

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 21 年度博士課程入学
氏名 由井 翔
指導教員名 西村 亮平

論文題目

Studies on the healing mechanism of
olfactory ensheathing cell transplantation in spinal cord injury
(脊髄損傷に対する嗅神経鞘細胞移植療法の治癒機転の解明)

脊髄損傷(SCI)は、その程度が重度である場合重篤な運動機能障害や排尿障害を引き起こすが、その変化は不可逆的であるとされてきた。しかし、近年の研究で中枢神経系(CNS)も再生能を持つことが示され、機能回復を目指した幅広い研究がなされている。これまでの研究結果から、不可逆的变化が生じる原因の一つが CNS 損傷部位に形成される特有の環境にあることが分かっている。損傷後の CNS には反応性アストロサイト(rACs)が集積し、グリア瘢痕と呼ばれる瘢痕組織が形成される。損傷時に断裂した軸索は、瘢痕組織を超えて遠位の脊髄へ再び伸長することができず、これが不可逆的变化を生む大きな要因となっている。グリア瘢痕が神経軸索の再伸長を阻害する物理的バリアとして働くが、これに加え rACs が産生するコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPGs)が軸索再生を阻害することも不可逆的变化をもたらす大きな要因と考えられている。一方 SCI モデル動物において、CSPGs を分解することで運動機能の回復が得られることが報告されており、SCI 後の機能回復を図る上で CSPGs の分解は重要なターゲットであることが示されている。

嗅神経鞘細胞(OECs)は、嗅覚系に特異的に存在するグリア細胞であり、嗅神経軸索の再生を補助している。この性質を利用して OECs を損傷脊髄に移植する試みがなされ、SCI モデル動物を用いた研究ではその有用性が数多く報告されているが、その機序に関してはあまり検討されておらず不明な点が多い。前述のように CNS 損傷における不可逆的变化には rACs とこれが産生する CSPGs が重要な役割を果たしていることから、想定される機序として、OECs による rACs の反応性変化の抑制あるいは産生された CSPGs の分解が考えられる。

そこで本研究では、OEC 移植による脊髄損傷の治癒機転を解明することを目的として以下の検討を行った。まず第 1 章で、CSPGs の分解活性をもつ酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の OECs における遺伝子およびタンパク発現のパターンを解析し、OECs が発現する MMPs の中で rACs の反応性変化の抑制および産生された CSPGs の分解に関連がある可能性があるものを検討した。次に第 2 章で、*in vitro* において OECs が rACs の反応性変化および産生された CSPGs の分解に及ぼす影響を、第 1 章において関連が示唆された MMPs の阻害系を用いて検討した。第 3 章では、SCI モデル動物に OECs を移植し、実際の損傷脊髄に OECs が与える影響を検討した。

なお、これらの検討に先立ち実験に使用する OECs の精製の過程で混入する細胞の影響について検討した。その結果、混在細胞が OECs に対して 50%以上の割合で存在する場合には OECs の増殖能に影響を及ぼすが、30%以下の場合には影響しないことが明らかとなった。このことから、数%の混在細胞の残存は実験結果に影響しないと判断し、以降の実験を行った。

第 1 章では、OECs における MMPs の発現パターンを遺伝子レベルおよびタンパクレベルで検討した。対象の MMPs は、CNS の発生および病態に深い関連があるとされる MMP-2、-3 および-9 とした。実験動物として 8 週齢雌 SD ラット 24 頭を用い、嗅球から OECs を精製、培養した。培養した OECs を、精製した OECs の純度の評価(n=5)、RT-PCR (n=3)および基質ザイモグラフィー(n=3)に用いた。精製した OECs の純度の評価は免疫細胞染色によって行った。RT-PCR では、OECs における MMP-2、-3 および-9 の発現を評価した。基質ザイモグラフィーでは、OECs の培養上清を用いて OECs による MMPs の細胞外への放出を検討した。MMP-2 および-9 をゼラチンザイモグラフィーを用いて、MMP-3 をカゼインザイモグラフィーを用いて評価した。

精製した OECs の純度は $96.2 \pm 2.7\%$ であった。RT-PCR では、OECs における MMP-2、-3 および-9 の mRNA 発現が認められた。中でも MMP-2 の発現が高い傾向にあり、MMP-9 の発現は低い傾向にあった。基質ザイモグラフィーでは、MMP-2

の細胞外への放出が認められたが、MMP-3 および-9 の放出は検出されなかった。RT-PCR および基質ザイモグラフィの結果から、OECs において MMP-2 の発現が MMP-3、-9 と比較して高く、酵素活性を持つタンパクとして細胞外に放出されていることが示された。これらのことから、OECs 移植による脊髄損傷治癒機転において OECs が産生した MMP-2 が瘢痕組織の CSPGs を分解する可能性が示唆された。

第 2 章では、*in vitro* において OECs が rACs の遺伝子およびタンパク発現に与える影響、および MMP-2 を介し細胞外の CSPGs に与える影響について検討した。実験動物には 8 週齢雌 SD ラット 12 頭および胎齢 18 日齢 SD ラット胎仔 18 頭を使用した。ラット胎仔大脳皮質からアストロサイトを精製、培養し、10 μ g/ml のリポポリサッカライド(LPS)を用いて 72 時間刺激し、rACs を誘導した。第 1 章と同様の方法で精製、培養した OECs を 0.4 μ m 孔のカルチャーインサート上に播種し、rACs と 24 時間共培養した。共培養終了後の rACs を用いて定量的 RT-PCR (n=3)および免疫蛍光染色 (n=3)を行った。定量的 RT-PCR では GFAP、および CSPGs のうち軸索再生阻害効果が報告されている 5 種(brevican、versican、neurocan、NG2、phosphacan)の発現を評価した。免疫蛍光染色では、GFAP および前述の 5 種のうち rACs と最も関連があるとされる neurocan の発現を、蛍光強度の定量を行うことにより評価した。実験群は、定量的 RT-PCR では陰性対照として共培養を行わない rACs のみの NC 群、および OECs との共培養を行った OEC 群の 2 群とし、免疫蛍光染色では MMP-2 特異的阻害薬存在下で OECs と共培養を行った 2I 群を加えた 3 群とした。

定量的 RT-PCR では、OEC 群で GFAP の発現がわずかに上昇したが、CSPGs の発現は 5 種のいずれにおいても有意な変化は認められなかった。免疫蛍光染色では、GFAP および neurocan の発現に有意な変化は認められなかった。これらの結果から、OECs は rACs の反応性および CSPG 合成能に影響を与えておらず、また、*in vitro* において OECs が産生する MMP-2 が rACs の細胞外に存在する neurocan の分解に関わっている可能性は低いと考えられた。しかし、本章で用いた rACs は大脳皮質由来の細胞を LPS 刺激して得た細胞であり、実際の SCI における瘢痕組織を再現できていない可能性があるため、SCI モデル動物での検討も必要だと考えられた。

第 3 章では、SCI モデルラットに OECs を移植し、損傷脊髄における免疫組織学的変化を検討した。8 週齢雌 SD ラット 12 頭を移植用 OECs の培養に使用し、10 週齢雌 SD ラット 6 頭を SCI モデル作製に使用した。麻酔下にて IH-impactor を用いて T10 レベル胸髄に 250 kDyne の力で挫傷を作製した。受傷後 14-15 日に

麻酔下にて損傷部を露出し、第 1、2 章と同様の方法で精製、培養した OECs を移植した。OECs には事前に Hoechst 33342 標識を施し、脊髓正中を走る血管の左右それぞれについて、損傷中心部、およびその前後 1 mm の計 6 ヶ所に、1 ヶ所あたり 50000 個の OECs を移植した。実験群は対照として培養液のみを移植した media 群、および OECs を移植した OEC 群の 2 群 (各群 n=3) とした。動物は移植後 7-8 日で灌流固定を行い、損傷中心部から前後 5 mm の脊髓を採取した。採取した脊髓は免疫蛍光組織染色に用い、Hoechst 33342 と MMP-2 の共局在、neurocan 蛍光強度の定量的評価、および損傷部における NF-200 陽性の軸索数の測定を行った。

OEC 移植を受けた全ての脊髓において、Hoechst 33342 陽性の OECs が観察され、Hoechst 33342 と MMP-2 の発現が関連している様子が観察された。neurocan の蛍光強度は、OEC 群において有意な低下が認められた。NF-200 陽性の軸索数に有意な差は認められなかった。これらの結果から、損傷脊髓に移植された OECs は MMP-2 を産生し、それにより neurocan が分解された可能性が考えられた。軸索数に有意な変化は認められなかったが、本研究においては移植後の観察期間が 1 週間と比較的短く、より長期の観察を行うことによって軸索数が変化する可能性が考えられた。

以上の結果から、OEC 移植による SCI の治癒機転において、移植された OECs が産生する MMP-2 が瘢痕組織内の neurocan を分解することがその機序のひとつであることが示唆された。