

主論文の要旨

Secreted Ectodomain of Sialic Acid-Binding Ig-like Lectin-9 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Promote Recovery after Rat Spinal Cord Injury by Altering Macrophage Polarity

〔 分泌型 Siglec-9 細胞外ドメインと MCP-1 は
マクロファージ極性変換によりラット脊髄損傷後の回復を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：古川 鋼一 教授)

松原 弘記

【緒言】

近年、幹細胞移植による治療効果は幹細胞由来液性因子による宿主へのパラクライン効果が主体であるとされている。しかし、効果の鍵となる因子はほとんどが不明である。効果因子を同定できれば、細胞移植を要しない治療法の開発が期待できる。本研究は、ヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) の無血清培養上清 (CM) をラット脊髄損傷モデル (SCI-rat) へ投与し治療効果を検討した。CM のプロテオーム解析を行い、その液性因子を機能分類した。さらに、分類した因子群からマイクログリア/マクロファージ (Mic/Mac) 抗炎症性 M2 型誘導因子を同定し、CM からそれら因子を欠いた場合や、因子のみでの SCI-rat 治療効果、因子で誘導した Mac の機能を検討し、因子を応用した新しい治療法確立の可能性を検証した。

【材料と方法】

本学倫理委員会承認のもと本学附属病院で患者の同意を得て提供されたヒト乳歯より SHED を分離・培養した。対照群として、Lonza 社から購入したヒト骨髄間葉系幹細胞 (BMSC)、ヒト線維芽細胞 (Fibro) を使用した。80%コンフルエント状態で無血清培地交換、48 時間培養し、細胞残骸を除去した上清を CM として使用した。

8 週齢雌 SD ラットを麻酔し、第 9 胸椎椎弓切除、背側脊髄を露出し IH インパクトアーにて 200kdyn の圧挫損傷を与えた。第 11 胸椎から脊髄くも膜下腔内へポンプ (iPRECIO SMP-200) に接続したシリコンカテーテルを挿入し、損傷直上部で 3ul/h で持続流出するように留置した。ポンプはラット腋窩の皮下に縫合・固定し埋め込んだ。また CM 投与比較として、同様のモデルへ SHED を計 1×10^6 個移植した。下肢運動機能評価 (BBB Score)、組織学的解析、免疫組織学的解析および Real time RT-PCR 法による遺伝子発現解析にて CM および細胞の治療効果を検討した。また、ラット大腿骨より M-CSF 添加培養して得られた Mac を用い、CM を作用させたときの M2 型転換効果を免疫組織学的解析、遺伝子発現解析にて検討した。

CM のヒト 274 種類サイトカインアレイ解析を行い、液性因子群の機能分類を行った。その中から、Mac M2 型転換に関連すると思われる因子を ELISA 法、ウェスタンブロッティング法 (WB 法) にて定量した。それら因子を中和抗体で中和した CM での Mac の M2 転換への影響および、SHED-CM からそれら因子を免疫沈降法にてデンプリレーションした CM (dSHED-CM) を、SCI-rat へ投与し治療効果を検討した。

同定した M2 型誘導因子群を Mac へ作用させ M2 型転換および SCI-rat へ投与し治療効果を検討した。ヒト急性単球性細胞株 (THP-1) に因子群を作用させ、その物理的相互作用を免疫沈降法にて解析した。また、誘導した Mac から得られた CM を初代培養ラット小脳顆粒細胞 (CGNs) へ作用させ、神経突起伸長および細胞死抑制を評価し、その機能を検討した。さらに、選択的 CCR2 阻害薬 (RS504393) を作用させた際の因子群の効果への影響を *in vitro* および *in vivo* で解析した。

【結果】

SCI-rat に細胞移植または CM 投与した結果、SHED 移植群および SHED-CM 投与群で著明な下肢運動機能回復が得られた (図 1A)。また、組織学的解析にて SHED 移植群および SHED-CM 投与群は有意に組織破壊抑制、5-HT 陽性神経軸索数が増加した (図 1B, C)。Real time RT-PCR 法による急性期炎症性/抗炎症性因子の経時的遺伝子発現解析では、炎症性/組織破壊因子の遺伝子発現は投与した CM 両者で減少した (図 1D-F)。抗炎症性サイトカイン、M2 型マーカーおよび血管新生因子の遺伝子発現は投与後 12 時間と 72 時間で SHED-CM 群で有意に増加した (図 1G-K)。免疫組織学的解析では、投与後 72 時間の損傷部周囲に集積した Mic/Mac は、SHED-CM 群において有意に CD206/IL-10 陽性 M2 型 Mic/Mac 数が増加した (図 1L, M)。

サイトカインアレイの結果、SHED-CM には 79 種類、BMSC-CM には 43 種類の液性因子が含まれ、40 因子は共通に発現し、39 因子は SHED-CM 特異的に発現していた (図 2A)。機能分類の結果、SHED-CM には 28 因子の抗アポトーシス/神経保護、軸索伸長促進、抗炎症、Mac 性状制御といった神経再生機能を有する因子が認められた (図 2B, C)。これまでの報告から、特異的 M2 誘導を発揮する因子として、単球走化性促進因子 (MCP-1)、シアル酸結合 Ig 様レクチン 9 (Siglec-9) および IL-6 に着目した。ELISA 法により CM 中の 3 因子含有量を定量した結果、MCP-1、Siglec-9 の含有量は SHED-CM が最も高かった (図 3A)。WB 法により Siglec-9 を検出した結果、SHED-CM では、37kDa の分泌型細胞外ドメイン (ED-Siglec-9) バンドが検出された (図 3B)。初代培養ラット Mac へ CM を作用させた結果、SHED-CM のみで Mac の細胞形態変化、M2 型関連遺伝子発現が有意に増加し、M2 型誘導が促進された (図 3C, D)。また、CM 中の MCP-1、Siglec-9 および IL-6 を抗体中和し、Mac に作用させた結果、MCP-1 と Siglec-9 両者を中和させると、Mac の M2 型誘導が抑制された (図 3C, D)。さらに、細胞表面をシアル酸分解酵素 (シアリダーゼ) で処理した Mac へ SHED-CM を作用させると、M2 型誘導が抑制された (図 3C, D)。

リコンビナント MCP-1/ED-Siglec-9 を Mac に作用させた結果、MCP-1/ED-Siglec-9 両者が作用すると Mac の細胞形態変化および M2 型関連遺伝子の発現が上昇した (図 4A-C)。また、MCP-1 受容体である CCR2 の選択的阻害薬 (RS504393) 添加により、MCP-1/ED-Siglec-9 の M2 型誘導作用が抑制された (図 4A-C)。さらに CCR2 ノックアウトマウス由来 Mac へ MCP-1/ED-Siglec-9 を作用させた結果、M2 型関連遺伝子の発現は上昇しなかった (図 4D)。CCR2 と ED-Siglec-9 の物理的相互作用を検証するため、CCR2 を恒常的に発現する THP-1 へ ED-Siglec-9 (Fc) を添加し免疫沈降、WB 法にて CCR2 抗体で検出した。結果、CCR2 の 55kDa と 42kDa の二つのバンドのうち、ED-Siglec-9 (Fc) 沈降群では 55kDa バンドのみ検出された (図 4E、レーン 4)。THP-1 を CCR2 抗体で免疫沈降し、WB 法にて Siglec-9 のメジャーターゲットである α -2,3 シアル酸を認識するレクチンプロットを行った結果、55kDa バンドのみ検出された (図 4E、レーン 8)。シアリダーゼ処理した THP-1 では 55kDa のバンドは減少した (図 4E、レーン 5、7、9 および図 4F)。因子で誘導した Mac の機能を解析するため、神経突

起伸長阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) コート培養皿に初代培養ラット CGNs を播種し、突起伸長を抑制した状態で MCP-1/ED-Siglec-9 誘導 Mac より採取した CM (Mac-CM) を作用させた結果、CGNs の神経突起伸長促進および細胞死抑制効果が認められた (図 5A-C)。また、因子で誘導した Mac は各種栄養因子の遺伝子発現が有意に上昇した (図 5D)。

dSHED-CM を SCI-rat へ投与した結果、下肢運動機能の低下、5HT 陽性軸索数が減少し、組織破壊が亢進した (図 6A-D)。また、損傷 72 時間後の M2 型関連遺伝子の発現減少、集積した M2 型 Mic/Mac 数の減少を認めた (図 6E-H)。

MCP-1/ED-Siglec-9 を 1ug/ml で PBS に溶解、ポンプにて SCI-rat へ投与した結果、コントロール群と比較し M2 型関連遺伝子発現上昇、M2 型 Mic/Mac 数の増加、CD206 タンパク発現の上昇、組織破壊抑制、5HT 陽性軸索数の増加がみられ、下肢運動機能が有意に回復した (図 7A-K)。

脊髄損傷 36 時間後から 12 時間毎に RS504393 を 1 週間経口投与し、MacCCR2 を抑制した状態で SHED-CM および MCP-1/ED-Siglec-9 を投与した結果、投与群において 72 時間後に集積する M2 型 Mic/Mac 数が有意に減少し、下肢運動機能、5HT 陽性軸索数が低下し、組織破壊が亢進した (図 8A-G)。

【考察】

SHED-CM の M2 型転換効果の本体は MCP-1/ED-Siglec-9 であり、ED-Siglec-9 が Mic/Mac 細胞膜上の α -2,3 シアル酸糖鎖を持つ CCR2 に特異的に結合し、そこへ MCP-1 が作用し M2 型誘導を促進することで SCI-rat の治癒促進に寄与していた。

近年、炎症期の Mac の炎症性 M1 型と抗炎症性 M2 型のスペクトラム制御が損傷治癒において重要な役割を果たし、M2 型を効率的に誘導することが治癒・再生促進への一つの鍵となる要因とされている。しかし、脊髄損傷を含め損傷治癒過程では M1 型スペクトラム優位で、効率的に M2 型へ誘導する方策が世界中で模索されている。

Siglec-9 は単球系細胞膜上に存在するシアル酸認識受容体である。免疫受容体抑制化モチーフを介し炎症性 M1 型への活性化シグナルを抑制することで抗炎症を促進するが、Siglec-9 分泌型細胞外ドメインの機能はこれまで報告がない。また、炎症性単球活性化/遊走促進に働く MCP-1 が ED-Siglec-9 を介することで M2 型誘導へ働くという報告もない。さらに、誘導した M2 型 Mac は神経再生に重要な液性因子を直接的に分泌し、SCI-rat の下肢運動機能回復に必要な不可欠な影響を及ぼしていた。本研究結果から、急性期脊髄損傷において MCP-1/ED-Siglec-9 による M2 型 Mic/Mac の効率的誘導を基盤とするこれまでにない治療法確立の可能性が示唆された。

【結語】

SHED-CM より MacM2 型誘導因子 MCP-1/ED-Siglec-9 が同定され、これらは SCI-rat 治療に必須の因子群であった。本研究より、ヒト歯髄幹細胞の有する M2 型 Mac 誘導による免疫制御機構が解明され、因子を応用した治療法確立の可能性が示唆された。