

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 由井 翔

損傷後の脊髄には反応性アストロサイト(rACs)が集積し、細胞外基質であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPGs)が多量に産生される。これらは断裂・損傷した軸索の再生を阻害し、重度の神経機能障害をもたらす主要な要因となっている。したがって、脊髄損傷(SCI)後の機能回復を図るためには、これらの抑制・分解が重要な標的の1つになると考えられる。

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、再生を繰り返している嗅神経軸索に補助的に働いている。この性質を利用した SCI モデル動物への OECs 移植実験ではその有用性が数多く報告されている。一方、OEC による神経機能回復の機序に関しては十分検討されておらず不明な点が多いが、OECs の性質から想定されるものとしては、rACs の反応性変化の抑制あるいは産生された CSPGs の分解が挙げられる。

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に *in vitro* および *in vivo* の検討を行った。

まず第 1 章では、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。その結果 RT-PCR により OECs における MMP-2、-3 および-9 の mRNA 発現が認められ、中でも MMP-2 の発現が高い傾向にあった。基質サイモグラフィーにより 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。これらの結果から、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、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 rACs の産生した CSPGs を分解する可能性が示唆された。

次に第 2 章では、*in vitro* において OECs が rACs の反応性変化に与える影響、および MMP-2 を介する CSPGs の分解に与える影響について検討した。すなわち SD ラット胎仔大脳由来の rACs と嗅球由来 OECs を共培養し、共培養終了後の rACs を用いて定量的 RT-PCR および免疫蛍光染色を行った。定量的 RT-PCR では GFAP および 5 種類の CSPGs (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 CSPGs のうち rACs と最も関連が深いとされる neurocan の発現を、蛍光強度の定量によって評価した。その結果、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。ま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ず、MMP-2 特異的阻害薬存在下での OECs と rACs の共培養でも有意な変化は生じなかった。このように、*in vitro* においては OECs による rACs の反応性への影響は認められず、OECs が産生する MMP-2 による neurocan の有意な分解も認められなかったが、

その理由の一つとして *in vitro* の条件下では生体の脊髄損傷の環境を十分再現できていない可能性が考えられた。

そこで第 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。SD ラットの脊髄第 10 胸髄に挫傷を作製し、受傷後 14-15 日に OECs を移植した。陰性対照では培養液のみを移植した。移植後 7-8 日で脊髄を採取し、免疫蛍光組織染色を用いて移植された OECs による MMP-2 の発現、neurocan 蛍光強度の定量的評価、および損傷部における neurofilament-200(NF-200)陽性の軸索数の測定を行った。その結果、OEC 移植を受けた脊髄において顕著な MMP-2 の発現上昇が観察され、neurocan の蛍光強度に有意な低下が認められた。NF-200 陽性の軸索数には有意差は認められなかった。これらの結果から、移植された OECs が 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。

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。

以上本研究は、脊髄損傷に対する嗅神経鞘細胞(OECs)移植療法の治癒機転の一端を明らかにしたものであり、学術上、臨床応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。