

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 17 年度博士課程 入学

氏 名 藤田 直己

指導教員名 西村 亮平

論文題目 ラット脊髄損傷モデルにおける鼻粘膜鞘細胞（OECs）移植とトレッドミルトレーニングが機能回復、病理組織学的変化及び神経栄養因子発現におよぼす影響

脊髄損傷は人のみではなく、獣医領域においても症例が多く、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。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、主の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や脱髄が生じてもシュワン細胞(Schwann Cells:SCs)が軸索を進展させ、髄鞘を再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、多分化能を持つ各種幹細胞（骨髄幹細胞、胚性幹細胞、体性幹細胞など）のほか、SCs や嗅神経鞘細胞（Olfactory Ensheathing Cells:OECs）も有望視されている。特に、嗅神経を取り巻くように存在し、哺乳類の成熟後も繰り返す嗅神経の再生を誘導していることから脊髄再生への応用が期待され、脊髄損傷モデル動物への OECs 移植実験では運動機能の有意な改善や再髄鞘化の促進が認められている。また、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、より有利であると考えられており、最も期待できる材料の一つであるといえる。

一方、従来の脊髄損傷治療においては、術後のリハビリテーションは必須であり、残存している機能の維持や回復に寄与すると考えられてきた。近年、脊髄損傷モデル動物を用いたトレッドミルトレーニングや水泳によるリハビリテーションが脊髄に与える影響を組織学的あるいは生化学的に検証した報告も増えてきており、脊髄における神経栄養因子の発現上昇や神経の可塑的变化による神経回路の再構築などの概念が提唱されており、新たな治療法とともに、リハビリテーションの重要性も再認識されている。特にトレッドミルトレーニングは最も研究が多く行われているリハビリテーション法であり、近年は免負荷式トレッドミルトレーニングも開発されるなど、注目されているリハビリテーション法である。

しかし、移植療法とリハビリテーションの併用における機能改善や脊髄への影響を検討した報告はほとんどなく、OECs 移植の臨床応用を考えた場合、移植後にリハビリテーションは必須であると考えられるが、お互いの効果がどのように作用しあうかは不明な点が多い。リハビリテーションにより脳由来神経栄養因子 (Brain Derived Neurotrophic Factor : BDNF) やニューロトロフィン 3 (Neurotrophin-3 : NT-3) の発現上昇がみられることや、OECs の生存や動態にこれらの因子が関与していることも示唆されていることから、OECs 移植後のリハビリテーションにより何らかの変化がもたらされる可能性は高いと考えられる。

これらのことを背景として、本研究ではラット脊髄損傷モデルにおける OECs 移植とトレッドミルトレーニングを併用し、それらが生体に与える影響を評価することを目的とし、以下の検討を行った。

- 1) 脊髄損傷ラットを作成し、OECs 移植およびトレッドミルトレーニングを行い、運動機能の改善の程度を評価した。(第 3 章)
- 2) OECs 移植およびトレッドミルトレーニングが及ぼす効果を損傷部における病理組織および神経栄養因子の発現量から評価した。(第 4 章)
- 3) 後根神経性より得たニューロンを用い、OECs と共培養し、神経栄養因子がニューロンや OECs に与える影響を *In Vitro* で評価した。(第 5 章)

第3章 OECs 移植およびトレッドミルトレーニングを行ったラット脊髄挫傷モデルにおける運動機能評価

脊髄を挫傷させたラットに嗅球より採取、培養した OECs の移植およびトレッドミルトレーニングを施し、運動機能改善を評価した。重度脊髄損傷ラットでは、トレーニング開始後 3 週間目の運動機能評価で OECs 移植とトレッドミルトレーニングを併用した群 (OEC-trained 群) で有意な運動機能回復が認められた。OECs 移植あるいはトレッドミルトレーニング単独ではどちらも行わなかった群と比較し改善傾向は認められ、重度脊髄損傷モデルにおいてはどちらの治療法も単独では機能回復効果が低いが、併用することで相加的な効果があることが示唆された。

第4章 OECs 移植およびトレッドミルトレーニングを行った脊髄挫傷モデルラットの損傷部における病理組織学的検討と神経栄養因子発現量の評価

トレッドミルトレーニングを行うことにより、BDNF や NT-3 といった神経栄養因子の mRNA レベルが損傷部より尾側の脊髄で上昇し正常化することが報告されており、またこれらの因子は中枢神経系における髄鞘形成や軸索伸展などにも寄与していることが知られている。さらに OECs の成長や動態にも関与していることを示唆する報告もあり、第 2 章の結果が損傷部に移植した OECs がこれらの因子により何らかの影響を受けた可能性があると考え、損傷部の病理組織学的評価と神経栄養因子の mRNA レベルを評価した。病理組織学的検査では OECs 移植の有無にかかわらず損傷部における再髄鞘化が認められたが、OECs 移植を行った群で有意に多くの再髄鞘化像が観察された。また白質の残存量についても OECs 移植を行った群で多く認められ、移植した OECs による再髄鞘化の促進および軸索の保護作用が示唆された。しかし、リハビリテーションの有無による組織像の変化は認められなかった。一方、損傷部における神経栄養因子の mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR で測定したところ、リハビリテーションを行うことで損傷部においても BDNF の発現レベルが有意に上昇し、正常化したことが示された。しかし、NT-3 はほとんどすべてのラットにおいて発現上昇が認められた。神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン 4 (NT-4)、グリア由来神経栄養因子 (GDNF)、網様体神経成長因子 (CNTF) においては OECs 移植あるいはトレーニングによる変化は認めら

れなかった。以上の結果より、OECs 移植とトレッドミルトレーニングを併用した重度脊髄挫傷モデルの運動機能改善においてトレーニングによる神経栄養因子発現の上昇が OECs の髄鞘形成能力を促進させることが示唆された。

第 5 章 OECs と神経細胞の供培養における神経栄養因子の作用の検討

前章までの結果より、神経栄養因子の存在は OECs の髄鞘形成能力に影響を与える可能性が示唆されたことを受け、*In vitro*における評価を行った。ラットの後根神経節より採取培養した神経細胞と OECs を各種神経栄養因子 (NGF、BDNF、NT-3、NT-4、GDNF、CNTF) を 5, 10, 50 ng/ml 含有する培養液中で共培養し、髄鞘マーカーであるミエリン塩基性タンパク (Myelin Basic Protein: MBP) の発現と神経突起成長の程度を免疫蛍光染色で評価した。MBP の発現は BDNF 存在下でもっとも多く認められ、BDNF 発現量の上昇による OECs の髄鞘形成促進が示された。また、濃度の変化による有意差は認められなかった。神経突起成長促進は NGF で最も顕著であった。前章でほとんどの個体で発現上昇が認められた NT-3 においては有意な変化は認められず、本研究からはその役割は不明であった。

以上の結果より、重度脊髄損傷ラットにおいては、OECs 移植あるいはトレッドミルトレーニングでは運動機能回復効果が低かったが、併用することで有意な運動機能改善が認められた。トレッドミルトレーニングを行うことで BDNF の発現レベルが上昇し、正常レベルに保たれることが示された。病理組織において併用したラットの損傷部位では髄鞘形成がより多く認められたが、*In Vitro*における検証から BDNF の発現レベル上昇が髄鞘形成の促進に関与している可能性が示唆された。

このことから、臨床応用においても OECs 移植後に積極的なリハビリテーションを行うことが推奨され、脊髄再生医療において移植療法とともにリハビリテーションの重要性を再認識する必要があると考えられた。しかし、ラットにおける運動機能改善は有意差が認められたものの、臨床的に十分な回復が期待できる程度ではなく、脊髄再生の治療法には、今後さらなる検討が必要であると考えられた。