氏　　名	清水義朗（しみずよしあき）
学位論文題目	ラット脊髄切断モデルにおけるhyaluronidase-4の抑制効果

学位論文内容の要旨

研究目的

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（以下 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ことが報告されている。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，中枢神経系では発生の段階でのみ発現し，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，正常な成体の脊髄内には認められない。CSPGs は細菌由来の酵素である ChondroitinaseABC（ChABC）による消化が可能であり，ChABC による脊髄損傷部の CSPGs の消化は軸索の再生と機能回復を促進するとの報告がある。また，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，自然に減少したとの報告がある。CSPGs が自然に減少する過程において，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が，生体内の酵素であるヒト hyaluronidase-4（Hyal-4）がコンドロイチン硫酸（CS）に特異的な加水分解酵素であるとの報告があり，さらに，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 の存在が確認され，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申請者らの研究グループから報告されている。申請者は，この現象を検討するために，ラット脊髄切断モデルを使用し，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，その作用を抑制することで CSPGs の消化が妨げられるとの仮説に基づき，抗 Hyal-4 抗体の局所投与後の CSPGs の変化について組織学的に検討を行った。

実験方法

10 週齢の雌性 Sprague-Dawley（SD）ラットに対して，ペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し深麻酔とし，第 9・10 胸椎の椎弓を切除して脊髄を露出し，かみそりの刃を用いて，同レベルの脊髄の右側を，正中を越えて切断した。切断後，抗 Hyal-4 抗体，コントロールとして IgG を，切断部から近位 2 mm，遠位 2 mm，切断部左側の計 3 ヶ所にニューロシリンジを用いて 1 μL ずつ注入し単回投与を行った。注入後 1，4 日，1 週で，再びペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し深麻酔とし，4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った。次に，抗 Hyal-4 抗体，IgG を，浸透圧ポンプを用いて，第 12，13 胸椎間から硬膜下にチューブ先端が切断部を越えるように挿入し持続投与を行った。留置後 1，2，3，4 週で還流固定を行った。固定後，損傷部脊髄を摘出し，凍結切片を作製した。作製した凍結切片に対して 1 次抗体に CS56，抗 GFAP 抗体を用い，2 次抗体に

Alexa488，594 を用いて蛍光免疫染色を行い，BZ-9000（KEYENCE）にて観察し画像を撮影した。

実験成績

単回投与では，抗 Hyal-4 抗体，IgG 投与群ともに，投与後 1 日目から CSPGs，GFAP の淡い染色性を認め，1 週までその染色性は漸増したが，染色性を示した面積の定量では，どの時点においても有意差は認めなかった。一方、持続投与では，抗 Hyal-4 抗体投与群では 1 週から 4 週まで CSPGs の染色性は漸増したが，IgG 投与群では 3 週までは漸増し，4 週で染色性は低下した。CSPGs の染色性を示した面積を計測したところ，4 週で有意差を認めた。

総括および結論

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 CSPGs が軸索再生を阻害しているが，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。Hyal-4 は，CSPGs の CS に特異的な内因性の消化酵素であり，ラット脊髄切断モデルの損傷部では，Hyal-4 が発現し CSPGs を消化しているならば，その作用を抑制することで CSPGs は消化されずに残存すると考えられる。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 はさらに増加していた。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と考えられる。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強く示唆された。近年では，脊髄損傷に対する様々な治療方法が研究され，臨床研究へ移行しており，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る。ChABC は細菌由来の酵素であるため，脊髄内注射や髄腔内注射でしか投与できないが，Hyal-4 は生体内の酵素であり，その分泌・産生は反応性アストロサイトの可能性も示唆されている。Hyal-4 の分泌・産生機序は未だ不明な点が多いが，今後その機序が解明されれば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。