




審査委員会報告書

【書式11】

令和 6年 1月 31日

申請者	フリガナ	イシジマ タカシ 石嶋 貴志 (男)	生年月日	1995年 6月 1日生
	氏名		国籍又は本籍	東京都
	学籍番号	21D5903	専攻名	生命理学専攻
論文題目		ラット顔面神経損傷時に働くシグナル分子の解析		
翻訳題目 (英文の場合のみ)				
審査 委員会 委員	(氏名) 印 (所属機関名) (役職名)			
	主査委員：中嶋 一行			創価大学大学院理工学研究科 教授
	委員：西原 祥子			創価大学大学院理工学研究科 教授
	委員：川井 秀樹			創価大学大学院理工学研究科 教授
内容の要旨及び審査結果の要旨 最終試験の結果の要旨			別紙1 別紙2	
博士学位申請論文の受付			受付日：令和 6年 1月 4日	
博士学位申請論文の受理			受理日：令和 6年 1月 10日 (可) ・ 不可	
論文審査の可否			実施日：令和 6年 1月 19日 (合) ・ 否	
最終試験の可否			実施日：令和 6年 1月 19日 (合) ・ 否	
審査 委員会 の結論	審査委員会は、石嶋貴志から提出された学位論文について厳格な審査を行い、かつ、申請者の専門分野に関する学力および研究能力に関する試問を行った。その結果、論文の内容が博士(理学)の学位に相当するものであり、かつ申請者が十分な学力と研究能力を有するものと認定した。			

審査委員会の審査及び最終試験の結果を受け、当該研究科委員会は以下の通り判定しました。

研究科委員会の判定	開催日：令和 6年 2月 16日		
	出席者数 30名	可数 30名	不可数 0名

最終可否	(合) ・ 否
------	---------

学位記番号	博 (甲)・乙 211号	授与年月日	令和 6年 3月 18日
学位の種類	博士 (理学)	備考	

研究科長 井田 旬一 

内容の要旨及び審査結果の要旨

【書式 1 1 (別紙 1)】

令和 6 年 1 月 31 日

氏名 (本籍)	石 嶋 貴 志 (東京都)		
学位の種類	博士 (理学)		
学位記番号			
学位記の授与日	令和 年 月 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 創価大学大学院学則第 31 条第 3 項該当 創価大学学位規則第 3 条の 3 第 1 項該当		
論文題目	ラット顔面神経損傷時に働くシグナル分子の解析		
論文審査機関	工学研究科委員会		
論文審査委員	主査委員	医学博士	中 嶋 一 行
	委 員	理学博士	西 原 祥 子
	委 員	Ph. D.	川 井 秀 樹



<論文の内容の要旨>

本論文は、ラットの顔面神経傷害時、傷害顔面神経核内に見られる運動ニューロンの機能低下とミクログリアの増殖を引き起こすシグナル伝達系を解析し、運動ニューロン・ミクログリア細胞間相互作用の存在を明らかにしたものであり、序論、方法、結果および考察から構成されている。以下にその要旨を述べる。

序論

ラットの第 7 脳神経である顔面神経 (運動ニューロン) の軸索繊維は、脳幹の神経核に存在する運動ニューロン細胞体から伸長し、頭蓋骨を貫通したのち、顔の表情筋に投射している。顔面神経核内には、運動ニューロンのほか、アストロサイトやミクログリアというグリア細胞も存在しており、これら複数種の細胞によって正常な神経系が構築されている。このラットの顔面神経系で、運動ニューロンが傷害を受けると、機能分子である choline acetyltransferase (ChAT)、vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) や GABA_AR α 1/GABA_AR β 2,3 が著しく低下する。また、傷害運動ニューロンの周囲では、ミクログリアが増殖を起し、ionized Ca²⁺ binding adapter molecule 1 (Iba1) や proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を高発現する。これらの現象は、傷害運動ニューロンの生存、修復・再生に重要と考えられるが、その基盤となるシグナル伝達系やシグナル分子の活性化/不活性化に関する情報は断片的であり不明な点が多く残されていた。すなわち、運動ニューロンの傷害時どんなシグナル分子が活性化/不活性化するのか、ミクログリアの増殖時どのようなシグナル経路/シグナル分子が働くか、また、傷害運動ニューロンのシグナル系を変動させるとミクログリアの増殖が影響を受けるかなど、ほとんど情報がないという状態であった。そこで、本研究ではラットの顔面神経傷害モデルを使用し、これらの諸点を解析した。対象シグナル分子として、細胞の初期応答に関連する immediate early genes (IEGs) である c-Jun と c-Fos、神経機能に深く関わっている cAMP response element binding protein (CREB) や同ファミリーの activating transcription factor 2 (ATF2)、多くの生命現象に関わる mitogen activated protein kinases (MAPKs) として extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) および p38 を選択した。

方法

生後 8 週齢の♂ウイスターラット (同腹) を使用した。片側傷害系では、左側をコントロールとして右側の顔面神経を茎乳突孔の位置で切断した。その後、経時的 (1, 5, 3, 6, 12h および 1, 3, 5, 7, 14d) に、両側神経核を回収し、免疫ブロット用の試料とした。免疫組織化学的染色を行う場合は、ラットを 4% パラホルムアルデヒドで経心的に灌流し、摘出した脳はさらに後固定を行い、クリオスタットによって厚さ 10 μ m の組織切片を作成した。

両側傷害系では左右の顔面神経を切断し、左側には vehicle を、右側には修復促進物質 (repair promoting substance ; RPS) を投与した ([³H]Cut Cut^{RPS}) と表記)。傷害 5 日後に免疫ブロットまたは免疫組織化学的方法によって両顔面神経核を比較した。なお、両側 sham 系、片側切断系および両側切断系は、それぞれ [Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut] と表した。

ラット新生仔脳由来の初代培養系は、常法によって調製した。培養ミクログリアは、この初代培養系から振盪法によって回収・播種した。

結果および考察**運動ニューロン傷害後のシグナル分子**

ラットの顔面神経を切断すると、傷害顔面神経核では、IEGs の c-Jun が傷害後 12h-7d に有意に増加し、CREB/ATF ファミリーの p-CREB と p-ATF2、MAPKs の p-ERK と p-JNK は、傷害後初期から有意に減少した。これら傷害応答性を示した分子の局在を、免疫組織化学染色によって調べると、p-ERK 以外、主に運動ニューロンの核に存在することが明らかになった。p-ERK は運動ニューロン細胞体に局在していた。c-Jun の増加は、運動ニューロンの生存維持に働き、p-CREB、p-ATF2、p-ERK および p-JNK の減少は、運動ニューロン特異的機能分子 (ChAT、VAChT、GABA_AR α 1) の低下に関連すると推測された。

一方、ミクログリアでは、運動ニューロンの損傷後、p-CREB、p-ATF2 および p-p38 が顕著な増加を示した。これらの分子は増殖反応に関連すると推測されたため、インビトロの増殖系でその活性化 (リン酸化) 反応を調べた。その結果、増殖因子 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) による増殖反応時、CREB、ATF2 および p38 が、強くリン酸化されることが明らかになった。さらに、これらの活性化がミクログリアのマーカー分子 (Ibal)、cFms (M-CSF の受容体) および S 期マーカー分子 (PCNA) の誘導に関連することが示唆された。

傷害運動ニューロンの回復とミクログリアの増殖性

顔面神経を傷害すると、それに呼応するように周囲のミクログリアが増殖を開始するが、このミクログリアの増殖程度がいつも一定なのか、運動ニューロンの損傷レベルに影響されるかどうかについて、傷害運動ニューロンのシグナル分子の活性化/量を回復させる修復促進物質 (RPS) を使用して調べた。RPS として、glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF)、N-acetyl-L-cysteine (NAC)、salubrinal (Sal) を選択し、ラットの顔面神経傷害モデルによって、その効果を調べた。

[^{V+}Cut Cut^{+RPS}]系の[cut+RPS]核では、GDNF、NAC、Sal のいずれも[cut+vehicle]核と比較して、c-Jun レベルを低下させ、p-CREB レベルを上昇させた。これは RPS が運動ニューロンの傷害性を回復させたことを示す結果であった。また、運動ニューロンの ChAT、VAChT および GABA_AR α 1 の量も[cut+RPS]核では[cut+vehicle]核より有意に高いことが明らかになった。これらの結果から、RPS の投与が、顔面運動ニューロンの損傷レベルを回復させたと考えられた。

[^{V+}Cut Cut^{+RPS}]系で、Ibal、cFms、PCNA のレベルを調べると、[cut+vehicle]核に比べると[cut+RPS]核では、いずれも増加が抑制されていた。p-p38/p38 の応答性を見ると、[cut+vehicle]核では高値を示したが、[cut+RPS]核では、それより有意に低い値を示した。免疫組織化学染色の結果も同様の結果を示した。これらの結果は、RPS 投与によって、ミクログリアの増殖性が抑制されたことを示唆している。従って、運動ニューロンの傷害程度を回復させるとミクログリアの増殖性が抑制されることが証明された。

<論文審査結果の要旨>

本論文は、ラット顔面神経を傷害した時に観察される運動ニューロンの機能分子の低下およびそれに付随して起こるミクログリアの増殖という現象を、シグナル分子の活性化/不活性化およびシグナル伝達経路の視点から解析し、まとめたものである。損傷神経核の IEGs (c-Jun, c-Fos)、CREB/ATF family (CREB, ATF2)、MAPKs (ERK, JNK, p38) を定量的に解析し、変動を示す細胞種 (運動ニューロン、グリア細胞) を明らかにした。さらに、運動ニューロンの傷害時に低下/上昇するシグナル分子の変動を抑制すると、ミクログリアの増殖性が低下することを明らかにした。この実験結果から、ミクログリアの増殖性は一定のものではなく、運動ニューロンの傷害程度によって影響を受けることが示された。本研究によって、運動ニューロン傷害時、シグナル系が特有の変動を示すことが明らかになったが、加えて、異種細胞間相互作用の存在が明確に示された点も評価できる。これら新規の知見や手法は、今後のニューロンの修復・再生研究の進展に、また、ニューロン・グリア相互作用の研究に波及・貢献すると考えられる。従って、本論文は、博士学位論文としての価値を有するものと結論した。

本論文の内容は、以下の原著論文に掲載された。

Ishijima T, Nakajima K.

Changes of signaling molecules in the axotomized rat facial nucleus.

J Chem Neuroanat. 2022 Dec;126:102179. doi: 10.1016/j.jchemneu.2022.102179.

CiteScore=5.2 (2022)

Ishijima T, Nakajima K.

Restoration of injured motoneurons reduces microglial proliferation in the adult rat facial nucleus.




J Neuropathol Exp Neurol. 2024 Jan 23;nlad116. doi: 10.1093/jnen/nlad116.

Impact Factor=3.2 (2024)

最終試験の結果の要旨

【書式11（別紙2）】

令和6年1月31日

フリガナ 申請者氏名	イシジマ タカシ 石嶋 貴志	専攻名	生命理学 専攻
審査委員会委員	主査委員	中嶋 一行	
	委員	西原 祥子	
	委員	川井 秀樹	

要旨

令和6年1月19日（金）、上記三名の審査委員により、申請者に対する最終試験を実施した。学位論文の内容およびそれに関連する周辺分野に関して口頭試問を行った結果、申請者は博士（理学）としての十分な学力と研究能力を有するものと判定された。従って、審査委員会は、申請者を合格と認定した。