金医大誌(J Kanazawa Med Univ)40：9－16, 2015

ラット脊髄切断モデルにおけるhyaluronidase-4の抑制効果

清　水　義　朗

要　約：(目的) 脊髄損傷では，損傷部にコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPGs) が発現し，軸索再生を阻害する。ラット脊髄切断モデルでは，CSPGsの蓄積が3週でピークに達した後徐々に減少する。CSPGsの内因性消化酵素としてhyaluronidase-4 (Hyal-4) の可能性が示唆されている。本研究では，ラット脊髄切断モデルで抗Hyal-4抗体を中和抗体として使用し，Hyal-4の作用を抑制することで起こる変化について組織学的に検討した。(方法) ラット脊髄切断モデルを作製し，抗Hyal-4抗体，コントロールIgGを脊髄内注射により単回投与，及び浸透圧ポンプを用いて髄腔内投与により持続投与を行った。単回投与では投与後1，4日，1週で，持続投与では投与開始後1，2，3，4週で損傷部脊髄の凍結切片を作製し，蛍光抗体法を用いて，CSPGs，反応性アストロサイトを染色し組織の観察を行った。(結果) 蛍光抗体法において，抗体の単回投与では，両群間に有意な差は認めなかったが，持続投与では，IgG投与群は4週でCSPGsが減少しているのに対し，抗Hyal-4投与群はCSPGsが減少せずに残存していた。(結論) ラット脊髄切断モデルにおいて，持続的にHyal-4を抑制することでCSPGsの自然減少が抑制された。これはHyal-4がCSPGsの内因性消化酵素であることを示唆する。

キーワード：脊髄損傷，コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPGs)，hyaluronidase-4 (Hyal-4)，ラット脊髄切断モデル，Hyal-4の抑制効果

緒　　言

脊髄の損傷後，損傷部周囲に反応性アストロサイトが凝集してコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPGs) を発現し，中心部が空洞化したグリア瘢痕を形成することで軸索再生を阻害する (1, 2)。CSPGsは，動物細胞の細胞表面や，結合組織の細胞外マトリックスに普遍的に存在するが (3)，中枢神経系では発生段階でのみ発現し，軸索の伸張方向を制御する細胞外抑制分子として作用し (4)，正常な成体の脊髄内には認められない。

このCSPGsは*Proteus vulgaris*という細菌から精製されるコンドロイチン硫酸 (CS) を分解する酵素であるChondroitinaseABC (ChABC) による消化が可能であり (5)，ChABCによる脊髄損傷部のCSPGsの消化は軸索の再生と機能的な回復を促進すると報告されている (6)。

Isedaらは，ラット脊髄挫傷モデルにおけるCSPGsの発現は，損傷後約2週でピークとなり以後も残存し軸索の伸張を阻害するが，ラット脊髄切断モデルでは，切断後約3週でピークに達した後に，自然に減少したと報告した (7)。このことから，脊髄内にCSPGsを消化する酵素が存在する可能性が考えられた。しかし，ChABCと同様の作用をもつ内因性の消化酵素の存在は明らかになっていない。2010年にKaneiwaらは，生体内の酵素であるヒトhyaluronidase-4 (Hyal-4) がCSに特異的な加水分解酵素であると報告し (8)，Tachiらは，ラット脊髄切断モデルにおいて，脊髄の損傷部にそのHyal-4の存在を確認し，CSPGsの周囲を取り囲むようにHyal-4が発現していることから，Hyal-4がCSPGsを消化している可能性があると報告した (9)。この現象を確認するために同モデルを使用し，損傷部で発現しているHyal-4に対して抗Hyal-4抗体を中和抗体として使用し，Hyal-4がCSPGsの内因性消化酵素であれば，その作用を抑制することでCSPGsの減少が妨げられると考え，CSPGsの変化について組織学的に検討を行った。

実　験　方　法

ラット脊髄切断モデルにおいて，抗Hyal-4抗体を単回投与，または，持続投与することによるCSPGs，および反応性アストロサイトの経時的な変化について蛍光抗体法にて観察し，画像解析を行った。この研究は金沢医科大学実験指針に基づいて行った。

1．ラット脊髄切断モデルの作製

10週齢雌性Sprague-Dawley (SD) ラット (三協ラボサービス，東京，日本) を42匹使用した。ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル，共立製薬，東京，日本) 45mg/kgを腹腔内

金沢医科大学大学院医学研究科運動機能病態学
石川県河北郡内灘町大学1-1
平成27年1月27日受理

投与し深麻酔をかけ，第9，10胸椎の椎弓を切除し，第11髄節を露出した。同部位の硬膜に切開を加えた後，剃刀の刃を用いて脊髄の右側を半切した。確実に半切を行うため，正中を越えて切断した。

2. 抗Hyal-4抗体

本実験に使用できるHyal-4に対する市販の抗体がなかったため，Invitrogen (カールスバッド，米国) に依頼して新たに抗Hyal-4抗体を作製した。ラットのHyal-4のアミノ酸配列からペプチド合成を行い，ウサギに免疫し血清を得た。得られた血清を，免疫に使用したペプチドを結合させたアフィニティーカラムで精製し，得られた抗体をウサギ抗Hyal-4ポリクローナル抗体として使用した (9)。

3. 単回投与モデルの作製

ラット脊髄切断モデルで切断直後に，切断部中央から近位2 mm，遠位2 mm，切断部左側の脊髄内に33G針のニューロシリンジ (75RN，HAMILTON，リノ，米国) を用いて，1 mg/mLの抗Hyal-4抗体を1 μLずつ1.0-1.2 μL/minの速度で注入した。コントロールとして1 mg/mLのウサギIgG (Sigma-Aldrich，セントルイス，米国) を同様の方法で注入した。

4. 持続投与モデルの作製

容量100 μLの浸透圧ポンプ (0.11 μL/hr/28 days，MODEL1004，ALZET，DURECT，クパチーノ，米国) に，抗Hyal-4抗体，IgGを100 μLずつ充填し，外径0.61 mm/内径0.28 mmのポリエチレンチューブ (PE-10，Intramedic，Clay Adams，パーシッパニー，米国) を接続して，0.9%生理食塩水に沈め37℃で48時間ローディングした。ラット脊髄を切断後に，第12，13胸椎間を開窓し，硬膜を露出させ，マイクロ鑷子および尖刃刀で硬膜を切開し，損傷部を越えるように硬膜下にチューブを挿入した。挿入椎間の遠位側でチューブ皮下に留置し，浸透圧ポンプを皮下に留置した。

5. 蛍光抗体法

切断の施行後，単回投与モデルでは1，4日，1週で，持続投与モデルでは1，2，3，4週でそれぞれ3匹ずつ，深麻酔下にて，phosphate buffered saline (PBS) 溶液で脱血した後に，4%パラホルムアルデヒド添加PBS溶液で還流固定を行った。損傷部を中心に頭尾側方向で20 mmの長さの脊髄を摘出し，25%ショ糖含有PBS溶液にて一晩，凍結保護し，OCTコンパウンド (サクラファインテックジャパン，東京，日本) で組織を包埋し，凍結切片を作製した。切片は冠状面で20 μmにスライスし，スライドガラスに並べた。PBS溶液でコンパウンドを洗浄してから，室温で2時間，10%正常ヤギ血清 (NGS)，および0.3% Triton X-100を含むPBS溶液でブロッキングの後，一次抗体を4℃で一晩反応させた。一次抗体は，CSPGsに対してMouse monoclonal antibody CS56 (Sigma-Aldrich) を1:200で使用し，反応性アストロサイトに対してGlial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (D1F4Q) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology，ビバリー，米国) を1:200で3% NGS，および0.3% Triton X-100を含むPBS溶液に希釈して使用した。PBS溶液で切片を洗浄した後，室温で1時間，二次抗体と反応させた。二次抗体は，Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Life technologies，ロックビル，米国)，Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Life technologies) をそれぞれ1:200で，3% NGS，および0.3% Triton X-100を含むPBS溶液に希釈して使用した。切片をPBS溶液で洗浄後，ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Life technologies) でカバーガラスをマウントし，BZ-9000 (KEYENCE，大阪，日本) で観察し画像を取得した。

6. 蛍光抗体法の定量化

各モデル，各時点において3匹ずつで得られた画像から1匹につき中央付近の3スライスを選択し，BZ-9000専用の解析アプリケーションであるBZ-Ⅱ Analyzer (KEYENCE) を使用して，それぞれ損傷部を中心に4000 μm×4000 μmの範囲内でCS56，GFAPの免疫染色性を示した領域の面積を計測した。輝度の域値は10 (0-255) で設定して計測し，その際，髄膜や神経根組織など非特異的領域を除外した。

7. 統計検定

記述統計は平均±標準偏差で示した。定量化により得られた各抗体の免疫染色性の各時点のデータ (各群で$n = 9$) から，同モデルの各時点群間でBonferroni Dunn's検定を用いて分散分析 (ANOVA) を行った。また，各モデルの同時点での2群間の比較にはMann-Whitney U検定を行った。$P < 0.05$をもって有意差と判定した。すべての統計検定にはStatView 5.0 (SAS Institute，ケーリー，米国) を用いた。

8. 陰性コントロールの作製

陰性コントロールとして，10週齢雌性SDラット2匹の正常脊髄に対して，前述と同様の方法でCS56，GFAP抗体を用いて蛍光抗体法を行った。

結　　果

1) 単回投与

注入後1日目から両群共に，損傷部にGFAP，CSPGsの淡い染色性が認められた (図1. A，D，J，M)。4日目でCSPGsのみで染色される瘢痕部分とその周囲において，GFAPの染色を認めるようになった (図1. B, E, K, N)。1週間経過すると，切断面内部はCSPGsで染色される瘢痕組織が増加し，辺縁ではGFAPの染色性が強くなった (図1. C, F, L, O)。

CS56の免疫染色性を示した領域の面積を計測したところ，抗Hyal-4抗体注入後1日では$19.5 \pm 4.2 \times 10^3 \mu m^2$，4日では$48.6 \pm 7.8 \times 10^3 \mu m^2$，1週では$126.0 \pm 20.3 \times 10^3 \mu m^2$であり，IgG注入後1日では$17.8 \pm 3.5 \times 10^3 \mu m^2$，4日では$55.1 \pm 7.9 \times 10^3 \mu m^2$，1週では$112.0 \pm 19.7 \times 10^3 \mu m^2$であった (図2. A)。GFAPの免疫染色性を示した領域の面積を計測したところ，抗Hyal-4抗体注入後1日では$29.1 \pm 7.1 \times 10^3 \mu m^2$，4日では$39.0 \pm 7.8 \times 10^3 \mu m^2$，1週では$95.0 \pm 14.3 \times 10^3 \mu m^2$であり，注入後1日から漸増していた (図2. B)。また，統計検定では，注入後1日から1週まで

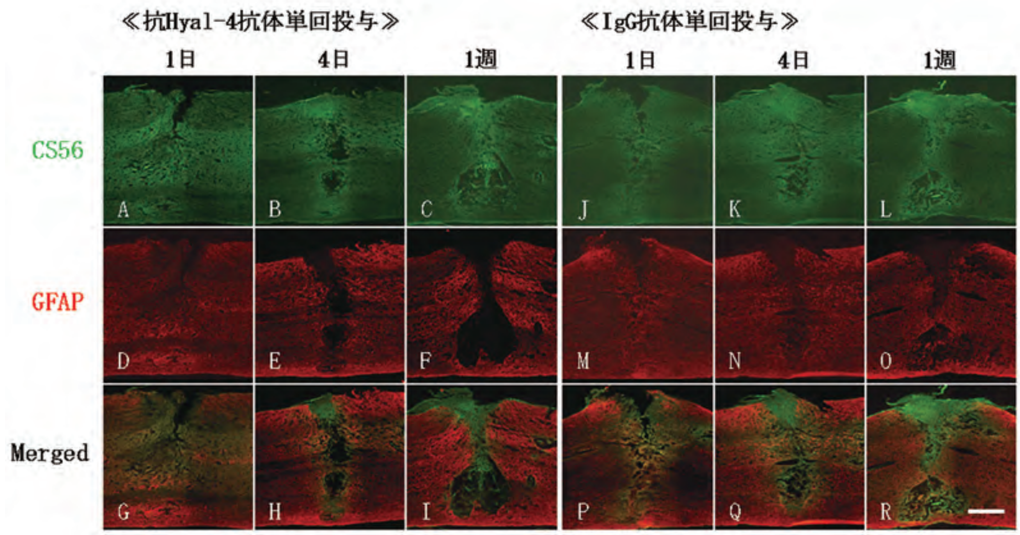

図1．抗Hyal-4抗体，コントロールIgG単回投与におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPGs) および反応性アストロサイトの蛍光染色像
投与後1日 (A, D, G, J, M, P)，4日 (B, E, H, K, N, Q)，1週 (C, F, I, L, O, R) におけるCS56の免疫染色性 (CSPGs) (緑) およびGFAPの免疫染色性 (反応性アストロサイト) (赤) の変化を示す。CS56の免疫染色性は両群とも投与後1日から認め (A, J)，1週まで損傷部を中心に漸増した (A-C, J-L)。GFAPの免疫染色性は両群とも投与後1日から認め (D, M)，1週まで損傷部周囲に漸増した (D-F, M-O)。2重染色像ではいずれの時点においても損傷部におけるCS56の免疫染色性を示す領域の周囲にGFAPの免疫染色性を示す領域を認めた (G-I, P-R)。全ての画像において頭側は左であり，スケールバーは500 μm。

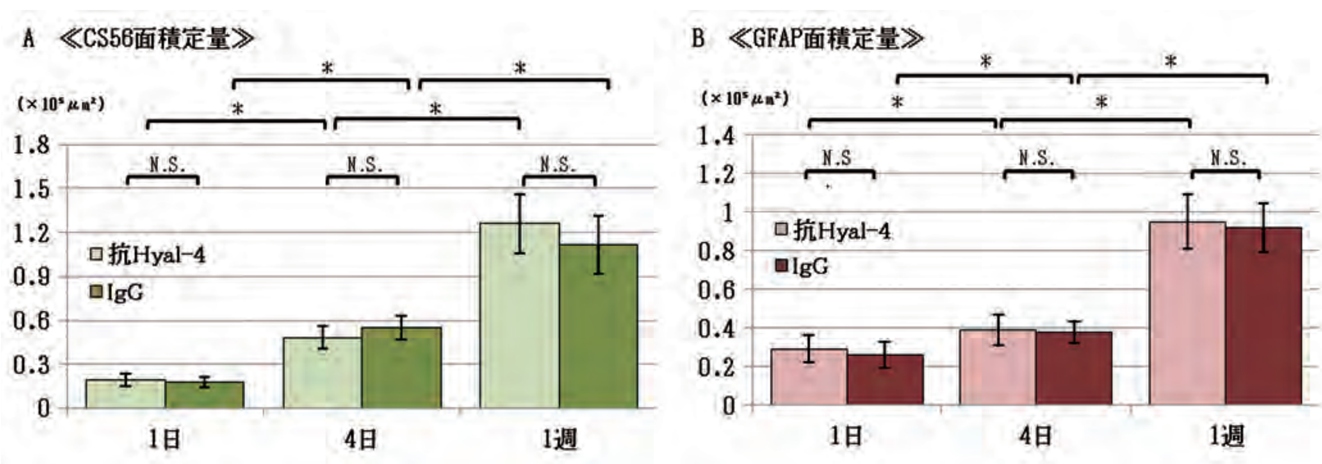

図2，抗Hyal-4抗体，コントロールIgG単回投与後の損傷部のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPGs) (A) および損傷部周囲の反応性アストロサイト (B) 分布面積の時間推移
示したグラフのデータは各時点で3匹ずつ，1匹につき3スライス (計9スライス) のデータの平均値であり，エラーバーで標準偏差を示す。各時点のデータから分散分析 (ANOVA) を行い，CS56，GFAPの免疫染色性は，両群とも1日から1週まで各時点間に有意差を認めた。同時点における両群間での比較はCS56，GFAPともに有意差を認めなかった。(＊ = $p < 0.05$，N.S. = not significant)。

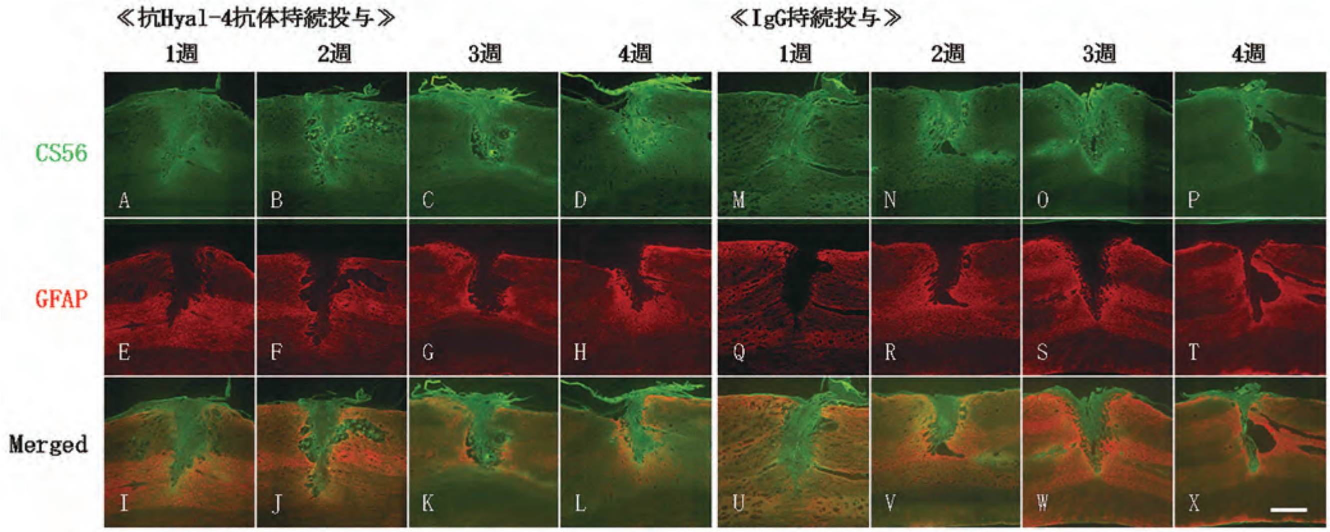

図3. 抗Hyal-4抗体，コントロールIgG持続投与におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPGs) および反応性アストロサイトの蛍光染色像

投与後1週 (A, E, I, M, Q, U)，2週 (B, F, J, N, R, V)，3週 (C, G, K, O, S, W)，4週 (D, H, L, P, T, X) におけるCS56の免疫染色性 (緑) およびGFAPの免疫染色性 (赤) の変化を示す。CS56の免疫染色性は両群とも投与後1週から3週まで損傷部を中心に増加するが (A-C, M-O)，4週では抗Hyal-4抗体投与群は増加していたが (D)，IgG投与群では減少していた (P)。GFAPの免疫染色性は1週から4週まで漸増していた (E-H, Q-T)。2重染色像ではいずれの時点においても損傷部におけるCS56の免疫染色性を示す領域の周囲にGFAPの免疫染色性を示す領域を認めた (I-L, U-X)。全ての画像において頭側は左であり，スケールバーは500 μm。

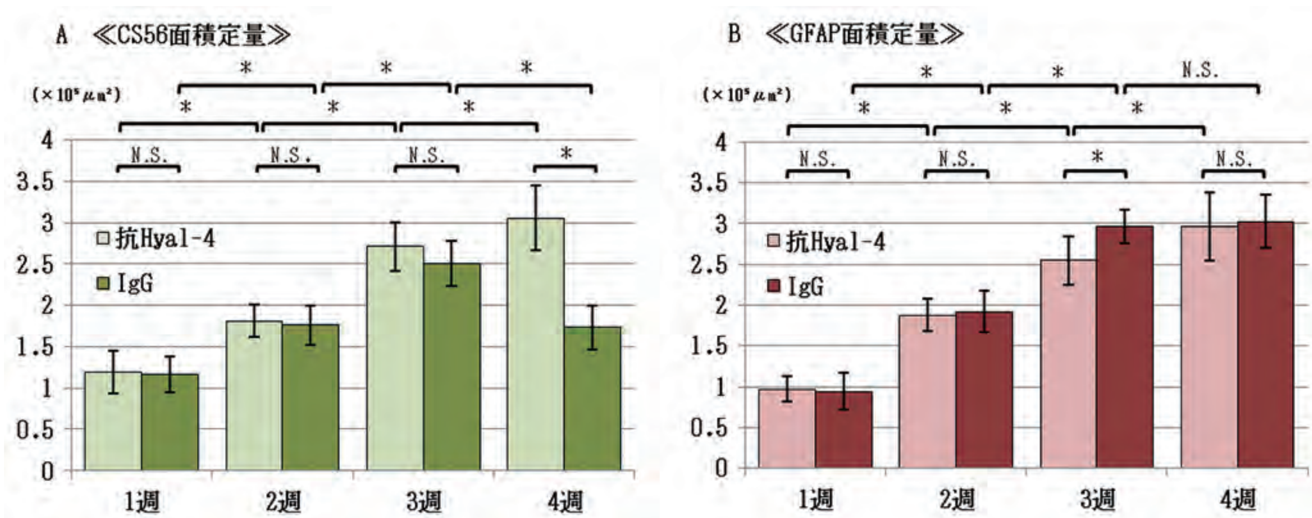

図4. 抗Hyal-4抗体，コントロールIgG持続投与後の損傷部のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPGs) (A) および損傷部周囲の反応性アストロサイト (B) 分布面積の時間推移

示したグラフのデータは各時点で3匹ずつ，1匹につき3スライス (計9スライス) のデータの平均値であり，エラーバーで標準偏差を示す。各時点のデータから分散分析 (ANOVA) を行い，CS56の免疫染色性は，両群とも4週まで各時点間で有意差を認め，GFAPの免疫染色性は，両群とも3週までは有意差を認めたが4週で抗Hyal-4投与群は有意差を認めなかった (B)。CS56の同時点における両群間での比較では，4週でIgG投与群は有意に減少していた (A)。GFAPの同時点における両群間での比較では，3週で有意差を認めたが，他の時点では有意差を認めなかった (B)。(∗ = $p < 0.05$，N.S. = not significant)。

は両群ともCS56，GFAPは有意に増加し，両群の各時点でのCS56，GFAPの比較では，有意差は認めなかった (図2. A, B)。

2) 持続投与

持続注入1週から両群とも損傷部を埋めるようにCS56の染色性を認め，切断面周囲にGFAPの染色を認めた (図3. A, E, M, Q)。以後，両群ともCS56，GFAPの染色性は強くなり，IgG投与群において4週でCS56の染色性は減弱したが，抗Hyal-4投与群では4週間経過後でも強く染色された (図3. B-D, F-H, N-P, R-T)。

CS56の免疫染色性を示した領域を計測したところ，抗Hyal-4抗体投与1週では$119.0 \pm 25.6 \times 10^3 \mu m^2$，2週では$181.2 \pm 19.8 \times 10^3 \mu m^2$，3週では$270.9 \pm 29.2 \times 10^3 \mu m^2$，4週では$305.6 \pm 39.0 \times 10^3 \mu m^2$であり，IgG投与1週では$115.8 \pm 21.6 \times 10^3 \mu m^2$，2週では$176.1 \pm 23.8 \times 10^3 \mu m^2$，3週では$250.3 \pm 27.1 \times 10^3 \mu m^2$，4週では$173.2 \pm 26.2 \times 10^3 \mu m^2$であり，IgG投与群では4週でCS56は減少したのに対して，抗Hyal-4抗体投与群では減少がみられなかった (図4. A)。GFAPの免疫染色性を示した領域の面積を計測したところ，抗Hyal-4抗体投与の1週では$97.2 \pm 15.0 \times 10^3 \mu m^2$，2週では$187.7 \pm 19.6 \times 10^3 \mu m^2$，3週では$254.6 \pm 29.3 \times 10^3 \mu m^2$，4週では$295.8 \pm 41.5 \times 10^3 \mu m^2$であり，IgG投与1週では$94.2 \pm 22.6 \times 10^3 \mu m^2$，2週では$191.9 \pm 25.7 \times 10^3 \mu m^2$，3週では$295.6 \pm 20.5 \times 10^3 \mu m^2$，4週では$302.3 \pm 32.7 \times 10^3 \mu m^2$であり，GFAPはいずれの群でも3-4週でピークを認めた (図4. B)。統計検定では，CS56は抗Hyal-4抗体投与において4週まで有意に増加し，IgG投与では3週までは有意に増加したが，4週で有意に減少した (図4. A)。

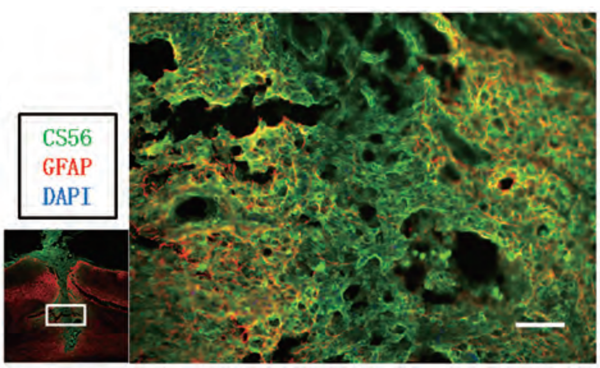

図5. CS56とGFAPの2重染色強拡大像
損傷部辺縁に存在するGFAP領域と一部オーバーラップする形で損傷部に向けてCS56領域が存在していた。頭側は左であり，スケールバーは50 μm。

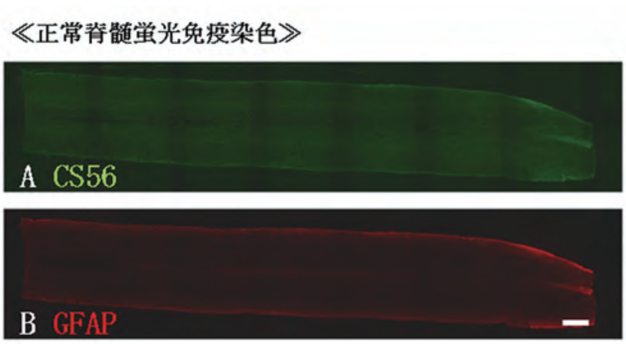

図6. 正常脊髄におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPGs) および反応性アストロサイトの蛍光染色像
正常脊髄組織においてCS56の免疫染色性 (CSPGs) (A, 緑) およびGFAPの免疫染色性 (反応性アストロサイト) (B, 赤) はいずれもほとんど認めなかった。スケールバーは1000 μm。

3) CSPGsと反応性アストロサイト，Hyal-4の関係性

2重染色像にてCSPGsと反応性アストロサイトの分布について関係性を観察した。

単回投与では，4日目から1週までは両群とも損傷部を中心にCS56領域を取り囲むようにGFAPの染色性を認め，その染色性は漸増した (図1. G-I, P-R)。

持続投与では，抗Hyal-4抗体，IgG投与両群とも投与後1週から損傷部を中心にCS56の染色性を，CS56領域を取り囲むようにGFAPの染色性を認めた (図3. I, U)。抗Hyal-4抗体投与群では，2-4週でCS56，GFAP領域の染色性は漸増した (図3. J-L)。IgG投与群では，GFAP領域の染色性は2-4週で漸増し，CS56領域の染色性は2-3週で漸増したが，4週でCS56の染色性は低下した (図3. V-X)。GFAP領域は損傷部中心に入り込むことはなく，CS56は時間経過とともに損傷部を埋め尽くすように染色性を認めた (図3. I-L, U-X)。強拡大では，損傷部辺縁のGFAP領域から一部オーバーラップする形で損傷部にむけてCS56領域を認めた (図5)。

Tachiらの報告したHyal-4領域 (9) は，損傷部辺縁に存在しており，本実験で示しているGFAP領域と類似しており，Hyal-4，反応性アストロサイトはどちらもCSPGsを取り囲むように存在していることが示された。

4) 正常脊髄の染色

CS56，GFAPの陰性コントロールとして，非損傷の正常脊髄を用いた。正常脊髄内においてはCS56およびGFAPの強い染色性は認められなかった (図6)。

考　　察

脊髄損傷の際に反応性アストロサイトからグリア瘢痕が形成されるが (1, 2)，Okadaらは，反応性アストロサイトを遊走させるシグナルであるStat3 (signal transducer and activator of transcription 3) をノックアウトした脊髄挫傷マウスでは，グリア瘢痕が形成されず損傷範囲が拡大したことから，グリア瘢痕の役割は脊髄損傷を最小限にすることであると結論している (10)。一方で，グリア瘢痕周囲のオリゴデンドロサイトに由来するミエリン関連蛋白質であるNogo-A (11)，MAG (Myelin-associated glycoprotein) (12)，OMgp (Oligodendrocyte-myelin glycoprotein) (13)，Rhoキナーゼ (14) や，グリア瘢痕組織内のCSPGs (15-17)，線維芽細胞から発現されるSemaphorin3A (18, 19) などは，損傷部に広く分布し軸索再生を強力に阻害する軸索再生阻害物質であることが知られている。グリア瘢痕は，脊髄損傷の範囲を最小限に抑えると同時に，脊髄再生を阻害する二面性を持つと考えられ，グリア瘢痕が損傷を最小限に抑えた後に，グリア瘢痕を除去することで脊髄再生が促されると考えられる。

損傷部にCSPGsの濃度勾配ができることで損傷軸索の断端にdystrophic endballと呼ばれる丸い構造が作られ軸索伸長を抑制することが知られている (20)。これに対し，ChABCを損傷部に投与してグリア瘢痕内のCSPGsを消化することにより，軸索の再生が促進されて機能的な回復が起こると多数報告されてきた (6, 7, 20, 21)。ミエリン関連蛋白質であるNogo-A, MAG, OMgpは，共通のレセプターであるNogo受容体にリガンドとして結合し (12, 13, 22)，Nogo受容体と結合し受容体複合体となっている神経栄養因子の低親和性受容体 (P75NTR) を介して，細胞内にシグナルを伝達することでRhoキナーゼを活性化し軸索伸展阻害を行う (14, 23) が，脊髄損傷後にRhoキナーゼ阻害剤を投与すると機能回復がもたらされ，軸索再生を認める (24)。Semaphorin3Aは，微小管およびアクチン骨格に作用し成長円錐を破壊するが，阻害剤を投与することで，脊髄損傷後の損傷部の軸索再生の促進，血管の再生，アポトーシスの抑制などの効果があり，さらに運動機能も有意に回復することが報告されている (19)。これら阻害因子の各々の作用を排除することで軸索伸長を認めていることから，これらはそれぞれに独立して軸索伸長阻害作用を有していると考えられる。

ChABCは，CSPGsのGAG鎖であるCSを分解する酵素であるが，Kaneiwaらによって示されたHyal-4は，生体内に存在するCSに特異的なエンド型加水分解酵素であり (8)，このHyal-4がCSPGsを消化できると考えられた。しかし，Hyal-4の発現部位は，ヒトの場合，胎盤，骨格筋，精巣に限局しており，マウスでは，精巣と胎生17日目の胚でしか発現しておらず，特定の臓器である限られた機能しか持たない酵素である可能性が高いと報告されている (25)。Tachiらは，ラット脊髄切断モデルでのHyal-4の発現を脊髄損傷部で示しており (9)，同モデルで抗Hyal-4抗体を投与することで損傷部に作用するHyal-4が抑制され，CSPGsが増加することが確認できれば，Hyal-4はCSPGsの内因性の消化酵素であると考えられ本実験にて検討した。

本実験において，抗Hyal-4抗体と，コントロールとしてIgGを切断後に単回投与したモデルでは，投与後1週間で変化が見られなかったことから，抗Hyal-4抗体の生体内での半減期は1週以内であると考えた。Tachiらの示すHyal-4のピークである3週 (9) まで抗Hyal-4抗体の効果が持続せず，Hyal-4の作用を抑制するためには抗体の追加投与が必要となる。そのため，抗体の再投与による損傷部の変化を避けるため，浸透圧ポンプを用いた持続投与を行った。IgG持続投与群では，CSPGsは3週でピークに達した後4週で減少したが，抗Hyal-4抗体持続投与群では，4週でもCSPGsはさらに漸増していた。内因性のHyal-4の中和抗体として使用した抗Hyal-4抗体の持続投与で，CSPGsの発現量が3週までIgG投与群と同程度であり，内因性のHyal-4の効果は3週前後で現れると考えられ，IgG投与群では内因性にCSPGsが消化されているが，抗Hyal-4抗体投与群ではCSPGsは消化されずに残存していることになる。このことから，脊髄切断モデルの損傷部では，内因性のHyal-4が発現しCSPGsを消化していることが示された。また，GFAPの染色性を示している損傷部辺縁から損傷部を埋めるようにCSPGsの発現を認め，一部がオーバーラップして存在しており，GFAPの染色性が強くなるにつれてCSPGsの発現量も増加しているが，Hyal-4の作用を抑制することによるGFAPの発現量に対する影響はなかった。

Tachiらは，Hyal-4は反応性アストロサイトから発現している可能性を報告しているが (9)，このHyal-4の発現部位は，本実験におけるGFAPの発現部位と類似していた。アストロサイトは，軸索再生促進，軸索再生抑制の機能を有し (26)，幼若ラットの脊髄完全切断モデルでは，損傷部に幼若アストロサイトが動員され損傷部を越えて軸索が再生したと報告された (27)。このように，アストロサイトの性質には2面性があることから，切断モデルにおいては，CSPGsを発現する反応性アストロサイトが損傷で発生する何らからの因子の影響を受けてHyal-4を発現することでCSPGsの合成，消化を調整している可能性が示唆される。

本実験で使用しているラット脊髄切断モデルでは，CSPGsは自然に減少しているが，臨床像に近い脊髄圧挫モデルではCSPGsが減少しない (7)。脊髄損傷時に発現するサイトカインの中でもIL-6は，神経幹細胞を強力にアストロサイトへの分化誘導をすると報告された (28)。また，成体の中枢神経系には神経幹細胞が存在し，損傷の際にはその内在性の神経幹細胞が増殖するが，ほとんどはアストロサイトに分化しグリア瘢痕を形成すると報告された (29)。脊髄圧挫モデルのように損傷が強いと，アストロサイトが増加し，損傷を抑えるためにCSPGsの発現量が増加することで，Hyal-4が発現していても，消化を上回る量のCSPGsが発現することでCSPGsの量が維持されているのかもしれない。

脊髄損傷で傷害された脊髄は回復しないと信じられていたが，近年では基礎研究が目覚ましく様々な治療方法が研究され臨床研究へ移行している。細胞移植では，瘢痕切除と自己嗅粘膜被覆グリア細胞局所移植で対象の半数が麻痺の改善を認め (30)，腰椎穿刺による自己培養骨髄間質細胞のくも膜下腔投与では数例が改善を認めている (31)。移植以外では，二次損傷予防の神経保護目的に，NメチルDアスパラギン酸 (NMDA) 型グルタミン酸受容体阻害剤であるRiluzoleの投与や (32)，軸索進展を目的とした，軸索伸展阻害因子であるRho阻害薬Cethlinの投与による臨床試験が行われ (33)，一部の患者で運動機能の改善を認めた。顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF) の神経保護効果が脊髄損傷に有効とされ，臨床試

験で良好な結果を得ている (34)。肝細胞増殖因子の投与も基礎研究では有効性が示されており (35)，今後，ステロイド大量療法の代わりになることが期待される。その中でも，CSPGsを消化することは軸索再生に有効であるというエビデンスが多数あり，近年では，神経幹細胞移植とChABC投与の併用 (19)，抗Nogo-A抗体とChABCの併用 (36)，リハビリとChABCの併用 (37) など様々な方法が研究され良好な結果を得ている。

ChABCは細菌由来の酵素 (5) であるため，脊髄内注射 (7) や髄腔内注射 (6, 38) でしか投与できない。Hyal-4は生体内の酵素であるため，アストロサイト内での分泌，産生機序はまだまだ不明な点が多いが，今後の検討でその機序が解明されると，生体内での増幅が可能となり，内服薬や注射薬など低侵襲な方法で，損傷部でのHyal-4の発現量を増幅させ，内因性にCSPGsを消化できる可能性があると考えられる。

本研究では，Hyal-4の中和抗体を脊髄損傷部に投与することでCSPGsの発現量に差を認めたが，今後の研究課題として，脊髄切断モデルにおけるHyal-4の増減による軸索の再生や機能的な回復と，脊髄圧挫モデルについて検討する必要がある。

利益相反の開示

開示すべき利益相反はない。

本稿を終えるにあたり，御懇篤なる御指導と御高閲を賜りました整形外科学教室　松本忠美教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行に際し，終始にわたり直接の御指導，御教示，御高閲を賜りました整形外科学教室　奥田鉄人非常勤講師に深謝いたします。併せて本研究を遂行するにあたり，機器の使用ならびに実験に御協力いただきました生理学Ⅰ教室　加藤伸郎教授，総合医学研究所　石垣靖人教授，生理学Ⅰ教室各位，総合医学研究所各位，ならびに終始にわたり御助言，御協力を賜りました整形外科学教室　川原範夫教授，整形外科学教室各位に心より深謝いたします。なお本論文の要旨の一部は，第49回日本脊髄障害医学会 (2014年9月，旭川)，第29回日本整形外科学会基礎学術集会 (2014年10月，鹿児島) において発表した。

文　献

1. Fitch MT, Doller C, Combs CK et al: Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. J Neurosci 1999; **19:** 8182-98.
2. Fawcett JW, Asher RA: The glial scar and central nervous system repair. Brain Res Bull 1999; **49:** 377-91.
3. Iozzo RV: Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. Annu Rev Biochem 1998; **67:** 609-52.
4. Brittis PA, Canning DR, Silver J: Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. Science 1992; **255:** 733-6.
5. Yamagata T, Saito H, Habuchi O et al: Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. J Biol Chem 1968; **243:** 1523-35.
6. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ et al: Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. Nature 2002; **416:** 636-40.
7. Iseda T, Okuda T, Kane-Goldsmith N et al: Single, high-dose intraspinal injection of chondroitinase reduces glycosaminoglycans in injured spinal cord and promotes corticospinal axonal regrowth after hemisection but not contusion. J Neurotrauma 2008; **25:** 334-49.
8. Kaneiwa T, Mizumoto S, Sugahara K et al: Identification of human hyaluronidase-4 as a novel chondroitin sulfate hydrolase that preferentially cleaves the galactosaminidic linkage in the trisulfated tetrasaccharide sequence. Glycobiology 2010; **20:** 300-9.
9. Tachi Y, Okuda T, Kawahara N et al: Expression of hyaluronidase-4 in a rat spinal cord hemisection model. Asian Spine J 2015; **9:** 7-13.
10. Okada S, Nakamura M, Katoh H et al: Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. Nat Med 2006; **12:** 829-34.
11. Chen MS, Huber AB, van der Haar ME et al: Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. Nature 2000; **403:** 434-9.
12. Domeniconi M, Cao Z, Spencer T et al: Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. Neuron 2002; **35:** 283-90.
13. Wang KC, Koprivica V, Kim JA et al: Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. Nature 2002; **417:** 941-4.
14. Yamashita T, Tohyama M: The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. Nat Neurosci 2003; **6:** 461-7.
15. Silver J, Miller JH: Regeneration beyond the glial scar. Nat Rev Neurosci 2004; **5:** 146-56.
16. Jones LL, Sajed D, Tuszynski MH: Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. J Neurosci 2003; **23:** 9276-88.
17. Galtrey CM, Fawcett JW: The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. Brain Res Rev 2007; **54:** 1-18.
18. Pasterkamp RJ, Anderson PN, Verhaagen J: Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. Eur J Neurosci 2001; **13:** 457-71.
19. Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M et al: A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. Nat Med 2006; **12:** 1380-9.
20. Yick LW, Cheung PT, So KF et al: Axonal regeneration of Clarke's neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC. Exp Neurol 2003; **182:** 160-8.
21. Barritt AW, Davies M, Marchand F et al: Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. J Neurosci 2006; **26:** 10856-67.
22. Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM: Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. Nature 2001; **409:** 341-6.
23. Yamashita T, Higuchi H, Tohyama M: The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. J Cell Biol 2002; **157:** 565-70.
24. Dergham P, Ellezam B, Essagian C et al: Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. J Neurosci 2002; **22:** 6570-7.
25. Kaneiwa T, Miyazaki A, Kogawa R et al: Identification of amino acid residues required for the substrate specificity of human and mouse chondroitin sulfate hydrolase (conventional hyaluronidase-4). J Biol Chem 2012; **287:** 42119-28.
26. Meiners S, Powell EM, Geller HM: A distinct subset of tenascin/CS-6-PG-rich astrocytes restricts neuronal growth in vitro. J Neurosci 1995; **15:** 8096-108.
27. Iseda T, Nishio T, Kawaguchi S et al: Spontaneous regeneration of the corticospinal tract after transection in young rats: a key role of reactive astrocytes in making favorable and unfavorable conditions for regeneration. Neuroscience 2004; **126:** 365-74.
28. Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M et al: Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. Science 1997; **278:** 477-83.
29. Johansson CB, Momma S, Clarke DL et al: Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 1999; **96:** 25-34.
30. Lima C, Escada P, Pratas-Vital J et al: Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury. Neurorehabil Neural Repair 2010; **24:** 10-22.

31. Saito F, Nakatani T, Iwase M et al: Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. Restor Neurol Neurosci 2012; **30:** 127-36.
32. Grossman RG, Fehlings MG, Frankowski RF et al: A prospective, multicenter, phase I matched-comparison group trial of safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury. J Neurotrauma 2014; **31:** 239-55.
33. Fehlings MG, Theodore N, Harrop J et al: A phase I/IIa clinical trial of a recombinant Rho protein antagonist in acute spinal cord injury. J Neurotrauma 2011; **28:** 787-96.
34. Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A et al: Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: a phase I/IIa clinical trial. Eur Spine J 2012; **21:** 2580-7.
35. Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M et al: Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury. J Neurosci Res 2007; **85:** 2332-42.
36. Zhao RR, Andrews MR, Wang D et al: Combination treatment with anti-Nogo-A and chondroitinase ABC is more effective than single treatments at enhancing functional recovery after spinal cord injury. Eur J Neurosci 2013; **38:** 2946-61.
37. Zhao RR, Fawcett JW: Combination treatment with chondroitinase ABC in spinal cord injury–breaking the barrier. Neurosci Bull 2013; **29:** 477-83.
38. Ikegami T, Nakamura M, Yamane J et al: Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances graft cell migration and outgrowth of growth-associated protein-43-positive fibers after rat spinal cord injury. Eur J Neurosci 2005; **22:** 3036-46.

Inhibitory Effect of Hyaluronidase-4 in a Rat Spinal Cord Hemisection Model

Yoshiaki Shimizu

Department of Orthopaedic Surgery, Kanazawa Medical University Graduate School of Medical Science, Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan

Objective. In spinal cord injury, chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) are expressed in the injured part and inhibit axonal regeneration. Treatment with chondroitinase ABC (ChABC) of bacterial origin digests CSPGs and promotes axonal outgrowth. Further, the accumulation of CSPGs in a rat spinal cord hemisection model reached a maximum at 3 weeks and then naturally decreased; the presence of hyaluronidase-4 (Hyal-4) has been suggested as an endogenous digestive enzyme. In this study, the effects of anti-Hyal-4 antibody on the histological changes in the rat spinal cord hemisection model were examined.

Methods. After creating a rat spinal cord hemisection model, experiments were conducted by administering anti-Hyal-4 antibody or control IgG by intraspinal injection as a single dose. For intrathecal administration, osmotic pumps were used. Frozen sections of the injured spinal cord were made after a single-dose administration on days 1, 4, or at 1 week, or at 1, 2, 3, and 4 weeks after the start of pump-aided injection. Immunofluorescence studies were then conducted using CS56 for CSPGs and anti-GFAP antibody for reactive astrocytes.

Results. No difference was observed between the test and control groups in the single-dose administration of the antibody. In pump-aided administration, CSPGs in the control group decreased in 4 weeks but those in the anti-Hyal-4 antibody administered group did not.

Conclusion. Persistent suppression of Hyal-4 allowed CSPGs to remain in the rat spinal cord hemisection model. It has been shown that Hyal-4 is an endogenous digestive enzyme of CSPGs that existed without a natural decrease.

Key Words: Spinal cord injury, chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs), hyaluronidase-4 (Hyal-4), rat spinal cord hemisection model, inhibitory effect of Hyal-4