

論文の内容の要旨

獣医学 専攻
平成 15 年度博士課程 入学
氏 名 伊 藤 大 介
指導教員名 西 村 亮 平

論文題目

Establishment of Olfactory Ensheathing Cells (OECs) Transplantation Therapy
for Spinal Cord Injury in Dogs
(犬の脊髄損傷に対する Olfactory Ensheathing Cells (OECs)
移植療法の確立)

現在、世界中で約 250 万の人が脊髄損傷により不自由な生活を余儀なくされている。人における脊髄損傷は交通事故、転倒、運動によるものが多く、その数は年々増加している。犬においても人と同様に、交通事故や椎間板ヘルニアなどによる脊髄損傷症例は多く、重症例では生涯にわたって不自由な生活を余儀なくされるか安楽死が選択される。脊髄損傷により機能不全が生じる原因は、損傷部位での神経細胞の損傷ではなく、主に脊髄軸索の断裂ならびに脱髄による神経回路の破綻に起因する。末梢神経の場合には軸索の断裂ならびに脱髄が生じてもシュワン細胞 (Schwann cells: SCs) が軸索を進展させ、髄鞘を形成することが可能であるが、中枢神経である脊髄は再生が不可能であると考えられてきた。しかし近年、中枢神経にも再生能力自体は備わっているが、中枢神経の環境が軸索の再生を妨げていることが明らかにされた。

従来、脊髄損傷に対して種々の薬剤治療が行われてきたが、十分な効果は得られていない。このため様々な治療法が試みられてきたが、その中で近年細胞移植による脊髄再生療法が

注目されている。細胞移植に用いる細胞としては、増殖率が高く、万能細胞である各種幹細胞（骨髄幹細胞、胚性幹細胞、体性幹細胞など）の他、SCs や嗅神経鞘細胞（Olfactory Ensheathing Cells: OECs）も有望視されている。哺乳類の嗅神経は成熟後も再生を繰り返しており、嗅神経を取り巻く OECs はこの再生を誘導している。また SCs は末梢神経において損傷した軸索を進展させ、自ら再髄鞘形成を行っている。前述のように、脊髄機能改善には断裂した軸索の再生ならびに再髄鞘化が重要であり、この観点からは、OECs と SCs に対する期待は大きい。特に中枢神経においてアストロサイトと共存が難しい SCs に比べ、元来中枢神経にも存在する OECs は脊髄への移植を考えた場合、より可能性が高いと考えられる。さらに近年ラットや人において嗅粘膜 OECs の採取ならびに培養が可能となり、嗅球 OECs では困難であった自家移植が可能となり、移植に伴う免疫抑制剤の使用や倫理的問題も考えなくて良くなった。

以上の点から OECs を用いた脊髄再生療法は幹細胞や SCs を用いた方法に比べ遙かに人や犬への臨床応用に近い位置にあると考えられる。すでに実験的に作製されたラット脊髄損傷モデルでは、十分な効果が得られることが報告されているが、人や犬ではラットに比べはるかに太い脊髄を持つこと、実際の脊髄損傷は非常に複雑な病態を示すことなどから人や犬でラットと同様の結果が得られるかについては不明である。また実際の臨床応用を行うためには、適応症例の鑑別法、適切な OECs の採取部位、OECs の培養法や移植法、OECs 移植による効果の評価法など解決すべき問題は数多く残されている。これらの問題を解決し、犬における脊髄再生療法が可能となれば、重度脊髄損傷犬に対する大きな福音となる。さらにそこで得られた成果は、人の臨床応用の前段階として重要な知見となりうる。これらのことを背景として、本研究では犬において OECs を用いた脊髄再生療法の確立を試みることを目的として以下の検討を行った。なお今回の研究には、動物倫理の立場から、脊髄損傷モデル作製犬ではなく、自然発生的に不可逆的な脊髄障害を生じた犬の臨床症例を用いて検討を行った。

- 1) OECs 移植適応症例の選択基準を決定するために椎間板ヘルニアを発症した犬の中で予後不良である症例の判別方法を検討した（第3章）。
- 2) 移植用 OECs の採取部位として犬嗅粘膜を用いることの可能性について検討した（第4章）。
- 3) 嗅粘膜 OECs の精製方法の検討を行い、確立した（第5章）。
- 4) 免疫染色による OECs と SCs を区別する方法について検討した（第6章）。
- 5) 従来の方法によって OECs 移植を行った犬の臨床例の脊髄組織を評価した（第7章）。

第3章では、2000年4月から2003年5月までの間に、東京大学大学院農学生命科学研究科附属動物医療センター（VMC）に来院し、重度胸腰部椎間板ヘルニアと診断された症例77頭の犬について発症期間、手術までの期間、手術時肉眼所見、ならびに Magnetic Resonance Imaging (MRI 画像) における脊髄異常信号強度と神経学的予後との関連性を検討した。その

結果、MRI 画像 T2 強調像における脊髄異常高信号像だけが予後に関連していることが判明した。77 頭中 33 頭（43%）の犬において T2 強調像において 1 椎体以上の脊髄異常高信号像が認められ、これらの犬 33 頭中 15 頭（45%）で神経学的予後が不良であった。この中で深部痛覚が消失した最重症症例で検討してみると、16 頭中 11 頭（69%）で神経学的予後が不良であった。一方 MRI 画像で脊髄異常信号強度が検出されなかった症例 77 頭中 44 頭では神経症状の重症度に関係なく、全ての症例で予後が良好であった。以上の結果から、犬の椎間板ヘルニアの症例で深部痛覚が消失し、MRI 画像 T2 強調像において 1 椎体以上の高信号像を認めた場合にはほぼ神経学的予後が不良であり、OECs 移植の候補となることが明らかになった。

第 4 章では、犬の OECs 自家移植を目的とした嗅粘膜 OECs の可能性について検討した。犬において嗅球から OECs を採取・培養は可能だが、嗅球の損傷に伴って発作が生じる危険性があることが報告されている。これに対して、嗅粘膜から OECs を採取できればこの問題を回避することができる。そこで、ここでは安楽死犬 7 頭から嗅粘膜ならびに嗅球を採取し、嗅粘膜からの OECs 採取・培養の可能性について嗅球 OECs と比較しながら検討した。その結果、嗅球から採取した場合 21 Days in vitro (DIV) の時点で OECs の割合は 75% 程度と増加し、2,200 万個/犬の OECs が採取可能であった。これに対して、嗅粘膜から採取した場合 21DIV の時点で OECs の割合は 25% に減少し、500 万個/犬程度の OECs しか採取できなかった。ラットにおける OECs 移植による脊髄再生の実験に用いている OECs の割合は少なくとも 50% であると報告されており、さらに犬の臨床応用には 500 万個以上の細胞を移植する必要があることも報告されている。この検討から、犬の嗅粘膜から OECs を採取・培養可能であることは示されたが、嗅粘膜 OECs を臨床に用いるためには、OECs を精製する方法を確立させる必要があることが明らかとなった。

第 5 章では、ラットや人において報告されている OECs 精製方法によって犬嗅粘膜 OECs が精製可能か検討した。まず始めに凍結した犬嗅粘膜 OECs を用いて種々の方法を行ったところ、PLL uncoated slides の変法による精製方法だけが有用であることが明らかとなったため、この方法を 6 頭の犬から採取した新鮮な嗅粘膜 OECs に応用した。その結果、6 頭中 4 頭で嗅粘膜 OECs の割合は 75% を越え、細胞数も 500 万個/犬を越えていた。しかしながら残る 2 頭では、その割合は 40% と 28% であり、OECs の数も 500 万個を下回っていた。以上のことから PLL uncoated slides 変法を用いることによって犬嗅粘膜 OECs が精製可能であることが判明したが、確実な再現性が得られなかったため、更なる精製方法の検討が必要であることが示唆された。そこでさらに、血清無添加培養液による精製方法について検討した。ラットや人では血清無添加培養液中に神経成長因子を添加することによって SCs の精製が可能であることから、形態的にも分子学的にも SCs に類似する OECs も同様の方法で精製できる可能性が考えられた。まず予備実験として血清無添加培養液下に神経成長因子

を添加し嗅粘膜 OECs の培養を行ったところ、嗅粘膜 OECs の割合は 21DIV の時点で 95% 以上に精製されたが、細胞数が 2~300 万個と少なかった。そこで本実験として安楽死犬 8 頭から採取した嗅粘膜 OECs を血清無添加培養液に神経成長因子を添加して 2 週間培養を行った後、血清添加培養液に神経成長因子を添加した従来の条件でさらに 1 週間培養を行った。その結果全ての犬において 21DIV の時点で嗅粘膜 OECs の割合は 80% 以上で、細胞数は 500 万個を越えており、今回検討した方法で、犬嗅粘膜 OECs でも精製が可能であることが明らかとなった。

第 6 章では Calponin タンパクの検索により SCs と OECs の区別が可能か検討した。先にも述べたように SCs と OECs は形態的にも分子学的にも類似しており、その区別は困難である。しかし、OECs 移植後その効果を組織学的に評価する場合、OECs による再髄鞘化と内因性 SCs による再髄鞘化を区別する必要がある。最近、幼若ラットにおいて OECs は Calponin を発現しているのに対し、SCs は発現していないことが報告された。本章では、性成熟したラットにおいて Calponin の発現の有無により、OECs と SCs が区別できるか検討した。その結果、嗅球ならびに嗅粘膜の OECs と SCs のいずれにも Calponin の発現は認められず、髄膜細胞ならびに線維芽細胞の一部においてのみ Calponin の発現が認められた。以上のことから Calponin 発現によって OECs と SCs を区別することは不可能であることが明らかになった。

第 7 章では、従来の方法によって得られた嗅球 OECs あるいは精製されていない嗅粘膜 OECs を移植した症例において、OECs 移植後に安楽死処置あるいは交通事故で亡くなった 3 症例の脊髄病理組織を検討した。全ての症例において OECs/SCs が多数脊髄実質内に存在し、多くの末梢神経型の髄鞘を形成していた。OECs による再髄鞘化なのか内因性 SCs によるものなのかを断定することは困難であったが、犬の場合、脊髄損傷後に内因性 SCs が脊髄実質に侵入し、再髄鞘化を起こすことはないと報告されている。したがって本研究で認められた数多くの末梢神経型の髄鞘は移植した OECs によるものであると考えられた。

以上の結果から、犬において嗅粘膜 OECs を用いた自家移植による OECs 移植療法が確立でき、また犬 OECs 移植によって損傷を受けた脊髄軸索の再髄鞘化が得られることが明らかとなった。しかし、ラット実験モデルで報告されているような劇的な神経機能改善は犬では認められておらず、今後さらに検討を加えていくことが必要と考えられた。