

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

成体神経前駆細胞を用いた損傷脊髄再生に関する基礎的研究

指導教官 中村 耕三 教授

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

大堀 靖夫

**【研究の背景】** 我が国には現在 10 万人以上の脊髄損傷患者がおり、毎年約 5000 人が新たに罹患している。さらに近年、高齢化社会に伴って比較的軽微な外傷で発症する高齢者の脊髄損傷患者が増加している。脊髄損傷の治療は、除圧固定手術とリハビリテーションが中心であり、ダメージを受けた脊髄自体の修復再生療法は今のところ皆無である。一方で、脊髄を含む成体中枢神経系の多くの領域に神経幹細胞や様々な前駆細胞群（ここではこれらを総称して神経前駆細胞と呼ぶ）が存在することが知られており、近年これら神経前駆細胞を利用

した再生医療の可能性が動物実験において研究されている。本研究では、green fluorescence protein (GFP) 発現レトロウイルスと培養系の手法を用いて成体ラット損傷脊髄内の神経前駆細胞の表現型を同定し、これらの細胞を標的とした人為的操作による細胞補充再生療法の可能性を検討した。

**[方法]** 雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (生後 7-9 週齢、体重 250-350g) を使用し、第 10 胸髄高位の脊髄切断モデルを作成した。損傷時に GFP 発現レトロウイルスを切断端から注入し、損傷後 3、7 日の GFP 陽性細胞の表現型を免疫組織染色、または組織片を単一細胞に分散後 (acute dissociation) の免疫細胞染色により同定した。さらに、fibroblast growth factor2 (FGF2) 及び epidermal growth factor (EGF) をウイルスと混合して注入し、増殖因子の実質内投与が損傷脊髄内の GFP 陽性細胞の数や表現型に及ぼす効果を検討した。次に、GFP 陽性細胞の性質を培養系で検討するために、損傷後 3 日脊髄片から neurosphere 法で初代培養を行い、GFP 陽性細胞の増殖・分化能を調べた。これらの GFP 陽性細胞に神経発生期に特異的な転写因子を強制発現させる目的で、neurogenin2 (Ngn2) 発現レトロウイルス、または mammalian achaete-scute1 (Mash1) 発現レトロウイルスを損傷脊髄内で感染させ、それらの効果を *in vitro* および *in vivo* において検討した。

[結果] 損傷後 7 日に GFP 発現レトロウイルスで標識された細胞は、注入部から実質部に散在し、その数は増殖因子の投与によって約 2.7 倍に増加した。GFP 陽性細胞の分布を矢状断面で観察すると、損傷近傍を中心に実質部広範に存在し、頭尾方向に約 8 mm の広がりがみられた。GFP 陽性細胞の表現型は、損傷後 3 日で、多くが Olig2, Nkx2.2, NG2 といったグリア前駆細胞のマーカーを発現していた。このような表現型を示す損傷脊髄内の GFP 陽性細胞の性質を培養系で検討すると、neurosphere 法により増殖し、これらのマーカーを発現した状態で、neurosphere を形成した。さらに、増殖因子非存在下に分化させると、全ての neurosphere 内でニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが混在してみられた。このことは GFP レトロウイルスで標識された細胞が、培養系で神経前駆細胞の性質を保持していることを示す。

次に、増殖因子投与の効果調べるために、損傷後 7 日脊髄内の GFP 陽性細胞の表現型を検討した。増殖因子非投与群では、損傷脊髄内にニューロンのマーカーを発現する GFP 陽性細胞は全く観察されなかったが、増殖因子投与群では、TuJ1 や HuC/D 陽性の幼若ニューロンが観察された。これらの GFP 陽性ニューロンは幼若なニューロンの新生を示すものであり、さらに成熟したニューロンのマーカーの NeuN が陽性な GFP 陽性細胞は観察されなかった。

次に、Ngn2 と Mash1 を発現するレトロウイルスをそれぞれ用いて、損傷脊

髄内の神経前駆細胞に遺伝子導入し、その効果を検討した。Ngn2 遺伝子導入によって、GFP 陽性細胞中に NeuN 陽性の成熟ニューロンが出現した。しかし、これらの新生ニューロンは経時的に減少し、損傷後 28 日でみられなくなった。

brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の同時投与によって、これらの新生ニューロンの生存維持効果がみられた。一方、Mash1 遺伝子の導入によって、GFP 陽性のオリゴデンドロサイトの割合が増加した。さらに、損傷後 28 日目に残存する GFP 陽性細胞の中で、Mash1 導入群にのみ myelin proteolipid protein (PLP) 陽性のミエリン形成オリゴデンドロサイトが少数ながら観察された。これらのことから、Mash1 は神経前駆細胞からオリゴデンドロサイトの産生を促進することが示された。しかし、PLP 陽性細胞は少数であり、分化したオリゴデンドロサイトがミエリン形成する際には、なんらかのミエリン形成抑制因子が存在していることが推察された。

**[考察]** 損傷脊髄内の増殖性細胞を GFP レトロウイルスで標識し、標識細胞の性質を培養系で解析すると、損傷脊髄内の神経前駆細胞は Olig2, Nkx2.2, NG2 三重陽性の表現型で存在することが示された。損傷脊髄内でこれらの前駆細胞からニューロン、成熟オリゴデンドロサイトの再生が妨げられる機構としては、抑制的環境因子と細胞の内在的な性質の二つがある。これまで、増殖因子が未

分化前駆細胞からニューロン分化に作用することは知られていない。一方、損傷脊髄内には種々のニューロン分化抑制因子が存在するとされ、増殖因子投与によって抑制的環境が部分的に克服されたことが、幼若ニューロン新生の一因として考えられる。損傷脊髄内前駆細胞への Ngn2 の強制発現によって、ニューロン分化・成熟が促進し、さらに BDNF 投与は、これらの新生ニューロンの生存維持に効果があった。一方で、Mash1 の強制発現は成熟したオリゴデンドロサイトの増加に効果があった。これらの結果から、損傷脊髄内の神経前駆細胞は薬剤投与や遺伝子導入など的人為的操作によって、細胞補充療法の源として利用できることが示された。さらに、本研究で用いた GFP 発現レトロウイルスによる標識とその解析法は、損傷脊髄の再生医療を目指した成体神経前駆細胞の応用に対する重要な手掛かりを与えるものと考えられる。