

称号及び氏名	博士（獣医学）廣井 聡
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 3 1 日
論 文 名	「 Involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in development and regeneration of chick peripheral nerve 」 (鶏末梢神経の発生と再生における細胞接着分子 gicerin の関与)
論文審査委員	主査 小川 和重 副査 松尾 三郎 副査 岡田 利也 副査 塚本 康浩

## 論文要旨

### 緒言

細胞接着分子は主に細胞表面に発現し、細胞接着活性を有するほか、細胞内への情報伝達にも関与することが報告されている。神経系においては、神経細胞の移動や神経突起の伸展・ガイダンスなどに関与し、発生だけでなく成熟後の神経回路の維持や再生にも関与すると考えられている。末梢神経は中枢神経と異なり損傷後の修復能力が高く、また、細胞接着分子は再生過程における神経細胞の軸索の再伸展や方向誘導に関与する可能性が考えられる。それゆえに、末梢神経での細胞接着分子の発現と機能を解明することは、神経損傷後の再生をコントロールする意味で重要である。

Gicerin は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子で、細胞外領域に 5 つの免疫グロブリン用ループ構造を持つ糖蛋白質である。接着様式としては gicerin 分子同士の間種分子間（ホモフィリック）結合と細胞外基質のラミニンの一種である Neurite Outgrowth Factor (NOF) との間種分子間（ヘテロフィリック）結合が認められている。Gicerin はその細胞接着活性を介し、中枢神経系、呼吸器、泌尿生殖器の発生に重要な働きをすることが見出され、上皮の再生を促進することも報告されている。

本研究では鶏末梢神経の gicerin の役割を明らかにするために、発生期と再生期の坐骨神経における gicerin の発現動態について検討した。

## **第1章 坐骨神経の発生と再生における gicerin の発現**

### **第1節 坐骨神経の発生における gicerin の発現**

8日齢の鶏胚を用いて、腰部～大腿部の凍結切片を作製し、抗 gicerin 抗体による免疫蛍光染色を行った。その結果、坐骨神経、脊髄（腰～仙髄）、後根知覚神経節（DRG : dorsal root ganglion）において gicerin 発現が観察された。坐骨神経、DRG においては、発生期のニューロンマーカーである microtubule associated protein 1b (MAP1b) の分布と一致したことから、gicerin はニューロンに発現することが示唆された。次に gicerin のリガンドである NOF の分布を抗 NOF 抗体による免疫蛍光染色で検討したところ、神経細胞ではなく、神経周膜等に発現が認められた。しかし、孵化時には上記組織に gicerin および NOF の発現は殆ど観察されなくなった。このことより、gicerin はその細胞接着活性を介して発生期の末梢神経回路の形成に何らかの役割を果たしていることが予想された。

### **第2節 再生期の坐骨神経における gicerin の発現**

1週齢鶏の左側坐骨神経を挫滅させ、末梢神経再生モデルを作製した。損傷2週間目に免疫蛍光染色により脊髄、DRG、坐骨神経における gicerin の発現分布を検討した。

坐骨神経損傷後2週間目の DRG の神経細胞体核内には末梢神経再生マーカーの1つである activating transcription factor 3 (ATF3) の発現が確認されたことから、この時期の坐骨神経が再生中であることが確認された。坐骨神経再生部位では、正常坐骨神経に比べて著しい gicerin の発現増強が確認された。Gicerin とシュワン細胞のマーカーである S100 蛋白の発現部位が異なっていたことから、坐骨神経再生時の gicerin 発現はシュワン細胞ではなく主に神経線維に発現していると考えられた。また、DRG の神経細胞体においても gicerin の発現増強が見られた。ウェスタンブロット法による gicerin 蛋白の発現量も再生時の坐骨神経、DRG 共に対照よりも増強していた。また、坐骨神経再生時には、DRG ニューロンから中枢側への投射経路である脊髄背角において gicerin の発現増強が見られた。脊髄腹根および運動神経細胞体には発現の変化が認められなかったことから、gicerin は感覚神経の再生に関与すると考えられた。また、坐骨神経における gicerin の発現増強は坐骨神経損傷24時間後には確認され、3日目までは損傷部位付近に局限していたが、7日目以降は損傷部位の近位、遠位の両方に分布し、その後2ヶ月目まで観察したが明らかな減少は認められなかった。

### **第3節 DRGからの神経突起伸展における gicerin の関与**

8日齢鶏胚から採取した DRG を用いて器官培養を行い、その突起伸展における gicerin の関与を検討した。この培養系は感覚神経の突起伸展機構の研究に汎用されている。

最初に、gicerin のホモフィリックな結合が DRG の神経突起伸展に関与するかを検討した。シャーレ表面に精製 gicerin-Fc 蛋白をコートし DRG を培養したところ、著しい突起伸展が認められた。しかし、その突起伸展は抗 gicerin 抗体の添加によって抑制された。また非コートのシャーレ上では突起の伸展が見られなかった。次に、gicerin のヘテロフィリック (gicerin-NOF) な結合が DRG の突起伸展に与える影響を検討するため、精製 NOF 蛋白をコ

コートしたシャーレ上で DRG を培養したところ、著しい突起伸展が認められた。さらにこの突起伸展は、抗 gicerin 抗体の添加によって抑制された。突起伸展が見られた DRG を抗 gicerin 抗体による免疫蛍光染色を行ったところ、細胞体、神経突起に gicerin の発現が見られた。このことから、gicerin のホモフィリックおよびヘテロフィリックな結合活性は DRG ニューロン（1次感覚神経）の突起伸展を促進することが示唆された。

## **第2章 NGF の gicerin 発現への影響**

発生期の DRG ニューロンの生存、軸索伸展には Nerve Growth Factor (NGF) や glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) などの神経栄養因子が関与している。神経栄養因子は末梢神経再生時にも発現し、軸索の伸展などを促進することが証明されている。そこで、末梢神経における NGF および GDNF と gicerin の関連性を検討した。

### **第1節 坐骨神経におけるNGFの発現**

再生時の坐骨神経を用いた抗 NGF 抗体による免疫蛍光染色から、NGF の発現が増強することが明らかとなった。RT-PCR でも NGF mRNA の発現増加が見られた。抗 S100 蛋白抗体との二重免疫染色では NGF と S100 蛋白の共分布が認められた。このことから坐骨神経再生時にはシュワン細胞において NGF の産生が増強することが示唆された。

### **第2節 NGFおよびGDNFとgicerin発現の関連性**

DRG を精製 gicerin-Fc 蛋白または精製 NOF 蛋白をコートしたシャーレ上で培養した。NGF を添加すると神経突起伸展がより促進され、これは抗 NGF 抗体の添加によって抑制された。しかし GDNF の添加では明らかな突起伸展の促進は認められなかった。従って、gicerin を介した突起伸展は NGF により促進されることが見出された。そこでこの変化が gicerin の発現の変化によるものかを確認するために、DRG での gicerin mRNA の発現に対する NGF の影響を調べた。その結果、NGF を培養液中に添加することにより gicerin mRNA の発現が増強することが判明した。また、GDNF 添加によるその発現の変化は見られなかった。つまり、NGF 存在下では gicerin の発現が増強され、それにより DRG ニューロンからの gicerin を介した神経突起伸展が促進されると考えられる。このことから坐骨神経再生時には NGF が gicerin の発現を増強させることで、神経突起伸展を促進させていることが示唆された。

### **第3節NGFによるgicerin遺伝子の転写活性調節**

マウス神経芽細胞由来の Neuro2a 細胞を NGF 存在下で培養すると gicerin mRNA の発現が増強し、GDNF 存在下では変化が見られなかった。そこで、gicerin 遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドをリポフェクション法により Neuro2a に導入し、NGF および GDNF 存在下でデュアル・ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、NGF 存在下でのみルシフェラーゼの発現量増加が確認された。このことから NGF が gicerin の転写活性を上昇させることが明らかとなった。

## **総括**

- 1、Gicerin は鶏胚の坐骨神経線維、DRG、脊髄に発現し、孵化後には消失することから、発生期の抹消神経回路形成に関与していると考えられる。
- 2、坐骨神経損傷後には坐骨神経、DRG、脊髄背角において gicerin 発現の増強が見られたことから、1次感覚神経の再生とその再構築における gicerin の関与が考えられる。
- 3、器官培養による DRG からの神経突起伸展は、gicerin を介したホモフィリックおよびヘテロフィリックな細胞接着活性により促進されることが明らかとなった。
- 4、NGF は再生期の末梢神経周囲のシュワン細胞において発現していることが確認された。
- 5、NGF は Neuro2a 細胞において gicerin の転写活性を上昇させ、DRG, Neuro2a 細胞において gicerin mRNA の発現を増強させることが示唆された。このことから DRG では NGF により gicerin の発現が増強し、神経突起の伸展が促進されたと考えられる。

以上のことから、生体内においても、抹消神経の発生と再生では局所で産生された NGF が gicerin の発現を増強し、その発現が神経回路の構築を促進すると考えられる。

## 審査結果の要旨

細胞接着分子は細胞表面に発現し、細胞接着の他、細胞内情報伝達にも関与する。神経系では、細胞移動や突起伸展・ガイダンスに働き、発生期の神経回路形成だけでなく完了後の回路の維持や再生への関与が示唆され、再生過程では、神経突起の再伸展や方向誘導への関与が考えられている。末梢神経は、中枢神経とは異なり損傷後の修復能力が高いため、末梢神経における細胞接着分子の発現と働きを解明することは、神経の再生制御機構を考える上で重要である。Gicerin は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子で、gicerin 同士の同種分子間結合と Neurite Outgrowth Factor (NOF; 細胞外基質ラミニンの一種) との異種分子間結合が認められる。これまでの研究で、gicerin は主に発生期に発現し、中枢神経では神経回路形成に働くことが見出されているが、末梢神経における発現と働きは明確には示されていない。本研究では、末梢神経の gicerin 発現とその働きを明らかにするため、鶏を対象に発生期の坐骨神経と後根知覚神経節 (DRG) および挫滅損傷後の坐骨神経における発現動態を調べるとともに、培養系を用いて神経突起伸展における gicerin の関与および神経栄養因子が gicerin 発現に及ぼす影響を検討した。

第1章・第1節では、8日齢の鶏胚を材料に免疫蛍光染色で gicerin 発現を検討した。Gicerin は坐骨神経、DRG、脊髄のニューロンに、NOF は神経周膜に発現することが示された。孵化時には消失したことから、gicerin は発生期の末梢神経において神経回路形成に働く可能性のあることが示唆された。

第2節では、1週齢鶏の左側坐骨神経を挫滅させた末梢神経再生モデルを材料に免疫蛍光染色で gicerin の発現動態を検討した。Gicerin は正常の右側坐骨神経では観察されないが、損傷24時間後に発現が誘導され、その発現は、7日目以降は損傷部の近位・遠位の両側へ

広がり、その後2ヶ月以上続いた。シュワン細胞マーカーS100蛋白を標識に用いた2重蛍光染色から、gicerinは再生時の神経線維に発現していることが示された。DRGの神経細胞体およびDRGから中枢側への投射経路である背根・脊髄背角で発現上昇が見られたので、gicerinは知覚神経に発現していることが推察された。

第3節では、8日齢鶏胚のDRGを器官培養し、DRGニューロンの突起伸展に対するgicerinの関与を検討した。Gicerin-FcまたはNOFをコートしたシャーレでDRGを培養すると突起伸展が起こるが、この伸展は抗gicerin抗体によって抑制された。免疫蛍光染色で突起におけるgicerin発現が認められたため、gicerinはDRGニューロン（知覚神経）の突起伸展を促進させることが示唆された。

第2章では、末梢神経再生時に発現し軸索伸展を促進させる神経栄養因子の1つNerve Growth Factor (NGF)がgicerin発現に及ぼす影響を検討した。第1節では、坐骨神経再生時のNGF発現をRT-PCRと免疫蛍光染色により検討し、シュワン細胞がNGFを発現し再生時にはそのmRNA発現が上昇することを明示した。

第2節では、gicerin-FcあるいはNOFをコートしたシャーレでDRGを器官培養し、NGFがDRGニューロンの突起伸展に及ぼす影響を検討した。NGFは突起伸展を促進し、抗NGF抗体によりこの促進効果は消失した。また、培養上でNGFによるgicerin mRNAの発現上昇が認められたため、NGFによるgicerin発現誘導を介するDRGニューロンの突起伸展促進作用が示唆された。

第3節では、gicerinプロモーター領域の下流にルシフェラーゼを組み込んだ遺伝子を導入したNeuro2a（神経芽細胞由来株）を材料に、NGFのgicerin発現誘導を検証し、NGFによるgicerinの転写活性上昇を明示した。

本研究で、gicerinは(1)鶏胚の坐骨神経、DRG、脊髄のニューロンに発現し、孵化後には消失すること、(2)坐骨神経損傷による再生時に坐骨神経、DRG、脊髄背角における発現が上昇したことから、1次知覚神経の回路形成・再構築に関与していることが示唆された。また、(3)NGFは坐骨神経の再生時にシュワン細胞で発現が誘導されること、培養系による解析から、(4)NGFはgicerin発現を誘導し、gicerinはDRGニューロンの突起伸展を促進させることが明らかになった。これらの知見は、末梢神経再生機構を解明する一助となり、医学・獣医学分野における神経再生に関する研究の発展に貢献するものである。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。