

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 金丸博子  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第388号  
学位授与の日付 平成29年9月20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 下歯槽神経損傷後の Semaphorin3A の発現とその機能に関する研究

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

### 博士論文の要旨

#### 【緒言】

末梢神経は中枢神経と異なり、損傷後の再生能が高い事が広く知られている。しかし実際には完全な機能回復には至らず、臨床的に満足しない症例もあるため、治療法の開発のためには末梢神経再生の機序を解明する事が重要である。Semaphorin3A(Sema3A)は胎生期に発現し、末梢神経回路形成に関与する因子である。成体では中枢神経である脊髄損傷後の軸索再生を阻害する事が知られている。末梢神経損傷後に生ずる神経叢に Sema3A が認められることが報告されているが、末梢神経再生との関連は未だに不明である。そこで本研究では下歯槽神経損傷モデルを用いて、下歯槽神経損傷後における Sema3A の関与について検討した。

#### 【対象と方法】

本実験には7-8週齢雄生C57BL6Jマウスを使用した。マウスの下歯槽神経を切断し、切断後1、3、7、14日目に屠殺した。通常通りに凍結切片を作成し、Sema3Aを免疫染色し、その経時的発現を観察した。また神経損傷様式の差による Sema3A の発現への影響を検討するため、下歯槽神経坐成実験および下歯槽神経切除実験を行い、術後1日目の Sema3A 発現を観察し、下歯槽神経切断後の発現と比較した。さらに、Sema3A の阻害が神経再生に与える影響を検討するため、下歯槽神経切断後、術当日および1日目、2日目に Sema3A 抗体または生理食塩水を局所投与し、2群の術後3日目の早期再生軸索の形態評価およびDiIによる逆行性神経標識による再生神経細胞数の比較を行った。

#### 【結果】

Sema3A は神経切断後1日目の切断中枢断端のみ発現を認め、3日目には減弱していた。また7および14日目には Sema3A は発現しなかった。また坐成損傷実験では Sema3A は発現せず、切除実験では切断と同様に中枢断端のみ発現した。Sema3A 抗体の投与は、早期の再生軸索の軸索の不規則な走行を制御し、末梢方向への伸長を促進した。また、Sema3A 抗体の投与は、三叉神経節における DiI 陽性細胞数を有意に増加させた。

#### 【考察】

神経損傷後の軸索の変化は中枢側と末梢側で大きく異なる。本研究での Sema3A の発現時間や発現領域は中枢側と末梢側では異なり、Sema3A は損傷部位より末梢側に生じたことからワーラー変性には関与しないと考えられた。Sema3A 抗体による Sema3A の機能阻害は、再生軸索を末梢方向への伸長を促し、Sema3A が再生の初期の段階に影響を与えていると思われた。中枢神経系再生の研究では Sema3A は細胞骨格の崩壊による軸索の退縮が認められているが、末梢神経においても同様に軸索伸長を阻害している可能性がある。また Sema3A 抗体投与は軸索の伸長する方向にも影響を与えていたことから、軸索の誘導を担うシュワン細胞や血管内皮細胞も作用した可能性もある。

Sema3A はシュワン細胞の遊走を抑制し、Sema3A と VEGF(血管内皮細胞増殖因子)が競合阻害する事や Sema3A が血管新生を阻害するという報告から考えると、Sema3A の抗体が VEGF による血管新生とそれと続く Schwann 細胞の遊走を促進し、その結果再生軸索の方向性の制御と標的方向への伸長を容易にした可能性がある。一方、Sema3A は細胞死を誘

導する因子でもある。実際、視神経切断後ではSema3Aの発現が細胞死を誘導する事が報告されており、視神経切断後のSema3Aの発現のピークが切断後の早期であることから、この点からもSema3A抗体の投与が下歯槽神経の細胞死を阻止し、それが軸索を伝わって三叉神経節へ運ばれた結果、DiI陽性細胞を増加させたものと考えられる。

#### 【結論】

Sema3Aは下歯槽神経の切断によって、早期に切断部の中脳側で発現する。また切断部の中脳側から末梢側への軸索伸長を抑制し、損傷した神経の細胞死を阻止する可能性がある。

#### 審査結果の要旨

末梢神経は中枢神経に比べ、軸索の再生が認められる。末梢神経では神経細胞体が健康であれば、軸索が切断されても、再生が可能である。この再生メカニズムは古くから研究が進められ、神経損傷部位より遠位の軸索はワーラー変性により断片化し、マクロファージにより除去される。この際、シュワン細胞包膜が形成され、シュワン細胞内につくられるBüngner's bandが再生軸索の足場となり、再生軸索が伸長する。この再生過程には神経栄養因子を含むさまざまなタンパクが関与することが知られているが、その詳細の解明は途上である。また、歯科臨床の際、下歯槽神経は損傷を受けやすく、損傷後に起こる感覚異常への対応が苦慮されている。形態学的な神経再生と機能回復には時間差があり、また必ずしも良好な機能回復を得られないこともあり、末梢神経再生過程の詳細な理解が治療法の開発につながると考えられる。本研究では、マウス下歯槽神経切断モデルを用いて、①下歯槽神経切断後の軸索変化、②下歯槽神経切断後のSemaphorin3Aの発現変化、③神経上膜切断によるSemaphorin3A発現の影響、④Semaphorin3Aの下歯槽神経再生への影響を明らかにすることにより、Semaphorin3Aの下歯槽神経再生における役割を明らかにしようとしている。その結果、正常状態では発現しないSemaphorin3Aが、下歯槽神経切断によって早期に切断中脳側で局限して、一過性に発現し、短期間で消失していた。またSemaphorin3A抗体の投与により、Sema3Aの効果抑制は発芽軸索の方向性と神経再生に影響を与えた。さらに逆行性トレーサーであるDiIの損傷部位への局所投与による三叉神経節ニューロンの検討では、Semaphorin3A抗体投与群でDiIにより標識されたニューロンが有意に多かった。これらの結果は下歯槽神経の切断によるSemaphorin3Aの早期発現の誘導、切断中脳側からの軸索伸長の抑制、損傷神経の細胞死の抑制を示している。

以上のように、本研究は末梢神経切断におけるSemaphorin3Aの動態を可視化し、初めて下歯槽神経再生過程における役割を明らかにした点で、本研究の意義を認める。