

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45317">https://hdl.handle.net/11094/45317</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>〉</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	え とう まさ き 衛 藤 昌 樹
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 2 mm 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。0.75  $\mu$ m 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 = 10  $\mu$ m、モニター解像度 1024  $\times$  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 (3  $\mu$ m 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クチン (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、6 $\mu$ m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%パラホルムアルデヒドで4時間固定した後、6 $\mu$ m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、坐骨神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られる。