

研究テーマ

新規軸索再生因子を応用した脊髄損傷後軸索再生方法の開発

研究代表者

施設名 : 北海道大学大学院医学院

氏 名 : 寺尾 英将

研究テーマ：新規軸索再生因子を応用した脊髄損傷後軸索再生方法の開発

所属先：北海道大学大学院医学研究院

氏名：寺尾 英将

【背景・目的】

脊髄損傷後の機能回復には、軸索再生が必須であるが、その臨床的再生方法は未だ確立されていない。基礎研究において、脊髄損傷部の軸索再生効果を認めた神経栄養因子の報告は散見されるが¹⁻³⁾、それらによる再生はいまだ不十分であるため、新たな因子の発見が求められている。我々は、末梢神経の軸索再生機序の解析から、シュワン細胞が発現する**Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor α 1(GFR α 1)**が新規の軸索再生因子であることを同定した。GFR α 1はGDNFの受容体として細胞膜上に存在する一方^{4,5)}、遊離して、GDNF非依存的なリガンドとして、軸索表面上にあるNCAMとIntegrin(Itg) α 7 β 1の複合体を受容体として、末梢神経の軸索再生を促進する(論文査読中)。

末梢神経損傷部で発見していた、NCAMとIntegrin(Itg) α 7 β 1複合体が中枢神経である脊髄神経でも発現しているかは不明であったので、Lewisラットの正常頸髄と損傷1週後の頸髄を免疫蛍光染色にかけた。NCAMとIntegrin(Itg) α 7 β 1複合体は、正常脊髄は発現していなかったが(図1)、損傷1週後の感覚神経軸索において、その発現を認めた(図2)。さらに、脊髄損傷部へのGFR α 1分泌骨髄間質細胞(Bone marrow stromal cell, BMSC)の移植で、脊髄損傷後の感覚神経の軸索再生が促進することが明らかとなり(図3)、GFR α 1は中枢神経軸索の再生効果も持つことが判明した。同時に、GFR α 1は、BMSCの増殖能を上げない事、グリア瘢痕の減少効果がない事、脊髄へのシュワン細胞浸潤促進効果がない事も判り(図4, 5)、間接的な軸索再生機序の関与が否定された。

そこで、本研究では、これらの知見をさらに発展させ、GFR α 1が随意巧緻運動の回復に必須である、皮質脊髄路(Corticospinal tract, CST)軸索の再生効果を持つか明らかにする事を目的として実験を行った。

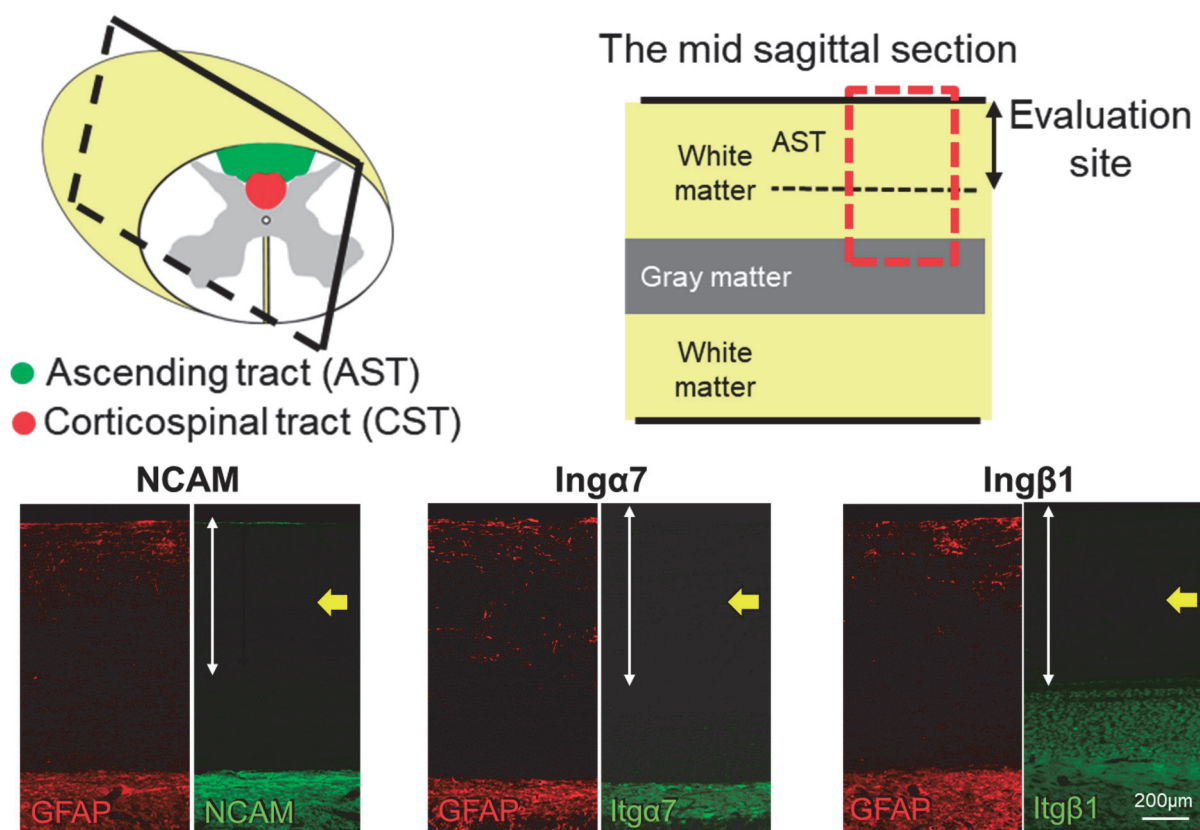


図1: NCAM、Itga7、およびItgb1は、正常な感覚神経軸索では検出されず。

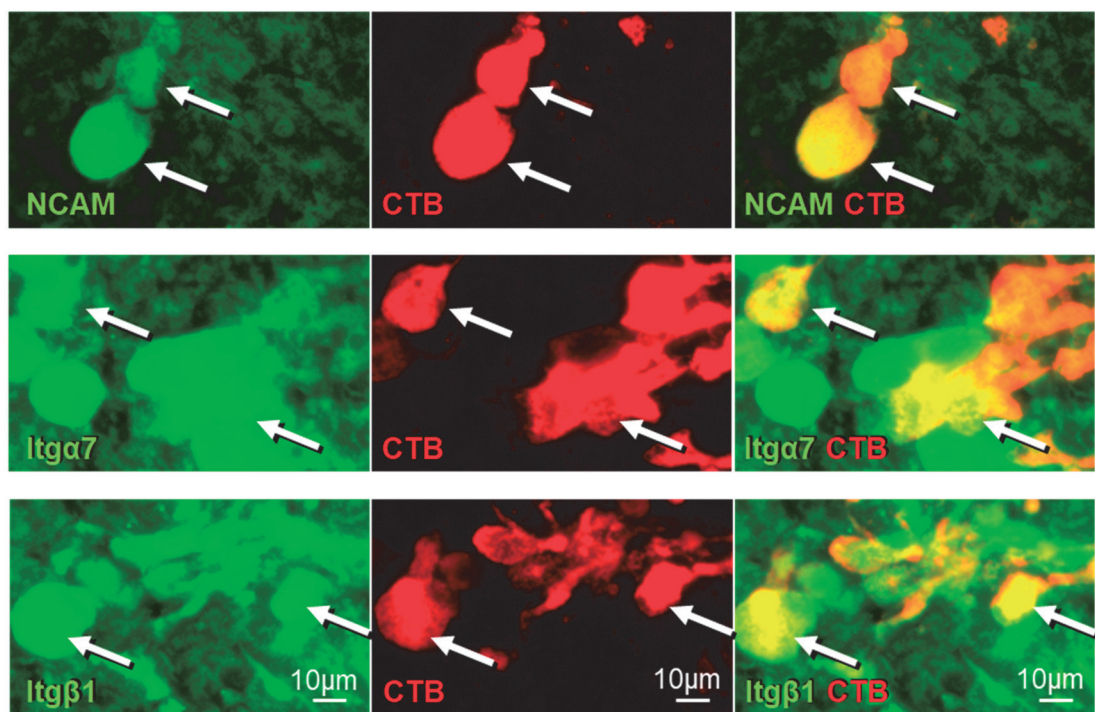


図2: CTBで標識された損傷感覚神経軸索は、NCAMとIntegrin(Itga7)β1複合体の発現を認めた。

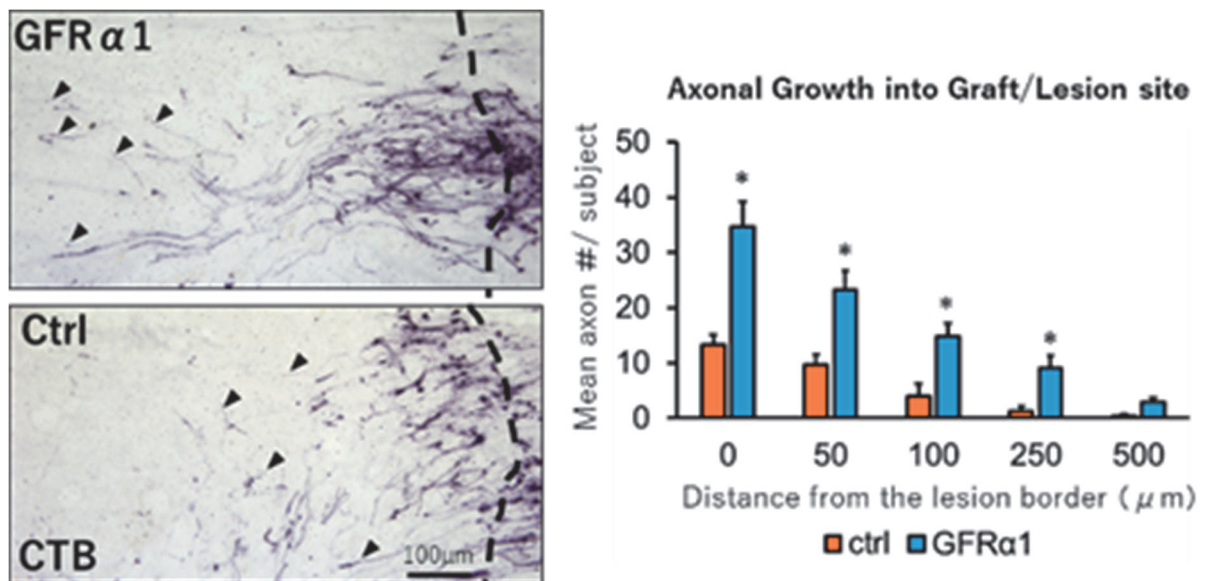


図3: 脊髓矢状断切片のCTB(感覚神経軸索)染色像。感覚神経軸索がGFR α 1分泌細胞内へと旺盛に再生する一方、対照細胞内への再生は乏しい(左)。定量結果(右)。点線は移植細胞と宿主との境界。黒矢印は再生軸索末端。右側が尾側。

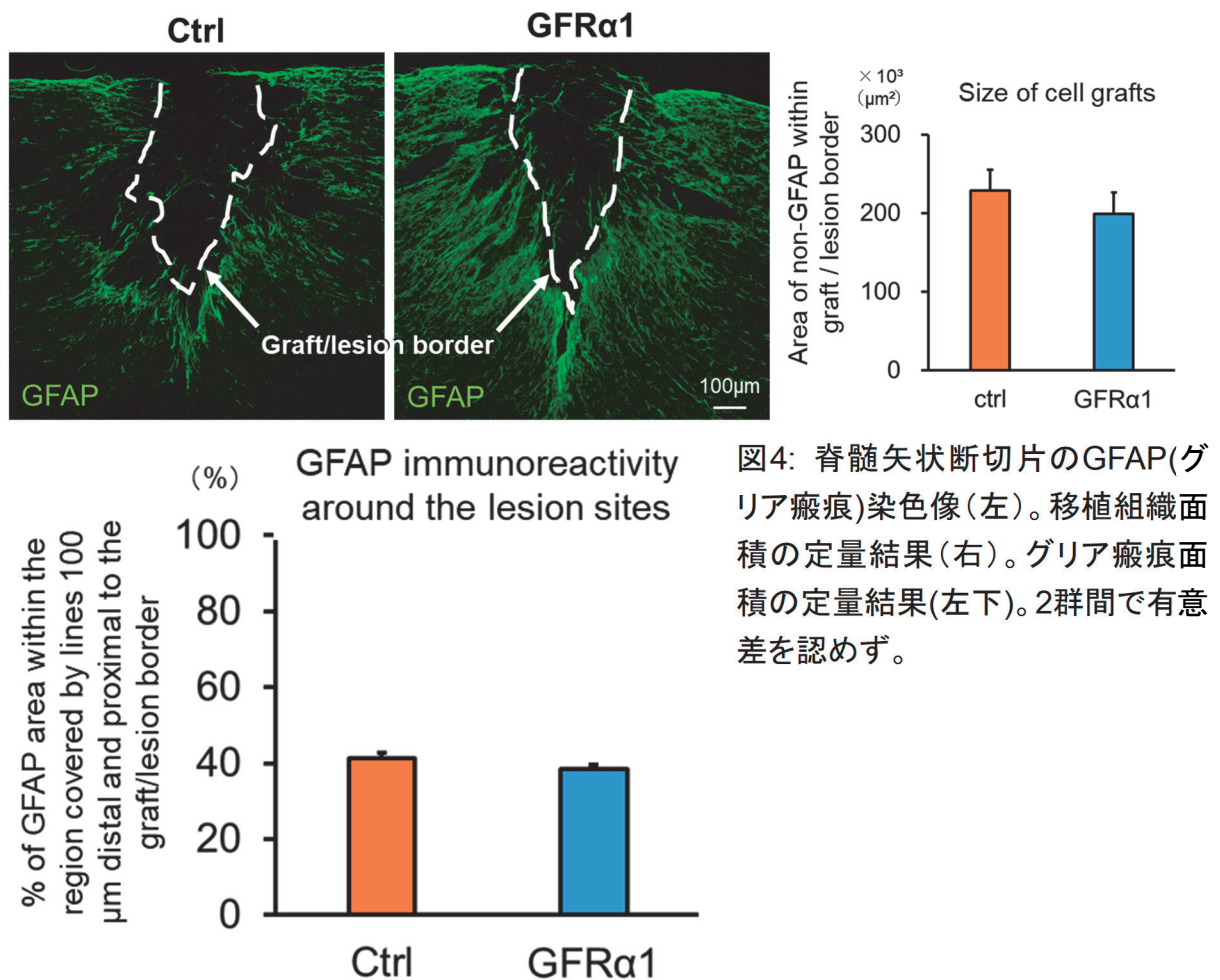


図4: 脊髓矢状断切片のGFAP(グリア瘢痕)染色像(左)。移植組織面積の定量結果(右)。グリア瘢痕面積の定量結果(左下)。2群間で有意差を認めず。

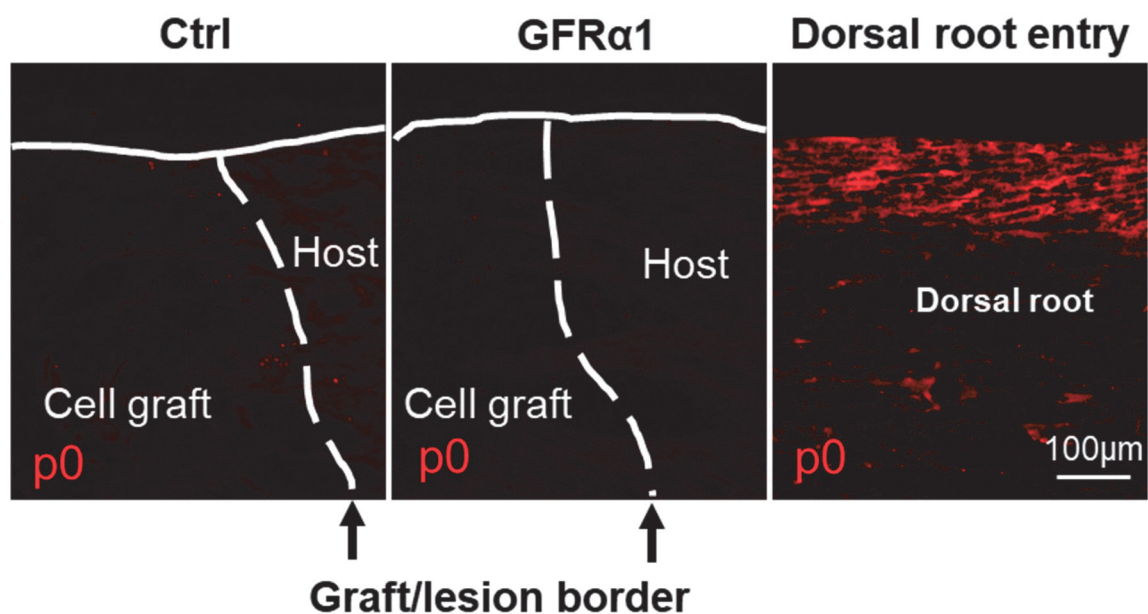


図5: 脊髓矢状断切片のp0(シュワン細胞)染色像。実線は脊髓背側沿。2群ともにシュワン細胞浸潤を認めなかった。

【方法】

方法 1 : Mouse GFR α 1神経突起伸長効果の種交差性の確定

Mouse GFR α 1の軸索再生効果を検証した。8週齢LEW/Crjラット後根神経節より感覚神経細胞を単離してシャーレに播種した。ラット感覚神経細胞のシャーレへの接着が確認できたのちに、mouse GFR α 1投与群、Rat GFR α 1投与群、陰性対象としてMouse IgG投与群の3群に分けそれぞれ投与し、48時間後に定量化した。濃度はすべて10 μ g/mlとなるように調整した。

方法 2 : Mouse GFR α 1分泌BMSCの作成

当研究室で作成済みの、GFPとMouse GFR α 1を強制発現させるレンチウイルスベクター液を使用した。8週齢LEW/Crjラットから単離したBMSCに作成したレンチウイルスベクター液をincubationした。72時間後からは一般的な培地交換と継代を行い、Cell sorter(BD FACSAria™III)を用いて、GFP蛍光の強い細胞集団を選別した。得られた細胞集団を再度培養し、次の実験に必要量増殖した段階で凍結保存した。得られた遺伝子組み換え細胞をそれぞれ免疫細胞染色にかけ、細胞での発現を確認した。

方法 3 : 皮質脊髓路軸索のNCAMとIntegrin(Itg) α 7 β 1複合体発現の検討

8週齢LEW/Crjラットの両側大脳皮質運動野に10%Biotinylated dextran amines溶液(以下BDA)を10 μ l(片側5.0 μ l)投与した。1週後、第4頸椎高位の頸髄にwire-knifeを使用して部分切断損傷を作成、さらに1週後に灌流固定を行った。BDAの注射手技に

は、PICOSPRITZER® III(PARKER HANNIFIN CORPORATION)を使用した。PICOSPRITZER® IIIの再現可能な圧力パルス注射によって投与量の再現性は担保された。頸髄損傷部を中心とした矢状断切片(厚さ30 μ m)を作成し、NCAMとIntegrin(Itg) α 7 β 1複合体が、BDAにより標識された損傷CST軸索との共局在を免疫蛍光染色により評価した。

方法4：頸髄損傷部へのmouse GFR α 1分泌BMSC移植

8週齢LEW/CrlCrljラットC4椎弓高位頸髄にwire-knifeを使用して部分切断損傷を作成直後、損傷部に遺伝子組み換え線維芽細胞(7.5万個)を移植し、4週後に灌流固定を行った。灌流固定の2週間前、両側大脳皮質運動野に10%BDA溶液を10 μ l(片側5.0 μ l)投与した。細胞移植部頸髄の矢状断切片(厚さ30 μ m)を作成し、皮質脊髄路軸索の移植組織内への再生を組織学的に評価した。

【結果】

1 Muman GFR α 1 神経突起伸長効果の種交差性

Mouse GFR α 1、Rat GFR α 1は、伸長神経細胞率と最大神経突起長の双方において、同等のラット神経突起伸長効果を認めた(図6)。軸索に対するMouse GFR α 1の効果は、種交差性のある現象であることが確認できた。

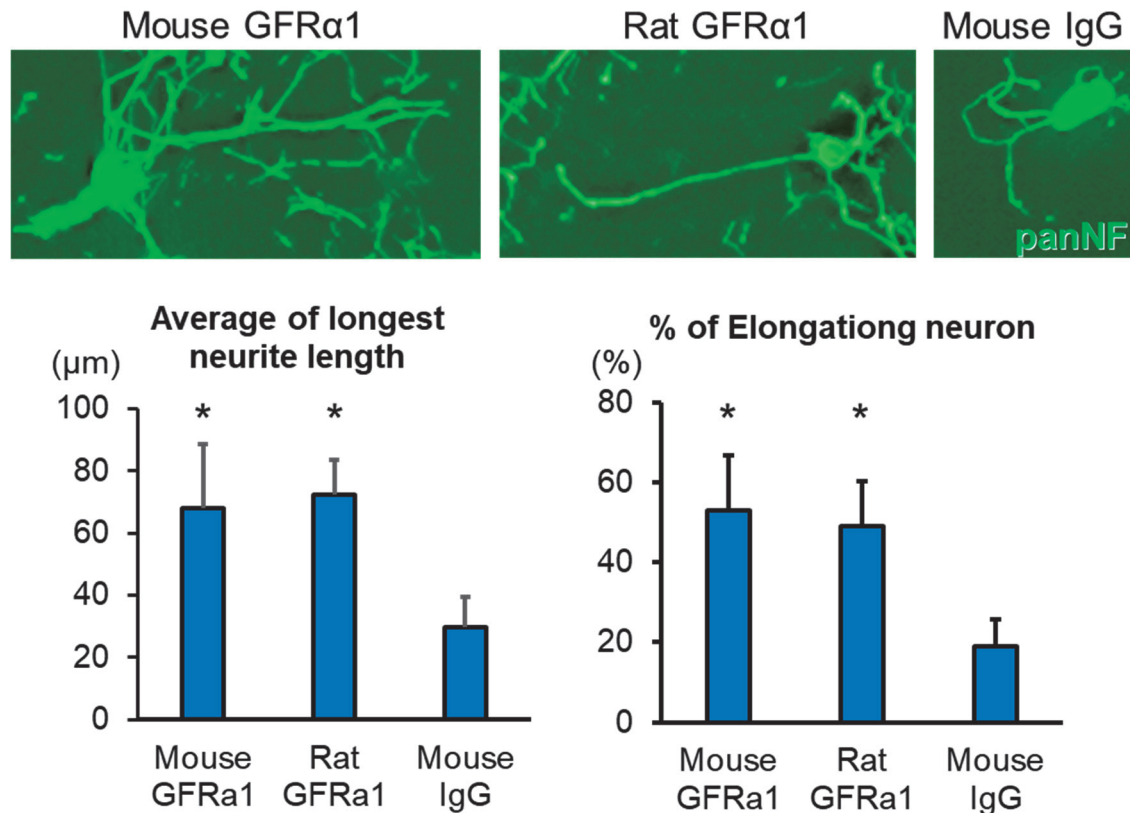


図6: ラット培養感覚神経細胞に対するGFR α 1の神経突起伸長効果

2 Mouse GFR α 1分泌BMSC

免疫細胞染色では、Mouse GFR α 1とGFPを強制発現させたBMSCは、95%以上の細胞でGFP陽性であり、同時にGFR α 1の発現も認めた (図7)。

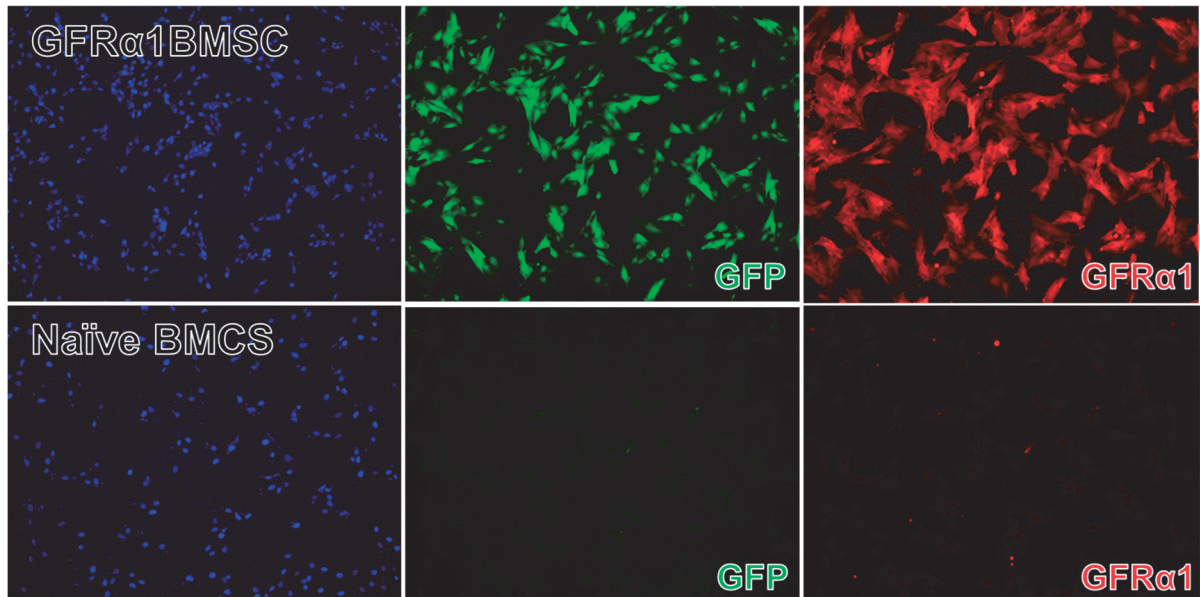


図7: 遺伝仕組み換えBMSCの免疫細胞染色像

3 皮質脊髓路軸索のNCAMとIntegrin(Itg) α 7 β 1複合体発現

免疫蛍光染色では、正常脊髄の皮質脊髓路においてCST軸索はItg β 1の発現を認めるも、NCAMとItg α 7の発現は認めなかった(図8)。

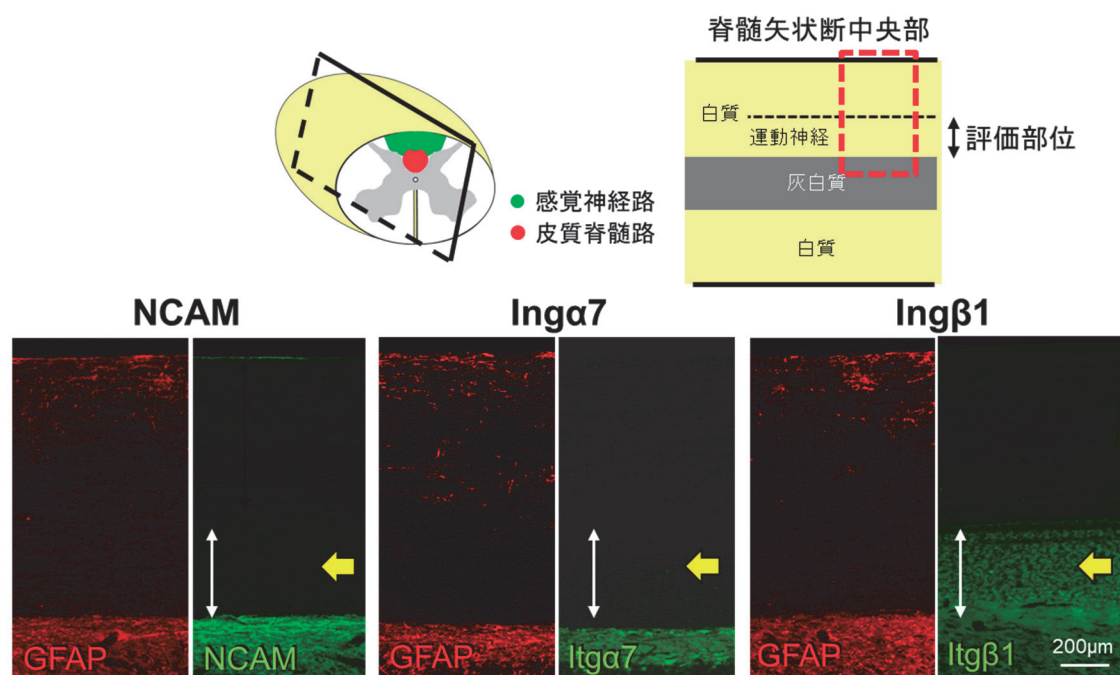


図8: 正常脊髄の免疫蛍光染色像

脊髓損傷1週後の皮質脊髓路CST軸索の一部で、NCAMとIntegrin(*Itg*) α 7 β 1複合体の発現を認めた。

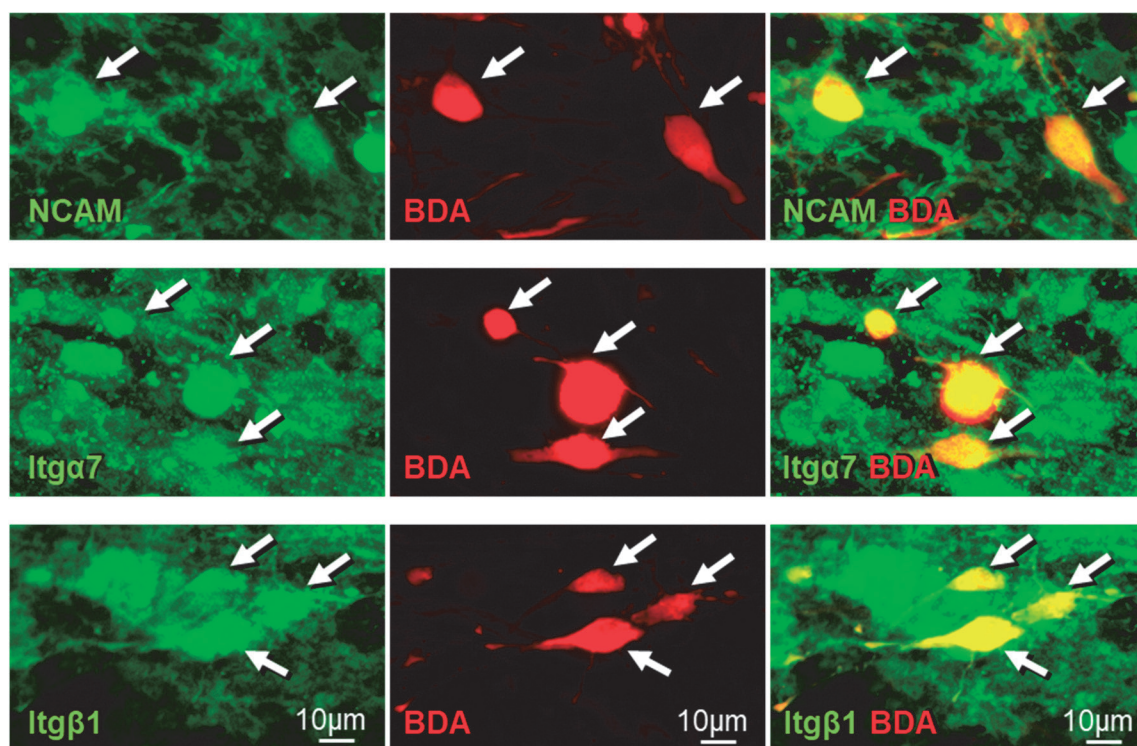
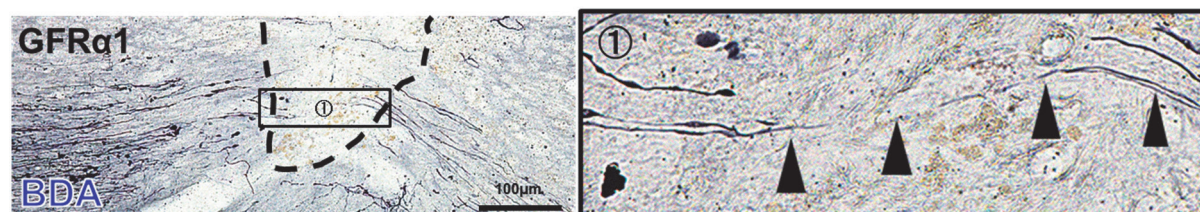


図9: 脊髓損傷1週後の免疫蛍光染色像、白矢印はBDAで標識されたCST軸索末端

4 頸髄損傷部へのmouse GFR α 1分泌BMSC移植

一部のCST軸索が移植細胞内へと再生し、尾側の宿主内へと再生する像を、GFR α 1分泌BMSC移植群に認めた、一方、対照群では、CST軸索の再生像を認めなかった。

図10: 脊髓矢状断切片のBDA(CST軸索)染色像。点線は移植細胞と宿主との境界。黒



矢印はBDAで標識された再生CST軸索。右側が尾側。

【考察・結論】

GFR α 1の脊髄損傷後軸索再生効果を検討するにあたって、まず**GFR α 1**の神経突起伸長効果の種交叉性を検討した。その結果、ラット由来神経細胞に対して、**Mouse GFR α 1**は**Rat GFR α 1**と同等の神経突起伸長効果を示し、軸索再生因子として、種交叉性があることが判明した。アミノ酸配列の相同性が**97%**と高いことから、想定された結果ではあるが、他の軸索再生因子で、相同性が高いにも関わらず、軸索再生効果が減弱する報告もあるため^{6,7)}、厳密な確認が必要であった。過去に我々は、マウス由来の神経細胞に対して、**Mouse GFR α 1**と**Human GFR α 1**が同等の神経突起伸長効果を示したことを確認し、種交叉性があることを発見した。**GFR α 1**は、発達期においても、神経組織の成長に重要な役割を果たすことから、進化の過程で種を超えてその構造が高度に保存されている可能性が示唆された。

今回、頸髄部分切断損傷部に**Mouse GFR α 1**を持続発現させた**BMSC**を移植したところ、一部の**CST**軸索が移植細胞内へと再生、尾側の宿主組織内へと再生する所見を観察した。このことは、**GFR α 1**が**CST**軸索再生効果を持つことを示唆しているが、再生が部分的であること、損傷部を超えた**CST**軸索を多く認めたことから、すべての**CST**軸索が切断されていない可能性も否定できず、再度の確認実験を実施する予定である。一方、脊髄損傷1週後の皮質脊髄路**CST**軸索の一部で、**GFR α 1**の受容体である、**NCAM**と**Itgla7 β 1**複合体の発現を認めたことは、一部の**CST**軸索のみが、**GFR α 1**に対する感受性を有する可能性を示唆している。また**CST**軸索で、**NCAM**と**Itgla7 β 1**複合体が部分的である理由が、**CST**軸索の解剖学topographyによるのか、損傷形態によるのか、その他の分子的要因によるのか、解明が望まれる。これまでの検討で、末梢神経や脊髄感覚神経に対する**GFR α 1**の軸索再生効果は、細胞シグナルである**PI3K**の亢進を介していることが、**In vitro**での検討により明らかになっている。今後、**CST**細胞でも同様の細胞内シグナルの亢進を介しているのか、**In vitro**での検討を予定している。

GFR α 1の脊髄損傷後の軸索再生に対する効果が、軸索に対する直接の効果だけではなく、損傷部に遊走するシュワン細胞が**GDNF**を分泌することで、**GFR α 1**が**GDNF**の受容体として機能することで、軸索再生効果を増強する^{8,9)}可能性が考えられる。我々は、過去に、今回の検討と同様の脊髄部分切断損傷モデルにおいて、シュワン細胞のマーカーである、**p0**に対する免疫蛍光染色を行ったが、損傷後4週では、シュワン細胞の浸潤を認めなかった。そこで、今回のモデルでは、シュワン細胞を介した間接的な効果の可能性は低いと考える。また、シュワン細胞の浸潤を認めなかった理由として、今回使用した損傷モデルの幅が、**Dorsal root entry zone**まで及ぶものではないためと考える。

【参考文献】

1. Bradbury EJ, NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord. *Eur J Neurosci.* 1999 Nov;11(11):3873-83.
2. Blesch A, Tuszynski MH. Cellular GDNF delivery promotes growth of motor and dorsal column sensory axons after partial and complete spinal cord transections and induces remyelination. *J Comp Neurol.* 2003 Dec 15;467(3):403-17.
3. Zhou L, Shine HD. Neurotrophic factors expressed in both cortex and spinal cord induce axonal plasticity after spinal cord injury. *J Neurosci Res.* 2003 Oct 15;74(2):221-6.
4. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, et al (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell.* 85(7): 1113-24
5. Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, et al (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature.* 382(6586): 80-3
6. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001;2(3)
7. Muha V, Müller HA. Functions and Mechanisms of Fibroblast Growth Factor (FGF) Signalling in *Drosophila melanogaster*. *Int J Mol Sci.* 2013 Mar 14;14(3):5920-37.
8. Du X, Deng L, et al Regeneration of Propriospinal Axons in Rat Transected Spinal Cord Injury through a Growth-Promoting Pathway Constructed by Schwann Cells Overexpressing GDNF. *Cells.* 2024 Jul 8;13(13):1160.
9. Chen BK, Windebank AJ, et al. GDNF Schwann cells in hydrogel scaffolds promote regional axon regeneration, remyelination and functional improvement after spinal cord transection in rats. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Jan;12(1):e398-e407.