

論文の内容の要旨

論文題目

脊髄損傷により生じるオリゴデンドロサイトの
細胞死に関する基礎的研究

指導教官 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 伊藤 順一

我が国には現在 10 万人以上の脊髄損傷患者が生活し、さらに新規発生数は毎年約 5 千人であると予測されているが、現在確立した治療はない。そのため多くの患者は麻痺が残存し高度な障害を伴う生活を余儀なくされている。特に国内においては、交通事故やスポーツによる 20 歳代の若年者の受傷が多いことが特徴として挙げられ、社会的にも大きな損失となっている。若年者の脊髄損傷だけでなく、基礎疾患に頸椎の脊柱管狭窄を有する中高齢者が転倒などの軽微な外傷によって脊髄損傷を発症するケースも多く、今後その数は増大すると予想されている。また医療の進歩により脊髄損傷患者の長期生存が可能になったが、脊髄損傷による麻痺、疼痛に対して現状では完全な治療法がない為、治療技術の開発は急務の課題と言える。

近年、神経幹細胞などを用いた移植治療が、動物実験である程度の治療効果を出しており、中国、ヨーロッパの一部では、神経グリア細胞を含む鼻粘膜組織からの細胞移植が既に臨床で行われている。こうした細胞治療に対し患者のみならず、医療従事者も高い関心を寄せているが、行われている細胞治療の効果判定は未熟な部分もある上、治療原理も確立したものとは言えない。細胞を用いた治療の開発には、細胞生物学的な基礎的知見の蓄積が必要となるが、損傷脊髄内での各細胞の挙動、形質の変化については未知の部分が多い。

そもそも、損傷脊髄内では、神経軸索の傷害、脱髄化、神経細胞の減少、瘢痕形成と、いくつかの細胞の変化が同時もしくは、経時的に生じている。

ここで、脊髄損傷の基礎医学的な治療の歴史を振り返ってみる。初期には、末梢神経損傷の回復のメカニズムをヒントとして、1981年に末梢神経の脊髄への移植が報告された。次に、末梢神経のみでは軸索伸長に限界があった為、1996年に **olfactory ensheathing cells** (嗅球グリア細胞) の移植が行われた。これらの移植細胞の役割としては、**axon guidance** (瘢痕の抑制)、**remyelination** (再髄鞘化)、サイトカイン産生能による **neuroprotection** (神経保護) などが考えられる。何れも、不足する細胞を補充するという考えがその根底にある。

体外からの移植による治療が一般的であるが、近年脊髄組織中に損傷に反応して増殖を開始する神経グリア前駆細胞 (多くがオリゴデンドロサイト前駆細胞) が存在することが報告されており、筆者はこうした内在性のグリア前駆細胞が脊髄再生の起点になりうると考えた。これは、体外からの細胞移植に依存せずに内在性の細胞を温存することによって、これらの細胞が成熟細胞へと分化し損傷脊髄の神経ネットワークが再構築されることを期待するものである。この内在性グリア前駆細胞を用いた脊髄損傷治療の開発には、細胞移植に相当するだけの細胞数を損傷脊髄内で確保することが重要な課題である。しかしこれまで内在性グリア前駆細胞の数的変化や損傷部の炎症反応に影響する因子の解明はほとんどなされていない。

既に、脊髄損傷により生ずる炎症反応に関しては、臨床現場で使用されているプレドニゾン大量投与による広範な免疫抑制が機能改善に対してある一定の効果をあげている。これは炎症反応が損傷拡大の一因という見方である。他に基礎的研究では、**TNF α** が神経系細胞のアポトーシスを誘導するという報告や抗 **IL-6** 抗体投与での脊髄損傷軽減の報告などが散見される。一方では活性型マクロファージ移植が損傷範囲を軽減しているという報告もあり、これは炎症反応を賦活化させることが損傷を軽減するという見方であり、炎症反応と脊髄損傷の関係は一定の見解を得ていない。また、炎症反応の中で大きな役割を果たしている炎症性サイトカインの中でも **IFN γ** に関してはこれまで報告がみられない。

本研究は内在性グリア前駆細胞が、何らかの炎症性サイトカインの影響を受け、損傷以後にその数を減じているという仮説の元に研究を行った。

まず、ラット脊髄損傷圧挫モデルにおいて、損傷脊髄内に増殖するグリア前駆細胞（反応性グリア前駆細胞：反応性 OPC）に対し GFP 発現レトロウイルスベクターを用いて標識し、反応性 OPC の自然経過を定量計測した。損傷脊髄組織近傍で反応性 OPC 数は損傷後 4 日目に比較して 7 日目には著明な減少がみられた。ここで上記の仮説に基づき、損傷脊髄内の炎症性サイトカイン発現を測定した。野生株 C57BL/6 マウス第 10 胸椎レベルの脊髄に 60kdyn の圧挫損傷を作成し、損傷後より 0 日, 1 日, 4 日, 7 日, 10 日, 14 日, 28 日の時点で組織より mRNA を精製して定量測定をおこなった。損傷後脊髄内では IL-1b, TNFa, IFNg の各種サイトカインが上昇していた。IL-1b, TNFa は損傷後 1 日目の急性期より発現がみられたが、IFNg は反応性 OPC の減少が観察された時期である 4 日目の亜急性期より発現がみられた。

次に反応性 OPC に対する IL-1b, TNFa, IFNg の直接作用を解析するために、*in vitro* の系を用いた。ラットグリア前駆細胞の株化細胞（CG-4 細胞）の培養液中に IFNg を投与した群でのみ、投与後 48 時間から 72 時間の間に、細胞容積の減少、核の凝集像を呈し、MTT アッセイによる生細胞数測定では細胞数の減少が確認された。また IFNg 投与群においては 72 時間の CG-4 細胞で DNA ラダーの検出がみられ、48 時間から 72 時間の時点でウエスタンブロット法により cleaved-caspase3 の蛋白を検出した。これらの結果より IFNg は CG-4 細胞に対して、直接的にアポトーシスを誘導することを確認した。以上より、IL-1b, TNFa, IFNg のうち、反応性 OPC に対する直接作用としては IFNg のみが細胞毒性を持っていた為、これを治療介入のターゲットと選定した。

ここで、*in vivo* で生じる IFNg による反応性 OPC への作用を解明するためマウスを用い解析を行った。先ず脊髄損傷を作成した野生株マウスの脊髄組織で IFNg 受容体の染色を施すと、OPC に IFNg 受容体が発現していた。また IFNgR^{-/-}マウス（IFNg 受容体欠損マウス）の脊髄にインパクトを用いて 60kdyn の圧挫損傷を作成し、損傷後 4 日目、7 日目、10 日目での反応性 OPC の数を定量比較すると、野生型マウスに比較して IFNgR^{-/-}マウスでは反応性 OPC はより多く保持されており、後肢運動機能が損傷後 28 日の観察期間で

有意に改善した。以上より、脊髄損傷の機能障害には炎症性サイトカインである **IFN γ** が関わっており、*in vivo* においても反応性 **OPC** を直接的にアポトーシスに誘導することが示された。

本研究で得られた知見から、反応性 **OPC** の保持が機能障害の抑制に関わっている可能性が示唆される。つまり反応性 **OPC** が保持されることは、細胞補充が内在性の細胞によって達せられることを意味している。そして保持された反応性 **OPC** は、分化により再髄鞘化の促進、神経栄養因子を産生することで神経細胞の保護という役割を果たすと考えられる。

本研究では、**IFN γ** シグナルの遮断による効果を解析したが、他の炎症シグナル遮断との効果比較や併用効果については今後の課題である。また臨床現場における **IFN γ** シグナルの遮断の方法としては他の炎症性疾患（クローン病）での治験が行われている抗 **IFN γ** 抗体製剤が候補として考えられ、臨床応用も含め選択的 **IFN γ** シグナルの遮断が脊髄損傷時の反応性 **OPC** の保持に関して効果的なターゲットとなり、運動機能の回復をもたらすものとして期待される。