

氏 名（本籍）	みず の ひで のり 水 野 秀 紀
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 2 5 2 3 号
学位授与年月日	平 成 2 0 年 3 月 2 5 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学位論文題目	筋萎縮性側索硬化症ラットモデルにおけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン沈着

（主 査）

論文審査委員	教授 糸 山 泰 人	教授 出 江 紳 一
	教授 笠 井 憲 雪	

論文内容要旨

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, 以下 ALS) は進行性の骨格筋萎縮と筋力低下を主症状とし, 3~5年の経過で呼吸筋麻痺をきたす予後不良な致死性疾患である。系統的運動ニューロン変性はその本態であるが, 病因・病態は未解明で有効な治療法がない。ALS の5~10%をしめる家族性 ALS の約20%において銅/亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (*SOD1*) 遺伝子変異が発見され, 変異 *SOD1* 遺伝子を過剰発現する動物モデルが開発されるや ALS 研究は大いに進展をみせている。最近, 運動ニューロン変性にはグリア細胞 (星状膠細胞や小膠細胞) が大きく関与することが複数報告され, 運動ニューロンをとりまく細胞外微小環境が注目されている。また, 近年までに成体中枢神経系に神経幹/前駆細胞が存在することが明らかとなり, 変性疾患である ALS に対しても細胞補充療法が新たな治療戦略として関心を集めている。

このような中で本研究では, 細胞外基質の主要構成成分として知られるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (以下 CSPG) に注目した。軸索再生阻害活性や細胞遊走阻害活性をもつ CSPG は中枢神経系に広く発現する分子群で, いったん中枢神経が外傷・虚血などの急性損傷に陥ると発現亢進してグリア瘢痕形成に与る。グリア瘢痕形成は病変を最小限にする一方で, 再生に対しては非許容的な環境を形成すると考えられている。本研究では, 独自に開発した ALS モデル・His46 Arg 変異 *SOD1*-Tg ラット脊髄において中枢神経系の主要 CSPG (neurocan, versican, phosphacan) の沈着と病態進行との関連を検討した。

対照 (非 Tg 正常同腹仔ラット) に比し Tg ラットの主病変部位 (前角とその周囲白質) では, いずれの CSPG についても蛍光免疫組織化学で有意な沈着亢進が明らかとなった。なかでも neurocan は有意な運動ニューロン脱落のない発症前から始まる進行性の沈着を示し, 本病態とのより強い関連が示唆された。免疫ブロッティングでは, 発症後期の Tg ラットに沈着する neurocan は成体脊髄では生理的にほとんど検出されない全長型を含んでいることが示された。一方, versican と phosphacan は発症早期までに沈着亢進をみせた後, 発症後期にはその沈着が軽度低下した。免疫ブロッティングでも, Tg ラットにおける蛋白量増加が確認された。さらに, 細胞選択的マーカーとの二重蛍光免疫組織染色により neurocan, phosphacan と反応性星状膠細胞との共局在が Tg ラット脊髄前角で認められ, 同細胞の CSPG 沈着への関与が示唆された。

本研究によって, ALS のような慢性進行性の変性病態における病変部への CSPG 沈着が明らかとなり, ALS 病変では CSPG が反応性星状膠細胞とともに再生に対して非許容的な環境を形

成している可能性が示唆された。細胞補充療法や再生誘導療法を開発する上では、このような細胞外微小環境を再生しやすい場へと変化させる戦略が同時に必要かもしれない。今後、CSPG 沈着亢進機構の解明や CSPG 分解をもたらす介入研究が必要と考えられる。

審査結果の要旨

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, 以下 ALS) は進行性の骨格筋萎縮と筋力低下を主症状とする系統的運動ニューロン変性症であり, 病因・病態は未解明で有効な治療法がない。ALS の 5~10%をしめる家族性 ALS の約 20%において銅/亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (*SOD1*) 遺伝子変異が発見され, 変異 *SOD1* 遺伝子を過剰発現する動物モデルが開発されるや ALS 研究は大いに進展をみせている。最近, 運動ニューロン変性にはグリア細胞 (星状膠細胞や小膠細胞) が大きく関与することが複数報告され, 運動ニューロンをとりまく細胞外微小環境が注目されている。また, 近年までに成体中枢神経系に神経幹/前駆細胞が存在することが明らかとなり, 変性疾患である ALS に対しても細胞補充療法が新たな治療戦略として関心を集めている。

本研究では, 独自に開発した ALS モデル・His46Arg 変異 *SOD1*-Tg ラット脊髄において中枢神経系の再生治療の開発における課題の一つである主要コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の沈着と病態進行との関連を検討した。軸索再生阻害活性や細胞遊走阻害活性をもつ CSPG (neurocan, versican, phosphacan) は中枢神経系に広く発現する分子群で, いったん中枢神経が外傷・虚血などの急性損傷に陥ると発現亢進してグリア瘢痕を形成する。グリア瘢痕形成は病変を最小限にする一方で, 再生に対しては非許容的な環境を形成すると考えられている。

研究結果では, 対照 (非 Tg 正常同腹仔ラット) に比し Tg ラットの主病変部位 (前角とその周囲白質) では, いずれの CSPG についても蛍光免疫組織化学で有意な沈着亢進が明らかとなった。なかでも neurocan は有意な運動ニューロン脱落のない発症前から始まる進行性の沈着を示し, 本病態とのより強い関連が示唆された。免疫プロットティングでは, 発症後期の Tg ラットに沈着する neurocan は成体脊髄では生理的にほとんど検出されない全長型を含んでいることが示された。一方, versican と phosphacan は発症早期までに沈着亢進をみせた後, 発症後期にはその沈着が軽度低下した。さらに, 細胞選択的マーカーとの二重蛍光免疫組織染色により neurocan, phosphacan と反応性星状膠細胞との共局在が Tg ラット脊髄前角で認められ, 同細胞の CSPG 沈着への関与が示唆された。

本研究によって, ALS のような慢性進行性の変性病態における病変部への CSPG 沈着が明らかとなり, ALS 病変では CSPG が反応性星状膠細胞とともに再生に対して非許容的な環境を形成している可能性が示唆された。細胞補充療法や再生誘導療法を開発する上では, このような細胞外微小環境を再生しやすい場へと変化させる戦略の必要性を本研究は示したものである。

よって, 本論文は博士 (医学) の学位論文に値すると考える。