

## 論文審査の結果の要旨

氏名：関口 尚希

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：犬の脊髄損傷に対する嗅神経鞘細胞移植療法のための基盤研究

審査委員：(主査)	教授	北川 勝人
(副査)	教授	中山 智宏
	教授	枝村 一弥
	教授	伊藤 大介

脊髄損傷（SCI）は、主に交通事故や脊椎脊髄疾患により脊髄が重度の物理的損傷を受けることで、感覚機能や運動機能が半永久的に障害を受ける病態を示す。胸腰部脊髄においてこの機能不全は、脊髄白質における軸索の断裂や脱髄による神経回路の破綻に起因する。近年、この不可逆的な病態は、損傷部のアストロサイトがコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）などの軸索伸展阻害分子を発現してグリア瘢痕を形成し、軸索再生を阻害することが原因であると明らかになった。

SCIに対する細胞移植療法において、嗅球や嗅粘膜に存在する嗅神経鞘細胞（OECs）が注目されている。哺乳類の嗅神経は成熟後も再生を繰り返しており、嗅神経を取り巻く OECs は新たな嗅神経軸索の伸展の誘導と支持する役割を担っている。胸腰部 SCI に対して機能改善を目的とした場合、断裂した軸索の再生と再髄鞘化が重要であり、OECs は有望な移植候補と言える。また、OECs はアストロサイトとの共存が可能であり、グリア瘢痕を跨いだ軸索再生の誘導が期待できる。さらに、患者自身の嗅粘膜から培養した OECs の自家移植によって免疫拒絶反応を回避できる利点がある。

近年、獣医療において、犬の胸腰部 SCI 臨床例での OECs 移植が報告されているが、齧歯類 SCI モデルほどの機能改善は認められていない。その原因として、犬の臨床例では損傷慢性期（損傷後 3 ヶ月以上）に移植を施したことや、移植 OECs の純度や数にばらつきあることなどが考えられる。これらを解決するためには、OECs 移植療法の適応症例の早期検出と、安定した OECs の純化培養法の確立が必要である。また、慢性期の症例においては、グリア瘢痕の CSPG の分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC（ChABC）を併用することで、良好な OECs の軸索再性能の誘導が期待できる。本研究では、SCI に対する OECs 移植療法の臨床応用実現に向けた基盤研究として、MRI を用いた OECs 移植治療適応患者の鑑別方法、犬 OECs の安定した純化培養方法、そして慢性 SCI モデルラットにおける ChABC と犬 OECs 移植による機能回復について検討した。

### 1.磁気共鳴 Heavily T2 強調画像を用いた胸腰部椎間板ヘルニア罹患犬の予後判定の検討

胸腰部椎間板ヘルニア（Hansen I型）は犬で一般的な脊髄疾患のひとつであり、SCIを伴う重度の症例では後肢の深部痛覚消失を伴う完全麻痺を示す。その約30-50%の症例では、既存の外科的治療（減圧術）を施しても運動機能の回復が認められない。これらの症例では、SCI後の脊髄の病態（出血、炎症、浮腫など）が脊髄造影X線検査やMRIのT2強調画像の所見に反映され、予後不良に関連すると報告されている。しかし、前者は造影剤投与のために侵襲を伴い、後者では撮影機器の磁場強度が描出感度に影響することが報告されている。MRIの撮影法の一つであるHeavily T2強調画像は、造影剤を用いることなく、脊髄造影X線画像のようにクモ膜下腔の脳脊髄液（CSF）のみを高信号として描出することができる。しかし、胸腰部椎間板ヘルニアの重症度や予後とCSF信号減衰域の長さの関係を検討した報告はない。そこで、胸腰部椎間板ヘルニアの症例において、Heavily T2強調画像でのCSF信号減衰域の長さや症状の重症度および予後との関係性を調査した。

日本大学付属動物病院神経科で2008年1月から2019年12月の期間にMRI検査により胸腰部椎間板ヘルニアの診断をされ、減圧術を受けた犬の症例を対象に回顧的に調査を行なった。起立不能の不全麻痺（Grade 3）と深部痛覚残存の完全麻痺（Grade 4）、深部痛覚消失の完全麻痺（Grade 5）の症例を本研究に組み入れた。Grade 3、4の症例では補助無し自力起立歩行、随意排泄機能の回復が認められた症例、Grade 5では前述の条件に加えて両後肢の深部痛覚の回復が認められた症例を予後良好とした。Heavily T2強調画像でのCSF信号減衰域の長さを測定し、第2腰椎（L2）の長さの比で表した（CSF:L2）。重症度および予後ごとのCSF:L2を比較検討した。

55頭の犬が本研究で対象となり、Grade 3が9頭、Grade 4が33頭、Grade 5が13頭であった。予後判定ではGrade 5の1頭が除外され、予後良好と判断された症例はGrade 3: 9/9、Grade 4: 31/33、Grade 5: 2/12であった。Grade 5のCSF:L2はGrade 3、4よりも有意に大きな値を示した（ともに $P < 0.01$ ）。Grade 5で予後不良の症例のCSF:L2は中央値5.91、予後良好では3.72であった。

以上の結果より、Heavily T2強調画像でのCSF信号減衰域の長さは胸腰部椎間板ヘルニアの症例の重症度に関連することが明らかとなった。また、深部痛覚を消失している症例において、予後不良症例のCSF信号減衰域の長さは予後良好症例のそれに比べて長い傾向にあることが明らかとなった。

## 2. 犬嗅粘膜由来 OECs の純化培養法の検討

犬の嗅粘膜由来 OECs は血清非含有培地を用いることで、混入細胞（主に線維芽細胞）の増殖を抑えて OECs の割合を増加させることが可能だが、その割合にはばらつきが生じる（ $< 10 \sim > 95\%$ ）ことが報告されている。我々は OECs が線維芽細胞よりも細胞接着性が乏しいことに着目し、物理的衝撃によって OECs が線維芽細胞よりも容易に培養面から剥離できるのではないかと考えた。本研究では血清非含有培地培養に物理的衝撃による細胞剥離処理を組み込むことで、OECs の割合を高めることが可能であるかを検討した。

### 実験 1

日本大学獣医学科で実施された実習後に安楽死を施された犬 7 頭から採取した嗅粘膜を培養に用いた。嗅粘膜をトリミング、酵素処理後に、血清非含有培地にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で 7 日間培養した。培養後、血清含有培地に培地を置換し再び 7 日間培養した。その後、衝撃による細胞剥離処理群 (Bang 群) とトリプシンによる剥離処理群 (Control [Ct] 群) に分けた。Bang 群では、培養面を PBS (Ca, Mg Free) で洗浄したのちに、Hank's buffer (Ca, Mg Free) を加えて、水平な机の上にフラスコを自由落下させ、細胞を培養面から剥離させた。Ct 群では 0.25% トリプシン処理で剥離させた。剥離させた細胞は新たなフラスコに継代し、血清含有培地にて 7 日間培養した後、蛍光免疫染色を施し、OECs と線維芽細胞の割合を算出した。

Bang 群では OECs が平均 4.6% (SD±6.26)、線維芽細胞が 94.4% (±7.34)、Ct 群では OECs が 0.34% (±0.41)、線維芽細胞が 98.8% (±2.91) であった。Bang 群の OECs 割合は Ct 群に比べて統計学的に有意に高値であった (P=0.015)。

実験 1 では、OECs の割合は上昇したものの、純化には程遠い結果であった。これは十分な OECs 増殖 (コンフルエント) の前に Bang 処理を行ったことが原因であると考え、実験 2 では細胞がコンフルエントに達した時点で Bang 処理を実施するように培養期間を変更し、同様の検討を行った。

#### 実験 2

日本大学動物病院で脳腫瘍摘出術を受けた 2 頭の犬において、開頭術中に除去および処分した嗅粘膜を培養に用いた。実験 1 と同様の条件で培養し、フラスコが細胞でコンフルエントになった時点で Bang 処理またはトリプシン処理にて継代した。この継代の工程を 2 週間継続した。培養後、実験 1 と同様に各細胞の割合を算出した。

Bang 群では OECs が平均 99.3% (SD±0.39)、線維芽細胞が 0.40% (±0.20)、Ct 群では OECs が 8.51%、線維芽細胞が 82.8% であった (1 頭の Ct 群が真菌の混入により測定不能)。

以上の結果から、物理衝撃による細胞剥離は OECs の割合を高めるための手技の一つとなる可能性が示唆された。今後は、短期間で効率的に OECs の割合を向上させるために、衝撃による細胞剥離処理を行うタイミングや血清の有無などの培養条件を更に検討する必要がある。

### 3.慢性期 SCI モデルラットへの ChABC 産生-犬 OECs 移植による運動機能回復の検討

SCI 病変部への ChABC の投与は、グリア瘢痕の CSPG を分解し、軸索再生を助長することが齧歯類 SCI モデルで報告されており、SCI に対する薬剤投与治療として注目されている。しかし、ChABC は生体の体温下で活性が急速に減弱する欠点がある。近年、SCI 部への ChABC の持続的供給を目的として、ChABC 産生遺伝子を導入した OECs (ChABC-OECs) が開発され、急性期 SCI モデルへの移植によって、*in vivo* での CSPG の分解と軸索伸展支持能の増強が報告されている。この ChABC-OECs は慢性期 SCI においても機能を発揮し、グリア瘢痕の分解と OECs の再生能によって運動機能の改善が期待できる。そこで、本研究では慢性期胸腰部 SCI モデルラットへの ChABC-OECs 移植による運動機能の改善の有無を検討した。

本研究は日本大学動物実験委員会の承認を受けて実施された (AP18BRS010)。24 頭の雄の成熟ラットで、第 10 胸椎レベルの挫傷 SCI モデルを作製した。損傷から 3 週間後に、犬 OECs、

ChABC-OECs、または Hank's buffer (Media) を SCI 部位の頭側と尾側の背側正中の脊髄実質内に移植した。移植後 6 週までの運動機能 (BBB スコア) の評価を行なった。

3 頭のラットが人道的処置として安楽死が施され、別の 3 頭は施術中に死亡した。最終的に 5 頭が Media 群、6 頭が OECs 群、7 頭が ChABC-OECs 群となった。BBB スコアでは、群間に統計学的に有意な差は認められなかったが、OECs 群と ChABC-OECs 群では観察期間中に改善傾向が認められ、ChABC-OECs 群が OECs 群よりもわずかに運動機能が改善する傾向にあった (OECs 群 : 移植前  $11.4 \pm 3.1$  ; 移植 6 週後  $15.0 \pm 2.5$ 、ChABC-OEC 群 : 移植前  $11.8 \pm 2.2$  ; 移植 6 週後  $15.9 \pm 2.9$ )。また、これらの群では Media 群 (移植前  $11.6 \pm 3.3$  ; 6 週目  $13.1 \pm 4.6$ ) と比較して BBB スコアの改善が大きい傾向にあった。

以上の結果から ChABC-OECs と OECs の移植は慢性期 SCI 動物の運動機能の改善をもたらす可能性が示唆された。

## 総括

本研究では、磁気共鳴 Heavily T2 強調画像で広い CSF 信号減衰を認める深部痛覚を消失した胸腰部椎間板ヘルニアの犬は、外科的減圧術後でも脊髄機能の回復が認められない傾向にあり、OECs 移植治療の適応患者になることが示唆された。本研究で検証した衝撃による細胞分離方法は、従来の培養方法 OECs の割合を高めることが期待され、移植に用いる OECs の精製手技の一つになると考えられた。慢性期の損傷脊髄への OECs の移植は、運動機能の改善をもたらし、さらに ChABC-OECs の移植ではより良い運動機能の改善をもたらす傾向にあることが示唆された。今後は、本研究での結果を利用した OECs の安定的な純化培養法の確立とともに、SCI 患者における OECs 移植の臨床応用への展開が期待される。

よって本論文は、博士 (獣医学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 4 年 2 月 22 日