

Title	膜型セマフォリン、M-SemaGの神経保護作用
Author(s)	竹田, 雄一
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43674">https://hdl.handle.net/11094/43674</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	たけだ ゆういち 竹 田 雄 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 16934 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	膜型セマフォリン、M-SemaG の神経保護作用
論文審査委員	(主査) 教授 松矢 篤三  (副査) 教授 森本 俊文    講師 竹村 元秀    講師 日高 修

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【緒言】

神経回路形成時に、神経細胞から伸長する軸索先端にある成長円錐は環境因子に応答するセンサーとして機能し、環境シグナルに応じて軸索の伸長方向を決定していると考えられている。即ち誘引性と反発性の環境因子によって神経回路形成がなされセマフォリンはこれら環境因子のうち反発性因子として1993年に同定された。その後いくつかのファミリー分子が見いだされたが、これらの分子の多くはその機能が未定である。私はこれらのセマフォリン分子のうち神経組織と免疫組織に主に発現するセマフォリン分子 M-SemaG に注目し神経系における役割を明らかにすることを試みた。本研究では天崎らが作製した M-SemaG 欠失マウスを用いて早期の神経回路形成に及ぼす影響や脳の外傷や一過性脳虚血傷害によるグリア細胞応答や脳細胞死に及ぼす影響を調べた。

#### 【方法】

実験動物は野生型として CS7BL/6 と、M-SemaG (MSG) ヘテロ接合子型と MSG ホモ接合子型 (MSG 欠失) マウスを用いた。胎生10~12日齢の胎仔の neurofilament 免疫染色や  $\beta$ -galactosidase 染色を行った。

脳外傷モデル動物は左側大脳皮質を長さ 2 mm 深さ 1 mm の剪刀で傷害し 6 時間 (n=3)、24 時間 (n=3)、3 日 (n=4)、5 日 (n=4) 後に灌流固定を行った。一過性脳虚血モデル動物は中大脳動脈を 20% 以下の血流量に低下 1 時間後、再環流した。脳の凍結切片あるいはビブラトーム切片を作製し、カウンター染色や様々なマーカー抗体を用いて神経細胞やグリア細胞を免疫染色した。また、一過性脳虚血傷害が引き起こすアポトーシスによる細胞死を検出するために組織上で DNA 断片化の検出 (TUNEL) を行った。

#### 【結果及び考察】

MSG 欠失マウスは肉眼的な外見や体重は野生型マウスと比較して顕著な差は見られなかった。胎生10~12日齢の MSG 欠失マウスの三叉神経、顔面神経、舌咽神経などの主に末梢神経の走行は前肢において神経の分岐が細く多いなどの傾向がみられたが、野生型の神経走行に比べ非常に大きな違いは見つからなかった。このことから初期の末梢神経回路形成に 1) MSG が関与していない可能性、2) 他の分子が MSG の機能を補完している可能性が考えられた。ヘテロ接合体あるいはホモ接合体における  $\beta$ -galactosidase 免疫活性は成熟動物の大脳皮質における散在性の

発現パターンや発現細胞の形態からオリゴデンドロサイトの可能性が示唆された。

一般に傷害によってアストログリアやマイクログリアなどの細胞が活性化されることがよく知られている。外傷モデル動物における剪刀傷害部近傍では術後24時間後からGFAP陽性のアストログリアが活性化された形態を示したのに対してMSG欠失マウスではその形態変化が少なく、マイクログリアも同様に、マーカーであるF4/80の染色性の上昇や細胞体の突起の明瞭化などの形態変化がMSG欠失マウスではやや低下していた。以上の結果からM-SemaGの欠失が傷害が引き起こすアストログリアやマイクログリアの活性化を抑制したことが示唆された。

次に、一過性脳虚血傷害に対するM-SemaGの影響を調べた。術後6時間後の傷害部ではGFAP免疫染色性の強くなった活性型アストログリア細胞が観察されたが、MSG欠失マウスではGFAP免疫活性は細胞の形態を示さず、点状の反応産物が細胞外に拡がっているようにみえた。また、脳虚血傷害部ではF4/80陽性マイクログリア細胞はやや活性化された細胞形態を示すものと細胞様の形態を示さない点状の免疫活性の2種類の反応産物がみられ、MSG欠失マウスでは後者の細胞様の形態を示さない点状の免疫活性が著しく増加し、前者の細胞形態を示す染色はほとんど検出できなかった。以上の結果から一過性脳虚血傷害6時間後の傷害部ではMSG欠失により1) グリア細胞の染色性が異常になっている可能性と2) グリア細胞が早期に細胞死をおこしている可能性が考えられた。

一過性脳虚血傷害1、3時間後のTUNEL陽性細胞は傷害部中心部にごく少数みられ、それ以外の領域ではほとんどみられないのに対し、MSG欠失マウスでは傷害1時間後の早期に傷害中心部ばかりにでなく傷害周辺部にも少数のTUNEL陽性細胞が観察され、時間経過とともに陽性細胞数が増加した。6時間、24時間後では虚血傷害が大脳皮質まで拡がるため、これらの領域にTUNEL陽性細胞は拡がるが、MSG欠失マウスでは野生型よりもより多数が観察された。以上の結果からM-SemaGは活性化グリア細胞が示す神経保護作用を亢進させ、一過性脳虚血傷害によるアポトーシスの誘導を抑制していることが示唆された。

増田らや藤岡らはMSGが神経栄養因子に対する親和性を高め、神経栄養因子作用を示したことから、本研究で示したようなM-SemaGの脳の保護作用は、グリア細胞などが分泌している様々な栄養因子／保護作用因子などの作用を高めることによる作用である可能性が示唆される。また、M-SemaGの新しい神経保護作用機構を解明することにより脳傷害に対する新たな治療法の開発に寄与すると思われる。

#### 【総括】

1. 膜型セマフォリン分子の1つであるM-SemaGを欠失しても早期の末梢神経回路形成には顕著な影響がみられなかった。
2. 2種類の脳傷害モデル実験から、M-SemaGが傷害早期にグリア細胞を活性化させて神経保護作用を示し、傷害による細胞死を遅らせ、減少させていると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

M-SemaGは、神経回路形成時に反発因子として見いだされたセマフォリンファミリーの一分子である。本研究結果は、このM-SemaGを欠失したマウスでは脳傷害が誘導するグリア細胞の活性化応答に低減が見られること、一過性脳虚血傷害により引き起こされるアポトーシスによる細胞死が亢進していることを明らかにしたものである。

このことから、M-SemaGは脳傷害時のアポトーシスによる細胞死を抑制し、神経保護作用を示すことが示唆された。

以上の研究結果は、脳傷害時の内在性保護作用の機序に重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。