


学位論文内容の要旨

受付番号	第 364 号	氏名	菊地隆太	
論文題名	マウス末梢神経切断後の一酸化窒素合成酵素 (NOS) の発現			
指導教員	高田 訓			

論文内容の要旨(2,000字程度)

I 研究目的(300字程度)

末梢神経が切断された場合、切断端中枢側には脱分化とともに増殖したシュワン細胞が遊走して細胞塊をつくり、この細胞塊内を軸索が伸長することが判明している。

一方、一酸化窒素 (NO) は神経伝達や免疫応答、血管系の調節などに関与していることがこれまでの研究で明らかになっている。このNOを産生する一酸化窒素合成酵素 (NOS) については、現在まで種々の末梢神経で発現が報告されており、in vitroでも神経細胞やシュワン細胞がNOSを発現することが判明している。しかし、切断端におけるNOSの発現については検討されていない。

そこで本研究では、マウス坐骨神経切断後、切断端中枢側における軸索とシュワン細胞でのNO産生とその機能を解明する目的で、各種NOSの発現とその局在を免疫組織化学的に検索した。

II 研究方法(500字程度)

実験動物には10週齢雄性C57BL/6JJc1系マウスを用いた。全身麻酔下に右側大腿外側部に切開を加え、坐骨神経を明示し、坐骨神経切断端を中枢側と末梢側に離断した。神経切断後、1日、7日、14日、21日目にペントバルビタールナトリウムで腹腔内麻酔を行い、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で灌流固定後、坐骨神経を摘出した。さらに、同液にて4℃24時間浸漬固定し、30%ショ糖液にて氷結防止処置を行い、Tissue Mountに包埋、クリオスタットで厚さ10 μ mの連続切片を作製した。切片は0.3% H_2O_2 含有メタノール溶液にて15分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化、ブロッキング、一次抗体による反応を行い、免疫組織化学的観察を行った。一次抗体としてnNOS (神経型NOS)、iNOS (誘導型NOS)、eNOS (内皮型NOS)、シュワン細胞のマーカーであるS100抗体、軸索のマーカーであるPGP9.5抗体を用いた。ABC法を施した後、DABにて発色を行い、5%メチルグリーンによる核染色後、光学顕微鏡にて観察した。加えて、nNOSがシュワン細胞または軸索に発現しているかを判別するため、nNOS抗体とS100抗体およびPGP9.5抗体を用い二重染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。なお、実験は奥羽大学動物実験委員会の承認を得て、奥羽大学実験動物指針を遵守し行った。

III 研究結果(600字程度)

正常坐骨神経において、nNOSの陽性反応は神経組織の一部である軸索にわずかながらみられ、二重免疫染色ではnNOSとS100の共発現は認められなかったが、nNOSとPGP9.5を共発現する部位が散在していた。iNOSの陽性反応は、神経組織とその周囲では観察されなかった。また、神経組織中の血管にeNOSの陽性反応が認められたが、神経線維にeNOSの陽性反応はみられなかった。

神経切断後1日における神経切断端でのnNOSの陽性反応は、切断端中枢側周囲の細胞に数多くみられた。iNOSの陽性反応は、切断端周囲に浸潤した円形細胞にみられたが、神経組織では陰性であった。eNOSの陽性反応は、神経切断端および周囲組織で認められなかった。二重免疫染色では、切断端にnNOSとS100の陽性反応がみられたが、nNOSとPGP9.5の陽性反応はほとんどみられなかった。切断後7日では、nNOSの陽性反応は、切断端周囲に散在する紡錘形の細胞にみられ、切断端から細胞塊を形成し、末梢側へと伸長していた。iNOSの陽性反応は、切断端周囲の円形細胞に弱くみられ、eNOSの陽性反応は細胞塊周囲の血管に認められた。二重免疫染色では、nNOSとS100の共発現がみられたが、PGP9.5とnNOSとの共発現はみられなかった。切断後14日では、切断端から伸長した細胞塊は切断後7日に比べて増加し、その細胞塊にnNOSの陽性反応がみられた。二重免疫染色では、nNOSとS100の共発現はほとんど観察されなかったが、nNOSとPGP9.5の共発現がみられた。切断後21日では、nNOSの陽性反応は伸長した神経組織内に散在性に観察された。二重免疫染色では、nNOSとS100の共発現はほとんど観察されなかったが、nNOSとPGP9.5では共発現がみられ、切断後14日に比べ増加していた。

IV 考察及び結論(600字程度)

正常坐骨神経では、nNOSの発現が軸索に認められたが、シュワン細胞には発現が認められなかったことから、軸索においてnNOSはシグナル伝達に関与している可能性が考えられた。坐骨神経切断後1日の切断端中枢側において、シュワン細胞にnNOSの陽性反応が確認されたことから、切断による刺激を受けた切断端表層のシュワン細胞がnNOSを発現し、NOを産生していると考えられた。切断後7日では、切断端中枢側から再生する神経組織の先端に、軸索の伸長に先立ち、nNOS陽性を示す細胞塊がS100と共発現していたことから、NOはシュワン細胞のシグナル放出や接着タンパクによる細胞塊形成に関与する可能性が伺われた。切断後14日では、nNOSとS100の共発現は観察されず、その後切断端から伸びだした神経組織に、nNOSとPGP9.5を共発現する部位をわずかであるが認められたため、軸索がnNOSを発現する状態となり、軸索でNOが産生されたことが示された。また、シュワン細胞塊に軸索の侵入が認められたことから、シュワン細胞塊内を軸索が通過するとシュワン細胞はNOの放出を停止することが示唆された。切断後21日では14日と同様に、二重免疫染色の結果からシュワン細胞ではnNOSは発現しておらず、軸索でnNOSが発現し、その陽性を示す分布密度は14日に比べ増加していた。このことから神経再生が進み、軸索が伸長するためにオートクライン的にNOを産生する可能性が考えられた。本研究結果から、神経切断後の末梢神経の再生過程に、シュワン細胞の増殖・遊走および軸索の伸長にNOが働くことが明らかとなった。