



Title	脳卒中モデル動物における神経系細胞の再生とSema4Dの関係
Author(s)	和田, 剛信
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57596
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"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 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	和田剛信
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 23725 号
学位授与年月日	平成22年3月23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	脳卒中モデル動物における神経系細胞の再生とSema4Dの関係
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 上崎 善規 准教授 西村 理行 講師 豊田 博紀

論文内容の要旨

神経回路形成には多くの誘引性、反発性の軸索ガイダンス因子が関わる事が知られている。このうち神経の成長円錐反発因子として同定されたセマフォリン分子は8つのクラスに分類されるファミリーを形成している。それらの一つである膜型セマフォリン Sema4D(S4D)は、成体動物の脳に広く発現しているが、その機能はよく分かっていない。先行研究において、S4D が成体大脳皮質における成熟オリゴデンドロサイトの制御に関与すると報告されているが、その機序は不明である。

本研究では、成体動物における一過性脳虚血モデル動物において、梗塞中心巣部では多くの神経系細胞が死滅しているが、梗塞巣近傍領域では細胞の生存と死が混在しており組織回復が見られることから、大脳皮質の梗塞巣近傍領域において、S4D 欠失が細胞増殖と細胞死へ及ぼす影響を調べた。梗塞後に BrdU (5-Bromodeoxyuridine) の投与による、神経系細胞の新たな増殖の経時的変化と、TUNEL 染色による細胞死を観察することで、成体動物の脳虚血後の神経修復再生過程における S4D 欠失の影響を明らかにする事を目的とした。

[材料と方法]

実験には60日齢のC57BL/6(野生型マウス)とS4D欠失ホモ接合型マウス(S4D欠失型マウス)を用いた。中大脳動脈結紮(tMCAO)による一過性脳虚血傷害モデル動物を作成した。手術方法は、ソムノペンチル腹腔内注射にて全身麻酔後、中大脳動脈

を露出後7-0ナイロン糸にて虚血させ、90分後に再灌流させた。tMCAO後、毎日BrdUを腹腔内投与して術後3~28日の動物を(n≧3各条件)を3、7、14、28日目にPLP固定液(0.075M Tris/0.01M sodium metaperiodate/0.05M phosphate buffer/2% paraformaldehyde)灌流固定を行った。脳を摘出してcryostatにて20μm厚の連続冠状断脳切片を作製し免疫組織化学に供した。染色には、BrdU抗体(増殖細胞)、TUNEL抗体(細胞死)、NeuN抗体(神経細胞)、NG2抗体(オリゴデンドロサイト前駆細胞)、GSTπ抗体、MAG抗体(成熟オリゴデンドロサイト)を用いた。

[研究結果]

- 1, BrdU陽性細胞がtMCAO後7日目では、S4D欠失マウスの梗塞巣近傍領域において野生型マウスと比較して1.52倍有意に増加した。
- 2, オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPCs)は、健側と比較して野生型マウスは梗塞後14日目に1.29倍増加した。一方、S4D欠失マウスでは、14日目に健側の1.75倍と有意に増加を示した。
- 3, GSTπ陽性のオリゴデンドロサイトは、健側と比較して野生型マウスでは梗塞後3日目に0.43倍と減少するが、その後徐々に回復して14日目に0.86倍と回復した。一方、S4D欠失マウスは健側に比べて7日目に0.42倍と一時減少したが、その後2週間後に1.00倍と健側と同程度の細胞数へ回復した。
- 4, BrdUとの二重免疫染色の結果、野生型マウス及びS4D欠失型マウスの両者ともに、OPCsやオリゴデンドロサイトはBrdUを取り込んでいたが、神経細胞はBrdUで標識されなかった。
- 5, TUNEL陽性細胞は、いずれの型のマウスも梗塞後7日目までにピークを示し、14日目以降のS4D欠失では野生型に比べ減少を示した。

[考察と結論]

生体動物脳におけるtMCAO後の増殖細胞において、S4D欠失マウスでは、野生型マウスと比較し梗塞巣近傍領域のBrdU陽性細胞が多くみられた事より、S4D欠失が脳虚血後の細胞増殖の誘導と、増殖細胞の生存を亢進させている可能性が考えられた。BrdU陽性細胞は梗塞後7日目、OPCs数は梗塞後14日にピークに達し、28日目で減少傾向を認めた事より、梗塞後14日目までが細胞増殖に重要な時期である事が示唆された。tMCAO後の細胞死において、TUNEL陽性細胞出現は遺伝子の型に関係なく梗塞後7日目までにピークとなり、28日目までの長期間で細胞死が観察された。野生型マウスにおいて、14日目以降の細胞死がS4D欠失マウスより多くみられ、14日目以降の野生型マウスのOPCsやオリゴデンドロサイト数がS4D欠失よりも少なくなった原因である可能性が考えられた。よって、S4Dが細胞増殖やオリゴデンドロサイトの

原因である可能性が考えられた。よって、S4D が細胞増殖やオリゴデンドロサイトの新生を抑制している可能性に加え、傷害後 14 日目以降の長期間細胞死を亢進する事により増殖分化したオリゴデンドロサイトを減少させる可能性が示唆された。

以上より、S4D が tMCAO 後の脳組織修復過程において、神経系細胞の回復に影響を及ぼしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では一過性脳虚血モデル動物を用いて中枢神経傷害に対する回復の役割について検討した。Sema4D 欠失させることは、大脳皮質梗塞巣近傍領域で、梗塞初期にオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を促進し、その後、アポトーシスを抑制することでオリゴデンドロサイト数を増加させていることを示した。

本研究は、今後、中枢神経傷害の回復に対する研究に有用な基礎的情報を提供するものであり、博士（歯学）の学位申請に値するものである。