

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 山田 友里恵  
学位 博士 (歯学)  
学位記番号 新大院博 (歯) 第387号  
学位授与の日付 平成29年 3月23日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Autocrine-mediated Shh Signaling Pathway Regulates Inferior Alveolar Nerve Regeneration via Controlling Schwann Cells  
(オートクラインによるソニックヘッジホッグシグナル経路はシュワン細胞の調節を介して下歯槽神経再生を制御する)

論文審査委員 主査 教授 大峽 淳  
副査 教授 瀬尾 憲司  
副査 教授 前田 健康

### 博士論文の要旨

#### 【緒言】

末梢神経は高い再生能を有するといわれている。神経切断後はワーラー変性の過程を経て再生すると考えられているが、臨床的に神経腫を形成するなどの異常な再生過程をみることがある。その発症メカニズムは明らかではないため、末梢神経再生の分子レベルでの詳細なメカニズムの把握が必須である。Sonic Hedgehog (Shh) シグナルは、発生過程における神経形成で重要な役割を担うことが知られている。一方で生後の末梢神経再生での活性も報告されているが、その詳細な機能は明らかにされていない。そこで、マウス下歯槽神経切断モデルを用いて、末梢神経再生における Shh シグナルの機能を検討した。

#### 【方法】

本実験には、7-9 週齢雄性の C57BL6 マウスならびに、Shh、Gli1 のプロモーターの下流に GFP がレポーターとして組み込まれているマウス(Shh-GFP マウス、Gli1-GFP マウス)を使用した。マウスの下歯槽神経を切断し、術後 3、7 日目に屠殺後、通報に従い切片を作成し、組織学的観察ならびに免疫染色による各種分子の検索を行った。また、Shh シグナルのインヒビターである cyclopamine の投与により、Shh シグナル抑制の神経再生への影響を検索した。切断神経再生の確認には、DiI のオトガイ孔への投与による DiI トレーシングアッセイを併用した。さらにヒト Schwannoma 由来培養細胞を用いた in vitro アッセイを行った。

#### 【結果】

Shh シグナルのリガンドである Shh は、神経損傷後 3 日目に、切断部中枢側断端と末梢側の切断神経で発現していた。Shh シグナル活性のマーカー転写因子である Gli1 も、Shh と同様の発現パターンを示し

た。Shh、Gli1ともに、損傷後7日目で、その発現が低下していた。術後3日目におけるShhとGli1は、幼若シュワン細胞のマーカーであるp75と共染することが確認された。また、ShhもGli1との共染も認められた。cyclopamineによるShhシグナル抑制では、神経損傷後7日目に再生軸索の異常走行と、三叉神経節におけるDiI陽性細胞数の減少が認められ、神経再生による軸索結合がShhシグナル抑制により障害されたことが確認された。cyclopamineによるShhシグナルの抑制では、中枢側断端の幼若シュワン細胞数が増加していたのに対し、末梢側でのシュワン細胞数の増加は認められなかった。In vitro アッセイでは、培養液へのShhタンパクの添加によるシュワン細胞の細胞増殖抑制が観察された。一方、切断神経の末梢側においては、cyclopamineによるShhシグナルの抑制で、マクロファージ数の減少と、ミエリンタンパクの残存が認められた。

### 【考察】

本研究結果より、Shhシグナルは末梢神経切断後、幼若シュワン細胞で活性化し、その活性はオートクラインで調節されていることが明らかとなった。シュワン細胞は、末梢神経再生に必要な不可欠な役割を担っていることは知られている。損傷神経末梢側では軸索の変性に伴いシュワン細胞がマクロファージを誘導し、そのマクロファージにより残存ミエリンが貪食される。本研究で認められたShhシグナルの抑制によるマクロファージ数の減少とミエリンタンパクの残存は、Shhシグナルが、末梢側のシュワン細胞によるマクロファージ誘導に関与している可能性を示唆している。事実、Shhがマクロファージの走化性因子の一つであることが報告されている。一方、切断神経中枢側では、Shhシグナル抑制による幼若シュワン細胞数の増加が認められた。In vitro アッセイでも外因性Shhタンパクによる幼若シュワン細胞の増殖抑制が観察され、Shhシグナルが中枢側では幼若シュワン細胞の増殖を制御していることが示された。中枢側断端のシュワン細胞の損傷後の脱分化・増殖は、神経再生に必須であると考えられている。しかし、今回の実験では、Shhシグナルの抑制により中枢側のシュワン細胞数が増加したものの、神経再生は障害されていた。これはすなわち損傷神経においては末梢側のミエリンの除去により、再生軸索の末梢方向への伸長が可能となることが推察される。したがって本研究で観察されたShhシグナル抑制による再生軸索の異常走行は、切断神経末梢側におけるマクロファージ数の減少と、それに伴うミエリンタンパクの残存によるものと考えられる。以上より、Shhシグナルが末梢神経再生に必須であり、切断部の中枢側断端と末梢側では異なる機能を有することが示された。本研究の成果は、神経再生に必要な分子機構の一部を明らかにし、さらに異常神経再生のメカニズムの解明に寄与するものと考えらる。

### 審査結果の要旨

Shhシグナルは、中枢神経発生にとって最も重要な分子経路であり、現在まで様々な観点から研究されているが、末梢神経再生における機能は、研究されていない。下歯槽神経は、歯科治療における偶発症の中で最も神経障害が生じる神経であるため、その再生過程における分子レベルでの解析は重要となる。本研究では、Shhシグナルの下歯槽神経再生における機能解析を、in vivoならびにin vitroによって行っており、非常に科学性の高いものとなっている。

Shhシグナルには、転写因子が3種類存在するが、それらの中で、発生過程での機能が最も研究されているGli1に焦点を絞った点には、妥当性がある。ShhシグナルのリガンドであるShhは、神経損傷後3日目に、切断神経の切断部中枢側断端と末梢側で発現し、Shhシグナル活性のマーカー転写因子であるGli1も、Shhと同様の発現パターンを示したという。Shh、Gli1ともに、損傷後7日目で、その発現が低下していたため、Shhの機能解析を術後3日目に定めたとする点も理解できる。術後3日目におけるShhと

Gli1 は、幼若シュワン細胞のマーカーである p75 と共染することが確認されたという。また、Shh も Gli1 との共染が認められ、下歯槽神経再生における Shh シグナルはオートクライン的に幼若シュワン細胞で機能発現しているとする知見は、非常に興味深い。さらに、単なる Shh シグナル関連分子の発現パターンの検索だけでなく、Shh シグナルの機能低下による再生への影響を検索した点も評価できる。cyclopamine による Shh シグナル抑制実験では、神経損傷後 7 日目に再生軸索の異常走行と、三叉神経節における DiI 陽性細胞数の減少が認められ、神経再生による軸索結合が Shh シグナル抑制により障害されたことを確認している。cyclopamine による Shh シグナルの抑制では、中枢側断端の幼若シュワン細胞数が増加していたのに対し、末梢側でのシュワン細胞数の増加は認められなかったという。このように Shh シグナルの機能が、末梢側と中枢側で異なることを示したのは、興味深い。さらに、In vitro アッセイでは、培養液への Shh タンパクの添加により、シュワン細胞の細胞増殖抑制が観察されたという。In vivo 研究だけにとどまらず、in vitro 研究も併用したことは、得られた知見の信憑性を飛躍的に向上させている。さらに in vitro と in vivo の結果に、整合性がとれており、本研究結果の信頼性の高さを物語っている。一方、切断神経の末梢側においては、cyclopamine による Shh シグナルの抑制で、マクロファージ数の減少と、ミエリンタンパクの残存が認められたという。損傷神経末梢側では、通常の場合、軸索の変性に伴いシュワン細胞がマクロファージを誘導し、そのマクロファージにより残存ミエリンが貪食されることが知られている。本研究で認められた Shh シグナルの抑制によるマクロファージ数の減少とミエリンタンパクの残存は、Shh シグナルが末梢側のシュワン細胞によるマクロファージ誘導を制御している可能性を示唆している。事実、Shh がマクロファージの走化性因子の一つであることが報告されており、本研究結果との整合性が見て取れる。本研究結果は、Shh シグナルが中枢側では幼若シュワン細胞の増殖を制御していることを示した。中枢側断端のシュワン細胞の損傷後の脱分化・増殖は、神経再生に必須であると考えられている。しかし、今回の実験では、Shh シグナルの抑制により中枢側のシュワン細胞数が増加しているにもかかわらず、神経再生は障害されていた。本研究で観察された Shh シグナル抑制による再生軸索の異常走行は、中枢側で認められた変化ではなく、切断神経末梢側におけるマクロファージ数の減少と、それに伴うミエリンタンパクの残存によるものと考察した点は興味深い。本研究結果から、Shh シグナルが末梢神経再生に必須であり、切断部の中枢側断端と末梢側では異なる機能を有することが示されたという。本研究結果は、そのような結論を導きだすのに十分たる証拠を示していると考えられる。Cyclopamin による Shh シグナルの抑制実験で認められた再生異常は、臨床で見られる神経腫にも類似しており、本研究の臨床へのフィードバックも大いに期待できる。本研究の成果は、神経再生に必要な分子機構の一部を明らかにしたことに加え、異常神経再生のメカニズムの解明にも寄与でき、臨床への応用も視野にすることができる。

本論文で示された研究成果は、中枢神経と末梢神経、発生と再生という生物学的にも重要性の高い領域における知見であることに加え、歯科臨床にも直結できる結果であり、学位論文としての十分な価値が認められる。