



Title	Suture of transected nerve suppresses expression of BH3-only protein Noxa in nerve-transected motor neurons of C57BL/6J mouse
Author(s)	蒲生, 和重
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47364
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

氏 名 ^{がも}蒲 ^う生 ^{かず}和 ^{しげ}重

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20977 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科臓器制御医学専攻

学 位 論 文 名 Suture of transected nerve suppresses expression of BH3-only protein Noxa in nerve-transected moter neurons of C57BL/6J mouse
(マウス舌下神経切断による損傷運動ニューロン内の BH3-only protein Noxa の発現は神経縫合によって抑制される)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 吉川 秀樹

(副査)
教 授 吉峰 俊樹 教 授 遠山 正彌

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

臨床において切断された末梢神経は早急に一次縫合するのが治療原則であるが、神経縫合による神経再生の分子メカニズムは未だ不明な点が多い。我々はこれまでマウス舌下神経損傷モデルを用いた研究を行っており、現在までに大部分の損傷運動ニューロンが数週間かけてゆっくりと死に至ることやそれに伴う分子メカニズムの一部などが次第に明らかとなってきた。そこでこのモデルは神経縫合の研究に適していると考えられた。本研究ではマウス舌下神経切断のみの“切断群”と切断直後に神経縫合を行う“縫合群”の2群のモデル動物を作製し、損傷運動ニューロン生存率および軸索再生率を比較検討することにした。さらに、栄養因子受容体下流の代表的な生存シグナル分子である ERK1 および AKT1、細胞死加速化分子である Noxa の発現動態を2群間で比較し、神経縫合後の分子メカニズムの一部を明らかにすることを目的とした。

〔 方 法 〕

ペントバルビタール麻酔下に7週齢雄性 C57BL/6J マウスの右側舌下神経を切断し、舌下神経切断のみの“切断群”と切断直後に神経周膜を縫合する“縫合群”の2群に分けた。術後7、14、35、56 日目に各群5匹ずつ断頭し、脳と舌を取り出しクリオスタットにて凍結切片を作製した。損傷運動ニューロンの生存率を検討するため、延髄レベルの凍結切片を用いてサイオニン染色し健常側・損傷側舌下神経運動ニューロン数をカウントした。舌への神経終末の再投射は、神経再生の良いマーカーである抗 Vesicular Acetylcholine Transporter (VAcHT) 抗体を用いて免疫組織化学を行い VAcHT 陽性神経終末をカウントした。損傷運動ニューロン内での生死に関わる分子群 ERK1、AKT1、Noxa mRNA の発現動態は *in situ* hybridization にて検討した。さらに切断群、縫合群それぞれ20匹のマウスから回収した健常側・損傷側舌下神経核をサンプルとして RNA を抽出し、ERK1、AKT1、Noxa 特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。

〔 成 績 〕

切断群、縫合群の損傷舌下神経運動ニューロン生存率を検討した結果、術後 7 日目では両群ともほぼ 100%の神経細胞が生存していた。切断群では術後 14 日目より徐々に細胞死が引き起こされるのに対し、縫合群では有意に高い細胞生存率を保っていることが明らかになった。術後 56 日目ではその差が一層顕著になり、切断群は 39.2%の細胞生存率であるのに対し縫合群は 82%と高い細胞生存率を示した。一方、神経再生の良いマーカーである VACHT 抗体を用いて舌の免疫染色を行ったところ、術後 7 日目には両群とも完全に VACHT 陽性神経終末が消失していた。縫合群では術後 14 日目以降徐々に VACHT 陽性神経終末の数が増加し、術後 56 日目には健常側の 86%程度にまで回復していた。ところが切断群では術後 56 日経っても VACHT 陽性神経終末は健常側の 21%程度しか認められなかった。従って舌下神経切断後神経縫合を行うことにより、損傷運動ニューロン生存率は有意に上昇し同時に軸索再生も促進することが明らかになった。次に細胞死が引き起こされていない術後 7 日目の損傷運動ニューロン内で、代表的な生死のシグナル分子である ERK1、AKT1、Noxa の mRNA 発現動態を *in situ* hybridization にて検討した。その結果、切断群に比べ縫合群では損傷後の Noxa mRNA 発現が有意に抑制されることが明らかになった。ERK1、AKT1 mRNA は切断群、縫合群ともに損傷運動ニューロンで同根度に発現上昇していた。さらに、健常側・損傷側舌下神経核をサンプルとしてリアルタイム PCR を行い mRNA 発現量を定量したところ、*in situ* hybridization の結果と同様に縫合群で損傷後の Noxa mRNA 発現が有意に抑制されることが確認された。

〔 総 括 〕

舌下神経切断後神経縫合を行うことにより、損傷運動ニューロンの生存および軸索再生が著明に促進されることが明らかになった。この時損傷運動ニューロン内での生存シグナル分子群の発現上昇は神経縫合の有無に関わらずほぼ同程度に認められるのに対し、細胞死加速化分子である Noxa の発現は神経縫合により有意に抑制されることが明らかになった。神経縫合を行うことにより、損傷遠位部のシュワン細胞や標的器官などから放出される何らかの因子が損傷運動ニューロンに作用し Noxa の発現抑制を引き起こすと考えられた。従って神経縫合を行った損傷運動ニューロン内では生死のバランスが変化し、生存シグナルがより優位に働くことで神経細胞死が抑制され神経再生が促されると推察された。

論文審査の結果の要旨

マウス舌下神経損傷モデルを用い、舌下神経損傷後神経縫合の有無による神経細胞生存率およびこれに関わる生死のシグナル分子の発現動態に関して比較検討した。神経縫合により神経細胞死が抑制され軸索再生が促進された。神経縫合により細胞死を加速させる分子である BH-3 only protein Noxa の mRNA 発現が抑制されることがわかった。一方生存を促す分子である AKT1、ERK1 などの mRNA 発現は神経縫合の有無にかかわらず同程度に発現していることがわかった。舌下神経損傷後、損傷運動ニューロン内で生死のシグナルバランスが崩れて神経細胞死が惹起されるが、神経縫合により死シグナルが減弱され生存シグナルが優位に働き再生が促されることが考えられた。この研究は神経縫合による神経再生の分子メカニズムの一部を解析した。この結果は神経再生研究に有益な進展をもたらすものと考えられる。よって上記の論文提出者が博士（医学）の学位授与に値する。