

論文審査結果の要旨

平成 27 年 2 月 10 日

氏名	竹 澤 洋 亮
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 123 号
学位記の授与日	平成 27 年 3 月 18 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 2 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	運動ニューロンの傷害／修復に関わるグリコーゲン代謝の研究
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 青 山 由 利 委 員 医学博士 金 松 知 幸

＜論文の内容の要旨＞

本論文は、ラットの顔面神経傷害時、傷害核で起こるグリコーゲンの変動現象およびそのメカニズムを解析したものであり、序論、方法、結果・考察および結論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の軸索繊維は、脳幹に位置する運動ニューロン細胞体を起点として頭蓋骨を貫通した後、顔の表情筋に接合している。この神経系で軸索を傷害すると、顔面神経核の運動ニューロンは元より、グリア細胞もさまざまな影響を受ける。運動ニューロンは、傷害後、一時的にアセチルコリン合成酵素（ChAT）や小胞型アセチルコリントランスポーター（VAChT）の量を減少させるが、それらは 4～5 週間の間に元のレベルに回復する。一方、ミクログリアは、運動ニューロンの傷害に応答して、一過性に増殖する。また、アストロサイトは増殖こそしないが、長期にわたり活性化状態を維持している。このように、傷害顔面神経核では、細胞レベルで大きな変動が起こるが、この組織再構築を推進するエネルギー物質や代謝については、不明な点が多く残されてきた。

本研究では、神経傷害とその後の修復・再生過程に密接に関連するエネルギー代謝、特にグリコーゲン代謝を明らかにするために、グリコーゲンおよびその調節関連分子に注目し、解析を行った。

方法

実験動物として生後 8 週齢のウイスター雄ラットを使用し、片側顔面神経を茎乳突孔で切断した。経時的（1、3、5、7、14、21、28、35 日）に脳を摘出し、各脳からコントロール側と傷害側の顔面神経核を回収した。

組織中のグリコーゲンは、アントロン硫酸法によって定量し、組織中のグリコーゲン顆粒の検出には、グリコーゲン抗体（奥羽大学、馬場麻人先生より提供）を使用した。

結果および考察

ラットの顔面神経を傷害し、経時的に顔面神経核を回収し、その中のグリコーゲン量をアントロン硫酸法により定量した結果、傷害後 5 日から有意に増加し、7 日後にピークとなり、その後は低下し始め、21 日以降はコントロールレベルに戻った。すなわち、グリコーゲンは、神経傷害後一過性の変動を示すことが明らかになった。

傷害顔面神経核におけるグリコーゲンの変動を、グリコーゲン抗体を使用した免疫組織化学によって調べたところ、傷害後1日では変化が見られなかったが、7日後になるとグリコーゲン染色性が増加するという結果が得られた。この結果はアントロン硫酸法による定量結果を支持するものであった。

傷害顔面神経核でグリコーゲンを産生する細胞腫の同定を、グリコーゲン抗体と各種細胞マーカーを使用した免疫二重染色によって行った。その結果、グリコーゲン顆粒のほとんどは、運動ニューロンの細胞体に一致し、アストロサイトやミクログリアには観察されなかった。また、グリコーゲン合成酵素 (GS) も、運動ニューロンに検出された。従って、グリコーゲンを産生する細胞は、主に運動ニューロンであることが証明された。

次に、傷害核で見られた一過性のグリコーゲン変動が、活性型 GS と不活性型 GS の調節によって引き起こされる可能性を調べた。傷害顔面神経核で、経時的に総 GS 量と不活性のリン酸化 GS (pGS) 量を解析した結果、傷害後の早期 (1～3 日) には、pGS/GS 比が低く (0.5 程度)、7～14 日にはその比が上昇し (2.0 以上)、その後しだいにコントロールレベル (1.0) に戻ることが明らかになった。すなわち、傷害後1～3日には、活性な GS が多いためグリコーゲンが合成・蓄積されるが、7日以降は不活性な GS が増加するためグリコーゲン合成が停止することを示唆している。また、傷害後7日以降グリコーゲン量が低下するのは、傷害脊髄運動ニューロンの例から推測すると、活性なグリコーゲンホスホリラーゼ (GP) が増加するためと考えられた。

結論

ラットの傷害顔面神経 (傷害運動ニューロン) が一過性にグリコーゲンを増加させることを明らかにしたが、この合成されたグリコーゲンは、修復・再生過程を推進するエネルギー産生に使用されると推測された。

本論文の内容は、以下のふたつの学術雑誌に掲載された。

(1) Takezawa Y, Kohsaka S, Nakajima K.

Transient down-regulation and restoration of glycogen synthase levels in axotomized rat facial motoneurons.

Brain Research 1586 (2014) 34-45.

(2) Takezawa Y, Baba O, Kohsaka S, Nakajima K.

Accumulation of glycogen in axotomized adult rat facial motoneurons.

Journal of Neuroscience Research (2015) in press.

<論文審査結果の要旨>

本論文は、ラット顔面神経傷害後に起こるグリコーゲン代謝を生化学的および免疫組織化学的に解析し、傷害核におけるグリコーゲンの一過性変動、および、そのグリコーゲンの産生細胞腫を初めて明らかにし、さらにグリコーゲン変動はグリコーゲン合成酵素と分解酵素の調節によって引き起こされることを示した。この研究結果は、傷害ニューロンのエネルギー代謝にはグリコーゲンが使用され、それが修復・再生過程に関わることを示唆しており、「神経系グリコーゲンの生理的／病理的役割はなにか」という問いに対する回答にもなっている。このように本論文は、学術的重要性が認められることから、学位論文として認定した。