

論 文 要 旨

Desert Hedgehog-Patched 2 Expression in Peripheral Nerves during Wallerian Degeneration and Regeneration Sepideh Naghibzadeh Bajestan

〔末梢神経のワーラー変性と再生過程における Desert hedgehog-Patched2 の発現〕

セピデ ナギブザデ バジエスタン

【序論および目的】

The hedgehog (Hh) family of secreted ligands plays a critical role in a variety of developmental processes in both insects and vertebrates. Three homologs of Hh, Sonic, Indian and Desert (Dhh) hedgehog have been described in mammals. *Dhh* mRNA is expressed in the Sertoli cells of developing testis and Schwann cells of the peripheral nervous system. Schwann cell-derived Dhh signals the formation of the connective tissue sheath around peripheral nerves in both mice and humans. Nerve injury leads to dramatic changes in expression of a large number of genes, which recapitulates the pattern seen in early development. As Desert hedgehog is involved in the development of peripheral nerves and is expressed in adult nerves, it may play a role in the maintenance of adult nerves and degeneration and regeneration after injury. We firstly investigated the Dhh-receptors, which are expressed in mouse adult nerves. Then we induced crush injury to the sciatic nerves of wild type (WT) and *dhh*-null mice and studied the morphological changes and the expression of *dhh* and related receptors in the distal stump of injured nerves at different time points after injury.

論 文 要 旨

【材料および方法】

The expression of Dhh receptors, *patched (ptc) 1* and *ptc2* was investigated in sciatic nerves of adult mice using RT-PCR. To identify the nature of the cells expressing *ptc2*, we studied the expression of *ptc2* mRNA in purified cultures of mouse Schwann cells and fibroblasts by RT-PCR. We also studied the expression of Ptc2 protein in sciatic nerves of adult mice using immunohistochemistry. Then we induced crush injury to the sciatic nerves of wild type (WT) and *dhh*-null mice and the distal stump of injured nerves were analyzed morphologically at different time points and expression of *dhh* and related receptors was also measured by RT-PCR in WT mice.

【結 果】

Ptc2 mRNA was expressed in adult sciatic nerves; however, *ptc1* mRNA was undetectable under the same experimental condition. Using RT-PCR in purified cultures of mouse Schwann cells and fibroblasts, we found *ptc2* mRNA in Schwann cells, and at much lower levels, in fibroblasts. By immunohistochemistry, Ptc2 protein was seen on unmyelinated nerve fibers. After nerve crush injury, degeneration of myelinated fibers was more severe in the nerves of *dhh*-null mice than those in WT mice. Furthermore, in regenerated nerves of *dhh*-null mice, minifascicular formation was even more extensive than in *dhh*-null intact nerves. Both *dhh* and *ptc2* mRNA levels were down-regulated during the degenerative phase post-injury in WT mice, while levels rose again during the phase of nerve regeneration.

【結論及び考察】

Our results suggest that the Dhh-Ptc2 signaling pathway may be involved in the maintenance of adult nerves and may be one of the factors that directly or indirectly determine the response of peripheral nerves to injury.

(Journal of Neurobiology 2005 年 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	医研第 602 号	氏名	セビデ ナギブザデ バジェスタン
審査委員	主査	出雲 周二	
	副査	丸山 征郎	米澤 傑

Desert Hedgehog-Patched 2 Expression in Peripheral Nerves during Wallerian Degeneration and Regeneration

(末梢神経のワーラー変性と再生過程における Desert Hedgehog-Patched 2 の発現)

Hedgehog は神経系の発生に重要な役割を果たしている。Hedgehog family の一つである Desert hedgehog(Dhh)は末梢神経の発生に関与していることが、マウス及びヒトで報告されているが、その分子機構の詳細や成熟期の役割については明らかでない。本研究では末梢神経の変性と再生過程における Dhh 及びその受容体 Patched(Ptc)/Smoothed(Smo)の役割を解明することを目的としている。

著者らは野生型成熟マウス 45 匹、*dhh* ノックアウトマウス 18 匹を用いて、坐骨神経に挫滅損傷を加えた末梢神経ワーラー変性モデルを作成し、病変組織について 1)末梢神経の変性、再生過程における Dhh とその受容体 Ptc1、Ptc2、及び Smo の mRNA 発現を半定量的 RT-PCR 法を用いて経時的に測定、2) Ptc2 蛋白の発現細胞を、培養細胞の RT-PCR、神経ときほぐし標本や新鮮凍結切片を用いた二重免疫組織化学法により同定、3) ワーラー変性病変の病理組織学的特徴をエボン包埋切片トルイジンブルー染色標本の光顕観察、有髄神経直径分布ヒストグラム作製、RCA-1 によるマクロファージ染色等により、野生型マウスとノックアウトマウスで比較検討している。

本研究で得られた新知見は次の 5 点である。

1. 野生型マウス末梢神経には *ptc2* mRNA が発現しているが、*ptc1* mRNA は検出出来なかった。
2. 培養シュワン細胞においても、*ptc2* mRNA が発現していた。培養線維芽細胞では *ptc2* mRNA の発現はシュワン細胞より低かった。
3. 培養無髄シュワン細胞には Ptc2 蛋白が発現していたが、有髄シュワン細胞では検出出来なかった。
4. 野生型マウス末梢神経の損傷実験では、損傷後 *dhh/ptc2* mRNA の発現は低下するが、再生期には再増加していた。
5. *dhh* ノックアウトマウス末梢神経は、野生型マウスに比べ損傷後の変性が高度であった。

以上より、末梢神経系の維持・再生に、Desert hedgehog/Patched 2 シグナル伝達経路が重要な役割を果たしていると結論している。

本研究は末梢神経の機能維持・再生における新たな分子機構の存在を明らかにし、末梢神経障害の治療における分子標的となりうることを示したものである。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 602 号	氏名	セビデ ナギブザデ バジェスタン
審査委員	主査	出雲 周二	
	副査	丸山 征郎	米澤 傑
<p>主査および副査の3名は、平成17年9月27日、学位請求者 セビデ ナギブザデ バジェスタン 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1. もし Dhh と Ptc2 が末梢神経の維持と再生に重要なら、その mRNA レベルは損傷後の間もない時期に上昇すべきなのではないでしょうか。</p> <p>答 神経成長因子である NGF・BDNGF は確かに損傷後直ぐに増加するが、髄鞘蛋白や CNTF などは、Dhh/Ptc2 と同様に少し遅れて再生期に増加することが報告されています。これは、Dhh/Ptc2 の発現が軸索-シュワン細胞相互作用に制御されている可能性を示唆しています。</p> <p>質問2. Figure 1 について。この標本は未固定であるから、有髄線維では抗 ptc2 抗体が浸透出来ないために、染色されていないという可能性はありませんか？</p> <p>答 Figure3 に示しているようにアセトン固定標本でも同様の結果を得ているので、その可能性はないと思います。</p> <p>質問3. Ptc1 が発生時期に神経に発現し、Ptc2 が成熟期の神経に発現する理由は何ですか？</p> <p>答 同様の現象は精巣においても見られることが報告されています。精巣は Dhh が作用するもう一つの器官です。理由はまだ不明ですが、現在研究が進行中です。</p> <p>質問4. 野生型マウスでは末梢神経損傷後、Dhh/Ptc2 mRNA は平行して推移していますが、Dhh KO マウスの場合に、Ptc2 mRNA の変化を調べましたか？</p> <p>答 Dhh KO マウスの末梢神経では、ptc2 mRNA の発現が野生型に比べ低いことは確認しましたが、損傷後の推移は調べていません。</p> <p>質問5. siRNA を使って Dhh の発現抑制実験を行って見たら興味深い結果が得られるかもしれませんね。</p> <p>質問6. Ptc2 はシュワン細胞と神経周膜細胞/fibroblast の両方に発現しているのですか？</p> <p>答 無髄線維のシュワン細胞のみです。</p> <p>質問7. Dhh/Ptc2 が免疫系細胞に発現しているかどうかを調べたことがありますか？</p> <p>答 ありません。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問 8. Dhh はアポトーシスに関与していますか？

答 Sonic hedgehog は中枢神経の発生に関与しているので、神経細胞のアポトーシスに関与しているかもしれませんが、Dhh に関しては不明です。

質問 9. Fig 6 で、Dhh KO マウスの末梢神経では損傷後に多数のマクロファージが浸潤していることを示していますが、これは神経障害の程度が強いことの原因ですか、それとも結果ですか？

答 それは今回の結果からは判断出来ません。

質問 10. Dhh heterozygous mouse は表現型に異常が見られますか？

答 末梢神経や精巣組織にも異常は見られません。これはヒトにおいても同様です。

質問 11. 何故損傷 2 日後の末梢神経において Ptc2 が陽性なのに、Dhh は陰性なのですか？

答 Dhh の発現は種々の抗体を用いて調べましたが、結果は陰性でした。これは方法や抗体の感度が原因なのかもしれません。

質問 12. Desert, Indian, sonic hedgehog の名前の由来は何ですか？

答 Sonic hedgehog はこの分子がクローニングされた当時流行っていたゲームソフトの主人公 Sonic the hedgehog に由来します。Desert, Indian は実際に砂漠針ねずみ、インド針ねずみという種類の針ねずみ(hedgehog)に由来します。

質問 13. Ptc2 は無髄線維シュワン細胞にのみ発現しているとのことですが、Dhh ノックアウトマウス末梢神経の無髄神経に異常は見られませんか？ヒト Dhh 遺伝子変異症例ではどうですか？

答 今回のマウス実験では無髄線維については調べていません。ヒト症例では特に異常は無いようです。

質問 14. 有髄線維のシュワン細胞では Ptc 2 の発現がみられませんが、Dhh/Ptc2 は有髄線維にはどのような作用をするのですか？

答 現時点では不明ですが、損傷により発現が消失し、有髄神経の再生に伴って発現してきているので、髄鞘形成前に何らかの関与をし、髄鞘再生と共に低下するのかもしれません。

質問 15. ノックアウトマウスの神経再生で minifascicle の形成がみられており、成体の神経再生に Dhh/Ptc1 の系が関与していると思われませんが、神経再生時の神経周膜に Ptc1 の発現はありませんでしたか？

答 RT-PCR では ptc 1 mRNA の発現は検出できませんでした。Ptc 1 の免疫染色はしていません。

質問 16. 控滅損傷による病変は均一に生じていましたか？解析には何匹のマウスを用いましたか？

答 損傷は記載されているようにすべて同じ方法で加え、個体間の差は軽微でした。RT-PCR には約 20 匹、損傷実験には野生型、KO マウスそれぞれ 20 匹を用いました。

質問 17. Dhh KO マウスで、より激しい神経損傷が起きたのは神経周膜の脆弱性が原因ですか？

答 神経周膜の脆弱性により、より強い圧迫が神経線維に加わった可能性が高いと考えています。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。