

主論文の要旨

**Keratan sulfate expression is associated
with activation of a subpopulation of
microglia/macrophages in Wallerian degeneration**

（ ワーラー変性でのケラタン硫酸の発現は
 ミクログリア／マクロファージの活性化と関連する ）

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

（指導：西田 佳弘 准教授）

新城 龍一

【諸言】

ワーラー変性は脊髄損傷後の損傷部より遠位部で生じる神経変性とされており、myelin debrisなどを除去する microgliaなどのグリア細胞の活動と関連があるとされている軸索再生の強い阻害因子である myelin debris を除去することは損傷後の神経機能回復において重要な段階である。ミクログリアとマクロファージの活性化が、脊髄損傷部より頭側の背側上行路と、損傷部尾側の皮質脊髄路に生じると報告されている。

過去には神経損傷部でケラタン硫酸(KS)の発現が見られることが報告されている。コンドロイチン硫酸(CS)は 軸索再生の強力な阻害因子として知られているが、我々は KS も強力な阻害因子のひとつであり、KS を除去することで脊髄損傷後の機能回復を促進することを報告した。損傷部では KS は反応性アストロサイトだけでなく、ミクログリアとマクロファージにも発現が見られる。アストロサイトが生成する KS は軸索再生の阻害に働くが、ミクログリアとマクロファージに発現する生化学的な意義はまだ解明されていない。

そこで、我々は KS の発現はワーラー変性とミクログリアとマクロファージの活性化と密接に関連していることを示した。

【対象・方法】

8 週齢の C57BL/6J マウスの雌を使用した。ソムノペンチルの腹腔内投与にて麻酔後に、頸部背側を切開し、第 3 頸椎の椎弓を切除し硬膜背側を露出させた。尖刃にて脊髄の右半切断し、筋肉と皮膚を縫合した。Sham 手術は椎弓切除のみとした。術後は抗菌薬であるバクトラミンを 1 週間経口投与した。

脊髄半切断後 1 週間で CST の順行性標識を行った。ソムノペンチルで麻酔後に、頭頂部を切開し、皮質運動野の頭蓋骨を両側開窓して、10 倍希釈した Biotinylated dextran amine (BDA)を、皮質運動野の左右 6 か所ずつ（1 か所 0.5μl）に注射した。BDA 注射後、2 週間で組織評価を行った。

【結果】

第 3 頸椎レベルでの脊髄右半切断が施行した。左の非損傷側の皮質脊髄路（CST）は BDA で標識されて尾側まで連続しているが、損傷側である右 CST は損傷部で途絶している（Fig. 1A）。第 5 頸椎レベルの脊髄の損傷側の横断面では、5D4 特異的な KS は広範囲で発現が見られる（Fig. 1B, C5）。KS の発現は第 1 胸椎レベルや第 1 腰椎レベルでは限局して見られる（Fig. 1B, T1 and L1）。

正常マウスでは KS の発現は見られないが（Fig. 1C）、損傷後 1 週間や 2 か月では Iba1 陽性細胞に KS の発現が見られる。このことから、ミクログリアとマクロファージの一部が KS を発現していることが示唆された（Fig. 1C, 2A）。第 1 腰椎レベルの脊髄での 5D4 と Iba1 陽性細胞数は、損傷後 1 週間で有意に増加している（Fig. 2B）。反対に、GFAP や Olig2 の染色は 5D4 と一致しないことから、KS の発現はアストロ

サイトとオリゴデンドロサイトのどちらにも見られないことを示唆する (Fig. 3)。

CD68 はミクログリアやマクロファージ全体の活性化のマーカーとして使用されるが、CD86 は M1、CD206 は M2 のミクログリアとマクロファージのマーカーとして使用されている。我々は M1 と M2 のどちらの極性のミクログリアとマクロファージに KS が発現しているかを検証した。KS の発現は CD68 と CD86 陽性細胞とは一致したが、CD206 陽性細胞とは一致しなかった (Fig. 4)。この結果より、KS は活性化した M1 ミクログリアとマクロファージに発現していることが示唆された。M1 ミクログリアとマクロファージに KS が発現していることは、KS と CD86 の継時的な発現によっても確認できる (Fig. 5A)。加えて、M2 マーカーである CD206 や Arginase1 の発現が、継時的な検証でも発現が見られないことから、KS を発現しているミクログリアとマクロファージは M2 ではないことがいえる (Fig. 5B, C)。

CD68 と IL-1 β の mRNA の発現は頸髄半切断後の損傷側で有意に増加する (Fig. 6A)。ところが、M2 マーカーである CD206、Arginase1、IL-4 と IL-10 の発現は有意な変化を認めない (Fig. 6B)。この結果は Fig.4 と Fig.5 で示されたミクログリアとマクロファージの極性と同様の結果である。

【考察】

この研究で、我々は KS の発現が損傷部近くだけでなく、かなり離れた部位でも見られることを発見した。KS の発現は損傷後少なくとも 1 か月以上は持続している。さらに、KS の発現は M1 ミクログリアとマクロファージに一致している。我々の結果はワーラー変性に伴うミクログリアとマクロファージに密接に関連していることを強く示唆している。

我々は過去に筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルマウスである SOD1^{G93A} においてミクログリアとマクロファージに KS の発現が見られることを発表した。KS は M1 と M2 でもないミクログリアとマクロファージに発現しており、M2 には発現しておらず、M2 ミクログリアとマクロファージは KS 欠損 (GlcNAc6ST1^{-/-}) SOD1^{G93A} マウスのみに見られた。したがって、SOD1^{G93A} マウスでは病初期に M2 ミクログリアとマクロファージの一時的な増加を認めるが、KS 欠損 SOD1^{G93A} マウスでは増加は見られない。本研究でも ALS モデルマウスと同様に M1 ミクログリアとマクロファージに KS が発現していた。ALS モデルマウスと違い、本研究の脊髄損傷モデルでは M2 への発現変化は認めなかった。したがって、双方のマウスモデルにおいて M1 ミクログリアとマクロファージに KS の発現が見られることは共通しているが、発現の結果や生物学的な意義は病状によって変化する可能性が有る。

脊髄損傷では損傷部における M1 マーカー (TNF α 、IL-1 β 、IL-6) と M2 マーカー (Arginase1、CD206) の発現の機能的な変化が誘導される。このことは、損傷部と離れた部位では M1 マーカーは増加するが M2 マーカーは変化しないという我々の結果とは異なっている (Fig.6)。この結果より、損傷部より離れた部位ではミクログリアとマクロファージは M1 有意になるという仮定が示唆される。

ミクログリアとマクロファージは貪食という病理的な作用があることが知られているが、最近では生理学的な働きも注目されている。ミクログリアの突起はシナプスまで伸びており、シナプスの状態の監視を行い、時にはシナプスに共存して病的なシナプス結合を除去しているとの報告がなされている。ミクログリアは皮質の第Ⅴ層に存在し出生後の発達に関与するとの報告も見られる。さらに、KSの発現は脊髄損傷やワーラー変性、ALSなど病的な状況でみられ、このKSの発現は今後の研究で生理学的な意義を解明することが期待される。

【結語】

本研究では頸髄の半切断後に、損傷部より離れた腰髄の損傷側でKSの発現が見られることを示した。このKSはM1ミクログリアとマクロファージにみられ、ワーラー変性に関係することが示唆された。