The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The role of CD36 in peripheral nerve remyelination after crush injury
Author(s)	衛藤, 昌樹
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45317
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【10】

氏　　名	衛藤昌樹（えとうまさき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　18048　号
学位授与年月日	平成15年6月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	The role of CD36 in peripheral nerve remyelination after crush injury **（末梢神経再髄鞘化におけるCD36の役割：挫滅病変作製後の組織学的検討）**
論文審査委員	（主査） 教　授　佐古田三郎 （副査） 教　授　津本　忠治　　教　授　戸田　達史

論文内容の要旨

〔目的〕

CD36はクラスBスカベンジャー受容体に分類される糖蛋白で、血小板、単球、マクロファージ、血管壁構成細胞、骨格筋、脂肪細胞などに発現している。酸化LDL、長鎖脂肪酸など多くのリガンドをもち、マクロファージの泡沫化にも深く関与していることが示され、また粥状動脈硬化巣形成の一因とも考えられている。末梢神経挫滅後にも泡沫化したマクロファージを多数認めることから、我々は変性ミエリンの処理に関してもCD36が関与しているという仮説を立てた。今回CD36欠損マウスの坐骨神経を用いて、挫滅後の形態変化を経時的に観察し、さらにミエリンの脂質構成成分であるフォスファチジルコリン（PC）の酸化物に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色、脂肪染色（oil red O）を行い、末梢神経挫滅後の神経再髄鞘化におけるCD36の役割を検討した。

〔方法〕

CD36欠損マウスおよびwild-typeマウス（いずれも8～12週齢の雌でC57B1/6 background）に対して、以下の方法で坐骨神経に挫滅病変を作製し、挫滅部について組織学的検討を行った。

・挫滅病変の作製：坐骨神経を幅2mmの動脈瘤手術用クリップを用いて、30秒間圧迫。圧迫部より数mm遠位にナイロン糸（Nescosuture11-0）で印を作り、病変部を同定できるようにした。

・morphometry：挫滅3週、および6週後に坐骨神経を摘出後、グルタールアルデヒドで浸潤固定し、さらに四酸化オスミウムで固定し脱水後にエポン包埋した。0.75μm厚の切片を作成し、チオニンブルーで染色後、ビデオモニター付き光学顕微鏡観察下で画像を取り込み（倍率：90ピクセル＝10μm、モニター解像度1024×768）、有髄線維径およびg-ratioを測定した（NIH image）。

・レクチン染色：挫滅1週、3週および6週後において、挫滅部横断面のエポン包埋切片（3μm厚）を作製し、マイクログリアやマクロファージのマーカーであるレケチン（RCA-1；Ricinus communis agglutinin 1）を用いて行った。

・免疫組織染色：挫滅1日後、3日後、1週後、3週後に各群の坐骨神経を摘出し、4％パラフォルムアルデヒドで

４時間固定した後、6μm厚の凍結切片を作製。酸化PCに対するモノクローナル抗体（FOH1a/DLH3）を用いて免疫染色を行った。

・脂肪染色：挫滅１日後、３日後、１週後、３週後に各群の坐骨神経を摘出し、４％パラフォルムアルデヒドで４時間固定した後、6μm厚の凍結切片を作製。中性脂肪を同定するためOil red O染色を行った。

〔結果〕

・Morphometry：CD36 欠損マウスでは、挫滅３週、および６週後において有髄線維の小径化、g-ratio の有意な増加を認めた。

・レクチン染色：正常対照マウスでは挫滅１週後に挫滅病変部へのマクロファージの浸潤がピークとなり、以後時間が経過するにつれてその数は減少していった。CD36 欠損マウスでは浸潤マクロファージのピークは挫滅３週後にずれ込み、またその時点で多数の崩壊ミエリンが残存していた。

・免疫染色：正常対照マウスでは挫滅１日後にすでに挫滅病変部に少数の FOH1a/DLH3 陽性所見を認めた。３日後には少数のマクロファージが挫滅部および挫滅遠位部で強く染色され、１週後には多数のマクロファージが浸潤し、細胞質には細かい顆粒状の強陽性所見と内部に弱陽性の構造物を含む空胞を認めた。３週後にはマクロファージの数は減少し、細胞質の空胞が相対的に増大し、強陽性の顆粒状構造物は減少していた。一方 CD36 欠損マウスでは、挫滅３週後までの全経過で陽性所見に乏しかった。マクロファージは１週後で対照と比較して明らかに少なく、逆に３週後では多数残存しているが、いずれも一部が極めて弱く染色されるのみであった。３週後では、一部のマクロファージの胞体内に強陽性の粗大な構造物を認めた。

・脂肪染色：正常対照マウスの挫滅１週後の切片では、浸潤したマクロファージの胞体内に脂肪滴を多数認めた。挫滅１日後、３日後、３週後では認めなかった。FOH1a/DLH3 で陰性であった胞体内の空胞は oil red O 染色でも陰性であった。CD36 欠損マウスでは、いずれの時期においてもマクロファージの胞体内に脂肪滴は見出されなかった。

〔総括〕

これらの結果から、CD36 欠損マウスでは坐骨神経挫滅後の神経再髄鞘化が著しく遅延することが明らかになった。これはCD36欠損により変性ミエリンのマクロファージへの取り込みおよび代謝が障害されたことに一因があると考えられ、CD36 が末梢神経障害後の再髄鞘化過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文はCD36ノックアウトマウスを用いて、坐骨禅経挫滅後の再髄鞘化過程を経時的形態的に評価を行っている。損傷した末梢神経が再生する過程において、変性したミエリンの処理およびその再利用に CD36 が関与していることに着目したことは非常に興味深い点である。今回の研究はクラス A スカベンジャー受容体ノックアウトマウスでの実験を引き継いだものであるが、より詳細に形態計測、免疫組織染色を行い、またレクチン染色を追加することによって、CD36 ノックアウトマウスがクラス A スカベンジャー受容体ノックアウトマウスとは全く異なる経過をたどることを発見したことは評価される点である。CD36 に関しては現在、糖脂質代謝の分野で精力的な研究が行われているが、今回の研究でその機能が末梢神経レベルにも及び、従来提唱されている以上に多機能な分子であることが示唆された。今後は脱髄性障害を中心とした末梢神経疾患に対して、CD36 の発現を高めることが治療に繋がるか否かを検討することが期待される。以上の研究成果を踏まえ本論文が学位論文に値するものと考える。