

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	https://hdl.handle.net/11094/55533
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

博士論文

脳虚血組織における、Sema 4 D の神経修復に及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科

歯学研究科博士課程統合機能口腔科学専攻

(顎口腔病因病態制御学)

指導：古郷幹彦教授

氏名：石口 満津子

博士論文

脳虚血組織における、Sema 4 D の神経修復に及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科

歯学研究科博士課程統合機能口腔科学専攻

(顎口腔病因病態制御学)

指導：古郷幹彦教授

氏名：石口 満津子

目次

1、	諸論	3
2、	材料・方法	5
3、	結果	8
	3-1	
	3-2	
	3-3	
	3-4	
	3-5	
4、	考察	32
5、	謝辞	34
6、	引用文献	35

1、 諸論

大脳を中心とする、中枢神経系 (Central nervous system: CNS) は生命にとって欠かすことのできないものである。グリア細胞を含む多数の神経系細胞間のネットワークにより運動機能や認知機能は成り立っているが、突然生じる脳虚血などにより神経系細胞は壊滅的な傷害を受ける。脳虚血は臨床における脳血管障害の中核をなす病態で、発症すると重篤な後遺症を残し、日常生活活動や生活の質の低下など多くの問題を引き起こすため、その解明は、非常に重要である。

神経系を構成する主な細胞にニューロンとグリアが存在する。ニューロンは周囲の環境の変化に応じて、他のニューロンへの情報伝達や、体の反応を起こさせる指示をだし、グリアは近傍のニューロンの構造を支持し、シグナル伝達を補助することで、脳機能を維持している。オリゴデンドロサイト (OL) はニューロンを支持し、髄鞘を形成することで、迅速な神経情報の伝達を可能にする (1)。OL の発生は、周産期に神経上皮由来の脳室帯でオリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte progenitor cells: OPCs) が発生し新皮質に遊走する (2)。その分化・成熟を最も盛んに認めるのは、マウスでは生後 5 日目~20 日目であるといわれている (1)。OL はミエリン鞘を形成するまでの間、段階的に形態を変化させる事が知られている。まずは遊走・分化能をもつ OPCs は platelet-derived growth factor receptor、NG2 chondroitin sulfate proteoglycan などを発現する。OPCs が分化すると未成熟オリゴデンドロサイト (immature OL) となり、遊走・分化能を失い、2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase、galactocerebroside などを発現し始める。更に分化が進み、成熟 OL となると、髄鞘を形成し始め、myelin basic protein、proteolipid protein、myelin-associated glycoprotein 等を発現する (3~7)。この OL を分化誘導する因子の一つに、セマフォリンが存在する。

セマフォリンは共通の sema domain を持った、8つのクラスに分類される、反発性軸索ガイダンス因子として知られる膜貫通型タンパクである (8~10)。中枢神経系と免疫系に多く発現しており、中枢神経系では OL に特異的に発現している。中でも、セマフォリンファミリーのクラス4である Sema4D は、in vitro において、ニューロンの成長円錐や OL の突起を退縮させる働きがある (11~14)。また、成獣マウス (生後 28 日以降) の新皮質でも、OL の増加に関与しているとの報告もある (15)。Sema4D の欠失は OL の発生段階 (生後14日~28日目) で、その OPCs のアポトーシスの抑制という機能で増殖と分化に影響を与えることが報告されており (16)、更にそのアポトーシス抑制の影響は、発達段階だけではなく、成獣マウスの中枢神経損傷モデルにおけるオリゴデンドロサイトの増殖や神経機能の再生でも注目されている (8、9)。また、成長後 Sema4D の発現は OL に限局し通常では認めないが、中枢神経損傷後に損傷周辺領域の OL の Sema4D 発現量が増加し、脳虚血後 7~14 日目に Sema4D の発現が増加する (15)。

CNS 以外では、免疫系の作用として T 細胞に特異的に発現し、metalloproteinase のタンパク分解作用によって活性化した T 細胞から Sema/CD100 として分泌され、B 細胞および樹状

細胞の活性化促進がある (17)。他にも、Sema4D を発現する破骨細胞と、Sema4D レセプターである PlexinB1 を持つ骨芽細胞との間のシグナリングによる骨形成抑制作用 (18) や血管形成抑制作用 (19) などでも報告がある。Sema4D が神経修復に及ぼす影響については不明な点も多いため、Sema4D 欠失動物の脳皮質脳虚血モデルを作製し、脳皮質の虚血周辺領域における神経や OL の細胞増殖や細胞死について検討を行った。

2、材料・方法

動物

実験には、6～7週齢の野生型 (Wild type: WT) マウスと Sema4D^{-/-} (Knock out: KO) マウスを用いた (15)。全ての実験手技は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験規定および、大阪大学大学院医学系研究科動物実験規程を遵守し、手技に習熟し可能な限り動物の個体数や苦痛は最小限にとどめて行った。今回の実験では、生後6～12週までのマウスを免疫染色および行動実験に使用し、マウスは骨格的および神経的成長の完了した生後 6 週齢以降を成獣として扱った。

Genotyping

マウスの遺伝子型を区別するため、Genotyping を行った。生後 4 週以降のマウスの尾より抽出したゲノム DNA を鋳型に Taq DNA Polymerase (BioLabs)、10mM dNTP (Promega)、Thermo Pol Reaction buffer (BioLabs) を DW で希釈し、Sema4D と LacZ の forward primer と reverse primer を入れ 94°C15sec、60°C30sec、72°C45sec×35 cycle、72°C2min、4°C2min の条件下で Genomic PCR 反応を行った。Sema4D の forward primer には 5'-GTCAGACGGGAACACCGGCAGCCTT-3' を、reverse primer には 5'-CTCCATGTTCCCAGGTGA-3' を使用した。LacZ の forward primer には 5'-GACACCAGACCAACTGGTAATGG-3'、reverse primer には 5'-GCATCGAGCTGGGTAATAAGAG-3' を使用した。

脳虚血モデル

6～7 週齢の WT マウスと KO マウスに対し、中大脳動脈 (Middle cerebral artery: MCA) 閉塞による大脳皮質虚血モデルを作成した (20、21)。マウスは 3 種混合麻酔薬 (メドミジン 0.3 mg/kg + ミダゾラム 4 mg/kg + ブトルファノール 5 mg/kg) の腹腔内注射により十分に麻酔し、左側眼窩と外耳道の間部を剪刀にて皮膚切開して頭蓋骨を露出、歯科用ラウンドバー (φ0.5 mm) にて頭蓋骨を穿孔し開頭した。その後、左側 MCA 遠位部を電気メスにて焼灼し、血流を遮断した (Fig. 1A、B)。脳虚血術後は 24 ± 1°C に設定されたケージに戻し、餌や水分は自由に摂取可能な元の環境にて飼育した。脳摘出後は 4 mm の厚さに脳をスライスし、1 %TTC (2, 3, 5-Tryphenyltetrazolium chloride) に 15 分間反応させ梗塞部位を確認した (Fig. 1C)。その後、摘出脳は、4 °C 条件下において 4 % paraformaldehyde 含有 PBS (phosphate buffered saline) 固定液で 2 晩の浸透固定を行い、30 %スクロースにて 2 日間インキュベートした。そして、ドライアイスにて脳を凍結させ、クリオスタットを使用し 25 μm 厚の連続冠状断脳切片を作成し、0.1 % azoide 含有 PBS にて 4 °C 下で保存した。同一レベルの切片で観察を行うため、免疫組織化学染色に先立って、1 個体につき 3 か所のチオニン染色

を行い、梗塞部位の確認を行った。

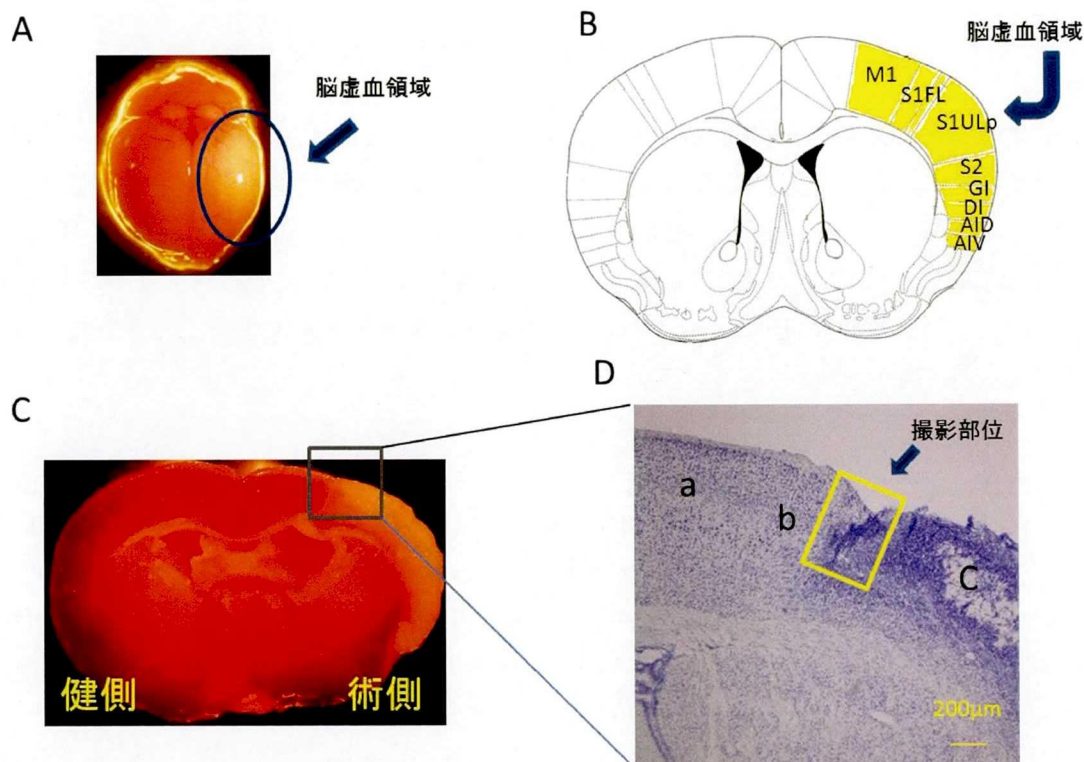


Fig. 1 POD7 の組織像 (A) POD7 の摘出したマウス脳。矢印にて示された部位が梗塞巣を示す。(B)冠状断模式図。MCA 虚血部位を黄色で示す。(C) 冠状断切片の TTC 染色像。白色の非染色域が脳虚血組織である。(D) チオニン染色像、(a) 正常領域、(b) 脳虚血周辺領域、(c) 脳虚血中心領域を示す。四角で示す部分が撮影部位である。Scale bar: 200 μ m。

免疫組織化学染色

冠状断脳切片に対し蛍光抗体染色を行った。染色には WT および KO の術後 1 日目 (Post Operation 1day: POD1)、3 日目 (POD3)、7 日目 (POD7)、35 日目 (POD35) の脳切片を用いた。切片を 20 分間 0.3 % H₂O₂ 含有 PBS で内在性ペルオキシダーゼを不活性化させた後、PBS にて 2 回洗浄し、ブロッキングバッファー (5 % Goat serum、0.05 % azide、0.3 % Tritonin-X 100 含有 PBS) において 60 分間のブロッキングを行った。そして、一次抗体を抗体希釈液 (1 % goat serum、0.1 % azide、0.1 % Triton X-100 含有 PBS) で希釈後、4 °C 下で 24 時間反応させた。一次抗体には、mouse monoclonal antibody to neuronal nuclear antigen (NeuN: ニューロンマーカー: Millipore 1/1000)、mouse monoclonal antibody to Nestin (幼弱ニューロンマーカー: Chemicon 1/1000)、rabbit polyclonal antibody to NG2 (OPCs マーカー: Chemicon 1/500)、rabbit polyclonal antibody to Glutathione-S-transferase π (GST π : OL マーカー: Medical Biol Lab 1/1000)、rat monoclonal antibody to

5-Bromo-2'-deoxyuridine-5' (BrdU: 新生細胞マーカー: Abcam 1/1000) を使用した。一次抗体反応後、PBS にて2回洗浄後、二次抗体を抗体希釈液で希釈し常温3時間でインキュベートを行った。二次抗体には、Cy2: goat anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences 1/1000)、Cy3: goat anti-rabbit IgG、Cy3: goat anti-mouse IgG (Amersham Biosciences 1/1000)、Alexa Fluor 555: goat anti-rat IgG (KPL 1/1000)を使用した。核の染色には Hoechst (Santa Cruz Biotechnology 1/10000) を使用した。BrdU については、PO1、3、7のマウスに、脳摘出3時間前に BrdU (50mg/kg: Sigma-Aldrich) を1回腹腔内注射した。冠状断脳切片作成後は、BrdU 染色にあたり、まず 37 °C 下にて 1 N HCl での 60 分間のインキュベートを行い、神経系細胞と BrdU との二重蛍光抗体染色により新生細胞を特定した。観察には共焦点顕微鏡 FV1000-D (OLYMPUS) を使用した。

アポトーシス細胞の検出

脳虚血組織のアポトーシス細胞を検出するため、DNA 鎖分解物の標識法である Transferase - Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling assay (Tunel assay: Promega) を WT および KO の PO1、PO3、PO7、PO35の各時期の冠状断脳切片に行った。Tunel との二重蛍光染色は、免疫組織化学染色と同様の手順で NG2、GST π 、NeuN の可視化を行い、4 % PFA で 15 分固定した後 Tunel assay を行った。

分析方法

細胞染色は一次体性感覚野相当部の虚血部位を1個体につき 250 μ m 間隔で3切片使用した。撮影部位は脳虚血周辺領域背側の大脳皮質 (Fig. 1D) を1視野当たり約 320 μ m \times 160 μ m の範囲内で3か所撮影し、各種陽性細胞を計測した。陽性細胞数は μ m²あたりの個数で換算し、得られたデータの平均値と標準偏差を算出した。また、新生細胞の特定には BrdU 陽性細胞との、アポトーシス細胞の特定には Tunel assay 陽性細胞との二重陽性細胞数を数えた。

統計学的手法では、WT と KO の脳虚血後の各時期における検出細胞数や割合に t 検定 (片側条件) を用いて比較した。各実験、各日齢において4個体以上のマウスを使用し実験を行った。なお、いずれの検定においても $p < 0.05$ になった場合に統計学的に有意差があると判断した。

行動実験

WT と KO マウスに6週齢時、中大脳動脈手術 ((Middle cerebral artery operation: MCAO) 実施後、24 \pm 1 °C で餌と水を自由に摂取可能な状態のもと、術後27日間飼育した後、オープンフィールドテストを行った。実験期間は術後28日目 (POD28) の1日10分間、マウスのフィールド内の移動回数を計測した。実験は、手術群 (POD28) と無手術群 (non operative: Non-Ope) を WT および KO でそれぞれ行った。

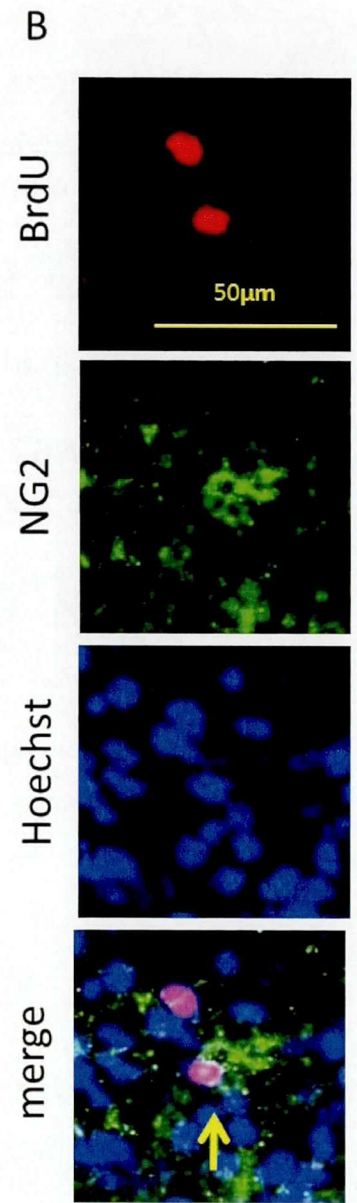
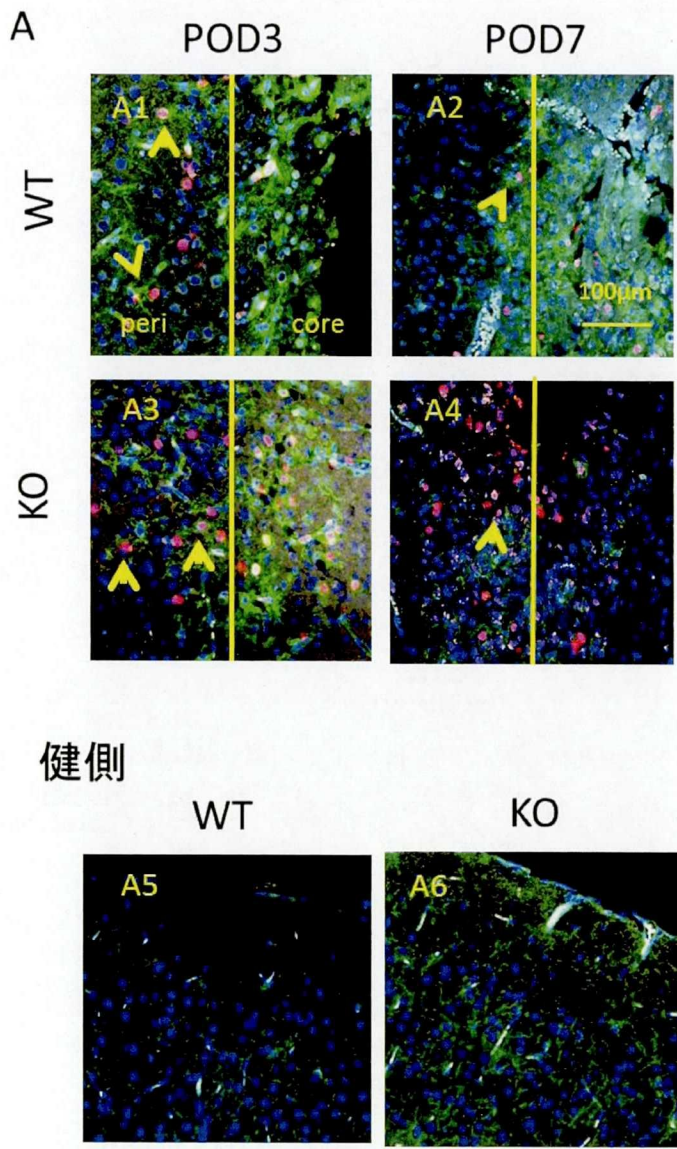
3、結果

3-1 脳虚血組織における新生細胞と OPCs 及びニューロンの経時的変化

WTとKOマウスの大脳皮質脳虚血モデルの術後3日目(POD3)および7日目(POD7)の新生細胞およびオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPCs)の経時的変化を確認するため、それぞれの細胞に特異的に発現するマーカーを用いて、細胞の検出を行った。OPCsマーカーにはNG2抗体を用いた。また、MCAO後、脳組織回収3時間前に投与したBrdUを取込んだ細胞を新生細胞とした(Fig. 2A, B)。WTとKOマウスにおける、脳虚血周辺領域のBrdU陽性細胞は健側と比較してPOD3から有意に増加しPOD7まで増加したが術後35日目(POD35)では健側と同じレベルまで低下した。POD3およびPOD7においては、WTに比べてKOではBrdU陽性細胞数の増加がさらに顕著にみられた(Fig. 2C, D, G)が、POD35ではKOと有意差が認められなかった(Fig. 2J)。

POD3およびPOD7の脳虚血周辺領域でNG2陽性細胞は、WTでは健側と比較してPOD7で細胞数が減少した(Fig. 2E)。KOでは健側と比較してPOD3およびPOD7でNG2陽性細胞数に変化を認めなかった(Fig. 2F)。POD3、7共にKOでWTよりNG2陽性細胞数が多いという結果が得られた(Fig. 2H)。BrdUとNG2の二重陽性細胞は、POD3、POD7の健側ではほとんどみられず、術側では少数の二重陽性細胞が認められたが、WTとKOの間では有意差は認められなかった(Fig. 2I)。

POD3、7で増加したBrdU陽性細胞を検出するため、ニューロン前駆細胞マーカーであるNestin抗体を用いて、蛍光免疫染色を行った(Fig. 3A, B)。脳虚血周辺領域のBrdU陽性細胞は、WTとKO共にPOD3で最も有意に増加を認めた。その増加量はKOでより有意にみられた(Fig. 3C, D, G)。POD3、7の脳虚血周辺領域のNestin陽性細胞はWTでは健側と比較して、POD3、7共に有意な増加を認めた(Fig. 3E)。KOでも同様にPOD3、7でNestin陽性細胞数の増加を認めた(Fig. 3F)。WTとKOで比較したところ、その増加のピークはWT、KO共にPOD3であり、POD3、7共にWTよりKOで有意な細胞の増加を認めた(Fig. 3H)。BrdUとNestinの二重陽性細胞数をWTとKOで比較すると、POD3、7共にKOで有意な細胞数の増加を認めた(Fig. 3I)。以上の結果より、Sema4D欠失は脳虚血組織周辺領域のNestin陽性細胞の増殖に影響を及ぼし、NG2陽性細胞の増殖に影響を及ぼさないが、数の維持に関与することが示唆された。



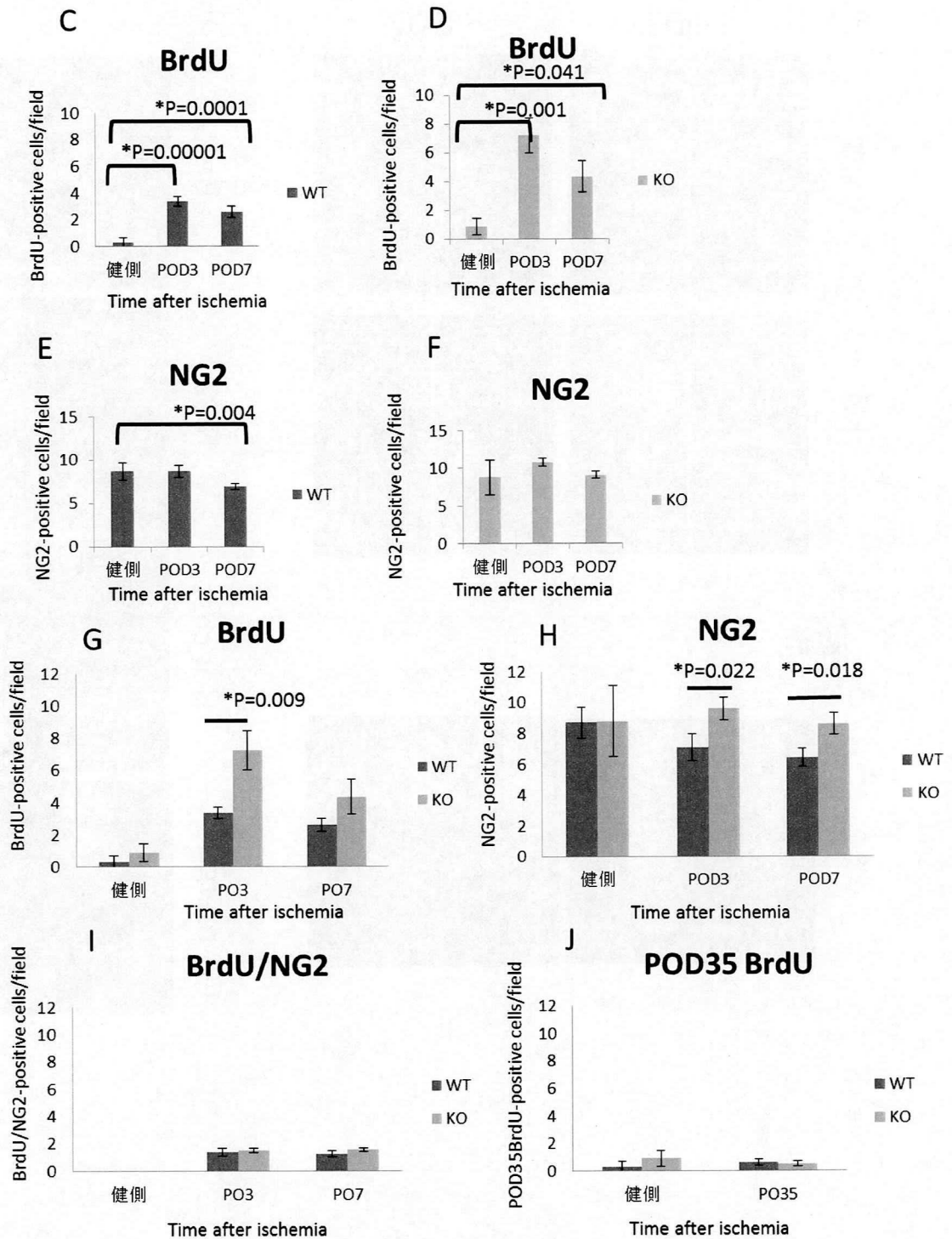
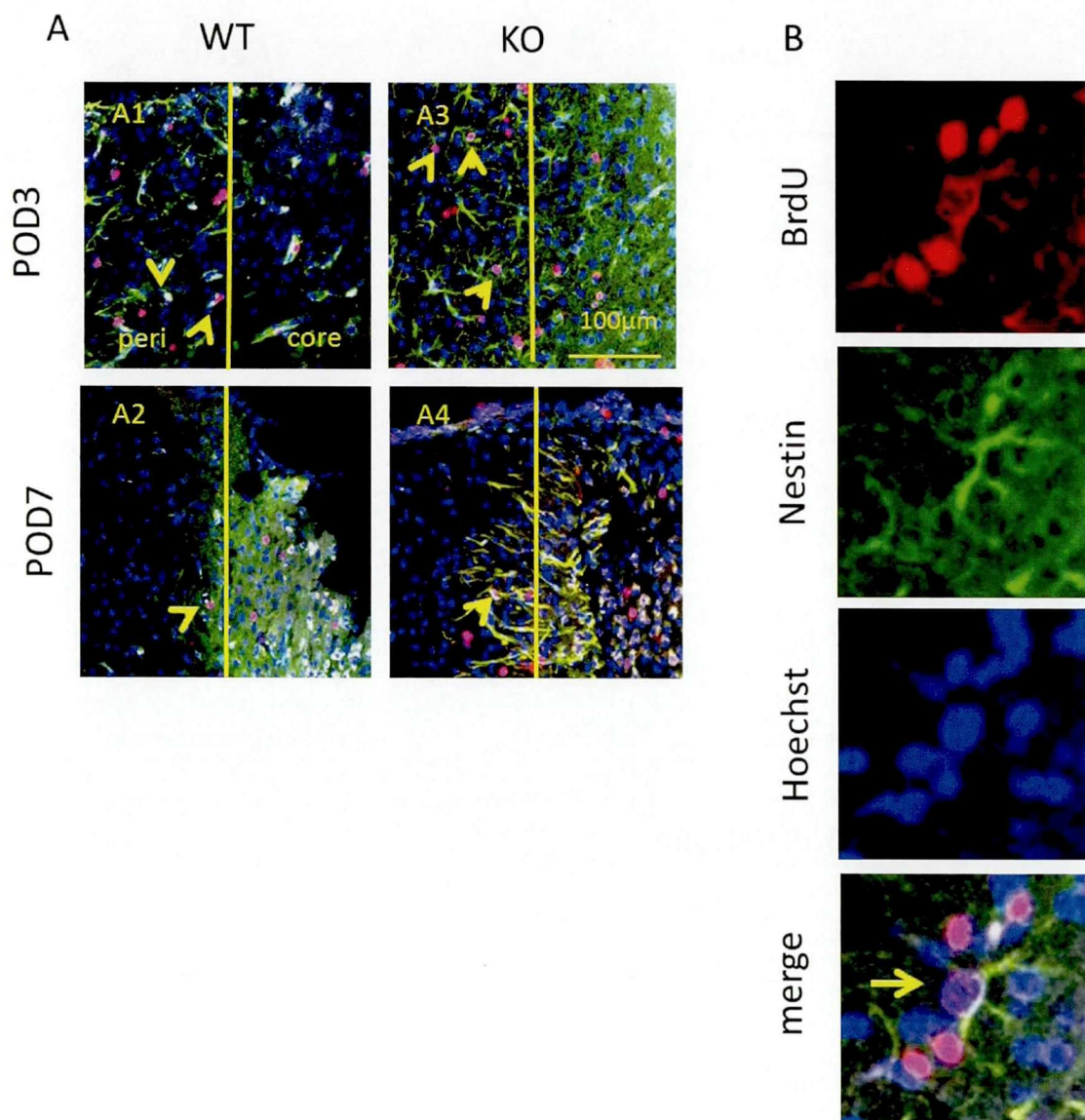


Fig. 2 脳虚血組織の新生細胞とOPCsの継時的変化 (A) MCAO 後 POD3 の WT (A1) と KO (A3)、PO7 の WT (A2) と KO (A4) マウス、および POD3 の WT (A5) と KO (A6) マウスの健側大脳皮質脳虚血周辺領域における NG2 (green) と BrdU (red) と Hoechst (blue) との merge 像。黄矢印先が BrdU/NG2 二重陽性細胞。写真左側: 脳虚血周辺領域 (peri)。

右側: 脳虚血領域 (core)。Scale bar: 100 μ m。(B) KO per の細胞拡大像。上から BrdU、NG2、Hoechst、merge 像を示す。Scale bar: 50 μ m。(C~I) WT および KO マウスのマーカー陽性細胞数を健側、POD3、POD7 で比較したグラフ。(C) WT BrdU 陽性細胞数。(D) KO BrdU 陽性細胞数。(E) WT NG2 陽性細胞数。(F) KO NG2 陽性細胞数。(G) WT 及び KO の BrdU 陽性細胞数。(H) WT 及び KO の NG2 陽性細胞数。(I) WT 及び KO の BrdU/NG2 二重陽性細胞数。(J) 健側と POD35 の BrdU 陽性細胞数の比較グラフ。*P < 0.05、N = 7。



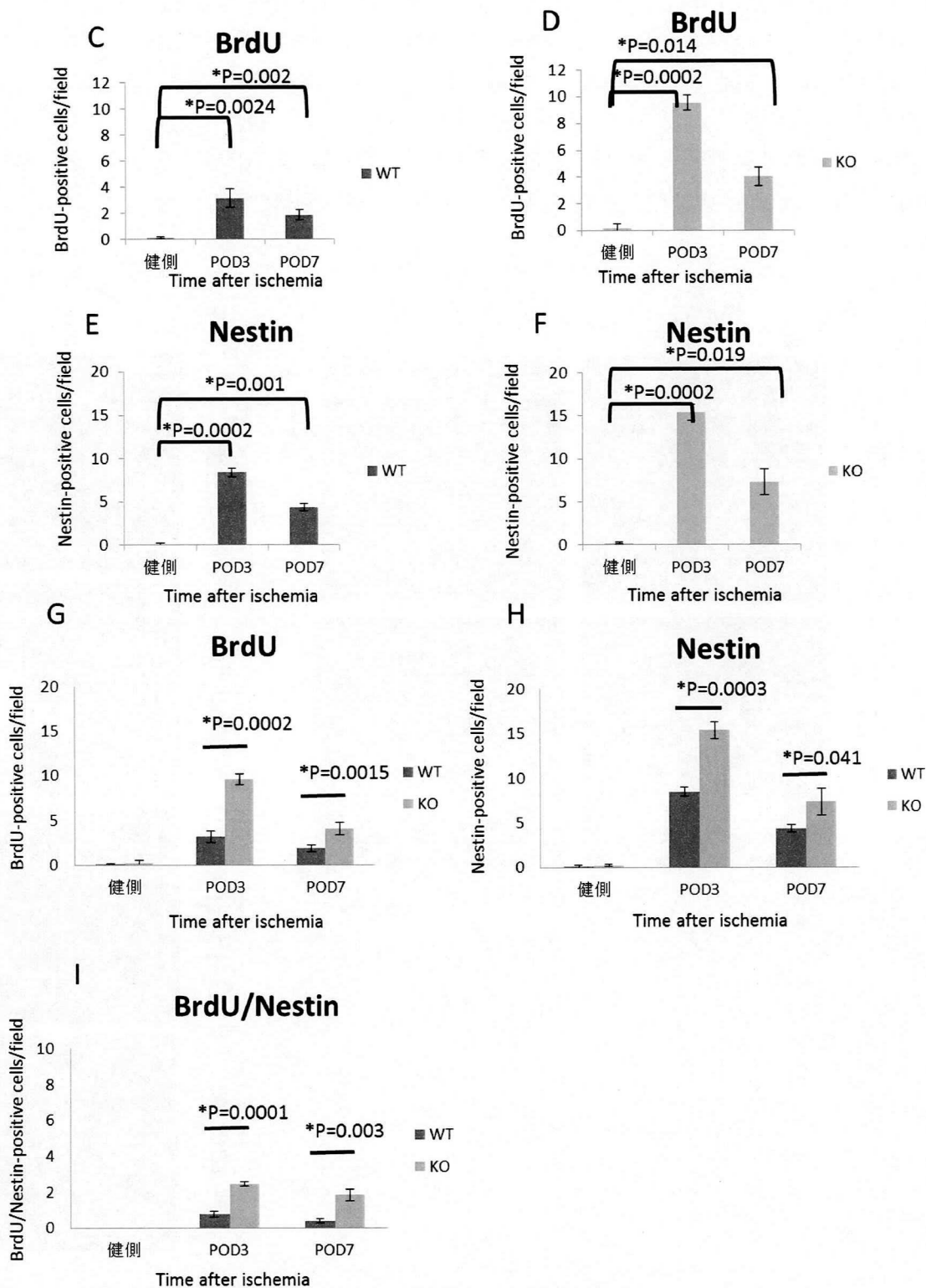


Fig. 3 脳虚血組織の新生細胞とニューロン前駆細胞の継時的変化 (A) MCAO後POD3のWT (A1) とKO (A3)、PO7のWT (A2) とKO (A4) マウスの大脳皮質脳虚血周辺領域におけるNestin (green) とBrdU (red) とHoechst (blue) とのmerge像。黄矢印先が

BrdU/Nestin 二重陽性細胞。写真左側: 脳虚血周辺領域 (peri)。右側: 脳虚血領域 (core)。
Scale bar: 100 μ m (B) KO peri の細胞拡大像。上から BrdU、Nestin、Hoechst、merge 像を示す。Scale bar : 50 μ m。(C~I) WT および KO マウスのマーカー陽性細胞数を健側、POD3、POD7 で比較したグラフ。(C) WT BrdU 陽性細胞数。(D) KO BrdU 陽性細胞。(E) WT Nestin 陽性細胞数。(F) KO Nestin 陽性細胞数。(G) WT 及び KO の BrdU 陽性細胞数。(H) WT 及び KO の Nestin 陽性細胞数。(I) WT 及び KO の BrdU/Nestin 二重陽性細胞数。 *P < 0.05、 N = 4。

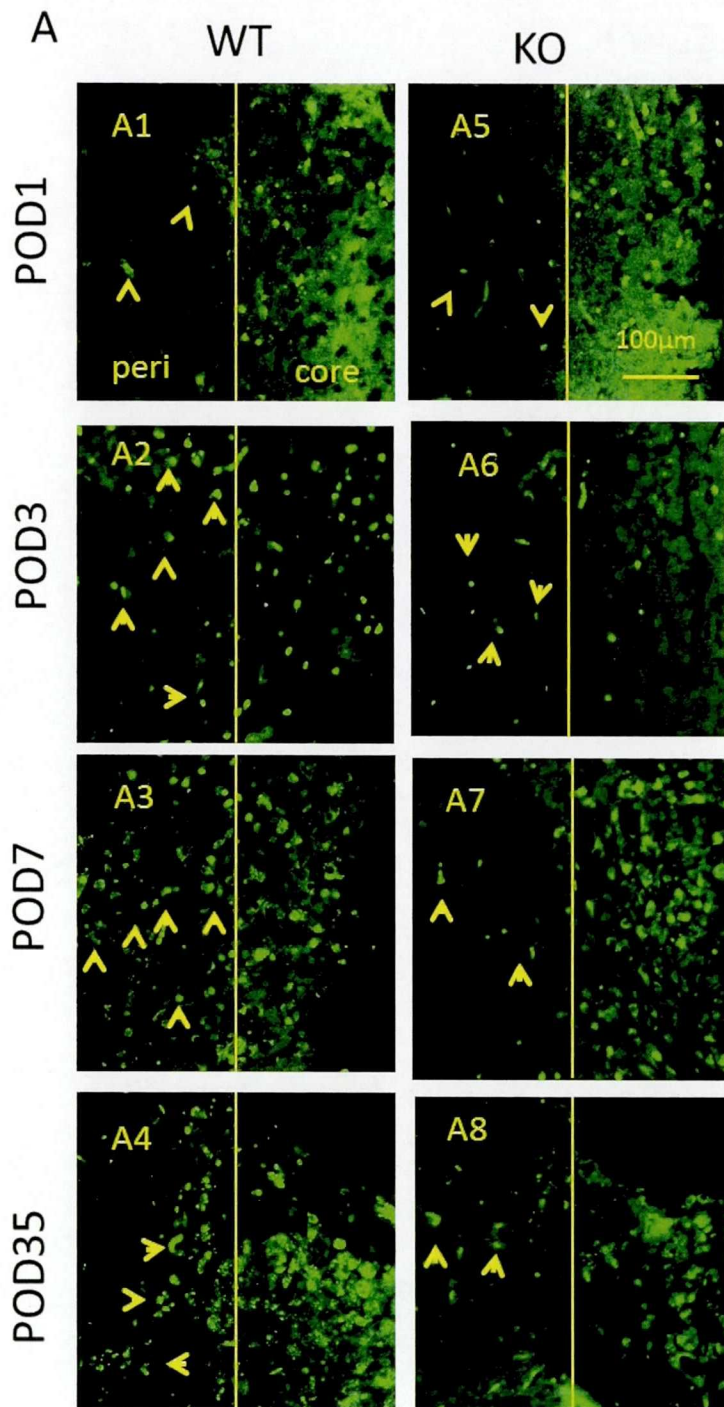
3-2 OPCsのアポトーシスの経時的変化

脳虚血周辺領域のアポトーシスの経時的変化とアポトーシスした細胞の種類を観察するため、POD1、3、7、35におけるWTとKOマウスの脳切片で蛍光組織化学染色による比較を行った。NG2陽性細胞は前述の結果から、KOのPOD3とPOD7でWTに比べ多かったが、BrdUとNG2の二重陽性細胞はWTと有意差が認められなかったことから、NG2陽性細胞数の違いは細胞の増殖ではなく細胞死の抑制による可能性が示唆される。アポトーシスを検出するために、POD1、3、7、35の脳虚血周辺領域でTunel assayによる観察を行った (Fig. 4A)。WTでは健側と比較してPOD1、3、7、35でTunel陽性細胞の増加を認めた。POD35でもTunel陽性細胞を認めたことから、脳虚血周辺領域の遅発性アポトーシスの存在が示唆された (Fig. 4B)。KOでも健側と比較して、POD1、3、7、35でTunel陽性細胞の増加を認めた (Fig. 4C)。WTとKOで比較すると、POD1ではWTとKOの間に差は見られなかったが、POD3、7、35の間で、KOではWTよりTunel陽性細胞が減少していた (Fig. 4D)。

OPCsとアポトーシスの関連を調べるため、POD1、3、7、35の脳虚血周辺領域でNG2とTunelの二重染色を行った (Fig. 5A、B)。WTマウスの脳虚血周辺領域のNG2陽性細胞は、健側に比べPOD1から7にかけて細胞数の減少傾向を示したが、POD35では健側と有意差がなかった (Fig. 5C)。KOでは健側と比較してPOD3でNG2陽性細胞の増加を認めたが、POD1、7、35では有意差を認めなかった (Fig. 5D)。これをWTとKOで比較すると、POD1のKOではWTと差を認めなかったが、POD3、7、35いずれでも、WTと比較してNG2陽性細胞の減少が抑制されていた (Fig. 5I)。

Tunel陽性細胞は、健側と比較してWTではPOD1の脳虚血周辺領域よりみられるようになり、POD1、3、7、35で増加した (Fig. 5E)。KOマウスでは、POD1ではWTと同様にTunel陽性細胞が認められた。その数は、POD3でいったん減少したもののPOD7で増加しPOD35で再び減少した (Fig. 5F)。WTとKOを比較すると、POD3以降ではWTと比較してKOでTunel細胞の減少を認めた (Fig. 5J)。

Tunel陽性のOPCs数はPOD3、7、35で、KOマウスの方がWTマウスに比べ細胞数の抑制を認めた (Fig. 5G、H、K)。以上の結果から、POD3、7、35のOPCsのKOにおけるNG2陽性細胞数が減少しなかったことは、Sema4Dの欠失により脳虚血後の影響によるOPCsのアポトーシスが抑制された結果である事が示唆された。



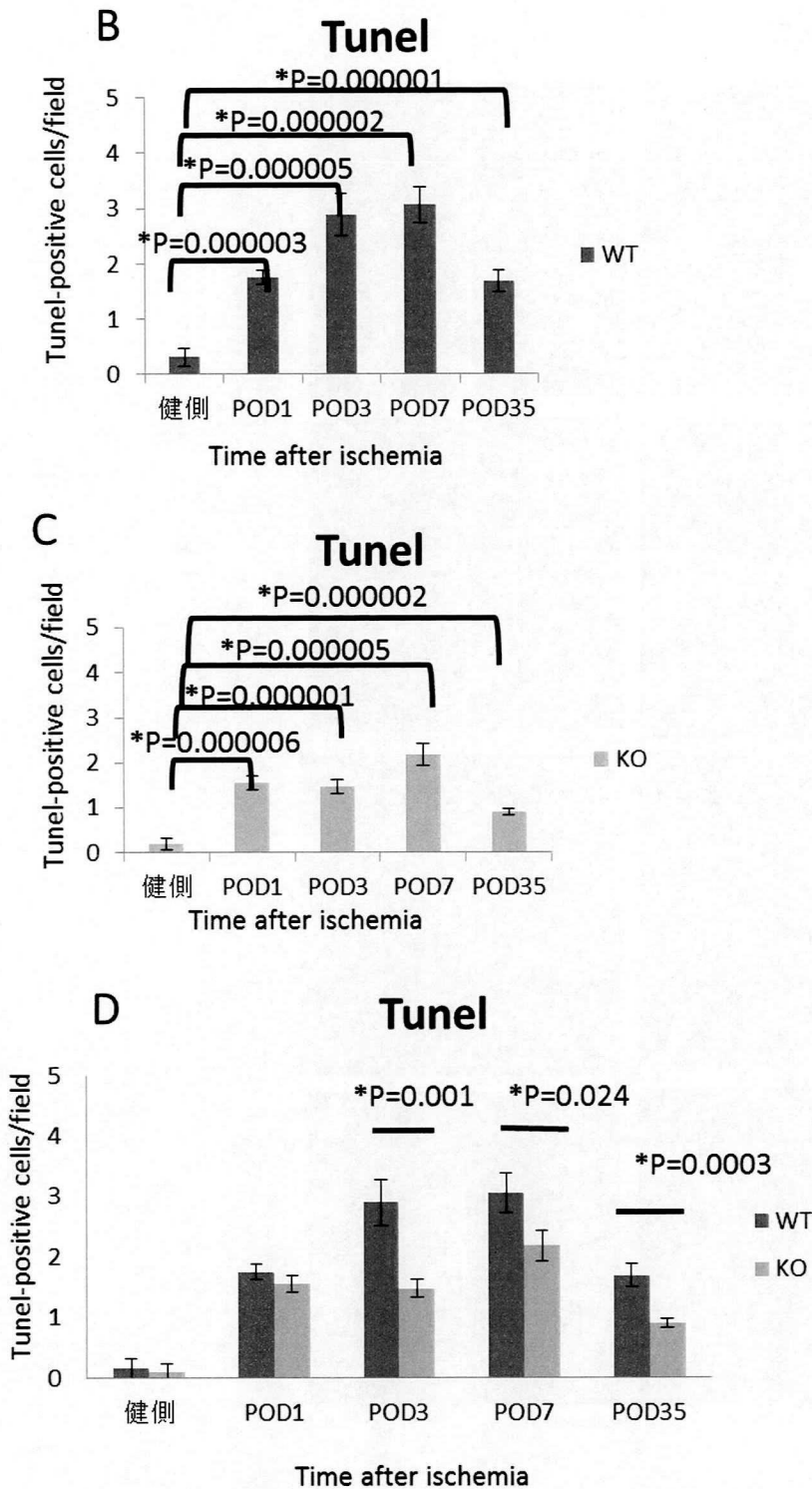
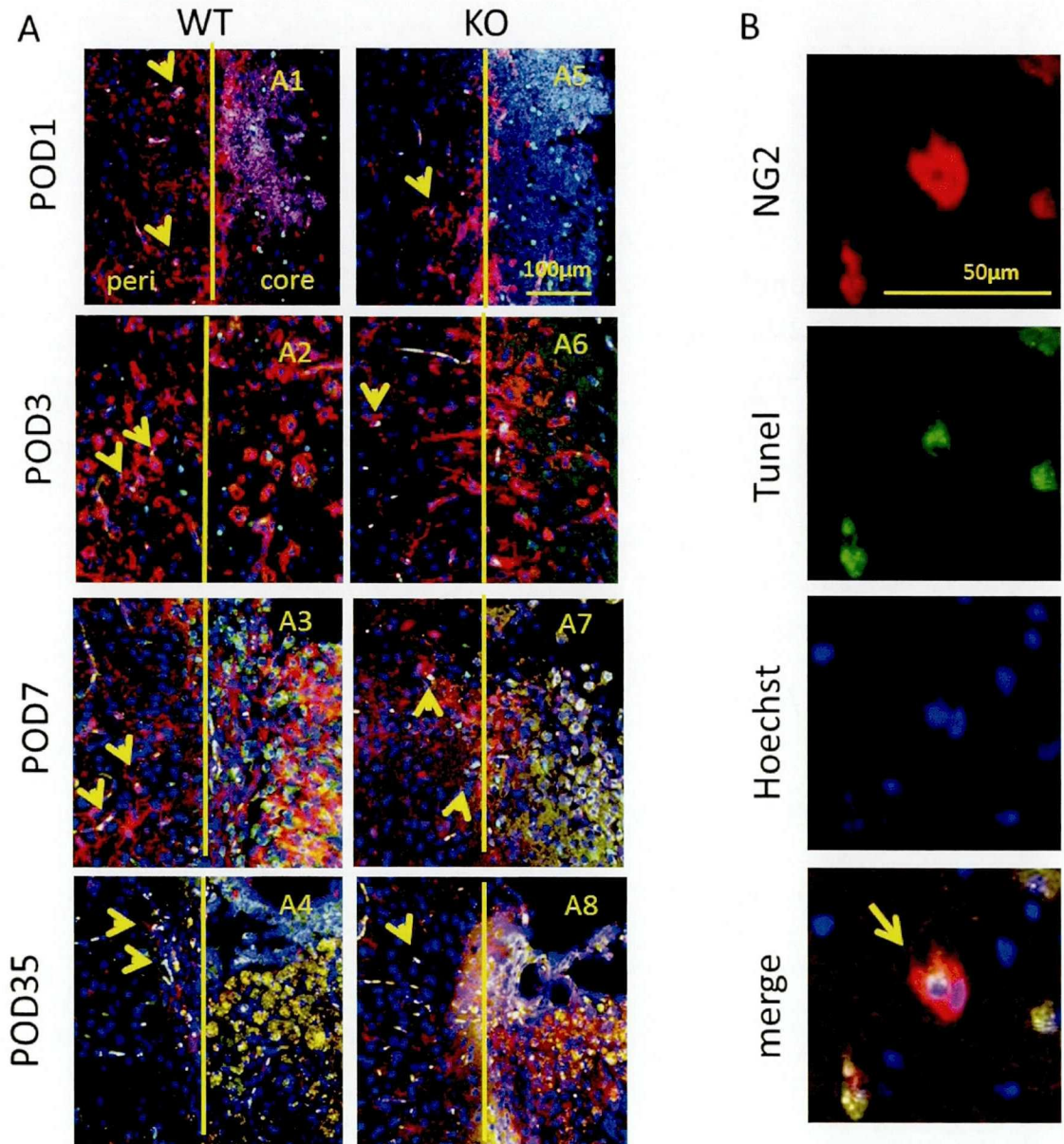
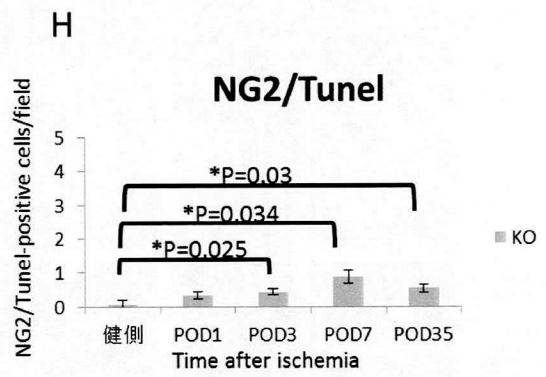
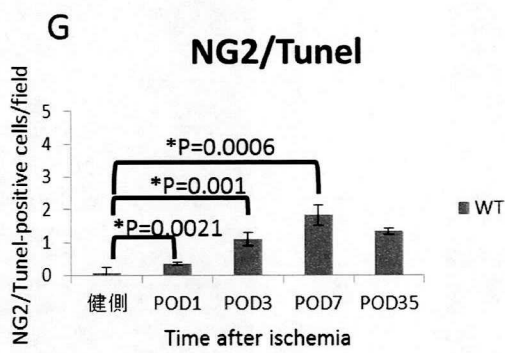
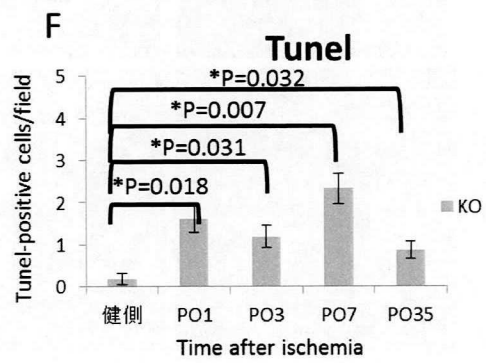
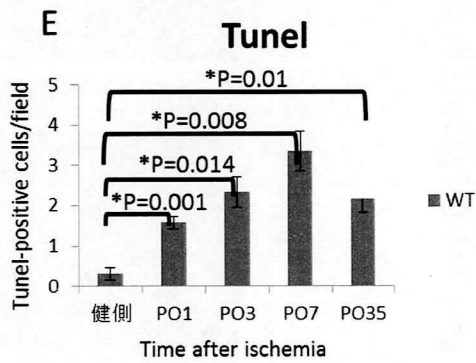
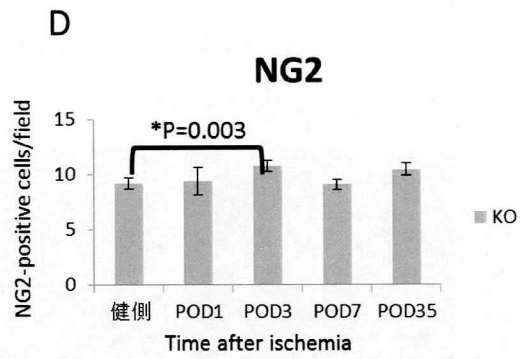
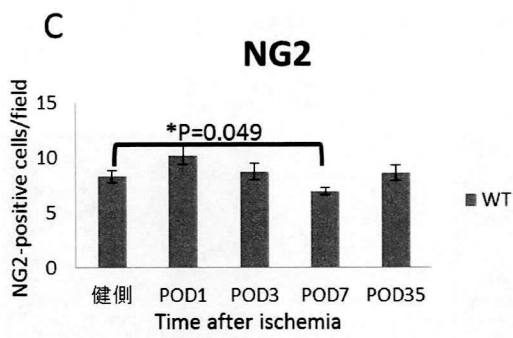


Fig. 4 アポトーシスの経時的変化 (A) MCAO 後 POD1 の WT (A1) と KO (A5)、POD3 の WT (A2) と KO (A6)、POD7 の WT (A3) と KO (A7)、POD35 の WT (A4) と KO (A8) マウスの脳虚血周辺領域における TUNEL (Green) 像を示す。黄矢印先が TUNEL 陽性細胞。写真左側: peri. 右側: core。Scale bar: 100 μ m。(B~D) WT および KO マウスの TUNEL 陽

性細胞数を健側、POD1、POD3、POD7、POD35で比較したグラフ。(B) WT Tunal 陽性細胞数。(C) KO Tunal 陽性細胞数。(D) WT 及びKO の Tunal 陽性細胞数。*P < 0.05、 N = 7。





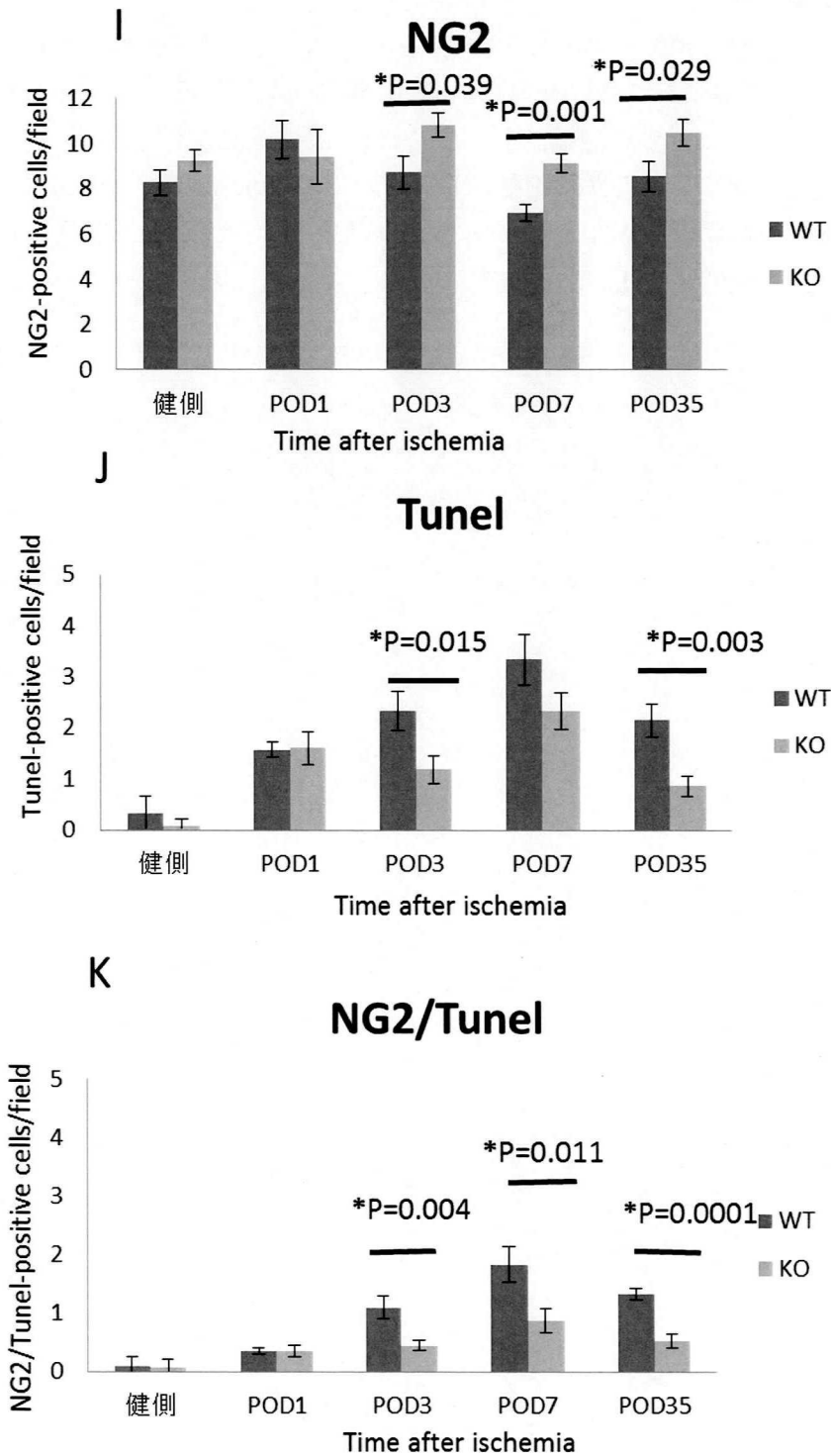


Fig. 5 OPCsのアポトーシスの経時的変化 (A) MCAO 後 POD1の WT (A1) と KO (A5)、POD3の WT (A2) と KO (A6)、POD7の WT (A3) と KO (A7)、POD35の WT (A4) と KO (A8) マウスの大脳皮質脳虚血周辺領域における NG2 (Red) と TUNEL (Green) と Hoechst (Blue) の merge 像を示す。黄矢印先が NG2/TUNEL 二重陽性細胞。写真左側: 脳虚

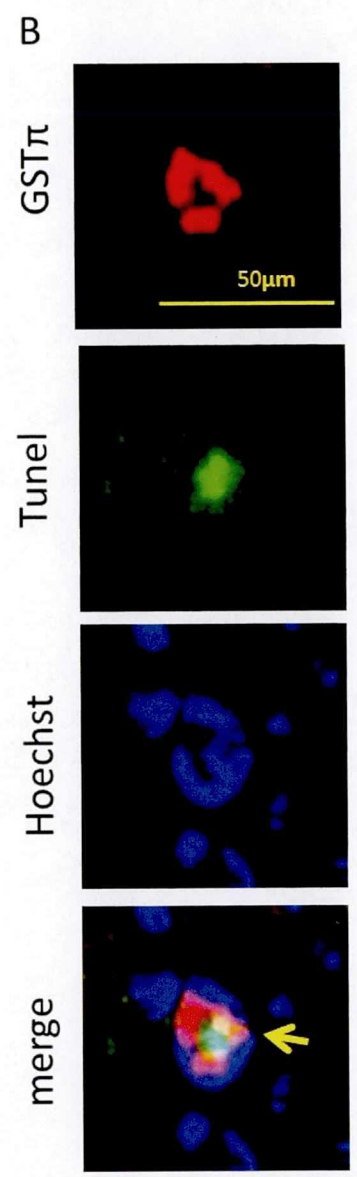
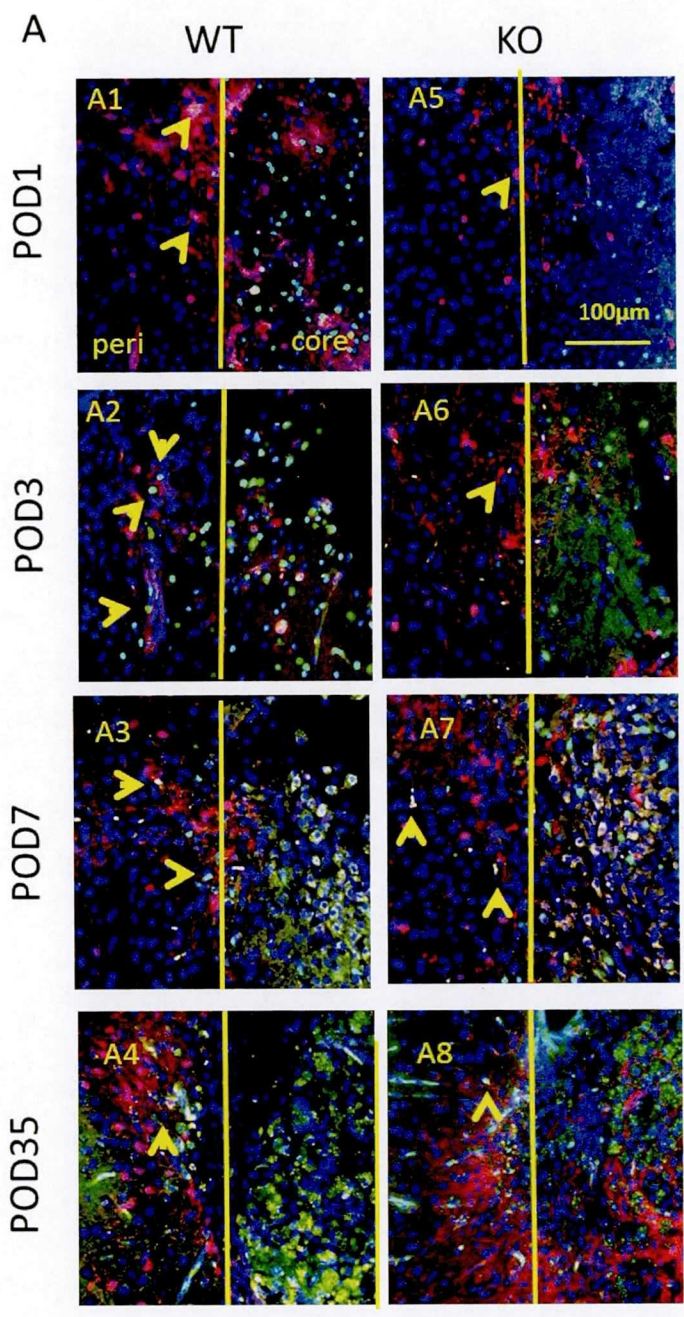
血周辺領域 (peri)。 右側: 脳虚血領域 (core)。 Scale bar: 100 μ m。(B) KO peri の細胞拡大像。上から NG2、Tunel、Hoechst、merge 像を示す。Scale bar: 50 μ m。(C~K) WT および KO マウスのマーカー陽性細胞数を健側、POD1、3、7、35 で比較したグラフ。(C) WT NG2陽性細胞数。(D) KO NG2陽性細胞数。(E) WT Tunel陽性細胞数。(F) KO Tunel陽性細胞数。(G) WT NG2/Tunel 二重陽性細胞数。(H) KO NG2/Tune 二重陽性細胞数。(I) WT 及び KO の NG2 陽性細胞数。(J) WT 及び KO の Tunel 陽性細胞数。(K) WT 及び KO の NG2/Tunel 二重陽性細胞数。*P < 0.05、 N = 7。

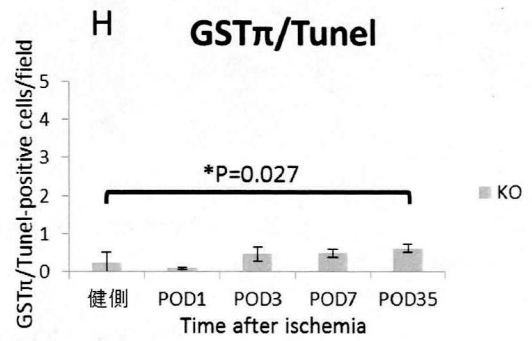
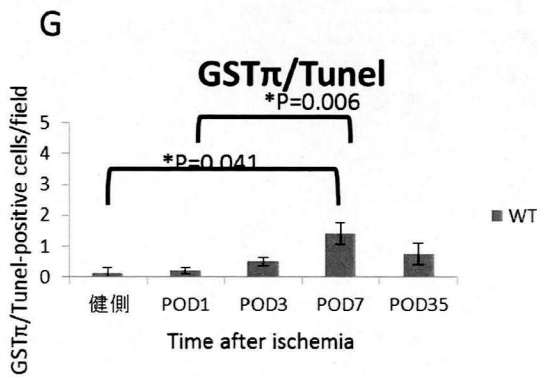
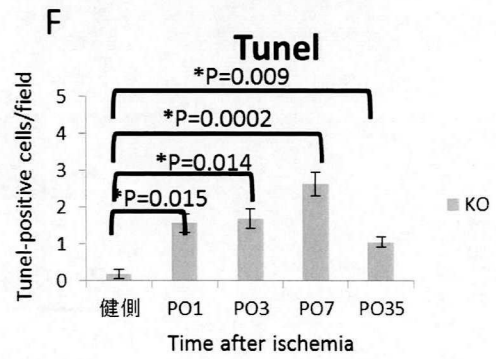
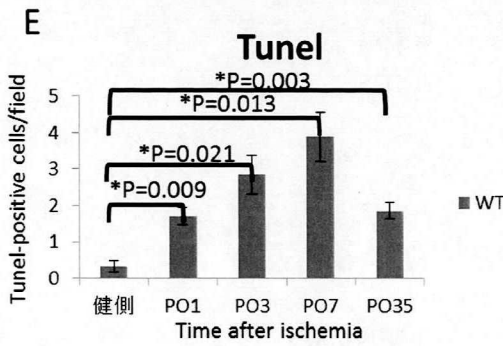
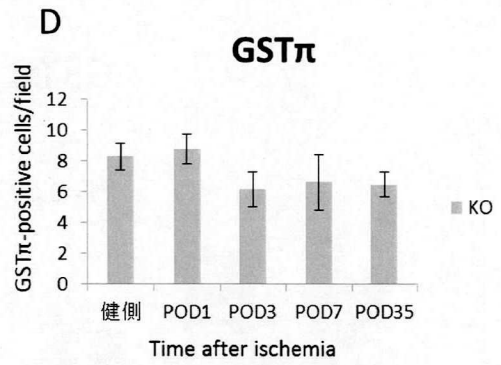
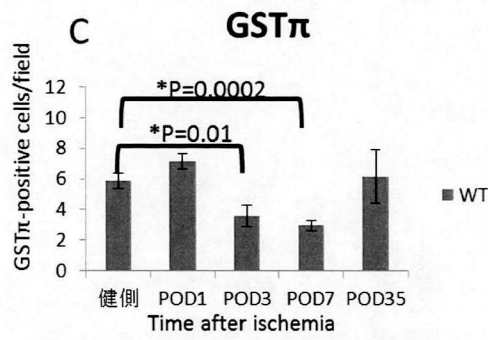
3-3 OLのアポトーシスの経時的変化

脳虚血後のOLに対するSema4Dのアポトーシスの経時的影響を調べるため、OLマーカーであるGST π 抗体とTunel assayを用いて、POD1、3、7、35のWTとKOマウスのGST π 陽性細胞数およびTunel陽性細胞を脳虚血周辺領域で数えた (Fig. 6A、B)。WTのGST π 陽性細胞は、健側と比較してPOD1では有意差がみられなかった。POD3、POD7ではGST π 陽性細胞が減少し、POD35ではPOD1より細胞数は少ないものの、POD7と比較して細胞数の回復を認めた (Fig. 6C)。KOのGST π 陽性細胞はPOD1~35で細胞数の増減はあるものの、健側と比較して有意差は認めなかった (Fig. 6D)。KOのGST π 陽性細胞は、WTと比較して、POD3とPOD7で有意に多かったが、POD35では、WTとKOに差が無かった (Fig. 6I)。脳虚血後のGST π 陽性細胞の減少並びに回復はWTで顕著でありKOではあまり変化がみられなかった。この事はWTのSema4DがMCAO後のGST π 陽性細胞の減少と回復に関与していることを示唆する。

KOと比較してWTのTunel陽性細胞は、POD7をピークに増加を認めた (Fig. 6E、F、J)。

WTのGST π とTunelの二重陽性細胞数は、POD1では殆ど見られなかったが、POD7をピークPOD3、POD7、POD35で上昇した (Fig. 6G)。一方KOではPOD1では殆ど二重陽性細胞は見られなかったが、POD3、7、35で増加したものの、その増加はWTより少なかった (Fig. 6H)。WTとKOで比較すると、POD7でWTと比較してKOで二重陽性細胞が有意に抑制されていた (Fig. 6K)。これらの結果から前述のKOではPOD3のNG2とTunel二重陽性細胞の増加を抑制されていたことから、MCAO後先にNG2陽性細胞がアポトーシスし、続いてGST π 陽性細胞がアポトーシスを起こすこと、この両者のアポトーシスに対しSema4D欠失が抑制的に作用する事が示された。





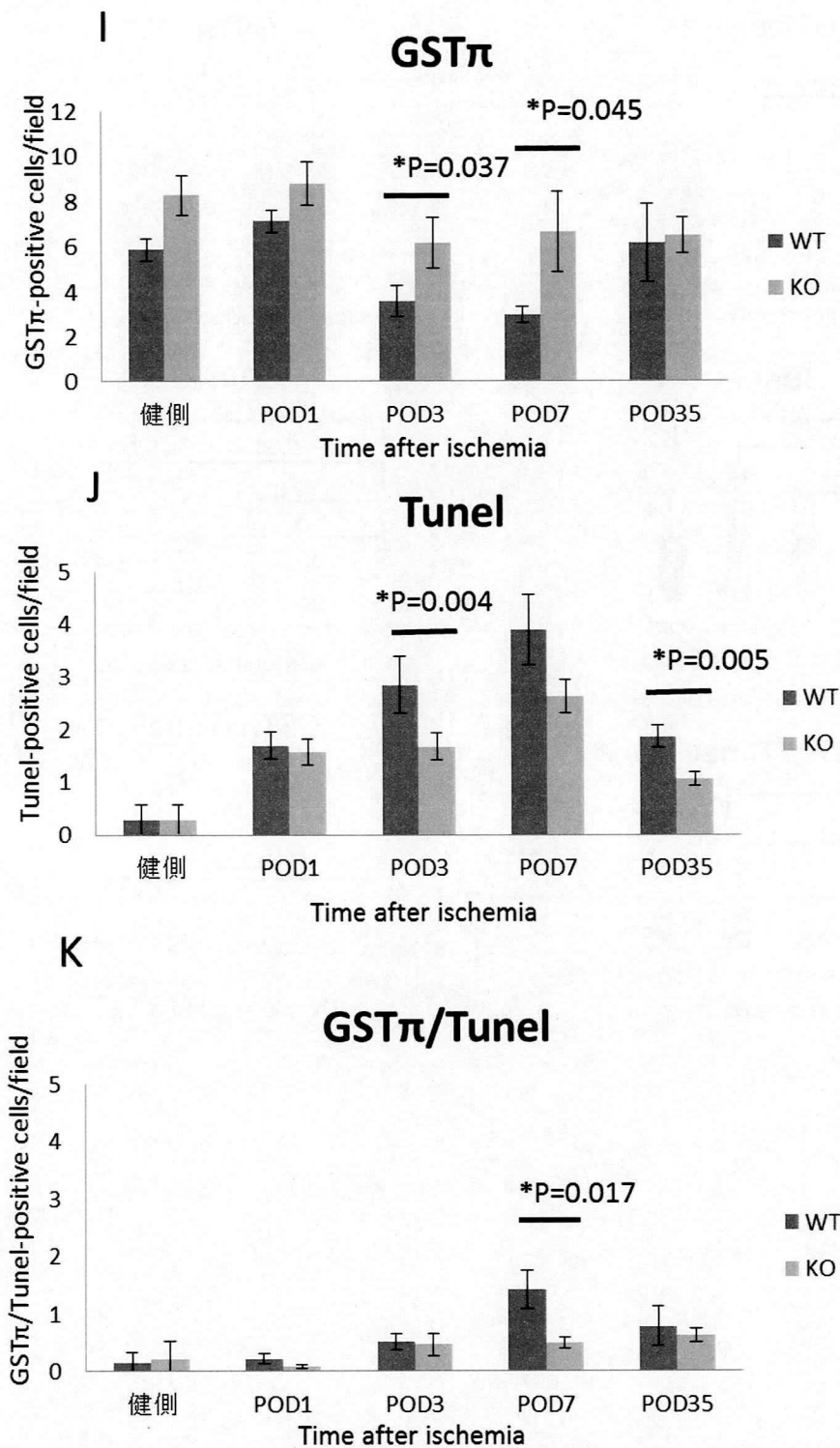


Fig. 6 OLのアポトーシスの経時的変化 (A) MCAO 後 POD1の WT (A1) と KO(A5)、POD 3の WT (A2) と KO (A6)、POD7の WT (A3) と KO (A7)、POD35の WT (A4) と KO (A8) マウスの大脳皮質脳虚血周辺領域における GSTπ (Red) と TUNEL (Green) と Hoechst

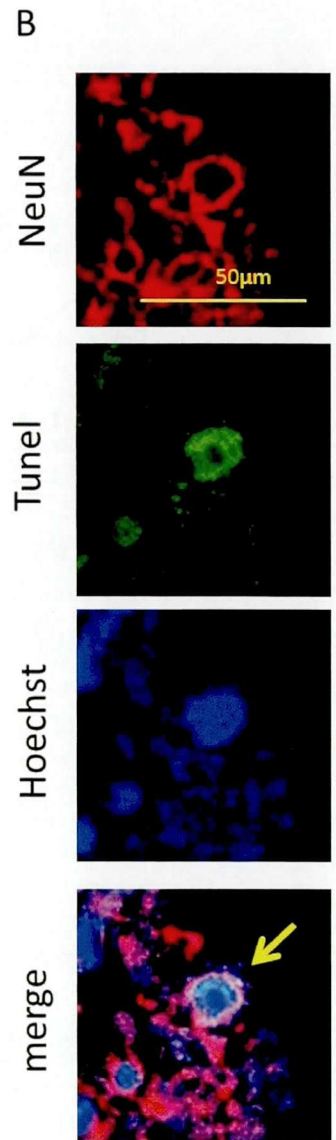
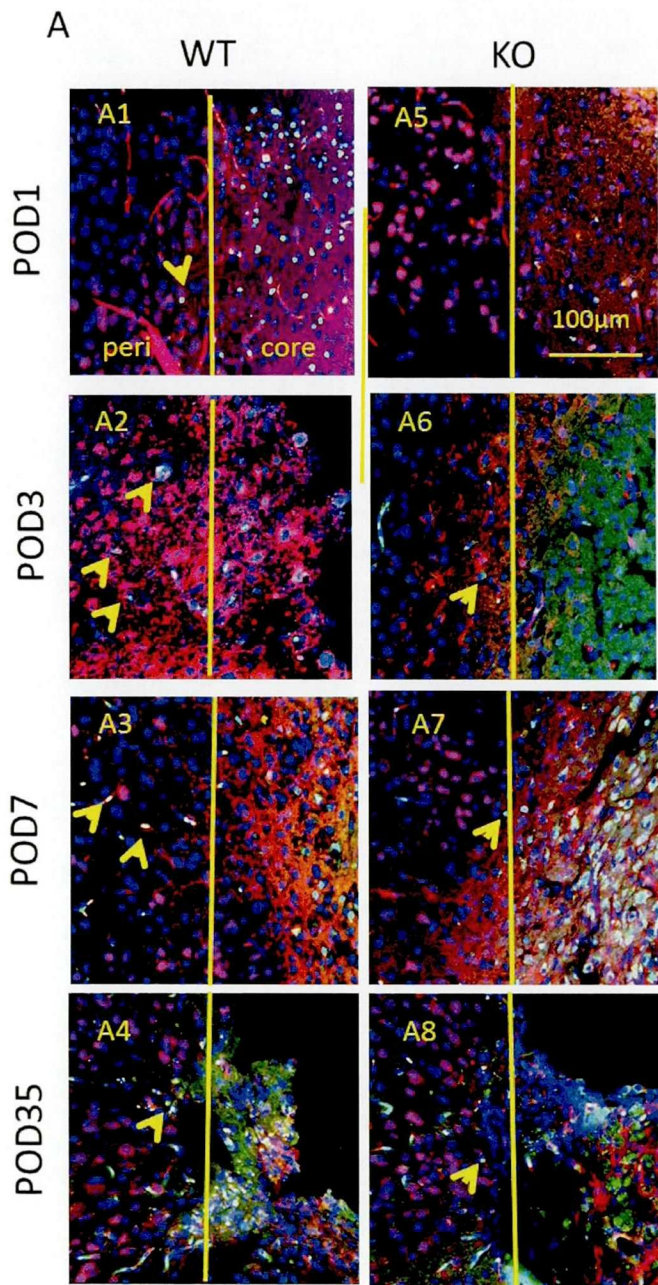
(Blue) のmerge像を示す。黄矢印先が GST π /Tunel 二重陽性細胞。写真左側: 脳虚血周辺領域 (peri)。右側: 脳虚血領域 (core)。Scale bar: 100 μ m。(B) KO peri の細胞拡大像。上から GST π 、Tunel、Hoechst、merge 像を示す。Scale bar: 50 μ m。(C~K) WT および KO マウスのマーカー陽性細胞数を健側、POD1、3、7、35 で比較したグラフ。(C) WT GST π 陽性細胞数。(D) KO GST π 陽性細胞数。(E) WT Tunel 陽性細胞数。(F) KO Tunel 陽性細胞数。(G) WT GST π /Tunel 二重陽性細胞数。(H) KO GST π /Tunel 二重陽性細胞数。(I) WT 及び KO の GST π 陽性細胞数。(J) WT 及び KO の Tunel 陽性細胞数。(K) WT 及び KO の GST π /Tunel 二重陽性細胞数。 *P < 0.05、 N = 7。

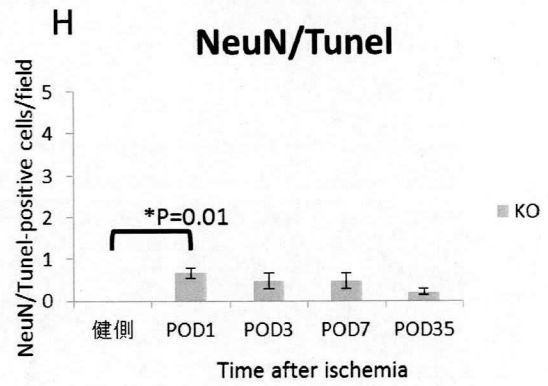
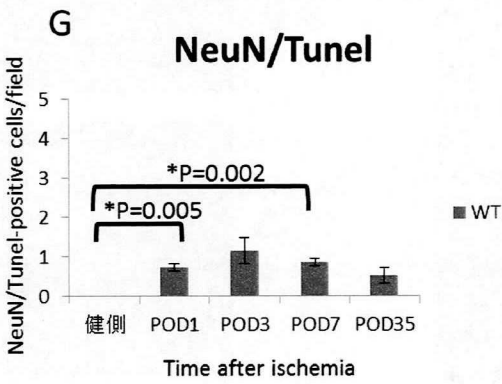
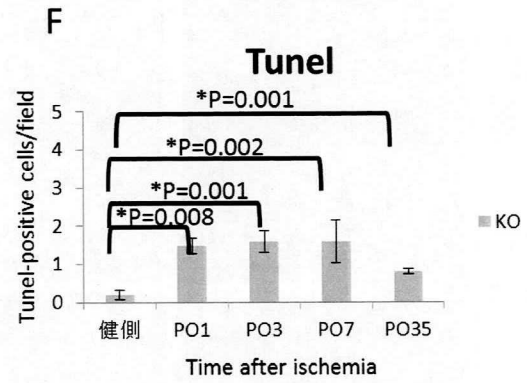
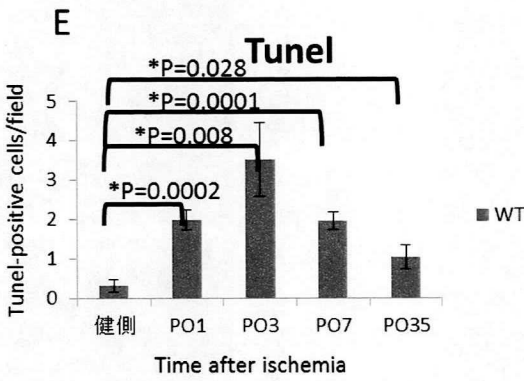
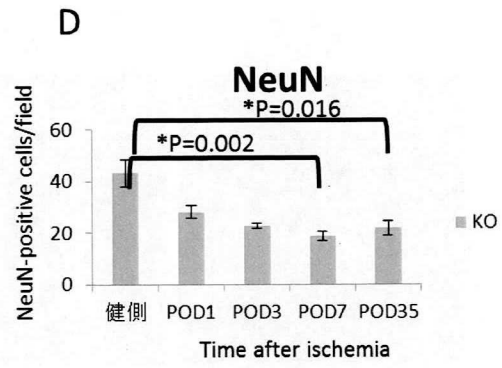
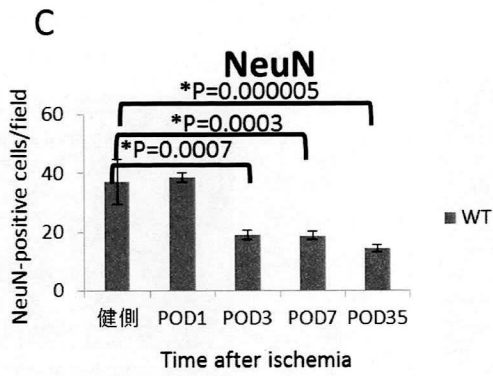
3-4 ニューロンのアポトーシスの経時的変化

これまでの結果で Sema4D 欠失が NG2 陽性細胞ならびに GST π 陽性細胞のアポトーシスに抑制的に作用することが判明したため、次にニューロンのアポトーシスの経時的な変化について調べた。ニューロンマーカーである NeuN 抗体と TUNEL assay を用いて POD1、3、7、35 の二重陽性細胞数を計測した (Fig. 7A、B)。WT と KO の脳虚血周辺領域の NeuN 陽性細胞は MCAO 後経時的に減少した。WT では健側や POD1と比較して POD3、7、35で NeuN 陽性細胞が減少した (Fig. 7C)。KO では健側と比較して POD1、3、7で NeuN 陽性細胞が減少した。POD7とPOD35では細胞数に差を認めなかった (Fig. 7D)。これを WT と KO で比較すると、NeuN 陽性細胞は KO では POD1 では WT より減少数が大きい、POD3では KO の方が WT よりわずかに NeuN 陽性細胞の減少が抑えられた。KO では POD7と比較してPOD35で NeuN 陽性細胞の減少が抑えられたが、WT では減少した (Fig. 7I)。

WT も KO も TUNEL 陽性細胞は健側では殆ど見られず、WT と KO いずれも POD1からPOD35まで増加がみられた。POD3でKOでは有意にWTよりTUNEL陽性細胞が少なかった (Fig. 7E、F、J)。

NeuN と TUNEL の二重陽性細胞は WT と KO いずれも健側では殆ど見られなかったが、WT では POD1、3、7、35でみられた。健側と比較して POD1、7で有意に二重陽性細胞が増えていた (Fig. 7G)。KO では二重陽性細胞は POD1、3、7、35で認めた。そのピークは POD1 であり、それ以降では二重陽性細胞数は減少していた (Fig. 7H)。WT と KO で比較したところ、POD1 では WT と KO の二重陽性細胞数に差は見られなかったが、POD3、7では WT と比較して KO の二重陽性細胞数が有意に少なかった。POD35でも有意差は認められなかったものの、WT より KO の陽性細胞が少ない傾向を示した (Fig. 7K)。これらの結果より、KO では MCAO 後 POD3、POD7で NeuN 陽性細胞のアポトーシスの抑制が起こっていることが示された。





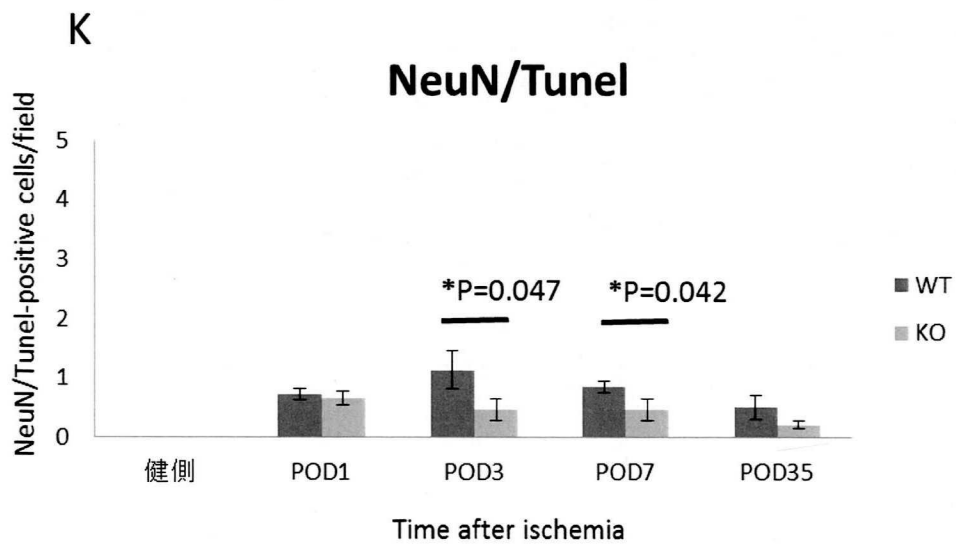
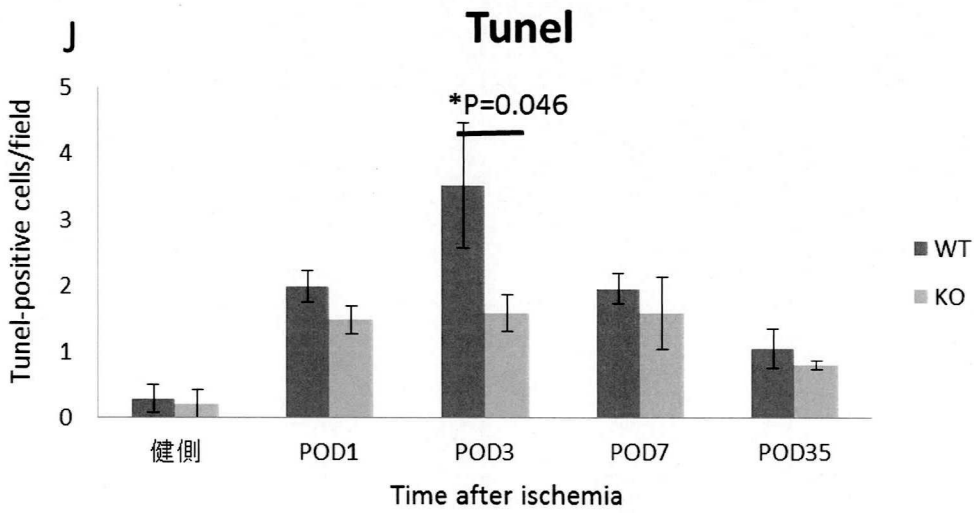
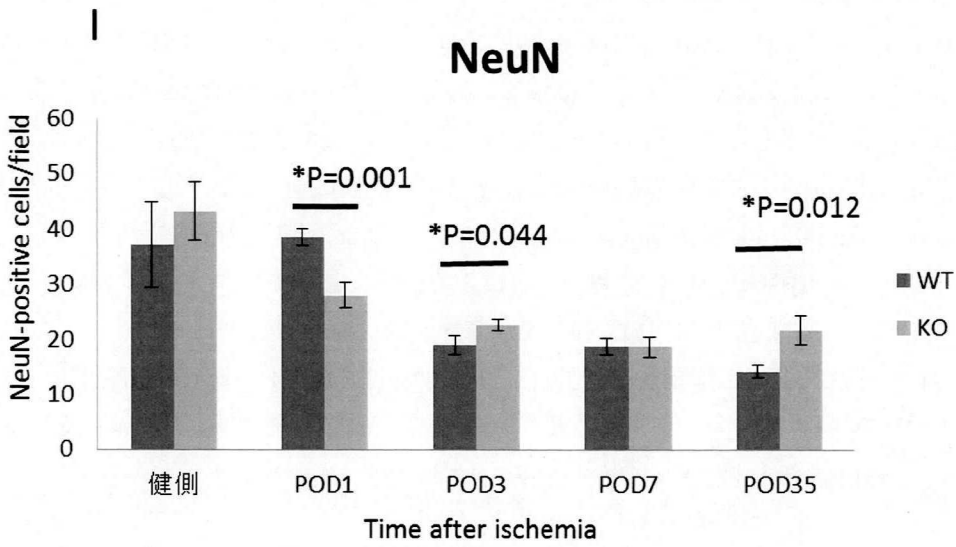


Fig. 7 ニューロンのアポトーシスの経時的変化 (A) MCAO後POD1のWT (A1) とKO (A5)、POD3のWT (A2) とKO (A6)、POD7のWT (A3) とKO (A7)、POD35のWT (A4) とKO (A8) マウスの大脳皮質脳虚血周辺領域における NeuN (Red) と Tunel (Green) と Hoechst (Blue) の merge 像を示す。黄矢印先が NeuN/Tunel 二重陽性細胞。写真左側: 脳虚血周辺領域 (peri)。右側: 脳虚血領域 (core)。Scale bar: 100 μ m。(B) KO peri の細胞拡大像。上から NeuN、Tunel、Hoechst、merge 像を示す。Scale bar: 50 μ m。(C~K) WT および KO マウスのマーカー陽性細胞数を健側、POD1、3、7、35 で比較したグラフ。(C) WT NeuN 陽性細胞数。(D) KO NeuN 陽性細胞数。(E) WT Tunel 陽性細胞数。(F) KO Tunel 陽性細胞数。(G) WT NeuN/Tunel 二重陽性細胞数。(H) KO NeuN/Tunel 二重陽性細胞数。(I) WT 及び KO の NeuN 陽性細胞数。(J) WT 及び KO の Tunel 陽性細胞数。(K) WT 及び KO の NeuN/Tunel 二重陽性細胞数。* $P < 0.05$ 、 $N = 7$ 。

3-5 手術によるマウスの行動量への影響

ここまでの結果より、Sema4D 欠失によって、脳虚血周辺領域のニューロン前駆細胞の増加や、OPCsとOLならびにニューロンのアポトーシスの抑制に影響を与えることが判明したため、WTとKOの術後の行動量に影響を与えるかについて観察を行った。手術群（POD28）と無手術群（non operative: Non-Ope）のWTとKOマウスを用いて10分間のオープンフィールドテストを行った。その結果、WTでは、Non-Opeと比較して、POD28で行動量の有意な増加を認めた（fig. 8）。しかし、KOではNon-Opeとの間では、POD28で行動量の増加傾向は認められたものの、有意差は認めなかった。WTとKOでの比較は、Non-Ope、POD28共に有意差を認めなかったことより、今回の研究ではアポトーシスを抑制されたOPCs、OL、ニューロンや、ニューロン前駆細胞の行動量への影響を観察することはできなかった。

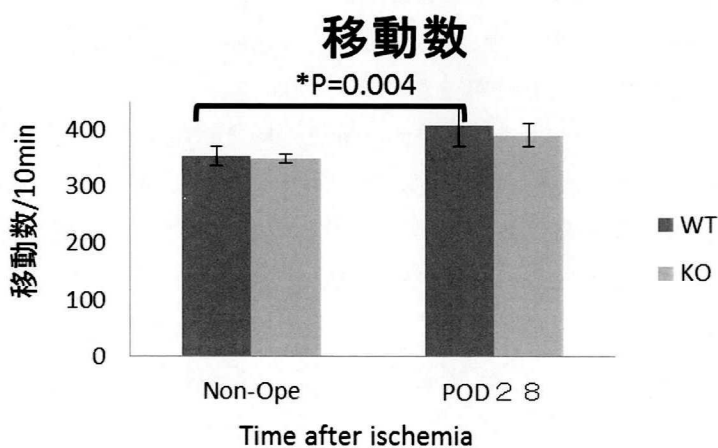


Fig. 8 10 分間の WT と KO マウスの移動数の比較 WT と KO マウス MCAO 後、POD28 群と Non-Ope 群の 10 分間の移動数を比較したグラフ。*P < 0.05、N = 7。

4、考察

この研究では、Sema4D の欠失が虚血ストレスによって発生する OL およびニューロンの増殖、ならびにアポトーシスへ及ぼす影響を調べた。MCAO 後 POD3~7 の間に脳虚血周辺領域において細胞増殖がみられ、POD3 にピークに達したが、その新生細胞の多くは OPCs ではなかった。Sema4D 欠失で POD3 に亢進した細胞増殖には OPCs 細胞が影響しなかったことから、OPCs 以外の細胞増殖に影響を与えている可能性が示唆された。KO マウスで Nestin 陽性細胞の増殖亢進がみられたことから、MCAO 後新生したニューロン前駆細胞が Sema4D 欠失の影響を受けて増殖した細胞の一つであることが示された。POD35 では WT と比較して KO では NeuN 陽性細胞の減少がみられなかったことから、新生したニューロン前駆細胞は POD35 ではニューロンに分化している可能性も示された。今回の研究で Sema4D 欠失により脳虚血傷害後の大脳皮質では細胞増殖の亢進がみられたのに対し、脳の発達過程では Sema4D 欠失による細胞増殖への影響がみられなかった (16) ことから、Sema4D は成体における傷害時において発達過程の脳とは別の作用を有することが示唆された。

OL はニューロンと同様に脳虚血障害に脆弱であるが、その周辺領域では増殖することが報告されている (22)。虚血周辺領域における OPCs は、WT では POD7 にかけて NG2 陽性細胞の減少を認めているのに対して、KO では術後に NG2 陽性細胞数が殆ど減少せずに維持されていた。Sema4D が OPCs の増殖に影響しなかったことから、OPCs の細胞死に関与するかを調べたところ、アポトーシスをおこしている NG2 陽性細胞は、WT と比較して KO で減少していたことから、KO における POD3 と POD7 の NG2 陽性細胞数の維持は、Sema4D 欠失によるアポトーシスの抑制に由来するものであると考えられる。

KO では POD3、7、35 における Tunel 陽性細胞が有意に減少していた。この事より脳虚血周辺領域において、Sema4D は Mature OL のアポトーシスを誘導する事が示唆された。また、POD3 以降で、GST π および NeuN 陽性細胞数の減少が、KO において抑制されており、Tunel 陽性細胞の OL やニューロンが POD7 で WT に比べて、有意に減少していた。この事より、Sema4D 欠失によるアポトーシスの抑制効果は、OL だけではなくニューロンにもおよぶことが示された。以上の結果から、Sema4D の欠失による POD3 以降の OL 数の減少抑制は OPCs と OL のアポトーシス抑制によるものであることが示唆された。また WT では POD35 で KO と同じレベルまで GST π 陽性細胞数の回復がみられたことから、OPCs の増殖が起きていることが示唆された。GST π 陽性細胞数は POD35 では WT と KO で差がみられなかったことから、WT マウスの OPCs 増殖による OL の回復に、Sema4D 欠失が影響するかどうか今回の研究では判明しなかった。Sema4D は NG2 陽性細胞やニューロンには発現せず、GST π 陽性細胞に発現することが報告されている (15) が、Sema4D 欠失によるニューロン数への影響について、KO では POD3、7 でニューロン前駆細胞の増加を認めたことや、POD35 でニューロン数の回復がみられたことから、Sema4D 欠失はニューロンの増殖を促進することが示唆された。

ニューロンは一般的に OL より低酸素ストレスに対して脆弱であるといわれているが、脳虚

血がヒトや動物の白質脳炎の原因の一つであることが示されたことから、OLの低酸素に対する在弱性が注目されている(23)。OLが虚血周辺領域のニューロンと同様に梗塞後に数が減少したことから、虚血に脆弱である事を明らかにした。脳虚血直後におきる梗塞巣の細胞死の多くはネクローシスであるが、二次的アポトーシスが起きることが報告されている(24)。この研究で周辺領域ではPOD3~7でピークとなるアポトーシスがおき、特にOLとニューロンがアポトーシスを起こしやすいことを示した。また、脳虚血周辺領域のアポトーシスは、脳虚血刺激によってニューロンやグリア、炎症性細胞から放出される様々なサイトカインや神経毒素によって引き起こされることが知られている(25)、リンパ球欠損マウスを用いた実験においては、リンパ球など様々な炎症細胞は、脳梗塞領域に侵入することで梗塞領域のニューロンやOLの細胞死を引き起こしていると報告されている(26)。脳虚血後、抗CD4抗体を投与した場合の脳虚血周辺領域では、新生ニューロン数の生存数の増加が認められ(27)、グリア細胞を用いたin vitro研究においてリンパ球の活性化によって産出されるSema4Dは、アポトーシスを促進していると報告されている(14)。これらの事より、脳虚血後に生じるOLやニューロンのアポトーシスはOL由来のSema4Dだけでなく、リンパ球由来の可能性もあることは否定できない。

また、POD35のNG2とNeuN陽性細胞数は、KOで有意に多く認められたが、GST π 陽性細胞数がWTとKOとで有意差が認められなかった事については、WTではGST π 陽性細胞は脳虚血刺激後に減少した後、回復した(14、28)からであると考えられる。この事より、WTにおいても、虚血周辺領域でのOLの増殖成熟は起きており、OLやOPCsのアポトーシスが抑制されないKOの方が、術後のより早いOLの回復に寄与した可能性が考えられる。POD35では、アポトーシスを抑制されたため、生存し早期に増殖成熟したOLと、アポトーシスによって成熟速度に制限を受けたOLとの間で、機能的な差異が現れるかどうかは不明である。

今回の研究でニューロンの回復が顕著であったことから、KOで脳機能回復が影響を受けるかを証明するため、POD28のWTとKOのマウスを用いて、10分間のオープンフィールドテストを行ったが、手術群でも非手術群にもWTとKO間で行動量の有意差は見られず、Sema4D欠失によって増殖した細胞の機能の差異について、今回の観察では解明できなかった。その理由の一つにマウスは行動量の個体差が非常に大きかった事があげられ、今後は行動実験に対する新たな条件設定の検索が必要であると考えられる。in vitroにおいても脳虚血組織で新生・分化したOLと正常OLとの間の機能差の有無についても観察を行う必要があると考えられる。また、新皮質の脳虚血部を中心にニューロンやグリア細胞などの神経系細胞の多量な細胞死が生じた後、脳室下帯(subventricular zone: SVZ)や海馬歯状回顆粒細胞下層(subgranular zone: SGZ)で神経幹細胞などの新生が起こるとの報告がある(29~33)ことより、脳虚血周辺領域で観察されたNG2陽性細胞はBrdU投与前にSVZやSGZで発生し、新皮質の脳虚血周辺領域まで遊走した可能性も否定できないため、今後、細胞移動の観点からも観察を行う必要性があると考えられる。

5、謝辞

本研究を行うにあたり、ご懇切丁寧な御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科歯学研究科博士課程統合機能口腔科学専攻顎口腔病因病態制御学 古郷幹彦教授、および大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻生体情報科学講座神経生物学研究室の稲垣忍教授、柴田理志助教に深謝致します。本研究の実施にあたり、種々御協力いただきました大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻生体情報科学講座神経生物学研究室の教職員各位に厚く御礼申し上げます。

6、引用文献

- (1) Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* Apr;81(2): 871-927 (2001).
- (2) Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD. Basic helixloop-helix factors in cortical development. *Neuron*39: 13-25 (2003).
- (3) Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. The OL and its many cellular processes. *Trends Cell Biol.* 3: 191–197 (1993).
- (4) Simons M, Trajkovic K. Neuron–glia Communication in the control of OL function and myelin biogenesis. *J Cell Sci.* 119: 4381–4389 (2006).
- (5) McTigue DM, Tripathi RB. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem.* 107: 1-19 (2008).
- (6) Nicolay DJ, Doucette JR, Nazarali AJ. Transcriptional control of oligodendrogenesis. *Glia.*55: 1287-1299 (2007).
- (7) Bansal R, Stefansson K, Pfeiffer SE. Proligodendroblast antigen (POA), a developmental antigen expressed by A007/O4-positive oligodendrocyte progenitors prior to the appearance of sulfatide and galactocerebroside. *J. neurochemistry.*58: 2221-2229 (1992).
- (8) Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin. A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell.* 75: 217-227 (1993).
- (9) Moreau-Fauvarque C, Kumanogoh A, Camand E, Jaillard C, Barbin G, Boquet I, Love C, Jones EY, Kikutani H, Lubetzki C, Dusart I, Chedotal A. The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J Neurosci.* 23: 9229-9239 (2003).
- (10) Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell.* 75: 1389–1399 (1993).
- (11) Huber, A.B., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D. & Cloutier, J.F. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 509–563 (2003).
- (12) Dickson, B.J. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298 : 1959–1964 (2002).
- (13) Swiercz JM, Kuner R, Behrens J, Offermanns S. Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron.* 35: 51-63 (2002).

- (1 4) Giraudon P, Vincent P, Vuailat C, Verlaeten O, Cartier L, Marie-Cardine A, Mutin M, Bensussan A, Belin MF, Boumsell L. Semaphorin CD100 from activated T lymphocytes induces process extension collapse in OLs and death of immature neural cells. *J Immunol.* 172: 1246-1255 (2004).
- (1 5) Taniguchi Y, Amazaki M, Furuyama T, Yamaguchi W, Takahara M, Saino O, Wada T, Niwa H, Tashiro F, Miyazaki J, Kogo M, Matsuyama T, Inagaki S. *Sema4D* deficiency results in an increase in the number of oligodendrocyte in healthy and injured mouse brain. *J Neurosci Res.* 87: 2833-2841 (2009).
- (1 6) Yamaguchi W, Tamai R, Kageura M, Furuyama T, Inagaki S. *Sema4D* as an inhibitory regulator in oligodendrocyte development. *Mol Cell Neurosci.* 2012 Mar;49(3): 290-9 (2011).
- (1 7) Kumanogoh A, K. Suzuki, E Ch'ng, C Watanabe, S Marukawa, N Takegahara, I Ishida, T Sato, S Habu, K Yoshida, W Shi, H Kikutani. Requirement for the lymphocyte semaphorin CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells. *J. Immunol.* 169: 1175-1181 (2002).
- (1 8) Negishi-Koga, T, Shinohara, M, Komatsu, N, Bito, H, Kodama, T, Friedel, R, H., Takayanagi, H. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nature Med.* 17: 1473-1480 (2011).
- (1 9) Larrivé, B., Freitas, C., Suchting, S., Brunet, I. & Eichmann, A. Guidance of vascular development: lessons from the nervous system. *Circ. Res.* 104: 428–441 (2009).
- (2 0) Nakagomi T, Taguchi A, Fujimori Y, Saino O, Nakano-Doi A, Kubo S, Gotoh A, Soma T, Yoshikawa H, Nishizaki T, Nakagomi N, Stern DM, Matsuyama T. Isolation and characterization of neural stem/ progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice. *Eur J Neurosci.* 29: 1842-1852 (2009).
- (2 1) Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, Tsukamoto Y, Iso H, Fujimori Y, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest.* 114: 330-338 (2004).
- (2 2) Bogousslavsky J, Regli F. Centrum ovale infarcts: subcortical infarction in the superficial territory of the middle cerebral artery. *Neurology.* 42: 1992-1998 (1992)
- (2 3) Marconx FW. Morawetz RB. Crowell RM. DeGirolami U. Halsey JH Jr. Differential regional vulnerability in transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 13:339-346 (1982)
- (2 4) Linnik MD. Zobrist RH. Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 24: 2002-2009

(1993)

(2 5) Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol.* 56: 149-171 (1998).

(2 6) Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Kaler LJ, Vandenbark AA, Offner H. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27: 1798-1805 (2007).

(2 7) Saino O, Taguchi A, Nakagomi T, Nakano-Doi A, Kashiwamura S, Doe N, Nakagomi N, Soma T, Yoshikawa H, Stern DM, Okamura H, Matsuyama T. Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke. *J Neurosci* 88 (11): 2385-97 (2011).

(2 8) Tanaka K, Nogawa S, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A. Upregulation of oligodendrocyte progenitor cells associated with restoration of mature oligodendrocytes and myelination in peri-infarct area in the rat brain. *Brain Res.* 989: 172-179 (2003).

(2 9) Tanaka R, Yamashiro K, Mochizuki H, Cho N, Onodera M, Mizuno Y, Urabe T. Neurogenesis after transient global ischemia in the adult hippocampus visualized by improved retroviral vector. *Stroke.* 35: 1454-1459 (2004).

(3 0) Tureyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Bowen KK, Dempsey RJ. Transient focal cerebral ischemia-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the adult mouse. *J Neurosurg.* 101: 799-805 (2004).

(3 1) Zhang RL, Zhang ZG, Wang L, Wang Y, Gousev A, Zhang L, Ho KL, Morshead C, Chopp M. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24: 441-448 (2004).

(3 2) Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology.* 55: 345-352 (2008).

(3 3) Yamashita T, Ninomiya M, Hernández Acosta P, García-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci.* 26: 6627-6636 (2006).

