

## 主論文の要旨

# A combination of keratan sulfate digestion and rehabilitation promotes anatomical plasticity after rat spinal cord injury

脊髄損傷ラットに対するケラタン硫酸分解酵素とリハビリテーション併用療法は、神経線維再生を促進する

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)

石川 喜資

## 【緒言】

神経損傷後の機能回復にとって、神経ネットワークの再構築は重要である。機能的及び解剖学的な可塑性促進が、脊髄損傷や脳梗塞後の治療で望まれている。しかしながら、いまだに十分な神経ネットワーク再構築を行う治療方法は存在しない。一方、リハビリテーションによるネットワーク再構築及びそれに伴う機能回復が報告されている。

神経ネットワークの再構築には、損傷軸索再生及びシナプス回路の構築が必要となる。その仕組みの解明が神経損傷に対する治療で求められる。成人の成熟した中枢神経システムは、神経損傷後に十分な回復機能をもっていないとされる。もし回復機能を上昇させた上でリハビリテーションを行うことができればより良好な運動機能改善が期待できるかもしれない。コンドロイチン硫酸（以下 CS）は、軸索伸長の強力な阻害因子である。コンドロイチナーゼ ABC（以下 C-ABC）による CS の分解は、軸索再生を促すのみでなく、運動機能回復も促進することが報告されている。コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、神経可塑性を制御しているといわれるペリニューロナルネット（以下 PNN）の構成物質の一つである。C-ABC は、この PNN 内の CS を分解することにより神経可塑性を増強させていると考えられている。

CS は、ケラタン硫酸（以下 KS）やヘパラン硫酸、ヒアルロン酸と同様にグリコアミノグリカンを構成する糖鎖の一つである。我々は、これまでに KS が、軸索伸長の阻害因子であることを報告してきた。5D4 陽性 KS ノックアウトマウスでは、脊髄損傷後に非ノックアウトマウスに比べて軸索再生及び運動機能回復が促進されることが分かっている。また KS 分解酵素であるケラタナーゼ II（以下 K-II）の脊損部への局所投与にて C-ABC と同様の機能回復が可能であることが報告されている。

ラット脊髄損傷モデルに C-ABC 投与とリハビリテーションを併用することで各々単独での治療効果よりも良好な機能回復促進ができる可能性が報告されている。これまでのところ、KS 分解酵素とリハビリテーション併用療法の効果の報告はない。今回、同併用療法が、C-ABC/リハビリテーション併用療法と同様の効果が得られるかについて確認した。げっ歯類では、頸髄レベルで CST を損傷することにより同側の上肢の巧緻運動機能障害を引き起こすことが可能である。本研究では、片側 C3/4 高位でのラット CST 損傷モデルを使用し、KS 分解酵素とリハビリテーション併用療法の脊髄損傷に対する効果を評価した。

## 【対象・方法】

約 8 週齢雌 Sprague Dawley ラット (N=58) を用いた。C3/4 高位にて脊髄の片側後側方損傷を行い脊髄損傷モデルとした。本モデルを C-ABC 投与群、K-II 投与群、生食投与群 の 3 つのグループに分け、各薬剤を脊髄損傷部に局所投与を 2 週間行った。さらに各グループを上肢機能リハビリ施行群と非リハビリ群とする計 6 グループ（各 N=5）にわけ、上肢機能評価（損傷後 6 週）及び組織免疫染色を行った。(Figure 1)また非損傷ラットを用いて、PNN と KS の関係について組織免疫染色にて調査した。

リハビリテーション及び機能評価として、single pellet reaching task (上肢機能評価)を使用し、Montoya らの報告と同様の手法を用いてリハビリテーション及び機能評価を行った。脊髄損傷 3 週間前にプレトレーニングとして、上肢使用をラットに教えた後、脊髄損傷モデルを作成した。損傷 1 週間後より 5 週間にわたりリハビリテーションを行った。上記機能評価として、損傷前の上肢使用による実験用ペレット摂食回数を計測し、20 回中の同動作の成功回数をベースラインとした。脊髄損傷後、最終機能評価時にあらためて上肢によるペレット摂食成功回数を計測し、ベースラインに対しての改善率を評価した。

### 【結果】

非脊髄損傷ラット脊髄を用いた、脊髄組織学的解析により、神経細胞を取り囲む PNN (WFA) と抗 KS 抗体 (BCD4) の co-localization を確認した (Figure 2)。さらに K-II 処理により、PNN 内の KS 陽性領域の消失を認めた (Data not shown)。

脊髄損傷モデルを用いた結果では、各薬剤投与グループ内で、リハビリ施行群は、非リハビリ群に比較して有意な運動機能回復率を認めていた (Saline 群 53.4% vs 26.0%)、(C-ABC 群 65.2% vs 36.5%)、(K-II 群 66.5% vs 38.9%) (各  $P < 0.01$  : one way ANOVA)。一方、各併用療法群は、リハビリ単独群に対して改善で有意差は認めなかった。本結果からは、C-ABC/リハビリテーション併用療法と K-II/リハビリテーション併用療法が同等であることが示された。(Figure 3)

脊髄損傷後 9 週目の脊髄損傷部頭側 (C2 高位) の脊髄切片にて組織免疫染色 (5HT-positive fibers および GAP43-positive fibers) を行い、神経線維量を Image J を用いて評価した。5HT による評価では、K-II/リハビリテーション併用療法は、K-II 単独療法群またはリハビリ単独療法群、非リハビリ群に比べて有意差を持って神経線維量の増加を認めていた (Figure 4)。GAP43 による評価においても同様の結果であり、C-ABC/リハビリテーション併用療法と同等の効果を確認した。(Figure 4)

### 【考察】

本結果では、KS 分解酵素/リハビリテーション併用療法により、著明な神経線維再生促進が可能であることが確認できた。またその効果については CS 分解酵素/リハビリテーション併用療法同等の効果があることを確認できた。このことから神経損傷後の神経可塑性について KS と CS は同様の役割を果たしている可能性が考えられる。

解剖学的な神経線維量の増加量は、機能改善の程度に影響することが考えられる。しかしながら、今回の結果では、KS 分解酵素/リハビリテーション併用療法と KS 分解酵素単独療法の間には、有意差をもった機能回復は認めなかった。その理由として、本研究の運動機能評価方法が不十分であった可能性があり、より巧緻性運動機能の評価する方法を検討する必要があると考える。

今回の結果および Fawcett らの報告から、CS または KS の分解は、軸索再生に寄与すると考えられ、一方でリハビリテーションは、神経回路ネットワークの再構築を

促進すると考えられる。以上から、KS もしくは CS 分解酵素とリハビリテーションの併用療法は、最大限の治療効果を得るために必要かもしれない。しかしながら、K-II と C-ABC はバクテリア由来の酵素であるため、臨床への応用には時間を要する可能性がある。

**【結語】**

KS 分解酵素/リハビリテーション併用療法は、ラット脊髄損傷後の神経線維増生を促進することが可能である。しかしながら神経線維量と機能回復との間に相関性は認めなかった。