



Title	ラット神経系における新しい細胞接着因子gicerinの性質と神経軸索再生における役割
Author(s)	李, 炳生
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40006
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	季炳生
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 12990 号
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	ラット神経系における新しい細胞接着因子 gicerin の性質と神経軸索再生における役割 Characterization of Gicerin, a Novel Cell Adhesion Molecule in Rat Nervous Cells and Functional Roles in Nerve Regeneration
論文審査委員	(主査) 教授 三木 直正 (副査) 教授 津本 忠治 教授 福田 淳

論文内容の要旨

【目的】

神経系の構築には多くの神経細胞間あるいはグリア細胞間、さらに神経細胞-グリア細胞間の相互作用が必要である。神経系の細胞間相互作用に関与する因子として、神経栄養因子、細胞外マトリックス因子と細胞接着因子をあげることができる。Gicerin は、NOF と異種分子間結合を、自身とは同種分子間結合をし、細胞-細胞外マトリックス及び細胞-細胞の相互接着に関与している。一方、末梢神経系の軸索および中枢神経系の神経線維束の損傷は、ニューロンおよびグリアにさまざまな変化をもたらす。本研究は、ニワトリで見出した gicerin が、他の動物種および株化細胞に発現しているかどうかを調べたところ、ラット神経細胞に発現していることを見出したので、その諸性質を調べた。さらに、障害神経軸索の再生に細胞外マトリックス因子や細胞接着因子が関与することが知られているので、ラット舌下神経損傷後に、NOF および gicerin が再発現するかどうかを検討した。

【方法】

1. 動物：Wistar 系ラットをペントバルビタール麻酔下に、片側舌下神経に損傷 (transection) を与えた。手術後、経時変化を見るため一定期間ごとに、ラットをエーテル麻酔下に断頭し、速やかに脳を取り出した。2. 免疫組織化学：既報の方法により、間接蛍光抗体法で免疫組織化学を行った。3. *in situ* ハイブリダイゼーション法：新鮮切片を、4% パラホムアルデヒド液にて 20 分間固定し、アセチル化を行った後、アルコールにて脱水処理を行った。probe はニワトリ gicerin cDNA に対する cRNA を合成し、³²P-dCTP により標識した。42°C で一晩ハイブリダイゼーションを行い、洗浄後アルコールにて脱水し、オートラジオグラフィーを行った。Digoxigenin 標識化 cRNA probe により、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。4. ウェスタンプロット法とノーザンプロット法：組織および培養細胞からの蛋白質の抽出は従来の方法に従った。全 RNA は組織及び培養細胞により AGPC 法により抽出した。既報の方法によりウェスタンプロットとノーザンプロットを行った。5. C6 グリオーマ細胞の NOF への結合活性の解析：ラット C6 グリオーマ株細胞を低濃度トリプシン (0.001%) / EDTA (0.01 mM) 液にて処理し、単細胞浮遊液を得た。この浮遊液を、NOF あるいは BSA をスポット状に塗布した培養皿上で培養した。20 分後ただちに PBS (-) で洗浄し、パラホルムアルデヒド固定を行った。結合活性は顕微鏡下で各スポットへ接着した細胞数で評価した。

【成績】

1, C 6 グリオーマ細胞およびラット脳における gicerin の発現

C 6 グリオーマ細胞に、 gicerin および NOF が存在するかどうか検討するために、免疫組織化学を行った。C 6 細胞には、 gicerin 抗体による強い染色を認めたが、 NOF の染色はごく弱いものであった。in situ ハイブリダイゼーション法の結果よりラット脳内での gicerin mRNA の発現を調べたところ、 mRNA の発現パターンは、免疫組織化学の結果とほぼ一致していた。特に gicerin の強い発現は、嗅球の上皮、粘膜下層、嗅神経層に見出され、粘膜下層での分布はフィブロネクチンやラミンの局在と似ていた。Gicerin は、嗅神経軸索にも発現していた。次に、ノーザンプロット法により、ラット脳および C 6 細胞における gicerin mRNA の発現を調べた。ラット脳および C 6 細胞とも、 5.2kb のバンドを認めた。最後に、 C 6 細胞における gicerin 蛋白質の発現を検討した。培養 C 6 細胞膜分画を用いたウェスタンプロット法では、 82kDa の gicerin のバンドを認めたが、 45kDa のバンドも見られた。

2, C 6 グリオーマ細胞の NOF への結合活性および細胞凝集能の解析

C 6 グリオーマ細胞は gicerin を強く発現しているので、 C 6 グリオーマ細胞を用いて NOF との結合について検討を行った。低濃度トリプシン／EDTA 溶液で処理し、細胞表面の蛋白質分子を保存したまま単細胞化した C 6 グリオーマ細胞を、あらかじめ NOF および BSA を塗布した培養皿でインキュベートし、 NOF との結合を調べた。C 6 細胞は、 NOF との強い結合活性を認めたが、 BSA とは結合しなかった。さらに、この結合は、 C 6 グリオーマ細胞をあらかじめ gicerin 抗体と反応させておくことで抑制された。以上の結果より、 C 6 グリオーマ細胞は NOF と特異的に結合することが示された。さらに、 C 6 細胞を用いて、同種間細胞接着活性についても検討した。低濃度トリプシン／EDTA 処理した C 6 細胞を浮遊状態でインキュベートすることにより、その凝集能活性を調べた。この凝集能は、 gicerin 抗体添加により、部分的に抑えられることから、 C 6 細胞は gicerin により、同種分子間結合することが明らかとなった。

3, ラット舌下神経損傷後の神経再生過程における gicerin の発現

ラット舌下神経に損傷 (transection) を与えた後、 gicerin の発現を免疫組織化学法で、経時的に調べた。損傷を受けた部位の近傍のアストロサイトに gicerin の強い染色を認めた。ミクログリアに gicerin の染色は認めなかった。Gicerin の発現について損傷手術後、 3 日目、 7 日目、 14 日目の経時変化を検討した。3 日目では、損傷神経近傍のアストロサイトは、まだ活性化がされておらず、 gicerin の染色も認めなかった。しかし、 7 日目から 21 日目までは、活性化アストロサイトおよび損傷神経に gicerin の強い発現を認めた。ラット舌下神経に損傷後の gicerin mRNA の経時変化を、 [³⁵S] -UTP 標識化 gicerin cRNA プローブを用いて in situ ハイブリダイゼーション法により検討した。gicerin は損傷手術後、 7 日目と 14 日目に mRNA の強い発現が検出された。手術側舌下神経核においても、 mRNA の強い陽性反応が認められたが、健常側ではそのような反応は認められなかった。

【総括】

本論文では、ラット C 6 グリオーマ細胞およびラット脳において gicerin が発現していることを見出し、その性質について検討した。さらに、ラット舌下神経損傷後の神経再生時における gicerin の発現とその役割についても検討した。ラット C 6 グリオーマ細胞およびラット脳の gicerin mRNA の大きさは、ニワトリ網膜での結果とほぼ一致し、約 5.2kb であった。さらにラット C 6 グリオーマ細胞の gicerin はニワトリと同様に、異種分子間および同種分子間の細胞接着結合活性を持っていた。一方、ラット舌下神経損傷 (transection) により誘導される gicerin 発現の経時変化を、 in situ ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学法により検討した。損傷手術後、 7 日目から 14 日目にかけて gicerin mRNA の強い発現を認めた。術側舌下神経核においても mRNA の強い陽性反応が認められたが、健常側ではそのような反応は検出されなかった。また、神経損傷に伴って活性化されたアストロサイトにも gicerin の強い発現を認めた。以上の結果は、 gicerin がラット神経系の発生や神経再生過程において重要な役割を果たしていることを示唆する。

論文審査の結果の要旨

本研究では、ラットC6グリオーマ細胞およびラット脳において、gicerinが発現していることを見出したので、その性質について調べると共に、ラット舌下神経損傷後の神経再生時におけるgicerinの発現とその役割についても検討した。ラットC6グリオーマ細胞およびラット脳のgicerin mRNAおよび蛋白質の大きさは、ニワトリ網膜での結果とほぼ一致し、それぞれ約5.2kb, 82kDaであった。さらにラットC6グリオーマ細胞のgicerinはニワトリと同様に、異種分子間および同種分子間の細胞接着結合活性を持っていた。一方、ラット舌下神経損傷(transection)により誘導されるgicerin発現の経時変化を、in situハイブリダイゼーション法および免疫組織化学法により検討した。損傷手術後、7日目から14日目にかけて、術側舌下神経核においてgicerin mRNAの強い発現を認めたが、健常側ではそのような反応は検出されなかった。また、神経損傷に伴って活性化されたアストロサイトにも、gicerin蛋白質の強い発現を認めた。これらのことより、損傷を受けた神経細胞の再生過程において、gicerinが末梢神経軸索伸展および反応性グリア間ネットワーク形成に関与していることが示唆された。本研究は、gicerinがラット神経系の発生や神経再生過程において重要な役割を果たしていることを示したもので、学位に値すると考えられる。