

主論文の要旨

Midkine overcomes neurite outgrowth inhibition of chondroitin sulfate proteoglycan without glial activation and promotes functional recovery after spinal cord injury

ミッドカインはコンドロイチン硫酸プロテオグリカンによる神経突起伸長抑制を克服し脊髄損傷後の機能回復を促進する

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：西田 佳弘 准教授)

村本 明生

【緒言】

成熟したほ乳類では中枢神経の損傷後、神経軸索はほとんど再生しない。それは損傷後の中枢神経では神経再生にとって強い阻害環境が生じるためである。もっとも強力な阻害因子の一つがコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)である。しかしながら損傷を受けた中枢神経では CSPG のような阻害因子ばかりではなく、軸索再生を促し、神経を保護する因子も産生される。

ミッドカイン(MK)は胚性腫瘍細胞の分化誘導時に早期発現してくる遺伝子の産物として発見された。MK は細胞の分化、増殖、生存、移動や神経突起伸長など様々な生理活性を示すことおよび、脳梗塞や脊髄損傷などの神経損傷時に発現することが知られている。しかし神経損傷時に MK が発現する意義については十分に分かっていない。

【目的】

神経系細胞の初代培養において MK がどの細胞で産生されるのか、また MK 投与により CSPG による神経突起伸長阻害環境を克服できるのか、またラット脊髄損傷モデルにおいて MK のくも膜下腔投与は下肢運動機能回復効果があるのかを調べること。

【対象および方法】

神経突起伸長の実験には 2 well のチャンバースライドを用い、20 μ g/ml のポリ-L-リジン(PLL)を 4 $^{\circ}$ Cで一晩コートし、250ng/ml の CSPG または 1000ng/ml の rh-MK あるいはその両方を 24 時間、37 $^{\circ}$ Cで coat した。小脳顆粒細胞(CGN)は P7 の SD ラットの小脳から採取し、glia 細胞と分離、分散し、チャンバースライドに 1.0 \times 10⁵ cell/ml で播種後、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で 24 時間静置した。Tuj-1 を用いた免疫染色で neuron の純度は 95%以上であった。astrocyte は P1 の SD ラットの大脳皮質より採取し、30 日間培養した混合 glia 培養から 3 回から 4 回の trypsin を用いた purification を経て得られた。細胞の 80%以上が GFAP 陽性であった。microglia も 21 日間培養した混合 glia から shake off 法で 98%以上の純度で得られた。

astrocyte の増殖評価は刺激後 5 日間培養した後、MTT assay を用いて行った。一晚ホルマザンを溶解し、ELISA リーダー600nm の吸光度を測定した。NO assay は刺激後 72h で Griess 試薬を用い、540nm の吸光度を測定して評価を行った。神経突起伸長 assay は seeding 後 24 時間で免疫染色を行い、細胞体の直径以上の長さの突起を Image J を用いて計測した。計測には 4 well を用い、1well あたり 10 視野から計測した。

ウエスタンブロッティングおよび RT-PCR に用いた脊髄組織は損傷中心より 5mm 頭側から 5mm 尾側までを用いた。また培養された astrocyte および microglia は purification を行った後 24 時間静置し、bFGF や TGF- β 1 で刺激し、48 時間後に蛋白あるいは RNA の抽出を行った。

18 匹の雌の adult SD ラットを Ketamine と xylazine で麻酔をかけ、脊髄損傷装置

(IH インパクト) を用いて T9 レベルに 200kdyn で圧挫損傷を加えた。損傷作成直後に T12 レベルのくも膜下に細いシリコンチューブを挿入した。このシリコンチューブは容量 200 μ l の浸透圧ポンプ (Alzet pump) に連結されて、0.5 μ l/時間の速度で 14 日間内容物が送り出される。9 匹には 3.4mg/ml の rh-MK (MK 群) を充填したポンプを、残りの 9 匹には生理的食塩水を充填したポンプを繋いだ (vehicle 群)。損傷翌日に両下肢完全麻痺を呈さなかったラットを評価から除外したため、MK 投与群は 7 匹、vehicle 群は 5 匹となった。

下肢運動機能テストとして BBB スコアと % grip テストを盲検的に毎週 8 週間施行した。電気生理学的検査では針電極による運動野の直接刺激を行い、両腓腹筋から筋活動電位を 10 回ずつ記録し、onset latency の平均値を用いた。

【結果】

ウエスタンブロットでラットの intact の脊髄や損傷後 24-48 時間では MK の発現はほとんど認めなかった。しかし損傷後 5 日では発現は著明となり、少なくとも 2 週間は発現を認めた (Fig. 1A)。MK の mRNA の発現も蛋白の発現と似たパターンを示した (Fig. 1B,C)。

ラット小脳顆粒細胞の初代培養において MK の産生は播種後 12 時間で検出され、3 日後にピークとなり少なくとも 10 日間は発現を認めた (Fig. 2A)。MK は bFGF により活性化された astrocyte でも産生されたが、活性化されていない astrocyte では産生されなかった (Fig. 2B)。しかし microglia では様々な物質で刺激しても MK の発現を認めなかった (Fig. 2C)。

neuron や反応性 astrocyte で産生された MK は glia や neuron の機能に影響をあたえるかも知れない。よって次に MK が glia に与える影響を調べた。bFGF や TGF- β 1 の投与により astrocyte は巨大化し星状に形状を変えたが、MK の投与では形態の変化は生じなかった (Fig. 3A)。同様に bFGF の投与で astrocyte は有意な増殖促進を示したが、MK 投与では増殖促進を認めなかった (Fig. 3B)。また同様に初代培養した microglia は LPS+IFN γ や TGF- β 1 の投与で特徴的な形態変化を起こしたが MK 投与では変化を示さなかった (Fig. 3C)。また LPS+IFN γ や TGF- β 1 の投与で microglia の NO 産生は著明に増加したが、MK 投与では増加しなかった (Fig. 3D)。これらの結果より MK は astrocyte や microglia を活性化しないことが示唆された。

次に MK の神経突起伸長効果を調べた。PLL 上に MK を coat すると初代培養した CGN の突起伸長は促進された (Fig. 4A)。1000ng/ml で MK coat すると 1.6 倍の伸長効果を示し (Fig. 4B)、同じ濃度の soluble 投与では 1.3 倍の突起伸長効果を認めた (Fig. 4C)。さらに注目すべきは、1000ng/ml の MK coat は CSPG の突起伸長阻害作用を克服する効果を示した (Fig. 4D)。この作用は MK と同じ塩基性タンパク質である BSA では認められなかった。

次にラット脊髄損傷モデルの下肢機能回復における MK くも膜下投与の効果を調べた。MK 投与群は 5 週目以降で vehicle 群に比べ有意な下肢機能改善を示した (Fig. 5A,

B)。またこれらの下肢機能の改善は電気生理学的評価でも裏付けられた。脊髄損傷後8週での onset latency の遅延は MK 投与群で vehicle 群に比べて有意に小さかった (Fig.5C)。

【考察】

我々はこれまでに報告されている MK の培養 neuron に対する突起伸長効果を確認することができた。そして MK が CSPG による突起伸長阻害作用を克服することを初めて示すことが出来た。CSPG は中枢神経損傷後の軸索再生における最も強力な阻害因子であることが知られており、この発見は vivo での MK 投与による神経損傷後の機能回復促進を示唆するものである。

bFGF、TGF- β 1 などの成長因子は neuron だけでなく glia 細胞にも影響を与えることが知られている。我々の研究でも bFGF は astrocyte の形態変化と増殖をひき起こした。この変化は vivo における損傷後の瘢痕形成につながるものである。また TGF- β 1 は microglia の形態変化と著明な NO 産生を引き起こしたが、これは neuron にとって有害な事象といえる。一方 MK は astrocyte や microglia を活性化しなかった。よって MK は glia の活性化による有害な作用を誘導することのない神経損傷の治療に有用な物質であることが示唆される。

脳梗塞や脊髄損傷後の反応性 astrocyte で MK が産生されることがこれまでに報告されている。しかし反応性 astrocyte は神経突起伸長阻害作用を有する CSPG も産生するため、脊髄損傷後に産生される MK の量は有意な機能回復を起こすには十分なものでない可能性がある。このため MK は元来、生体内に存在する成長因子ではあるが、外から補うことが軸索伸長阻害を克服するのに必要であったと考えられる。

【結語】

MK は損傷後の脊髄および培養した neuron や活性化された astrocyte で発現していることが分かった。MK は神経突起伸長作用を持ち、CSPG の阻害作用を部分的に克服することが示された。ラットの脊髄損傷モデルにおいて MK のくも膜下腔投与は下肢の機能的および電気生理学的回復を促進した。MK の作用メカニズムはまだ十分に分かっていないが、MK は神経損傷に対する有用な治療の一つとなり得る。