

Title	脳虚血組織における、Sema4Dの神経修復に及ぼす影響
Author(s)	石口, 満津子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/55533">https://hdl.handle.net/11094/55533</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 【目的】

脳虚血疾患による神経細胞の損傷は、重大な身体機能の低下や、日常生活に支障をきたす疾患である。しかし、脳虚血周辺組織における修復/再生機構については未だ未解明な点が多い。Sema4D は軸索ガイダンス因子であるセマフォリンファミリーの1つであるが、免疫反応、細胞遊走、血管新生など様々な細胞機能に関与することが報告されている。特に発達期の脳において、オリゴデンドロサイト (OL) のアポトーシスが増加し、OL 細胞数を制御することが報告されている。しかしながら、脳虚血傷害時に神経修復に Sema4D がどのような機能を果たしているのか不明である。虚血傷害後の神経修復に及ぼす Sema4D の影響を明らかにするため、Sema4D 欠失動物の大脳皮質脳虚血モデルを作製し、大脳皮質の虚血周辺領域におけるニューロンや OL の細胞増殖や細胞死について検討した。

## 【研究内容】

6 週齢の野生型と Sema4D 欠失型マウスの中大脳動脈枝を焼灼し大脳皮質虚血モデルを作成した。大脳皮質の虚血周辺領域における細胞増殖を直前に投与した BrdU 取込み細胞数で、アポトーシスを Tunel 染色陽性細胞数で評価した。これらの細胞の同定のため各種細胞のマーカーとして次の抗体、NG2 (oligodendrocyte progenitor cells[OPCs])、glutathione-S-transferase  $\pi$  (GST  $\pi$ ) (OL)、Nestin(ニューロン前駆細胞)、NeuN(ニューロン)を用いた。

術後 3 日目、7 日目(POD3、7)の虚血周辺領域の BrdU 取込み細胞数と NG2 単独陽性細胞数が Sema4D 欠失型マウスでは野生型より多い傾向を示した。しかしながら、NG2 陽性/BrdU 取込み細胞数は、野生型と Sema4D 欠失型の間に差がみられなかった。Nestin 陽性細胞および、Nestin 陽性/BrdU 取込み細胞数は、POD3、7共に KO で有意に増加していた。以上の結果から Sema4D 欠失は脳虚血組織周辺領域のニューロン前駆細胞の増殖に関与することが示唆された。

Tunel 陽性細胞は POD3、POD7 および POD35の Sema4D 欠失型マウスで、野生型に比べ数が減少していた。Tunel 陽性でかつ NG2 陽性、GST  $\pi$  陽性、あるいは NeuN 陽性細胞数も Sema4D 欠失型マウスでも野生型に比べ減少した。以上の結果から虚血傷害後の Sema4D 欠失型マウス大脳皮質では OPCs、OL やニューロンのアポトーシスが抑制されていることが明らかになった。

更に Sema4D 欠損によって増加した新生ニューロン前駆細胞や、アポトーシスを抑制された OPCs、OL、ニューロンが、マウスの行動量に影響を与えるかについて、POD28の野生型およびSema欠失型マウスを用いてオープンフィールドテストを行った。その結果、野生型では、非手術群より手術群の行動量の上昇がみられたが、Sema4D

## 【6】

氏 名	石 口 満 津 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯学)
学 位 記 番 号	第 2 5 7 6 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 25 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	脳虚血組織における、Sema4D の神経修復に及ぼす影響
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 古 郷 幹 彦 (副査) 教 授 豊 澤 悟 准教授 竹村 元秀 准教授 河合 伸治

欠失型では手術群と非手術群の間に有意差は認められなかった。野生型と Sema4D 欠失型の比較でも有意差を認めなかった事より、今回の観察では新生ニューロン前駆細胞や、アポトーシス抑制された OPCs、OL、ニューロンの行動量への影響をみることはできなかった。

#### 【まとめ】

脳虚血傷害後の Sema4D 欠失マウスでは OPCs やニューロン前駆細胞の増殖傾向がみられ、神経系細胞の OPCs、OL、ニューロンのアポトーシスが抑制されたことから、神経修復に関与していることが強く示唆された。この結果は脳の発達過程で報告された Sema4D のアポトーシス亢進作用の結果 (Yamaguchi et al, Mol Neurosci, 2012) に一致するが、脳虚血傷害後の大脳皮質では OPCs の増殖がみられたことは、脳の発達過程で報告された結果と異なることから、成体における傷害時に Sema4D は別の作用を有することが示唆された。

今後は、脳虚血組織で新生・分化した OL やニューロンと正常 OL やニューロン間の機能の差の有無についての検討や、脳虚血周辺領域で観察された OPCs について脳室下帯や海馬歯状回顆粒細胞下層から新皮質の脳虚血周辺領域への細胞移動の観点からも更なる研究を行う必要があると考える。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は Sema4D の中枢神経系 (Central nervous system, CNS) に及ぼす影響を解明することを目的として、Sema4D 欠失動物の大脳皮質脳虚血モデルを作製し、虚血ストレスによって発生する、オリゴデンドロサイト (OL) の増殖および、OL とニューロンのへの Sema4D の欠失による影響を調べ、検討を行った。

その結果、虚血傷害後の Sema4D 欠失型 (Knock out, KO) マウス大脳皮質では OPCs (oligodendrocyte progenitor cell) , OL やニューロンのアポトーシスが抑制されていることが明らかになった。さらに脳虚血傷害後の KO ではニューロンの細胞数の減少がみられた。これにより、Sema4D の欠失が神経損傷の低減に関与していることが示唆された。また虚血性障害後の大脳皮質で OPCs の増殖がみられたことは、脳の発達過程で報告された結果と異なることから、成体における傷害時に Sema4D は別の作用を有することが示唆された。

以上の結果は、脳虚血組織の神経回路の再生機構を解明する上で重要な知見を与えるものである。

よって、博士 (歯学※) の学位論文として価値のあるものと認める。