認める。