Osaka University Knowledge Archive

Title	髄鞘形成に関与するSema4Dの研究
Author(s)	谷口, 佳孝
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45170
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【7】

氏　　名	谷口佳孝（たにぐち よしたか）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　18578　号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	**髄鞘形成に関与するSema4Dの研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　古郷　幹彦 （副査） 教　授　上﨑　善規　　助教授　竹村　元秀　　講　師　渥美友佳子

論文内容の要旨

【緒言】

神経回路形成には多くの誘引性、反発性の軸索ガイダンス因子が関与することが知られている。そのうち、セマフォリンは約500アミノ酸からなる共通のSema domainを有する大きなファミリーを形成し、これらは分泌型と膜結合型に分類されている。1996年にFuruyamaらにおいてクローニングされたSema4D（S4D）は膜結合型分子で神経系と免疫系双方に強発現することが確認されているが、神経系における役割は不明である。本研究ではS4Dの生体脳における機能解明を目的として1）大脳におけるS4Dの発現細胞の特定を行い、S4Dがオリゴデンドロサイトに局在することを明らかとした。次に2)S4Dの欠失がオリゴデンドロサイトの成熟や髄鞘形成の及ぼす影響を調べた。さらに一過性脳虚血モデル動物を作成し、脳虚血傷害後の神経再生過程におけるS4Dの発現変化およびS4D欠失がオリゴデンドロサイトの発現変化や再髄鞘化に及ぼす影響ついて調べた。

【方法】

動物　動物は野生型C57BL/6マウスとS4Dホモ接合子型S4D欠失マウスを用いた。脳成熟発達過程の観察には髄鞘形成期である14日齢及び髄鞘形成完了期である60日齢を用いた。脳損傷後の神経再生過程の検討には一過性脳虚血傷害モデルを用いた。すなわち、60日齢のマウスを1-3%ハロセン吸入麻酔下に右側中大脳動脈を経頭蓋的に2時間閉塞し、再灌流後1、7、14日目に実験に供した。免疫組織化学法　動物をネンブタール腹腔内麻酔下にパラホルムアルデヒド含有PLP固定液で灌流固定後、大脳を摘出しビブラトームで20μmの冠状脳切片を作成した。上記切片において髄鞘蛋白であるMBP（myelin basic protein）、オリゴデンドロサイトのマーカーであるMAG（myelin-associated glycoprotein）、CNPase、GSTπ、前オリゴデンドロサイトのマーカーであるO4、オリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーであるNG2、PDGFRαや神経細胞のマーカーであるNeuN（neuronal nuclei）、アストロサイトのマーカーであるGFAP（glial fibrillary acidic protein）、マイクログリアのマーカーであるF4/80およびS4Dに対する抗体をそれぞれ用いて免疫組織化学法ならびにS4Dとの二重蛍光抗体法を施行し、S4D発現細胞を同定した。ウエスタンブロット法　摘出脳を可溶化し、各レーン20μgの蛋白をアクリルアミドゲルで電気泳動した。転写後S4D、MAG、MBPに対するウエスタンブロット法を施行した。電子顕微鏡　60日齢の野生型とS4D欠失マウスを0.5%グルタール含有パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定後、通常の電子顕微鏡用標本作製をおこない、透過型電子顕微鏡で観察した。視神経などの軸索ならびに髄鞘の径を計測し、形態学的評価を行った。

【結果】

S4D 免疫陽性構造の分布と発現細胞の同定

成熟マウスにおける S4D 陽性細胞は大脳皮質、脳梁などに広く分布していた。二重蛍光免疫組織化学の結果、S4D 陽性細胞は MAG、O4 陽性細胞の多くと一致したが、NeuN 陽性細胞、GFAP 陽性細胞、F4/80 陽性細胞とは一致しなかった。また NG2、PDGFRα陽性細胞や GSTπ陽性細胞とも一致しなかった。

脳成熟過程における S4D、オリゴデンドロサイトマーカーの発現変化とオリゴデンドロサイトの成熟に及ぼす S4D の影響

野生型大脳皮質では、MAG 陽性細胞数は 14 日齢から 60 日齢にかけて増加したが、S4D 陽性細胞数は 14 日齢に比べて 60 日齢で有意に減少していた。60 日齢における MAG 陽性細胞は大型/強陽性のものと小型弱陽性の細胞にわけられ、S4D/MAG 陽性細胞は前者の大型/強陽性を示した。ウエスタンブロット法でも 60 日齢における S4D 蛋白量の減少していた。

S4D 欠失型大脳皮質は野生型と比較して 14 日齢、60 日齢とも MAG 陽性細胞数が多くさらに染色性も亢進していた。また S4D 欠失型では MBP 免疫活性も野生型と比較して亢進していたことから髄鞘成分が増加していることが示唆された。NG2、PDGFRα陽性細胞数は野生型と S4D 欠失型で顕著な差はみられなかった。

成熟 S4D 欠失マウスにおける軸索及び髄鞘の微細形態の変化

S4D 欠失マウスでは一部に髄鞘の過形成を認めた。また軸索径は野生型マウスと比較して小さく、G-ratio（髄鞘を含まない軸索径/髄鞘を含む軸索径）は小さかった。

脳虚血傷害後の神経再生過程における S4D の発現変化とオリゴデンドロサイト再生に及ぼす S4D の影響

野生型マウスでは一過性脳虚血後の梗塞周辺領域に S4D 免疫活性が一過性に亢進した。一部は同時に MAG 陽性であったが、MAG 陽性細胞数には有意な増加は認められなかった。しかし、S4D 欠失型では 14 日目において、MAG 陽性細胞が対照群に対して有意に増加していた。MBP 染色性も野生型マウスでは虚血前と同程度であったが、S4D 欠失マウスでは明らかに増強していた。

【考察】

1. S4D 陽性細胞は未成熟な髄鞘形成オリゴデンドロサイトや前オリゴデンドロサイトに特異的なマーカーと一致し、脳成熟に伴う発現変化も同様であったことから S4D は前オリゴデンドロサイトや未成熟な髄鞘形成オリゴデンドロサイトの細胞体及び突起に発現することが示唆された。

2. 脳成熟過程あるいは脳虚血傷害後の神経再生過程において欠失マウスでオリゴデンドロサイト前駆細胞数には変化を認めず、髄鞘形成オリゴデンドロサイト数や髄鞘成分が増加したのは、S4D がオリゴデンドロサイト前駆細胞から髄鞘形成オリゴデンドロサイトへの分化成熟を抑制するためであると考えられた。

3. 軸索及び髄鞘の微細形態の検討から野生型に比べて欠失マウスの髄鞘が厚く、過形成と考えられる形態異常を認めたことから S4D は髄鞘形成を抑制的に調節していて、正常な髄鞘形成に関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究では、生体脳における Sema4D の機能解析を目的に、大脳での Sema4D の発現細胞を同定した結果、未成熟な髄鞘形成オリゴデンドロサイトであることが明らかとなった。さらに Sema4D 欠失による脳成熟過程あるいは脳損傷後のオリゴデンドロサイトおよび髄鞘の変化を検討した結果、Sema4D はオリゴデンドロサイトの成熟と髄鞘形成を抑制的に制御することが示唆された。

この論文は、生体脳における Sema4D の髄鞘形成への関与を明らかにしたものであり、博士（歯学）の学位の請求に値するものと認める。