



PDGF- α receptor expression following hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain

Morioka, Ichiro

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2013-04-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3044

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003044>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 4 2 】

氏 名・(本 籍)	森岡 一朗	(兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	
学 位 記 番 号	博い第1602号	
学位授与の 要 件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の 日 付	平成16年3月31日	

【 学位論文題目 】

PDGF- α Receptor Expression Following Hypoxic-
Ischemic Injury in the Neonatal Rat Brain
(新生仔ラット低酸素性虚血性脳障害時における
血小板由来成長因子 α 受容体の発現に関する研究)

審 査 委 員

主 査	教 授	丸尾 猛
	教 授	甲村 英二
	教 授	西尾 久英

【はじめに】

低酸素性虚血性脳障害は、将来の脳性麻痺や精神発達遅滞を引き起こす原因の一つであり、現在も減少傾向になく、その病態解明、新たな治療法の開発が急務な疾患である。その障害のターゲットの一つである大脳皮質白質を構成するオリゴデンドロサイトは、発達期脳において低酸素虚血により容易に傷害を受け、白質軟化を引き起こし、低酸素性虚血性脳症の形成に強く関与している。オリゴデンドロサイトを細胞障害から防護することが低酸素性虚血性脳障害の新たな治療法の一つとして期待される。

近年、神経幹細胞の存在が証明され、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの神経系細胞は、この神経幹細胞の由来と考えられている。オリゴデンドロサイトは、神経幹細胞から前駆細胞を経て最終的に成熟オリゴデンドロサイトへと分化成熟し、神経軸索に髄鞘を形成する。オリゴデンドロサイト前駆細胞は、血小板由来成長因子 (PDGF) の A 鎖および α 型レセプターにより分化調節を受けており、PDGF-A 鎖によって PDGF α 型レセプター (PDGF-R α) が活性化されると、成熟オリゴデンドロサイトへの分化が抑制され、前駆細胞のままの状態での増殖が促進されると考えられている。PDGF-R α の発現はオリゴデンドロサイトの分化に伴って消滅し、成熟段階では認められなくなる。このため PDGF-R α はオリゴデンドロサイト前駆細胞に特異的と考えられ、培養系でも前駆細胞にのみ発現が認められることから、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化マーカーとして位置付けられている。

さらに、*in vitro* の研究で、酸化ストレス刺激や虚血に対してオリゴデンドロサイトには分化段階に応じた障害への脆弱性が存在することが報告されており、発達期低酸素性虚血性脳障害におけるオリゴデンドロサイトの分化調節機構は、近年研究対象としての興味が集まっているところである。

本研究では、低酸素性虚血性脳障害時におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の反応を明らかにするために、新生仔ラット脳低酸素虚血モデルを用いて PDGF-R α の発現を解析し、分化制御による細胞障害回避の可能性を検討した。

【方法】

新生仔ラット脳低酸素虚血モデル：日齢 7 の Sprague-Dawley ラットをエーテル吸入麻酔下、左総頸動脈を結紮切離した。2 時間の回復時間をおいた後、直腸温を $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に保ち、8%酸素を 2 時間負荷した。ほとんどの仔ラットは低酸素虚血負荷中にけいれん発作を認めた。コントロールは、日齢 7 に左総頸動脈の結紮切離のみを行ったものとした (sham 群)。

Northern blot：検討対象時間に左大脳皮質を摘出し、超遠心法にて total RNA 分画を抽出し、常法の Northern blotting を行った。ラット由来 PDGF-R α 、PDGF-A 鎖 probes は、RT-PCR 法にて cDNA の一部を作り、plasmid にて増幅し作製した。内因性コントロールとして、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、等量の RNA サンプルの比較検討であることを確認した。

Western blot：検討対象時間に左大脳皮質を摘出し、常法にて total protein 分画を抽出し、SDS/PAGE にて Western blotting を行った。抗体は、抗ラット PDGF-R α ポリクローナル抗体、抗ラット β -actin 抗体 (Santa Cruz 社) を使用した。 β -actin の蛋白濃度により検討蛋白量が同量であることを確認した。

免疫組織化学染色：新生仔ラットを灌流固定した後、脳組織を摘出し、海馬レベルの前額断でパラフィン切片を作製した。免疫組織化学染色は ABC 法によって行った。抗体は Western blot と同じ抗ラット PDGF-R α ポリクローナル抗体 (Santa Cruz 社) を使用した。

【結果と考察】

PDGF-R α mRNA の発達変化：正常ラット大脳皮質において、6.8 kb の PDGF-R α の単一バンドを確認した。PDGF-R α mRNA は出生時より豊富に発現しており、日齢 10 でピークに達し、その後徐々に減少した。

この PDGF-R α mRNA の動きは、成熟オリゴデンドロサイトのマーカーである髄鞘構成蛋白プロテオリビッド蛋白やミエリン塩基性蛋白の mRNA の動きと反比例しており、PDGF-R α がオリゴデンドロサイトの分化と密接な

関連を有すると考えられた。

低酸素虚血脳障害後の PDGF-A 鎖、PDGF-R α mRNA の発現誘導：低酸素虚血負荷後 PDGF-A 鎖 mRNA には変化を認めなかった。PDGF-R α mRNA は低酸素虚血負荷直後 30 分にコントロールと比較して有意に一過性の増加を示した。その後減少し、負荷後 12 時間を最低値とし、以後増加傾向を示した。

低酸素虚血脳障害後の PDGF-R α 蛋白の発現：PDGF-R α 蛋白は、低酸素虚血負荷後徐々に増加し、負荷後72から96時間で有意な一過性の増加を示した後、120時間で基線へ戻った。

低酸素虚血脳障害時の PDGF-R α 蛋白の局在：低酸素虚血負荷後72時間の免疫組織化学染色において、低酸素虚血負荷側の脳皮質においてのみ PDGF-R α の染色性を認めた。一方、低酸素虚血負荷側の線条体、コントロールの脳皮質、線条体には染色性は認められなかった。

PDGF-R α の mRNA、蛋白ともに低酸素虚血負荷後、一過性の発現増強を示した。mRNA の増加から蛋白の増加への時間的経過は、PDGF-R α の能動的 up-regulation と考えられ、免疫組織化学染色の結果は障害部位における PDGF-R α 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞の相対的増加を意味していると考えられる。

このことより、発達期の低酸素虚血障害後、脳皮質においてオリゴデンドロサイトの分化抑制機構が働いたことが示唆された。オリゴデンドロサイト前駆細胞は自己増殖可能な細胞で、傷害閾値の高い細胞と考えられる。また、オリゴデンドロサイトは白質髄鞘の修復機能を有し、オリゴデンドロサイト前駆細胞がその修復機構のソースとなることが報告されている。PDGF-R α システムを介して、オリゴデンドロサイトの分化を前駆細胞段階で停止させておく、あるいは、成熟途上のオリゴデンドロサイトから前駆細胞へと分化を逆戻りさせることが、発達期の低酸素虚血による脳白質障害防護となる可能性が示唆された。このように、発達期の低酸素虚血脳障害時の分化抑制機構は、オリゴデンドロサイトの修復機構を担っている可能性がある。

【結論】

発達期の脳皮質において、PDGF-R α 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞が、低酸素虚血障害後一過性に、障害部位に限局して増加することが示された。この生体反応の意義としては、障害に反応してオリゴデンドロサイトの分化を一時的に抑制制御することにより、障害閾値を高めて自身の生存を促し、障害環境の消失後に再び分化を誘導して白質を構成してゆくという障害修復機構を担っている可能性が考えられた。実際に PDGF-R α の発現が認められた障害部位に、より早期に髄鞘蛋白の発現が認められる現象を我々は確認しており、この生体反応を外因性に制御することが、発達期脳障害の治療戦略に結びつくものと思われる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1603 号	氏名	森岡 一郎
論文題目	PDGF- α Receptor Expression Following Hypoxic-Ischemic Injury in the Neonatal Rat Brain 新生仔ラット低酸素性虚血性脳障害時における 血小板由来成長因子 α 受容体の発現に関する研究		
審査委員	主 査 丸尾 猛 副 査 甲村 英子 副 査 西尾 久英		
審査終了日	平成 16 年 3 月 15 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

周生期の低酸素性虚血性脳障害は、脳性麻痺や精神遅滞を引き起こす主要な原因の一つであり、新たな治療法の開発が急務な疾患である。その障害のターゲットとしては皮質神経細胞が重要なものであるが、近年、白質障害に起因する運動麻痺や視覚認知などの高次機能の障害が注目されている。脳白質を構成するオリゴデンドロサイトは、神経系幹細胞から前駆細胞を経て最終的に成熟細胞へと分化成熟し、神経軸索に髄鞘を形成する。発達期脳において、オリゴデンドロサイトは低酸素虚血により容易に傷害を受け、白質軟化を引き起こし、低酸素性虚血性脳症の形成に強く関与している。故に、オリゴデンドロサイトを細胞障害から防護することが低酸素性虚血性脳障害の新たな治療法として期待されている。

本研究者は、オリゴデンドロサイトを未分化な段階で一時的に分化停止、あるいは逆分化させ、障害への閾値を上昇させることで細胞を防護し、後遺症を軽減させる戦略のもと研究を展開している。オリゴデンドロサイトの分化抑制制御因子として血小板由来成長因子 (PDGF) の α 型レセプターに着目し、その発現動態を低酸素虚血脳障害ラット新生仔モデルにおいて検討している。オリゴデンドロサイトの前駆細胞は PDGF α 型レセプター (PDGF-R α) により分化調節を受けており、本受容体が活性化されると成熟オリゴデンドロサイトへの分化が抑制され、前駆細胞の状態での増殖が促進されると考えられている。PDGF-R α の発現はオリゴデンドロサイトの分化に伴って消滅し、成熟段階ではほとんど認められなくなることを本研究においてもノザンプロットにて証明している。このため PDGF-R α はオリゴデンドロサイト前駆細胞に特異的と考えられ、その発現は分化マーカーとして位置付けられている。

次に、臨床に即した低酸素虚血脳障害ラット新生仔モデルにおける検討にて、PDGF-R α の mRNA レベル、蛋白レベルがともに脳障害発生部位においてのみ一過性に発現増強することを確認している。このことは PDGF-R α の能動的 up-regulation と考えられ、オリゴデンドロサイト前駆細胞の相対的増加を意味している。このことより、発達期大脳皮質の低酸素虚血障害部位において、オリゴデンドロサイトの分化抑制機構が働いたものと考察している。オリゴデンドロサイト前駆細胞は自己増殖可能な細胞で、傷害閾値の高い細胞と考えられる。PDGF-R α システムを介して、オリゴデンドロサイトの分化

を前駆細胞段階で停止させておく、あるいは、成熟途上のオリゴデンドロサイトから前駆細胞へと分化を逆戻りさせることが、発達期の低酸素虚血による脳白質障害の防護修復機構を担っている可能性がある」と結論付けている。

発達期の脳皮質障害部位において、PDGF-R α 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞が限局性に増加する生体意義としては、障害に反応してオリゴデンドロサイトの分化を一時的に抑制制御することにより、障害閾値を高めて自身の生存を促し、障害環境の消失後に再び分化を誘導して白質を構成してゆくという障害修復機構を担っている可能性が考えられる。研究者らは、実際に PDGF-R α の発現が認められた障害部位に、より早期に髄鞘蛋白の発現が認められる現象を確認しており、この生体反応を外因性に制御することが、発達期脳障害の治療戦略に結びつくものと考察している。

本研究は、周生期の発達段階にある白質の障害修復防護機構における PDGF-R α の役割を分子生物学的に解析したものであり、今後の低酸素性虚血性脳障害に対する治療戦略への価値ある重要な新知見であると認める。

よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。