

マウス末梢神経切断後の一酸化窒素合成酵素(NOS)の発現

奥羽大学大学院歯学研究科顎口腔外科学専攻

菊 地 隆 太

(指導教員：高 田 訓)

Expression of Nitric Oxide Synthase (NOS) Isoforms  
after Peripheral Nerve Transection in Mice

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,  
Ozu University, Graduate School of Dentistry

Ryuta Kikuchi

(Director : Satoshi Takada)

## Abstract

Nitric oxide (NO) is involved in the regulation of many physiological processes, such as vascular relaxation, neurotransmission, and immune regulation. The involvement of NO in nerve cell death and neurodegenerative disease has been suggested. NO-synthesizing enzyme (nitric oxide synthase (NOS)) has been identified and its distribution and function in various tissues and organs have been investigated. There are 3 isoforms of NOS: nNOS present in nerve cells, eNOS present in vascular endothelial cells, and iNOS synthesizing NO in response to cytokine stimulation. In this study, to clarify the action of NOS in nerve regeneration after transection of the sciatic nerve in mice, we immunohistochemically investigated NOS expression.

The expression of nNOS was positive in some Schwann cells around the stumps on the central sides on day 1, and the number of nNOS-positive Schwann cells increased on day 7. On day 14, nNOS-positive Schwann cells were disappeared in the stumps, but nNOS was expressed in the growing axons from the stumps. The number of nNOS-positive axons increased on day 21. Inflammatory cells infiltrating around the stumps were expressed for iNOS on day 1, but the positivity level decreased after day 7. eNOS was expressed in blood vessels on the stump from day 7, and the number of eNOS-positive blood vessels decreased thereafter.

It was suggested that 3 isoforms of NOS are closely associated with the healing process after transection of the sciatic nerve in mice. Of note, NO may be involved in the proliferation and migration of Schwann cells, the regeneration of axon at the early days after transection of the nerve.

Key words: nitric oxide synthase, nNOS, sciatic nerve, nerve regeneration, Schwann cell, immunohistochemistry

## 和文抄録

一酸化窒素（NO）は、血管の弛緩、神経伝達や免疫系の調節などの多くの生理的過程に必要である。神経細胞死や神経変性疾患の発症には、NOが関わっていることが示唆されている。現在、種々の組織・器官において、NOを産生する酵素である一酸化窒素合成酵素（NOS）の局在とその機能が検討されている。NOSには、神経細胞に存在する nNOS、血管内皮細胞に存在する eNOS、サイトカインの刺激により NO を合成する iNOS の 3 種類のアイソフォームが存在している。そこで今回我々は、マウス坐骨神経切断後の神経変性と神経再生過程における NOS の働きを明らかにするために、NOS の発現を免疫組織化学的に検索した。

切断後 1 日において、切断端中枢側の周囲に nNOS 陽性を示すシュワン細胞が散在しており、その後、切断後 7 日では nNOS 陽性のシュワン細胞は増加した。切断後 14 日で切断端から nNOS 陽性のシュワン細胞はみられなくなり、代わって、切断端から伸長する軸索に nNOS が発現した。nNOS 陽性の軸索は 21 日では増加した。iNOS は、切断後 1 日では切断端周囲の炎症性細胞浸潤に発現していたが、切断後 7 日以降陽性反応は減弱した。切断後 7 日から eNOS は、切断端の血管に発現を示したが、その後、eNOS 陽性の血管は減少した。

以上のことから、マウス坐骨神経切断後には 3 種類の NOS が発現し、治癒過程に深く関連することが示唆された。特に、神経切断後早期に NO は、シュワン細胞の増殖と遊走および軸索の再生に関与することが考えられた。

キーワード：nitric oxide synthase, nNOS, 坐骨神経, 神経再生, シュワン細胞, 免疫組織化学

## 緒 言

末梢神経は旺盛な再生能をもち、傷害を受けても機能回復することが報告されているが、完全に断裂すると機能回復は難しいとされている<sup>1)</sup>。これまで、形態学的手法<sup>2)</sup>や遺伝子改変<sup>3)</sup>、iPS細胞の応用<sup>4)</sup>により、末梢神経損傷における神経再生過程の検索が行われてきた。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、このシュワン細胞からなる細胞塊、すなわち **nerve bridge** 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<sup>5)</sup>。この神経再生の過程には、**nerve growth factor (NGF)**<sup>6)</sup>、**brain derived neurotrophic factor (BDNF)**<sup>7)</sup>、**ciliary neurotrophic factor (CNTF)**<sup>8)</sup>、**fibroblast growth factor (FGF)**<sup>9)</sup>、**transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )**<sup>10)</sup>などの細胞増殖因子や転写因子<sup>11)</sup>およびシグナル伝達経路<sup>12)</sup>が関わっている。加えて、シュワン細胞の細胞膜には、様々な細胞接着分子が発現し、これらの分子が神経再生の促進に関与することが報告されている<sup>13)</sup>。末梢神経の軸索の伸長にはシュワン細胞と密接な関係があり、シュワン細胞が末梢神経の軸索の再生方向を示すガイドとして働く機構が存在すると考えられている<sup>5)</sup>。

一方、フリーラジカル的一种である一酸化窒素(以下; **NO**)は多数の分子ターゲットをもつメッセンジャーである<sup>14~16)</sup>。**NO**は受容体を介することなく細胞膜を自由に通過し、多くの機能を発揮することが知られており、神経伝達<sup>17)</sup>や免疫応答<sup>18)</sup>、血管系の調節<sup>19)</sup>の他にアポトーシス<sup>20)</sup>や創傷治癒<sup>21)</sup>にも関与している。この**NO**を産生する酵素である一酸化窒素合成酵素(以下;**NOS**)は3種類のアイソフォームからなり、アイソフォームの違いにより神経型**NOS**(以下;**nNOS**)、誘導型**NOS**(以下;**iNOS**)、内皮型**NOS**(以下;**eNOS**)に分類される<sup>22)</sup>。**nNOS**

は中枢神経および末梢神経の細胞体や軸索に恒常的に発現し、シグナル伝達に関与することが知られている<sup>23)</sup>。iNOSは炎症性サイトカイン、リポ多糖などにより発現が誘導され、免疫応答や生体防御に関与することが知られており<sup>24)</sup>、eNOSは血管内皮細胞や血小板などに発現して血管平滑筋弛緩による血圧の調整や血小板の粘着と凝集抑制に関わっていることが明らかにされている<sup>25)</sup>。しかし、これら3種のNOSの発現状況は生体の細胞や組織、臓器ごとに異なっており、それぞれに発現するNOSの種類や局在、機能に関して今なお検討され続けている<sup>26~28)</sup>。

これまで、種々の末梢神経でnNOSの発現が報告<sup>29~31)</sup>されており、*in vitro*では神経細胞やシュワン細胞でもnNOSを発現することが判明している<sup>32)</sup>。また、末梢神経を圧迫し損傷した場合には、損傷軸索を取り巻くシュワン細胞にnNOSが発現するといわれている<sup>33)</sup>。しかし末梢神経を切断した実験においては、切断された神経の脊髄後根神経節でのnNOSの発現を解析した報告<sup>34)</sup>はみられるものの、切断端におけるNOSの発現については検討されておらず、末梢神経切断後の神経再生過程におけるNOSの発現とその動態に関しては、現在まで不明である。

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NOS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。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

実験動物には10週齢、雄性C57BL/6JJcl系マウス（日本クレア、東京）を用いた。実験動物用固形飼料（オリエンタル酵母、東京）と水を自由に摂取させ、奥羽大学

実験研究施設内（室温 23℃，湿度 65%）で飼育した。なお，動物飼育は奥羽大学動物実験委員会の承認（動物実験許可番号：平成 27 年度第 2015-24 号）を得て，奥羽大学動物実験規程を遵守し行った。

## 2. 手術方法

メデトミジン（0.15mg/kg），ミダゾラム（2mg/kg）およびブトルファノール（5.0mg/kg）の三種混合麻酔薬の腹腔内投与で麻酔を行った後，右側大腿部外側面を剃毛し，大腿二頭筋の起始部直下で同神経を剖出させ，大転子の近位で完全に神経を切断した。さらに切断部より遠位の坐骨神経を 1 mm 切除し連続性を完全に絶ち，坐骨神経切断端を中枢側と末梢側に離断した。その後，絹糸を用いて完全閉鎖創として終了した。手術後は鎮痛薬としてメロキシカム（0.2mg/kg）を最長 3 日間，24 時間おきに皮下注射した。

## 3. 試料作製方法

坐骨神経を切断したマウスは，切断後 1 日，7 日，14 日，21 日目にジエチルエーテル吸入麻酔後にペントバルビタールナトリウム（50mg/kg）の腹腔内投与を行い，開胸して左心室より生理食塩水を灌流した。その後，4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（pH7.4）で灌流固定後，切断した坐骨神経を周囲筋組織とともに摘出した。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（白井松器機，東京）に包埋，液体窒素で急速凍結し，クリオスタット（MICROM, Germany）にて，厚さ 10μm の坐骨神経縦断面の連続切片を作製した。切片にはヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色および免疫組織化学的染色を行い，光学顕微鏡下にて観察した。

## 4. 免疫組織化学的染色

薄切標本は、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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した。次いで 10% 正常ヤギまたは正常ウサギ血清 (VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit, VECTOR Lab. Inc., CA, USA) にて 1 時間、ブロッキング処理を行い、その後一次抗体を反応させた。

本研究では一次抗体として、抗ヒト nNOS ヤギポリクローナル抗体 (Life Span BioSciences Inc., WA, USA) (希釈倍率 1:1000)、抗ヒト iNOS ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) (希釈倍率 1:5000)、抗ヒト eNOS ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) (希釈倍率 1:10000)、ならびにシュワン細胞を識別するための抗 S100 タンパクウサギポリクローナル抗体 (ニチレイバイオサイエンス, 東京) (希釈倍率 1:100) および末梢神経軸索を標識するため抗ヒト PGP9.5 ウサギポリクローナル抗体 (Ultraclone Inc., UK) (希釈倍率 1:10000) を用いた。各一次抗体は室温にて、12 時間反応させた。

次に、二次抗体としてビオチン標識抗ヤギ・ウサギ抗体もしくはビオチン標識抗ウサギ・ヤギ抗体 (VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit, VECTOR Lab. Inc., CA, USA) を室温にて 1 時間、その後ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン (VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit, VECTOR Lab. Inc., CA, USA) を 1 時間室温にて反応させた。3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (ニチレイバイオサイエンス, 東京) にて発色を行い、5% methyl green (武藤化学薬品, 東京) にて核染後、光学顕微鏡下にて観察を行った。また、切片の洗浄には 0.05M Tris 塩酸緩衝液 (pH7.6) を、抗血清の希釈には 0.1M phosphate buffered saline (PBS) (pH7.4) を用いた。免疫染色の陰性対照として、一次抗体の代わりに正常ウ

サギまたはヤギ血清 (DAKO Corp., CA, USA) を用いて同様の反応を行った。

nNOS と S100 タンパクの二重蛍光免疫染色ならびに nNOS と PGP9.5 の二重蛍光免疫染色は、まず 10% 正常ロバ血清 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) を用い 1 時間ブロッキング処理を行い、各抗体の希釈倍率を 1:100 とした抗体混合液を室温にて 12 時間反応させた。次いで、Alexa Fluor 488 標識抗ヤギ・ロバ抗体 (Bioss Inc., MA, USA) (希釈倍率 1:100) と Alexa Fluor 555 標識抗ウサギ・ロバ抗体 (Bioss Inc., MA, USA) (希釈倍率 1:100) の抗体混合液を暗室内にて 2 時間室温で反応させ、封入後直ちに蛍光顕微鏡下にて観察した。

## 結 果

### 1. 正常坐骨神経における各 NOS の局在

坐骨神経は周囲を神経上膜に包まれ、多くの神経線維が束をなして走行しており、内部には血管も観察された (図 1 a)。

nNOS の陽性反応は神経組織の一部にわずかながらみられ、神経上膜の結合組織中にも陽性反応が認められた (図 1 b)。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 (図 1 c)。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 (図 1 d)。神経組織中に、S100 タンパクで標識されたシュワン細胞が軸索の走行と一致して配列していた (図 1 e)。また、PGP9.5 を用いた染色では、多くの軸索に陽性反応がみられた (図 1 f)。

抗 nNOS 抗体と抗 S100 タンパク抗体を用いた二重蛍光免疫染色では、nNOS と S100 タンパクの共発現は認められなかった (図 2 a~c)。これに対して、抗 nNOS 抗体と

抗 PGP9.5 抗体を用いた二重蛍光免疫染色では，nNOS と PGP9.5 を共発現する部位が散在していた（図 2 d~f）。

## 2. 神経切断後 1 日における各 NOS の局在

神経切断端の細胞は正常と異なり膨化を認め，周囲には炎症反応に伴う円形細胞の浸潤がみられた（図 3 a）。

nNOS の陽性反応は切断端周囲に浸潤する数多くの円形細胞にみられ，特に切断端に密集していた。切断端神経組織の nNOS 陽性反応は，正常坐骨神経における nNOS の陽性反応に比べ増強していた（図 3 b）。iNOS 染色では切断端周囲に浸潤した円形細胞に陽性反応が出現していたが，神経組織では陰性であった（図 3 c）。eNOS 染色では，神経切断端および周囲組織で顕著な陽性反応は認められなかった（図 3 d）。S100 タンパク染色により標識されたシュワン細胞は切断端に密集しており，正常坐骨神経におけるシュワン細胞の配列様式がみられ，一定の方向性が失われていた（図 3 e）。PGP9.5 染色では，切断端において多くの軸索が陽性反応を示していたが，正常坐骨神経と比べ膨化していた（図 3 f）。

抗 nNOS 抗体と抗 S100 タンパク抗体を用いた二重免疫染色では，切断端に nNOS と S100 タンパクの陽性反応がみられ，正常坐骨神経では観察されなかった nNOS と S100 タンパクの共発現がみられた。加えて，nNOS のみを発現する細胞もみられた（図 4 a~c）。これに対して，抗 nNOS 抗体と抗 PGP9.5 抗体を用いた二重蛍光免疫染色では，nNOS と PGP9.5 を共発現する部位はほとんどみられなかった（図 4 d~f）。

## 3. 神経切断後 7 日における各 NOS の局在

切断後 7 日では，多くの紡錘形の細胞が密集し，細胞塊を形成して切断端より末梢側へと伸長していた。切断端では，1 日で観察された膨化した細胞は存在していなかった。伸長した nerve bridge の周囲では，円形細胞は

ほとんど観察されなくなり，代わって口径の小さな血管が著明に増殖していた（図 5 a）。

nNOS の陽性反応は，切断端周囲に散在する細胞にみられ，特に紡錘形の細胞で強い傾向であった。nNOS 陽性を示す紡錘形細胞は，切断端から細胞塊を形成し，末梢側へと伸長していた（図 5 b）。iNOS の反応は，切断端周囲の残存する円形細胞に弱い陽性反応がみられた（図 5 c）。eNOS の反応は，伸長した細胞塊の周囲に増殖した血管に陽性であった（図 5 d）。シュワン細胞のマーカーである S100 タンパクに陽性を示す細胞は，切断端に密集して細胞塊を形成し，末梢側へと伸長していた（図 5 e）。PGP9.5 染色では，切断端から伸長した神経組織内に PGP9.5 陽性を示す軸索の侵入はほとんど観察されなかった（図 5 f）。

抗 nNOS 抗体と抗 S100 タンパク抗体を用いた二重蛍光免疫染色では，切断端から伸長する細胞塊に nNOS と S100 タンパクの共発現がみられた。また，細胞塊を形成せずに散在する細胞でも nNOS と S100 タンパクの共発現が多く認められた（図 6 a~c）。抗 nNOS 抗体と抗 PGP9.5 抗体を用いた二重蛍光免疫染色では，PGP9.5 を発現する微細な軸索が観察されたが，nNOS との共発現はみられなかった（図 6 d~f）。

#### 4. 神経切断後 14 日における各 NOS の局在

切断端から伸長した細胞塊は切断後 7 日に比べ，増加しており，かつ神経組織として密集した形態を呈していた（図 7 a）。

nNOS の陽性反応を示す細胞の数は，切断端から伸長した神経組織内にみられたが，切断後 7 日に比べ減少していた（図 7 b）。iNOS の反応は，切断端周囲では陰性であった（図 7 c）が，切断端から伸長した神経組織の微細な血管に eNOS の弱陽性反応がみられた（図 7 d）。S100 タ

ンパクを用いた染色では、伸長した神経組織内において、7日後と比べ、シュワン細胞が増加していた。しかし、切断後7日ではシュワン細胞は細長い細胞塊を形成していたのに対して、切断後14日では幅広い細胞塊となっていた(図7e)。PGP9.5染色では、7日ではほとんど観察されなかったが、数多くのPGP9.5陽性軸索が末梢側に向かい伸長していた(図7f)。

抗nNOS抗体と抗S100抗体を用いた二重蛍光免疫染色では、nNOSのみを発現する細胞とS100タンパクのみを発現する細胞が多数みられたが、nNOSとS100タンパクの共発現はほとんど観察されなかった(図8a~c)。抗nNOS抗体と抗PGP9.5抗体を用いた二重蛍光免疫染色では、nNOSのみを発現する細胞とPGP9.5のみを発現する細胞が多数みられたのに加え、切断後7日では観察されなかったnNOSとPGP9.5の共発現がみられた(図8d~f)。

#### 5. 神経切断後21日における各NOSの局在

切断端から伸長した軸索は、さらに太さを増し、神経上膜の形成はみられないものの、密に走行していた。また、伸長した神経組織内には血管の侵入も観察された(図9a)。

nNOSの反応は、伸長した神経組織内に陽性細胞が散在しており、その分布密度は切断後14日と比べ増加していた(図9b)。iNOSの陽性反応は、切断後14日と同様に伸長した神経組織ではみられなかった(図9c)。eNOSの反応は、密に形成された神経組織内に侵入した血管が陽性を示していた(図9d)。S100タンパク染色においては、伸長した神経組織内で切断後14日と比べ、さらにシュワン細胞の数が増加していた。切断後21日におけるシュワン細胞は、索状に配列し、軸索の走行と同様な走行様式を示していた(図9e)。PGP9.5染色では、末梢側に

向かい伸長する細長い軸索が数多くみられ，その数は切断後 14 日に比べ増加していた（図 9 f）。

抗 nNOS 抗体と抗 S100 タンパク抗体を用いた二重蛍光免疫染色では，nNOS のみを発現する細胞と S100 のみを発現する細胞が多数みられたが，切断後 14 日と同様に，nNOS と S100 タンパクの共発現はほとんど観察されなかった（図 10 a~c）。これに対して，抗 nNOS 抗体と抗 PGP9.5 抗体を用いた二重蛍光免疫染色では，nNOS と PGP9.5 の共発現がみられ，共発現を示す細胞の数は切断後 14 日に比べ増加していた（図 10 d~f）。

なお，正常坐骨神経と切断後の坐骨神経の S100 タンパク陽性細胞および PGP9.5 陽性細胞における nNOS の経時的発現状況を表に示す（表 1）。

## 考 察

末梢神経の再生過程を解析する研究には，旺盛な再生能をもつマウスが用いられることから<sup>13)</sup>，本研究でもマウス坐骨神経を用い，神経切断後の神経再生過程を形態学的手法により検討した。観察部位は神経切断後シュワン細胞にガイドされ再生する神経組織，特に軸索の再生に焦点を絞るため，切断端中枢側を検索対象とした。また，正常時<sup>23)</sup>や損傷時<sup>33, 34)</sup>において発現が着目されている NOS を検索分子として，神経再生過程での発現細胞とその機能に関して検討した。

まず，正常坐骨神経では，nNOS の発現がわずかながら PGP9.5 で標識される軸索に認められた。しかしながら，S100 で標識されるシュワン細胞には発現が認められなかったことから，正常時のシュワン細胞では nNOS は発現していないことが示された。軸索に nNOS の陽性が認められたことは，従来の報告<sup>23)</sup>と同様に，シグナル伝達が行われているためと考える。また，eNOS も坐骨神

経組織中の一部の血管内皮細胞に発現がみられたが、これは他の器官において通常確認される血流調節などの機能と同様の現象<sup>25)</sup>が坐骨神経組織においても観察される結果であるとみなされる。これに対して、iNOSの発現は正常坐骨神経では確認されなかった。iNOSは、サイトカインやリポ多糖などの刺激因子により炎症時に発現されるとされている<sup>35)</sup>。正常坐骨神経では炎症反応が随時起きているとは考えられないため、iNOSの発現が観察されなかったと考える。

坐骨神経切断後1日の切断端中枢側において、正常とは異なり軸索断端の膨化を認め、周囲に炎症性細胞浸潤が認められた。nNOSとS100タンパクの二重蛍光免疫染色像では、切断端表層にはS100タンパクで標識されるシュワン細胞に、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を産生していることが示唆された。しかし、PGP9.5で標識される軸索では、nNOSの発現が認められなかったことから、軸索ではNOを産生していないことが伺える。これまで、坐骨神経切断後のシュワン細胞を培養した実験で培養シュワン細胞がnNOSを発現し、神経再生の誘導の可能性を示唆した報告<sup>32)</sup>がある。この報告より、本研究の神経切断後1日目にみられるシュワン細胞におけるnNOSの発現は、神経再生を促すことに関与する可能性が考えられる。切断端では炎症性細胞とみられる円形を呈した細胞が数多く観察され、この細胞にiNOSの陽性反応が認められた。坐骨神経を結紮することにより、その圧迫刺激から結紮部周囲にiNOSの陽性反応を認めた報告<sup>36)</sup>もあり、この結果は切断刺激により炎症性サイトカインなどが誘発されたことによる炎症反応が惹起されたものであると考えられた。一方、eNOSの発現は切断端において認められなかった

ことは、神経再生過程に eNOS が関与しない結果であり、切断後 1 日では血管新生も行われてはいないためであると考えられる。

坐骨神経切断後 7 日で、切断端中枢側から再生する神経組織の先端に nNOS 陽性を示す細胞が観察され、細胞塊を形成し末梢側へと伸長していた。この nNOS 陽性を示す細胞は、nNOS と S100 タンパクの二重蛍光免疫染色で共発現が認められたことからシュワン細胞と同定された。7 日後にみられた細胞塊の周囲に散在する細胞に多くの共発現がみられたことから、切断端周囲には nNOS を発現するシュワン細胞が増加していると考えられた。また、PGP9.5 で標識された軸索は短く観察されたが、nNOS との二重蛍光免疫染色による共発現は観察されなかった。この結果から軸索は短く伸長しているが、NO は産生していないと考えられた。さらに、eNOS を発現する微細な血管が多く認められたことから、細胞塊周囲に新生血管が増殖、切断された神経組織の修復に eNOS が関与することが考えられる。また、神経損傷時に血管からのシグナルがシュワン細胞の遊走を促進させる働きがあるとの報告もある<sup>37)</sup>。血管における eNOS の発現は、NO の産生がシュワン細胞周囲のフリーラジカル環境に働きかけ、シュワン細胞の活発な活動を維持することにも関与する可能性があるとも推察される。

再生する軸索が伸長する場合、シュワン鞘が形成されて後に軸索がシュワン鞘に向かって再生すること、シュワン細胞が再生軸索の方向づけに影響を及ぼすことが知られている<sup>38)</sup>。また、末梢神経が切断されると、再生のために遊走したシュワン細胞は脱分化し、幼弱な細胞に戻ることが可能であり、シュワン細胞は線維芽細胞とともに切断端中枢側において nerve bridge と呼ばれる細胞塊として群がり、EphrinB-EphB2 シグナル伝達の結果、

Sox2 を上昇させることでシュワン細胞表面に N カドヘリンが局在して，nerve bridge 内に切断端中枢側から伸長した軸索が侵入する<sup>5)</sup>。以上より，本研究においてもシュワン細胞が軸索の伸長を誘導するために，軸索の伸長に先立ち遊走し，細胞塊，すなわち nerve bridge を形成したと考えられる。この過程において 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。

坐骨神経切断後 14 日では，切断端から伸長した細胞塊はさらに増加していた。二重蛍光免疫染色により，nNOS と S100 の共発現は観察されず，シュワン細胞での nNOS の発現は消失し，NO を産生していないことを示した。これに対して，切断端から伸長した神経組織に 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。これは軸索が nNOS を発現する状態となり，軸索で NO 産生が開始された結果である。また，わずかにシュワン細胞塊への軸索の侵入も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。

坐骨神経切断後 21 日では，二重蛍光免疫染色の結果から 14 日と同様にシュワン細胞では nNOS は発現しておらず，軸索で nNOS が発現しその分布密度は切断後 14 日に比べ増加していた。切断後 21 日の再生軸索における NO の産生については，坐骨神経切断後の脊髄後根神経節に nNOS が発現して，神経再生の促進に関わるという報告<sup>34)</sup>があり，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。切断後 21 日以降の軸索の再生と伸長に関しては，切断端末梢側における NO 産生も考慮に入れ検索する必要があると思われた。

本研究結果から，末梢神経では正常時および切断後において，nNOS を介して NO が軸索またはシュワン細胞か

ら神経再生の過程に応じて、段階的に産生されることが推察された。つまり、神経切断後の神経組織における nNOS は、切断後初期の増殖するシュワン細胞に強く発現し、軸索がシュワン細胞塊を通り抜けた 14 日後では、シュワン細胞において消失し、代わって軸索に発現していた。これらの発現調整は、再生される軸索とシュワン細胞間で何らかの情報交換が行われなくては成立しない。再生軸索とシュワン細胞間には、細胞接着分子を介した接着があり、neural cell adhesion molecule (NCAM) などの接着分子がシュワン細胞の足場として軸索伸長に役立ち、さらに tight junction や gap junction が軸索とシュワン細胞間に介在することが知られている<sup>39)</sup>。この報告では、軸索とシュワン細胞間にはある種の情報が交換され、両者が接触することにより、軸索が伸長するという機構が存在すると述べられている。本研究においても神経切断後 14 日目でシュワン細胞塊に軸索が侵入していたことから、ここにも軸索とシュワン細胞の情報交換がなされており、nNOS を介した NO が情報伝達物質として働き、相互作用が発揮される可能性が考えられた。また、シュワン細胞の表面には基底膜があり、この中に laminin, fibronectin, tenascin-C などの軸索突起伸長において支持的な働きを担うとされるタンパクが存在する<sup>13)</sup>。本研究では神経切断後 1 日目と 7 日目に nNOS がシュワン細胞に発現を認めたことから、NO が軸索伸長を促す目的でシュワン細胞において支持的に働いている可能性も示唆された。いずれにしても、神経周膜や基底膜の再生は、神経切断後の予後を左右する現象であり、nNOS を介した NO 産生が影響を及ぼす可能性が考えられた。

## 結 論

マウス坐骨神経および神経切断後の再生過程における

NOS の発現とその局在について免疫組織学的に検索し、以下の結論を得た。

1. 正常坐骨神経において、軸索の一部に nNOS の発現が観察されたが、シュワン細胞では nNOS の発現は認められなかった。また、eNOS を発現する血管も観察されたが、iNOS の発現はみられなかった。

2. nNOS は、神経切断後 1 日で切断端周囲に散在するシュワン細胞に発現していた。その後 7 日で nNOS を発現するシュワン細胞は増殖し、切断端に細胞塊を形成したが、14 日では nNOS を発現するシュワン細胞は観察されなかった。

3. 切断後 14 日で切断端から伸長する軸索に nNOS の発現が出現し、21 日では数多くの伸長する軸索に、nNOS の発現が認められた。

4. 切断後 1 日の切断端周囲に、iNOS を発現する円形細胞が数多くみられたが、徐々に減少し、14 日では観察されなかった。

5. eNOS の発現は、切断後 1 日の切断端周囲ではみられなかったが、7 日では eNOS を発現する微細な血管が多数観察され、以降減少した。

以上のことから、マウス坐骨神経切断後には 3 種の NOS が発現し、再生過程に深く関連することが示唆された。特に、nNOS の発現が切断後早期のシュワン細胞と切断後 14 日以降における伸長する軸索に認められたことから、一酸化窒素がシュワン細胞の増殖と遊走および軸索の再生に関与することが考えられた。

本論文の要旨は、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会（平成 27 年 3 月 神戸）、第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会（平成 27 年 9 月 新潟）、第 60 回奥羽大学歯学会（平成 27

年 11 月 郡山) において発表した。

#### 利益相反

本論文に関して，開示すべき利益相反は無い。

#### 参考文献

- 1) Chhabra, A., Ahlawat, S., Belzberg, A., Andreseik, G. : Peripheral nerve injury grading simplified on MR neurography: As referenced to Seddon and Sunderland classifications. **24**;217-224 2014.
- 2) Martini, R., Schachner, M. : Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J. Cell. Biol.* **106**;1735-1746 1988.
- 3) Grochmal, J., Midha, R. : Recent advances in stem cell-mediated peripheral nerve repair. *Cells Tissues Organs.* **200**;13-22 2014.
- 4) Xu, W., Cox, C.S., Li, Y. : Induced pluripotent stem cells for peripheral nerve regeneration. *J. Stem Cells.* **6**;39-49 2011.
- 5) Kim, H.A., Mindos, T., Parkinson, D.B. : Plastic fantastic: Schwann cells and repair of the peripheral nervous system. *Stem Cells Transl. Med.* **2**;553-557 2013.
- 6) Verge, V.M., Riopelle, R.J., Richardson, P.M. : Nerve growth factor receptors on normal and injured sensory neurons. *J. Neurosci.* **9**;914-922 1989.
- 7) Mansour-Robaey, S., Clarke, D.B., Wang, Y.C., Bray, G.M., Aguayo, A.J. : Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on

- survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **91**;1632-1636 1994.
- 8) Rezende, A.C.S., Vieira, A.S., Rogério, F., Rezende, L.F., Boschero, A.C., Negro, A., Langone, F. : Effects of systemic administration of ciliary neurotrophic factor on Bax and Bcl-2 proteins in the lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection. Braz. J. Med. Biol. Res. **41**;1024-1028 2008.
- 9) Jungnickel, J., Haase, K., Konitzer, J., Timmer, M., Grothe, C. : Faster nerve regeneration after sciatic nerve injury in mice over-expressing basic fibroblast growth factor. J. Neurobiol. **66**;940-948 2006.
- 10) Scherer, S.S., Kamholz, J., Jakowlew, S.B. : Axons modulate the expression of transforming growth factor-betas in Schwann cells. Glia. **8**;265-276 1993.
- 11) Le, N., Nagarajan, R., Wang, J.Y., Araki, T., Schmidt, R.E., Milbrandt, J. : Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **102**;2596-2601 2005.
- 12) Parrinello, S., Napoli, I., Ribeiro, S., Wingfield, Digby.P., Fedorova, M., Parkinson, D.B., Doddrell, R.D., Nakayama, M., Adams, R.H., Lloyd, A.C. : EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. Cell. **143**;145-155. 2010.
- 13) Hall, S. : Nerve repair: a neurobiologist's view. J. Hand. Surg. Br. **26**;129-136 2001.
- 14) Förstermann, U, Sessa, W.C. : Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur. Heart. J. **33**;829-837 2012.

- 15) Magrinat, G., Mason, S.N., Shami, P.J., Weinberg, J.B. : Nitric oxide modulation of human leukemia cell differentiation and gene expression. *Blood*. **80**;1880-1884 1992.
- 16) O'Dell, T.J., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., Arancio, O. : Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **88**;11285-11289 1991.
- 17) Oh, S. : The generation of nitric oxide and its roles in neurotransmission and neurotoxicity. *Keio J. Med*. **44**;53-61 1995.
- 18) Hesse, M., Cheever, A.W., Jankovic, D., Wynn, T.A. : NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. *Am. J. Pathol*. **157**;945-955 2000.
- 19) Förstermann, U., Mülsch, A., Böhme, E., Busse, R. : Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ. Res*. **58**;531-538 1986.
- 20) Brüne, B., von, Knethen, A., Sandau, K.B. : Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell. Death. Differ*. **6**;969-975 1999.
- 21) Ghalayani, P., Jahanshahi, G., Birang, R., Bazazzadeh, M. : Assessment of the effect of diode laser therapy on incisional wound healing and expression of iNOS and eNOS on rat oral tissue. *Dent. Res. J. (Isfahan)*. **10**;348-52 2013.
- 22) Poulos, T.L., Li, H. : Structural basis for

- isoform-selective inhibition in nitric oxide synthase. *Acc. Chem. Res.* **46**;390-398 2013.
- 23) Melikian, N., Seddon, M.D., Casadei, B., Chowienczyk, P.J., Shah, A.M. : Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. *Trends. Cardiovasc. Med.* **19**;256-262 2009.
- 24) Sato, K., Miyakawa, K., Takeya, M., Hattori, R., Yu i, Y., Sunamoto, M., Ichimori, Y., Ushio, Y., Takahashi, K. : Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in reversible endotoxic shock studied by a novel monoclonal antibody against rat iNOS. **57**;36-44. 1995.
- 25) Klahr, S. : The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrol. Dial. Transplant.* **16**;60-62 2001.
- 26) Ambe, K., Watanabe, H., Takahashi, S., Nakagawa, T., J, Sasaki. : Production and physiological role of NO in the oral cavity. *Japanese Dental Science Review.* **51**;in Press.
- 27) Ishioka, M., Ishizuka, Y., Shintani, S., Yanagisawa, T., Inoue, T., Sasaki, .J, Watanabe, H. : Expression profiles of NOS isoforms in gingiva of nNOS knockout mice. *Tissue. Cell.* **46**;122-126 2014.
- 28) Kuwana, M., Watanabe, H., Abe, S., Yanagisawa, T., Sasaki, J. : Expression of Mn-SOD, iNOS and eNOS mRNAs in osteoblasts from the maxilla of osteopetrotic mice. *Anat. Histol. Embryol.* **42**;124-129 2013.
- 29) Chakder, S., Bandyopadhyay, A., Rattan, S. : Neuronal NOS gene expression in gastrointestinal myenteric neurons and smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **273**;1868-1875 1997.

- 30) Gonzalez-Cadavid, N.F., Burnett, A.L., Magee, T.R., Zeller, C.B., Vernet, D., Smith, N., Gitter, J., Rajfer, J. : Expression of penile neuronal nitric oxide synthase variants in the rat and mouse penile nerves. *Biol. Reprod.* **63**;704-714 2000.
- 31) Flowerdew, S.E., Wick, D., Himmelein, S., Horn, A.K., Sinicina, I., Strupp, M., Brandt, T., Theil, D., Hübner, K. : Characterization of neuronal populations in the human trigeminal ganglion and their association with latent herpes simplex virus-1 infection. *PLOS ONE* **8**;e83603 2013.
- 32) Shen, A., Gao, S., Ben, Z., Wang, H., Jia, J., Tao, T., Niu, S., Li, X., Cheng, C. : Identification and potential role of PSD-95 in Schwann cells. *Neurol. Sci.* **29**;321-330 2008.
- 33) Gao, S., Fei, M., Cheng, C., Yu, X., Chen, M., Shi, S., Qin, J., Guo, Z., Shen, A. : Spatiotemporal expression of PSD-95 and nNOS after rat sciatic nerve injury. *Neurochem. Res.* **33**;1090-1100 2008.
- 34) Verge, V.M., Xu, Z., Xu, X.J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T. : Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**;11617-11621 1992.
- 35) Mills, C.D., Thomas, A.C., Lenz, L.L., Munder, M. : Macrophage: SHIP of Immunity. *Front. Immunol.* **5**;620 2014.
- 36) González-Hernández, T., Rustioni, A. : Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. *J. Neurosci. Res.* **55**;198-207 1999.
- 37) Cattin, A.L., Burden, J.J., Van, Emmenis.L., Mackenzie,

F.E., Hoving, J.J., Garcia, Calavia.N., Guo, Y., McLaughlin, M., Rosenberg, L.H., Quereda, V., Jamecna, D., Napoli, I., Parrinello, S., Enver, T., Ruhrberg, C., Lloyd, A.C. : Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell*. **162**;1127-39 2015.

38) OHMI, S. : Electron microscopy of peripheral nerve regeneration. **56**;625-631 1962.

39) Dezawa, M., Adachi-Usami, E. : Role of Schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration. *Prog. Retin. Eye. Res.* **19**;171-204 2000.

## 図表の解説

図 1 : 正常坐骨神経における H-E 染色像および各 NOS 抗体と S100 タンパク抗体, PGP9.5 抗体による免疫染色像

a : H-E 染色, b : nNOS, c : iNOS, d : eNOS, e : S100,  
f : PGP9.5 bar=100 $\mu$ m

坐骨神経は多くの神経線維が束をなして走行し, 内部には血管 (white arrow) もみられる。nNOS の陽性反応は神経組織の一部 (black arrow), eNOS の陽性反応は神経組織中の血管 (white arrow) にみられるが, iNOS は陰性である。神経組織中に, S100 タンパクで標識されるシュワン細胞 (black arrowhead) が索状に配列し, PGP9.5 で標識される軸索が数多く走行する。

図 2 : 正常坐骨神経における nNOS 抗体と S100 タンパク抗体, PGP9.5 抗体との二重蛍光免疫染色像

a : nNOS(green), b : S100(red), c : Merge(yellow),  
d : nNOS(green), e : PGP9.5 (red), f : Merge(yellow),  
bar=100 $\mu$ m

nNOS と S100 タンパクの共発現部位はみられないが, nNOS と PGP9.5 を共発現する部位 (white arrow) が観察される。

図 3 : 神経切断後 1 日における H-E 染色像および各 NOS 抗体と S100 タンパク抗体, PGP9.5 抗体による免疫染色像

a : H-E 染色, b : nNOS, c : iNOS, d : eNOS, e : S100,  
f : PGP9.5 bar=100 $\mu$ m

神経切断端 (dotted line) の細胞は膨化しており, 周囲には円形細胞 (asterisk) が浸潤する。切断端に nNOS 陽性細胞 (black arrow) が散在しており, 切断端周囲に浸潤した円形細胞 (asterisk) は iNOS 陽性である。eNOS の陽性反応は, みられない。切断端に S100 タンパクで

標識されたシュワン細胞 (black arrowhead) と PGP9.5 で標識された軸索 (white arrowhead) が密集している。  
図 4 : 神経切断後 1 日における nNOS 抗体と S100 タンパク抗体, PGP9.5 抗体との二重蛍光免疫染色像

a : nNOS(green), b : S100(red), c : Merge(yellow),  
d : nNOS(green), e : PGP9.5 (red), f : Merge(yellow),  
bar=100 $\mu$ m

神経切断端に nNOS と S100 タンパク, PGP9.5 の発現が強くみられ, nNOS と S100 タンパクの共発現が観察される (white arrow)。しかし, nNOS と PGP9.5 の共発現する部位はみられない。

図 5 : 神経切断後 7 日における H-E 染色像および各 NOS 抗体と S100 タンパク抗体, PGP9.5 抗体による免疫染色像

a : H-E 染色, b : nNOS, c : iNOS, d : eNOS, e : S100,  
f : PGP9.5 bar=100 $\mu$ m

神経切断端 (red dotted line) には紡錘形の細胞が密集, 細胞塊 (yellow dotted line) を形成し伸長している。切断端から伸長する細胞塊に nNOS の陽性反応 (black arrow) がみられ, 周囲の円形細胞には iNOS の弱陽性反応が観察される。eNOS は, 細胞塊周囲の微細な血管 (white arrow) に陽性反応がみられる。切断端から S100 タンパクで標識されたシュワン細胞 (black arrowhead) が密集し細胞塊を形成しているが, PGP9.5 で標識された軸索の侵入はほとんどみられない。

図 6 : 神経切断後 7 日における nNOS 抗体と S100 タンパク抗体, PGP9.5 抗体との二重蛍光免疫染色像

a : nNOS(green), b : S100(red), c : Merge(yellow),  
d : nNOS(green), e : PGP9.5 (red), f : Merge(yellow),  
bar=100 $\mu$ m

神経切断端から伸長する細胞塊に nNOS と S100 タンパ

クの発現が強くみられ，nNOS と S100 タンパクは共発現している（white arrow）。しかし，nNOS と PGP9.5 の共発現はみられない。

図 7：神経切断後 14 日における H-E 染色像および各 NOS 抗体と S100 タンパク抗体，PGP9.5 抗体による免疫染色像

a：H-E 染色，b：nNOS，c：iNOS，d：eNOS，e：S100，  
f：PGP9.5 bar=100 $\mu$ m

神経切断端から伸長する細胞塊（yellow dotted line）は増加し，密集している。nNOS 陽性細胞（black arrow）は，切断端から伸長した神経組織内にみられるが，7 日目に比べ分布は疎である。iNOS は陰性であるが，伸長した神経組織の血管に eNOS の弱陽性反応がみられる。伸長した神経組織内には数多くの S100 タンパクで標識されたシュワン細胞（black arrowhead）と PGP9.5 で標識された軸索（white arrowhead）がみられる。

図 8：神経切断後 14 日における nNOS 抗体と S100 タンパク抗体，PGP9.5 抗体との二重蛍光免疫染色像

a：nNOS(green)，b：S100(red)，c：Merge(yellow)，  
d：nNOS(green)，e：PGP9.5 (red)，f：Merge(yellow)，  
bar=100 $\mu$ m

神経切断端から伸長する神経組織内に nNOS と S100 タンパクの発現はみられるものの，共発現はみられない。しかし，伸長する神経組織内には nNOS と PGP9.5 を共発現する部位がわずかにみられる（white arrow）。

図 9：神経切断後 21 日における H-E 染色像および各 NOS 抗体と S100 タンパク抗体，PGP9.5 抗体による免疫染色像

a：H-E 染色，b：nNOS，c：iNOS，d：eNOS，e：S100，  
f：PGP9.5 bar=100 $\mu$ m

神経切断端から伸長した軸索は口径を増し，密に走行している。さらに，軸索間には太い血管（white arrow）が形成されている。nNOS 陽性細胞（black arrow）は，切断端から伸長した神経組織内に散在しているが，iNOS 陽性細胞は観察されない。軸索間には，eNOS 陽性の血管（white arrow）が侵入している。伸長した神経組織内には，S100 タンパクで標識されたシュワン細胞（black arrowhead）と PGP9.5 で標識された軸索（white arrowhead）がみられ，14 日目に比べ増加している。

図 10：神経切断後 21 日における nNOS 抗体と S100 タンパク抗体，PGP9.5 抗体との二重蛍光免疫染色像

a : nNOS(green), b : S100(red), c : Merge(yellow),  
d : nNOS(green), e : PGP9.5 (red), f : Merge(yellow),  
bar=100 $\mu$ m

神経切断端から伸長する神経組織内に nNOS と S100 タンパクの発現はみられるものの，共発現はみられない。しかし，伸長する神経組織内には nNOS と PGP9.5 を共発現部位が数多くみられる（white arrow）。

表 1：正常坐骨神経と切断後の坐骨神経の S100 タンパク陽性細胞および PGP9.5 陽性細胞における nNOS の発現  
—：陰性，±：弱陽性，+：陽性

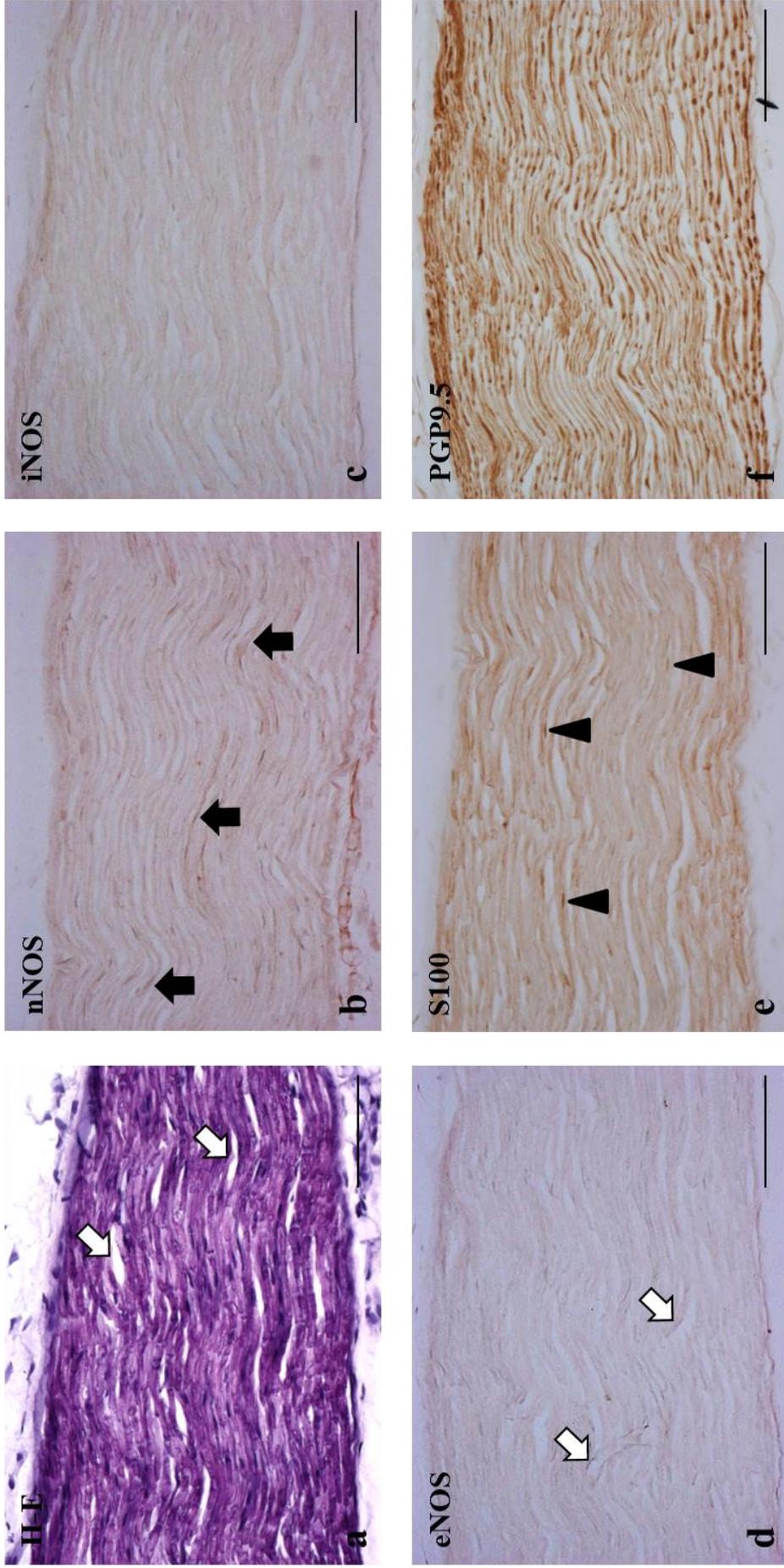
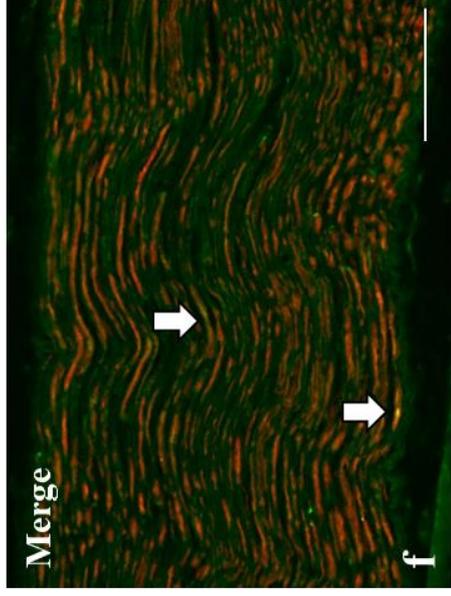
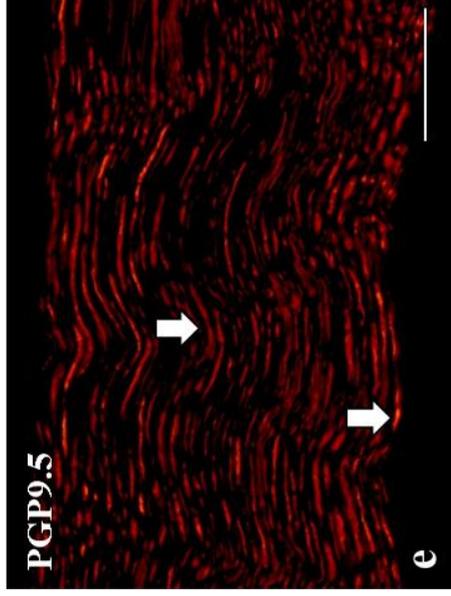
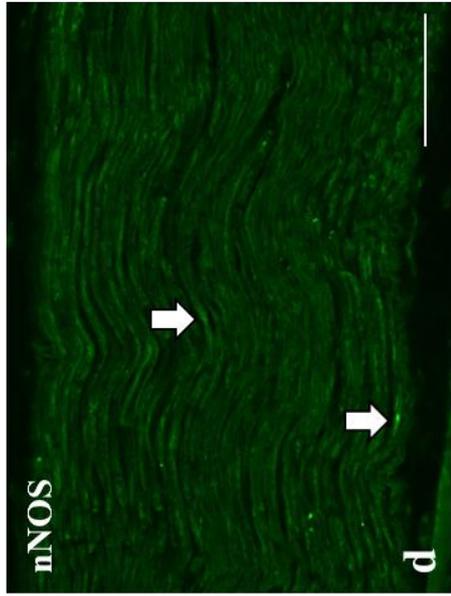
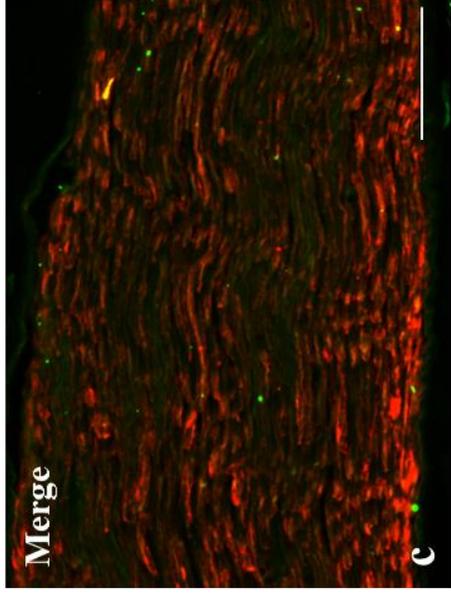
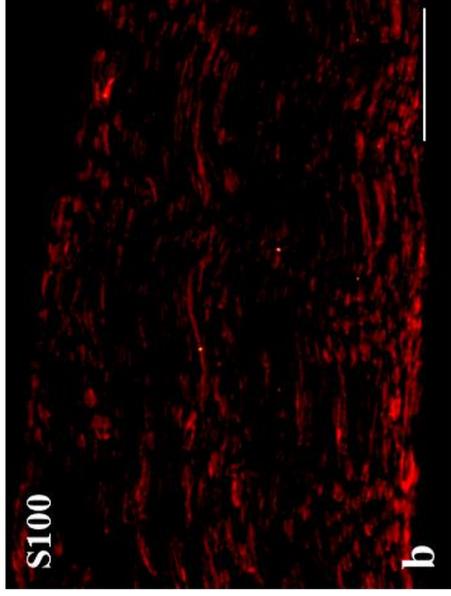
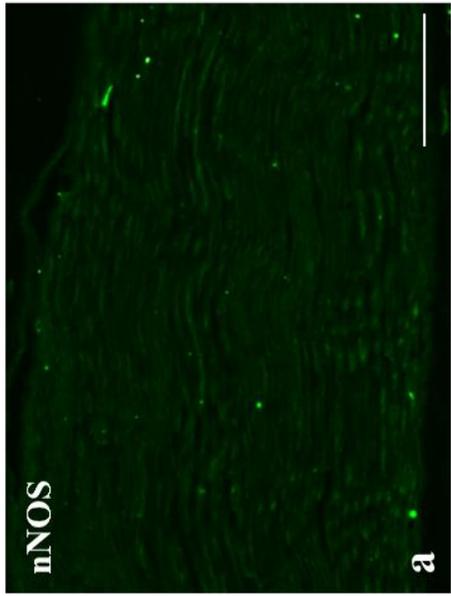
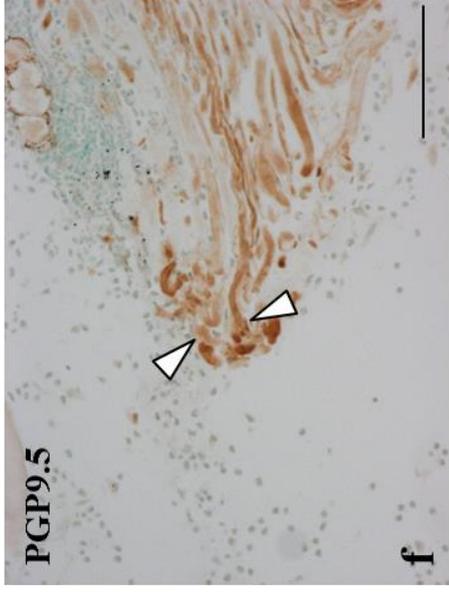
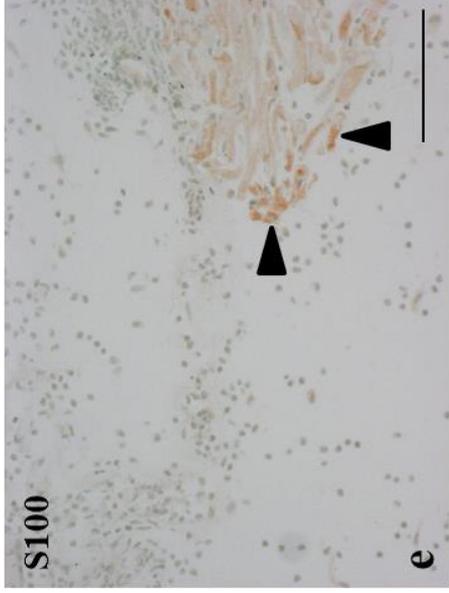
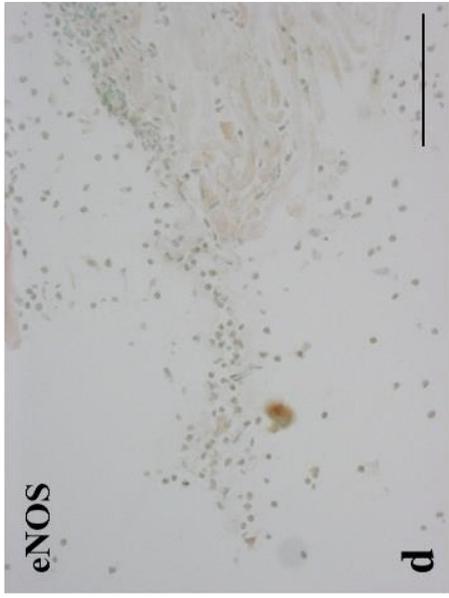
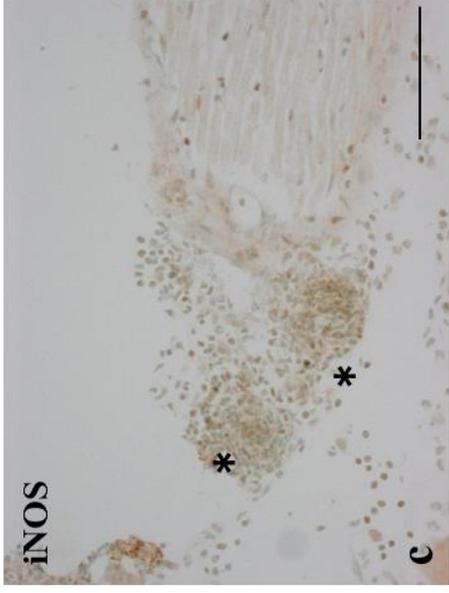
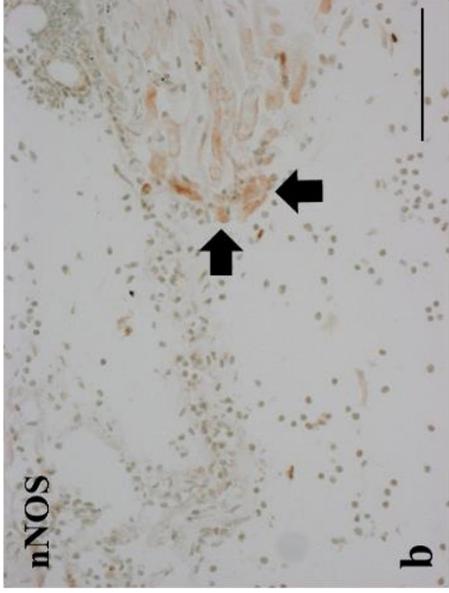
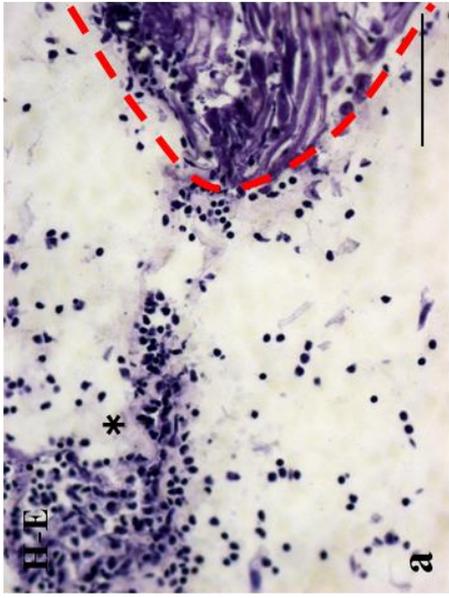
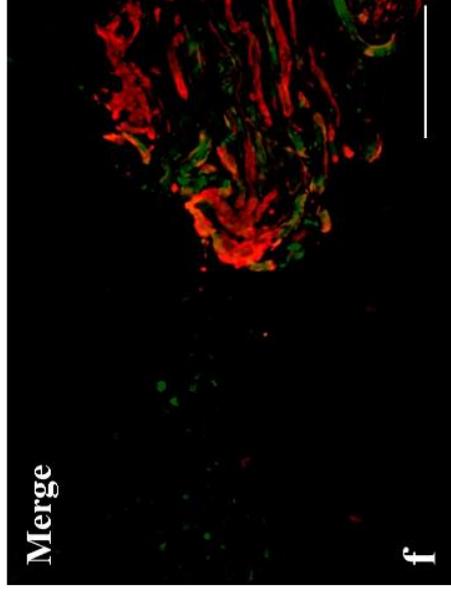
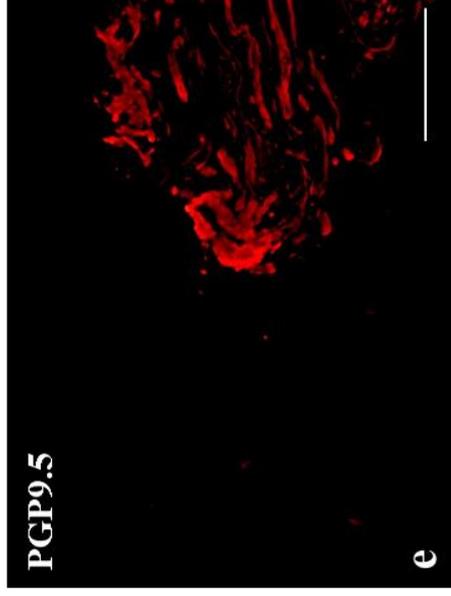
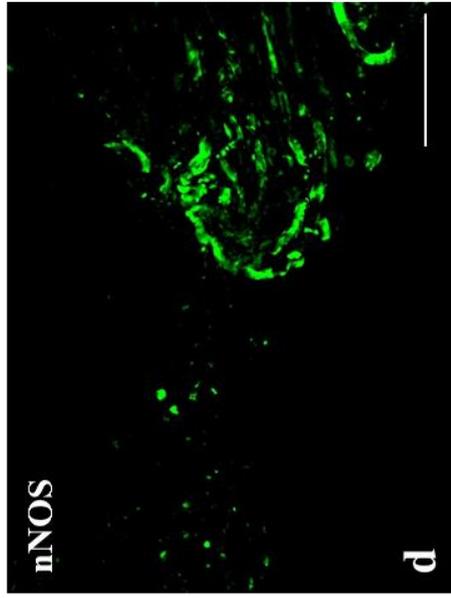
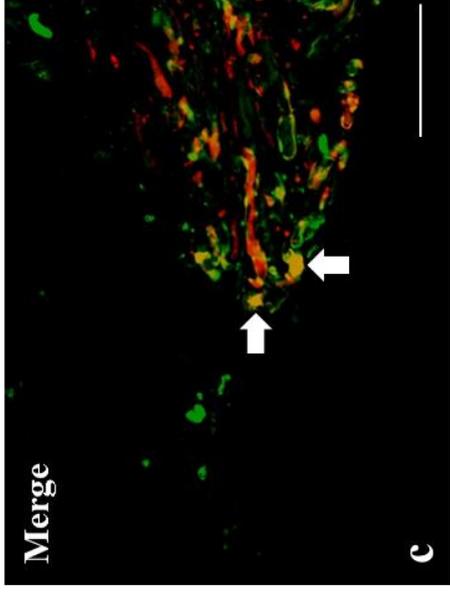
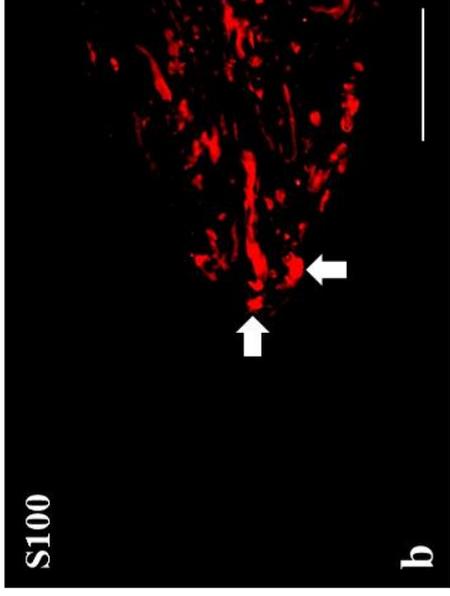
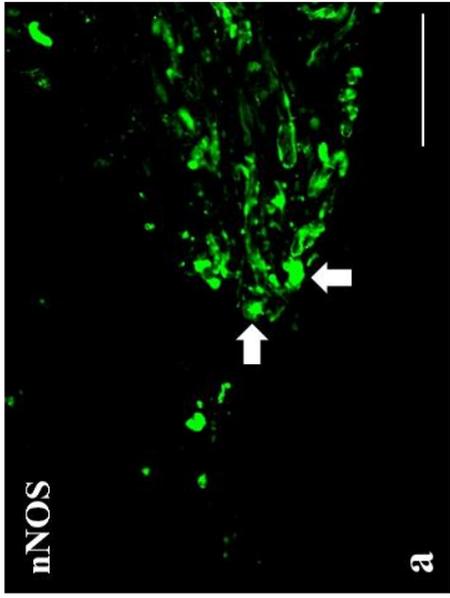
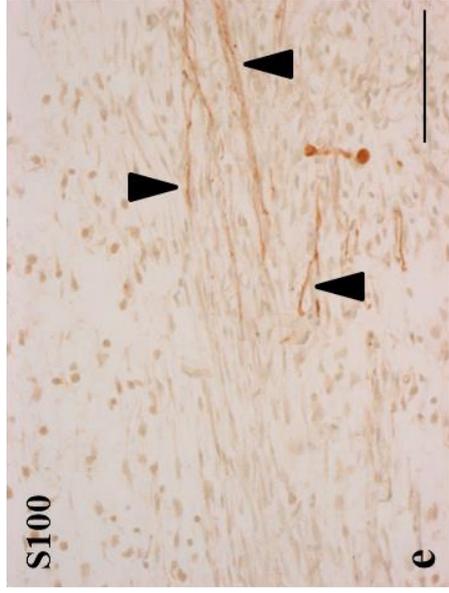
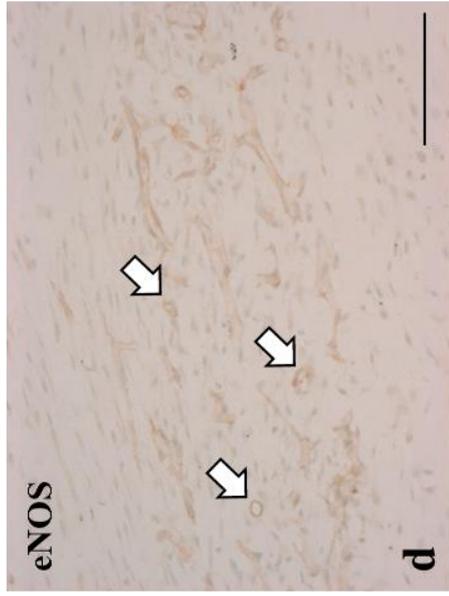
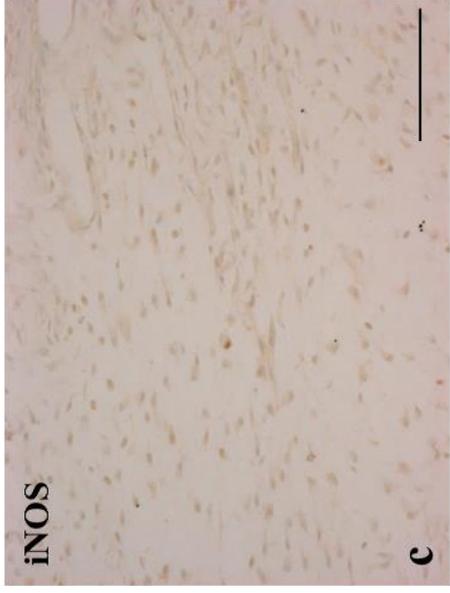
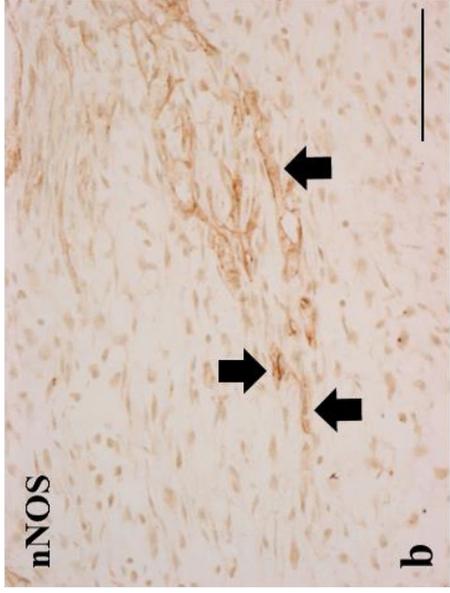
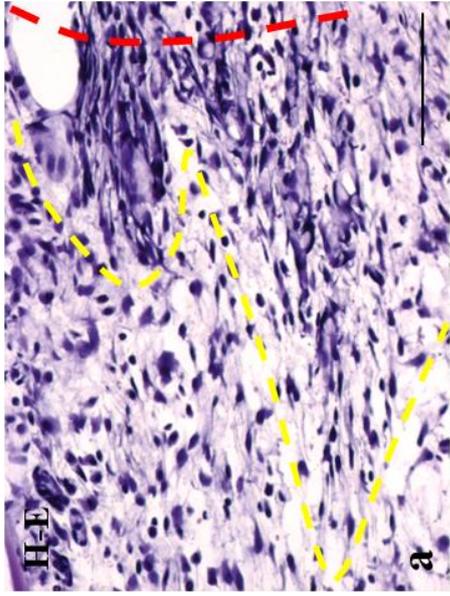


图 1









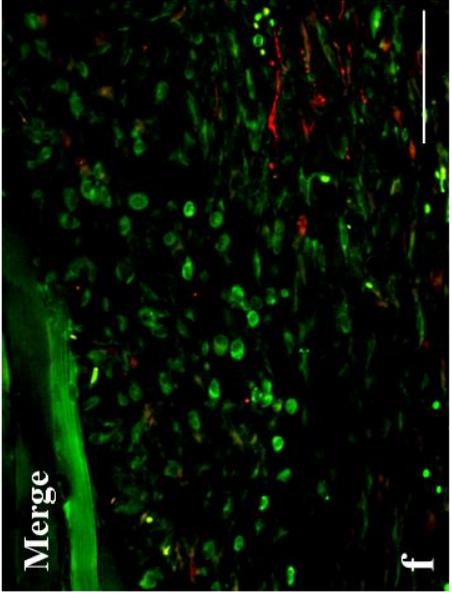
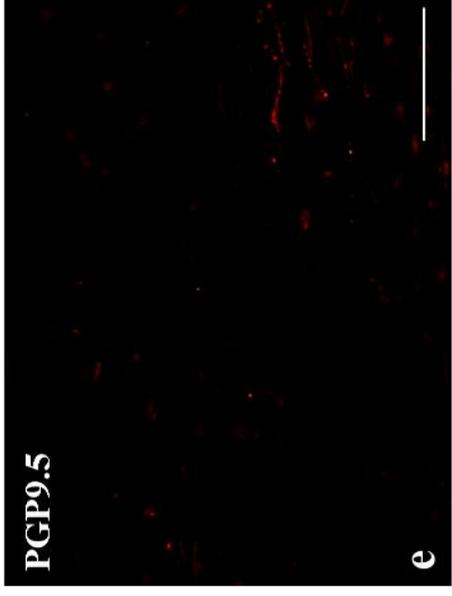
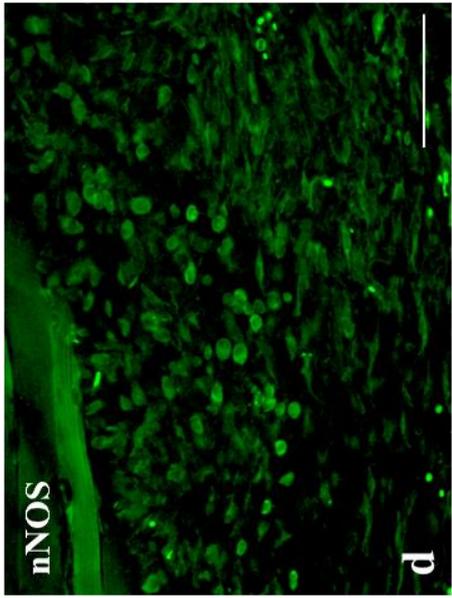
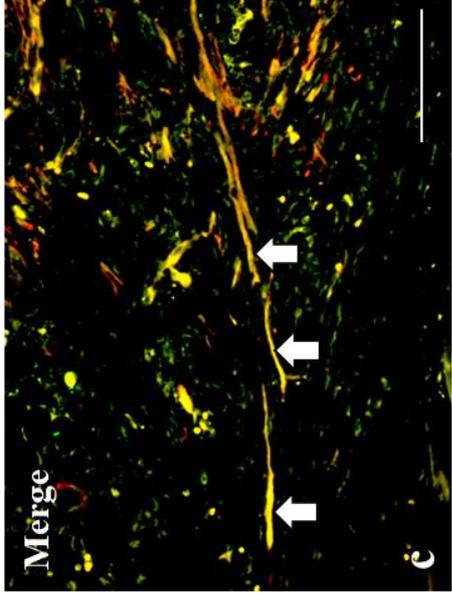
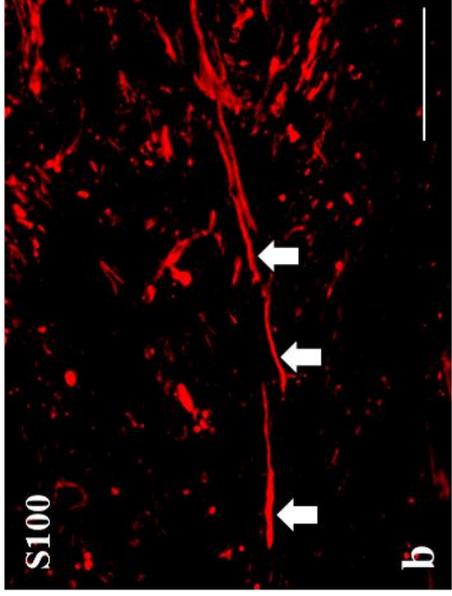
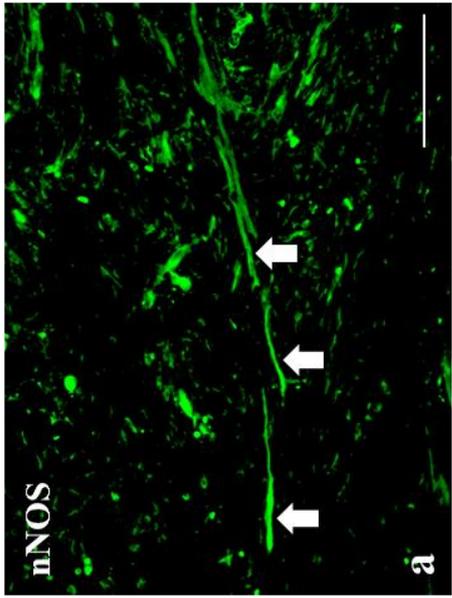
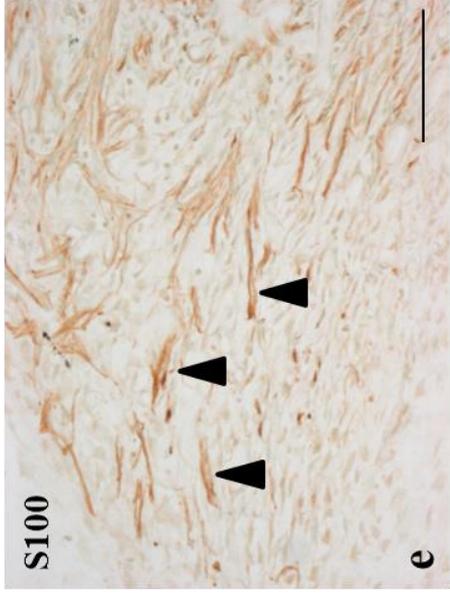
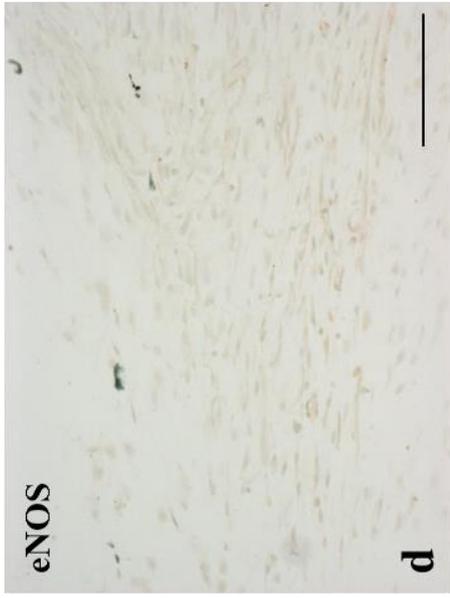
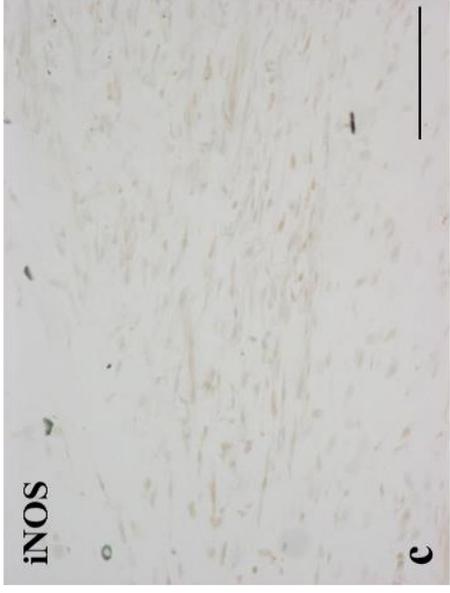
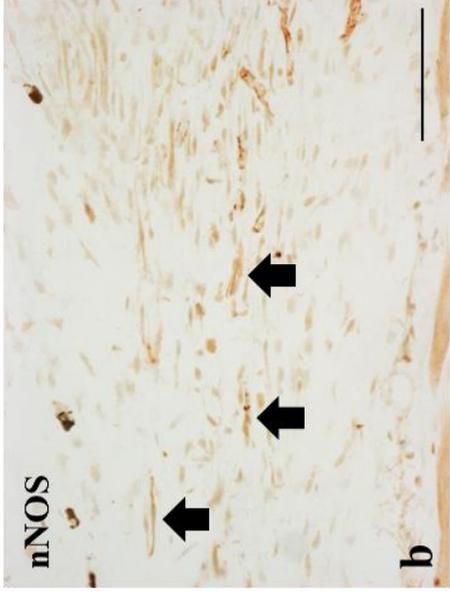
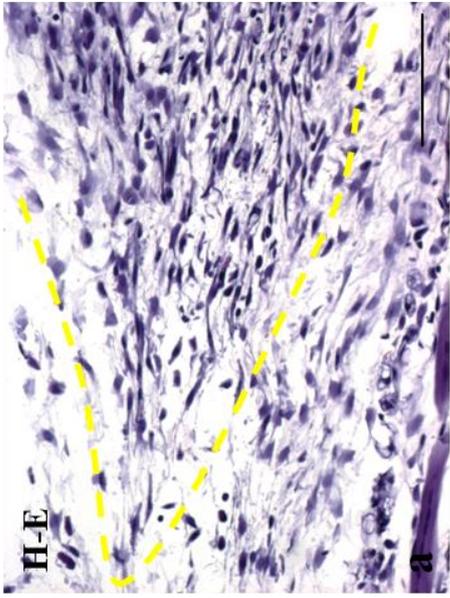
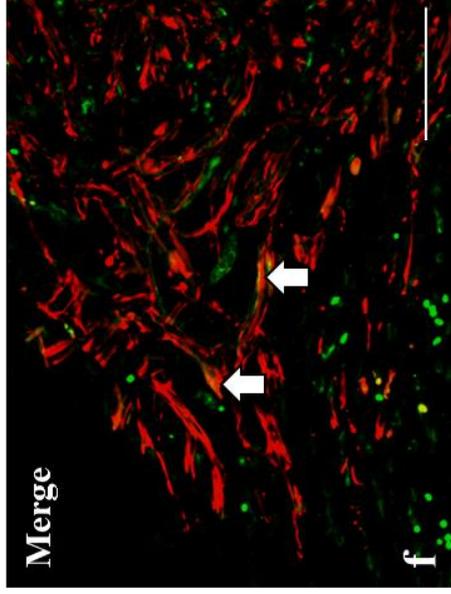
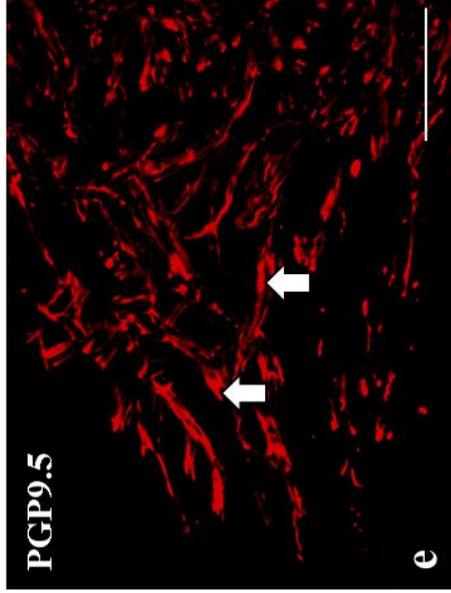
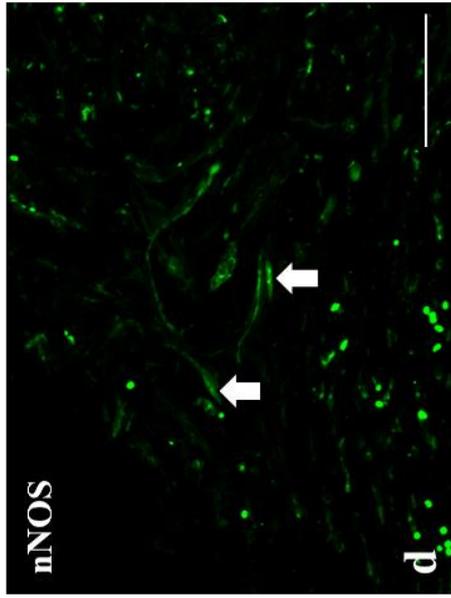
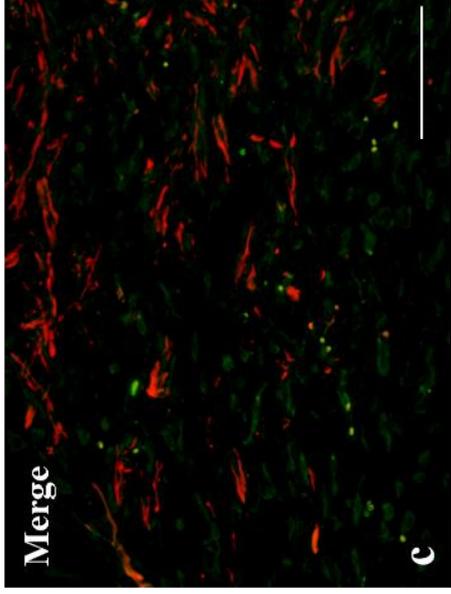
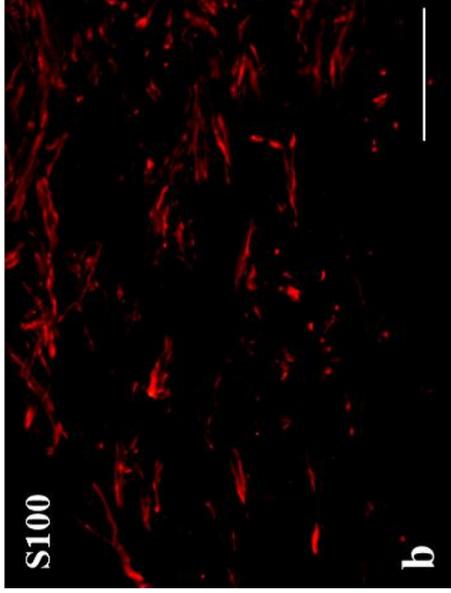
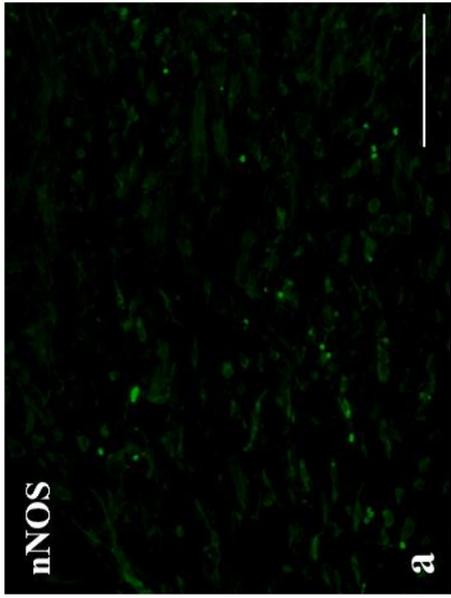
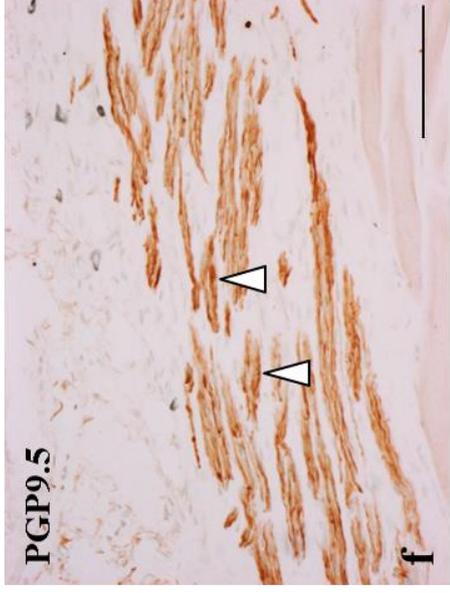
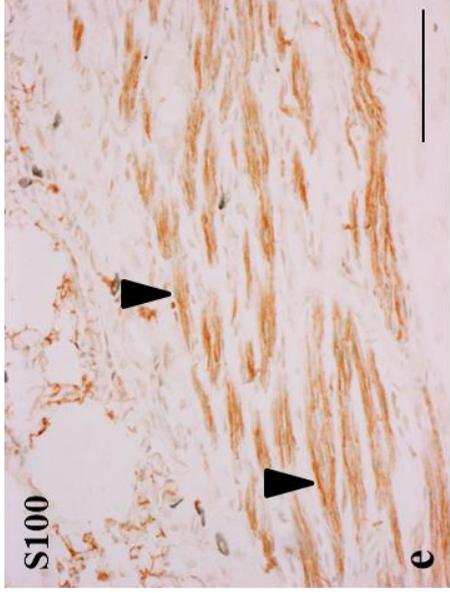
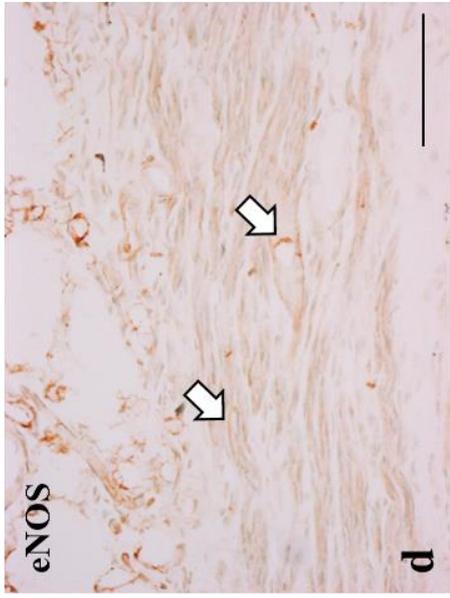
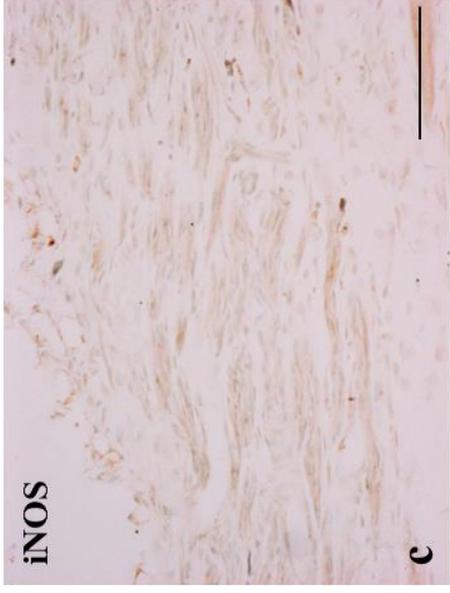
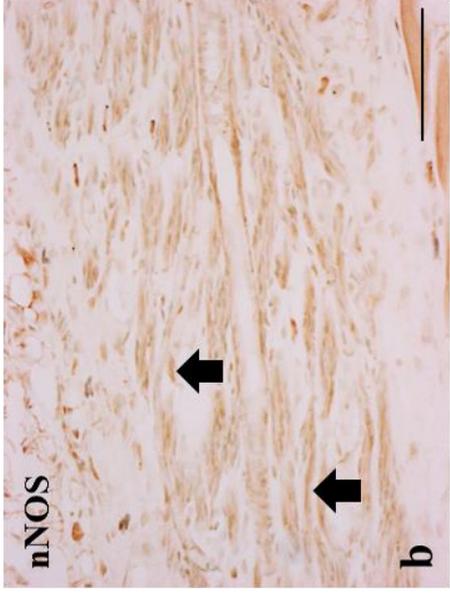
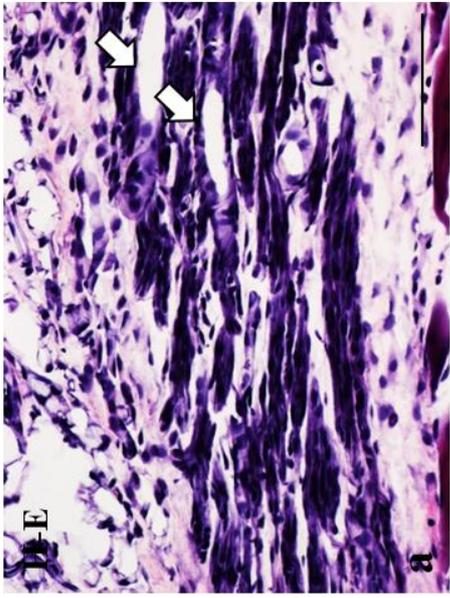


图 6







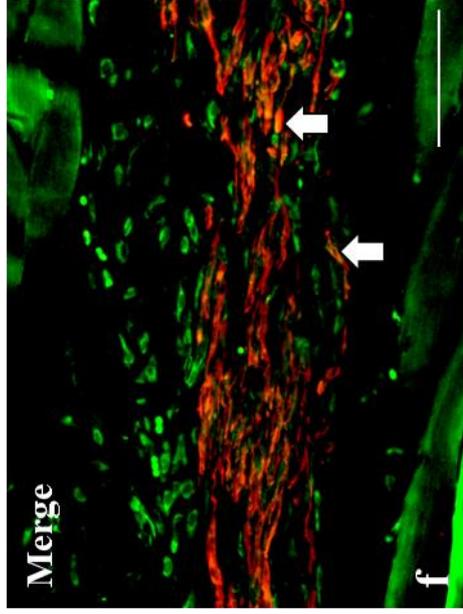
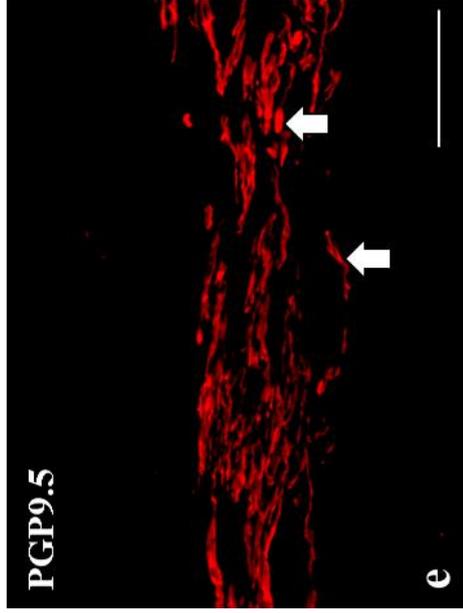
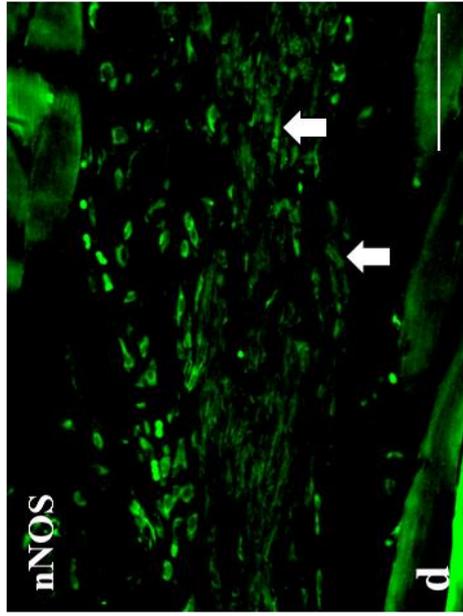
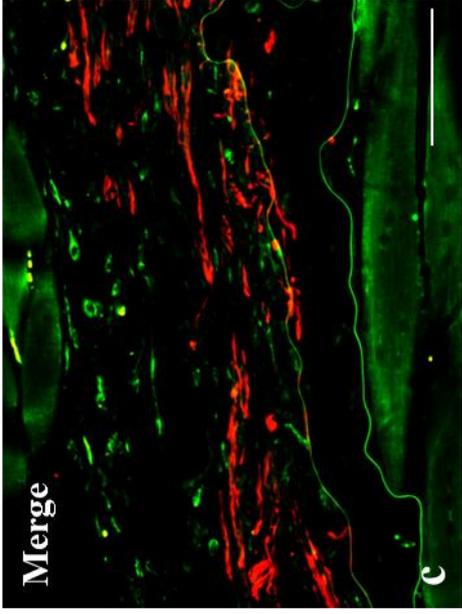
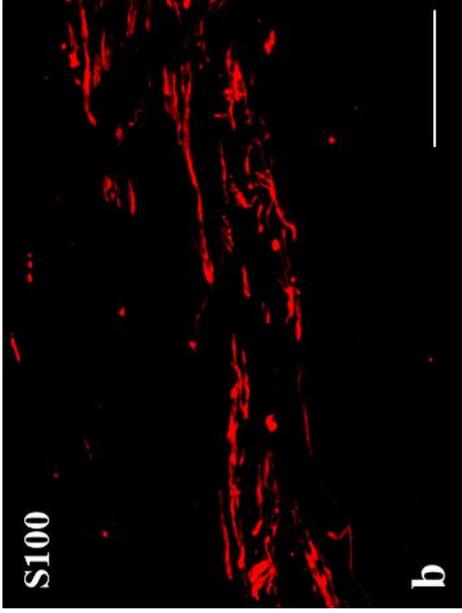
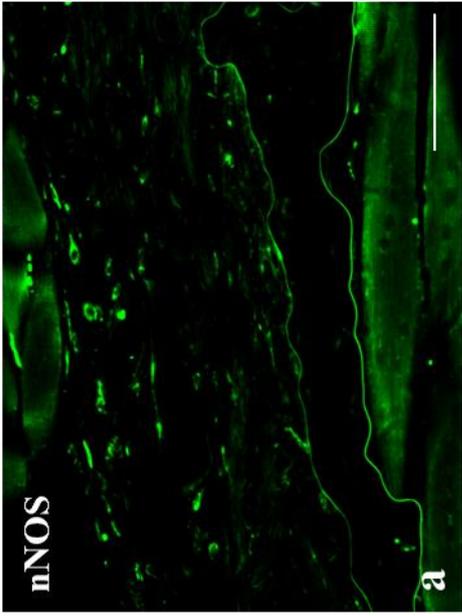


表 1 正常坐骨神経と切断後坐骨神経のS100タンパク陽性細胞およびPGP9.5陽性細胞におけるnNOSの発現

	PGP9.5陽性細胞	S100タンパク陽性細胞
正 常	±	—
切断 1 日	—	+
切断 7 日	—	+
切断14日	+	—
切断21日	+	—

— : 陰性    ± : 弱陽性    + : 陽性