

—平成15年度 岐阜薬科大学特別研究費（奨励）—

脊髄損傷修復を目指した神経幹細胞からの 嗅神経被覆グリアの誘導

福光 秀文

1. 緒言

脊髄は脳と末梢組織の連絡路であるため、損傷を受けると損傷部より下位の身体機能は完全に失われる。歩行、排尿あるいは呼吸などの一般的な生命活動に著しい支障を来し、患者の QOL は大きく低下する。脊髄損傷の抜本的治療法の開発が切望される中、近年、嗅球及び嗅上皮に存在する嗅神経被覆グリア (olfactory ensheathing glia : OEG) を脊髄損傷モデル動物に移植すると、軸索再生を促し運動機能が回復することが報告され脚光を浴びている^{1,2)}。もともと嗅上皮では、生涯を通じて嗅覚神経細胞が新生されるが、OEG にはその軸索を嗅脳へと誘導し神経投射を促す働きがある^{3,4)}。OEG を用いた損傷脊髄の治療は、この OEG の他のグリア細胞にはない独自性を利用した画期的な方法であり、脊髄損傷の抜本的治療法の開発に大きく寄与すると考えられる。

実際に細胞移植を行う場合、免疫学的拒絶反応を考えると患者自身の細胞を用いるのがベストである。ところが OEG は生体内での存在数が少ない上、培養下での増殖率が悪く必要量を確保することが極めて困難である。一方、嗅上皮には自己増殖能が高く OEG にも分化する神経幹細胞が豊富に存在する。嗅上皮は鼻腔奥の嗅粘膜直下に存在するため、比較的容易な外科的手術で摘出することが可能である。この嗅上皮神経幹細胞 (olfactory stem cells : OSCs) を OEG に誘導できれば短期間に十分量の OEG を確保できると考えられる。本研究では、神経幹細胞においてグリア系譜を誘導することが知られている骨形成因子 (bone morphogenetic protein : BMP)-2 を OSCs に添加することにより OEG への誘導を試みた⁵⁾。

2. 実験方法

OSCs の培養は以下の方法で分離培養した。実体顕微鏡下で 7 週齢 Wistar ラットから嗅上皮を摘出して分散し、上皮細胞増殖因子 EGF、及び ESGRO (白血病細胞阻止因子 LIF) を含む N₂ 培地に懸濁後、コラーゲン IV コートしたプラスチックカバースリップ上で 3 日間培養し

た。このようにして得た OSCs に 100 ng/mL の BMP-2 を 3 日間処理した後、OEG に特異的に発現するニューロトロフィンの低親和性受容体 p75 及びグリア系細胞に発現する骨格タンパク質 S100 β に対する抗体を用い蛍光免疫染色を行い、OEG への分化の有無を調べた。

3. 実験結果・考察

OSCs の培養 : EGF 及び ESGRO 存在下で嗅上皮の細胞群を 3 日間培養したところ、増殖性の高い OSCs がコロニーを形成しているのが観察された。この OSCs は p75 及び未分化細胞に特異的に発現する骨格タンパク質であるネスチンを発現している (Fig. 1A-C)。一方これらのコロニー及びその周囲には S100 β 陽性の細胞はほとんど観察されなかった (Fig. 1D-E)。したがってこれらの細胞は p75 を発現する未分化細胞で、OEG とは異なる細胞であることが分かる。一方、これらのコロニーの外に p75 及び S100 β 陽性の OEG が散在していた (Fig. 1F)。これは嗅上皮に存在する OEG が混入したものと考えられる。

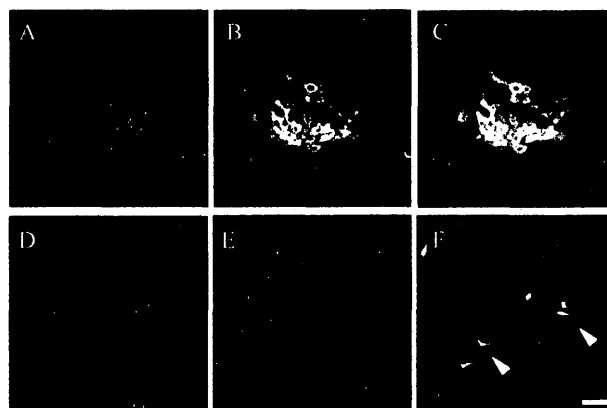


Fig. 1

(A-C): Cultured OSCs were reacted with antibody against p75 and nestin. (A),(B) indicates p75-immunoreactivity and nestin-immunoreactivity respectively. (C) indicates merge. (D-E): OSCs were reacted with antibody against p75 and S100 β . (D) indicates p75-immunoreactivity. (E) indicate S100 β

-immunoreactivity. (F): p75 and S100 β positive OEG were observed a little in this culture (arrowheads).
scale bar : 100 μ m.

BMP-2 処理による分化誘導 : EGF 及び ESGRO 存在下で 3 日間培養を行った OSCs に BMP-2 を 3 日間処理し、OEG への分化誘導を試みた。BMP-2 を処理した細胞群では、未処理の細胞群に比べ有意に p75 及び S100 β 陽性の OEG が増加していた (Fig. 2)。

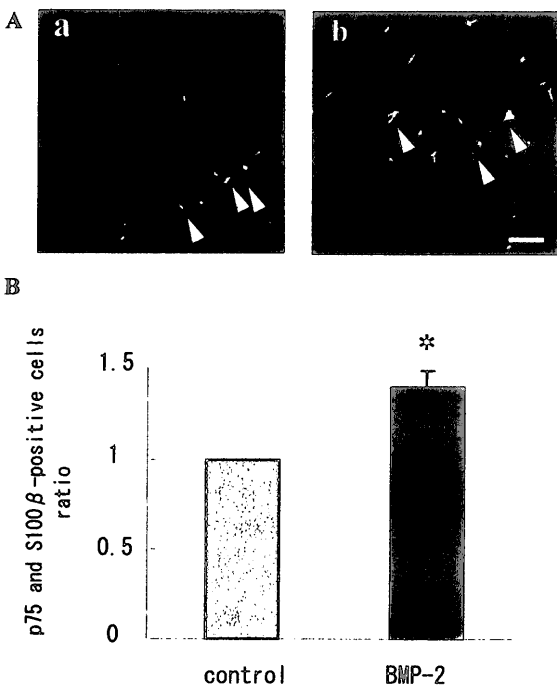


Fig. 2
(A): Cultured OSCs were treated with (b) or without (a) BMP-2 (100 ng/mL) for 3 days. Then cells were reacted with antibody against p75 and S100 β . p75 and S100 β positive OEG were observed in these cultures (arrowheads). (B): Values are expressed as the mean \pm S.E. of the ratio of the number of p75 and S100 β positive cells in the BMP-2 treated cultures/the number of p75 and S100 β positive cells in the control cultures. * $p < 0.05$ by Student's t -test. Scale bar : 100 μ m.

BMP-2 の OEG の増殖に及ぼす影響 : BMP-2 の処理により OEG の数は有意に上昇したが、この OEG が OSCs より分化したものではなく、もともと培養系に混入していた OEG が BMP-2 により増殖した可能性も考えられる。そこで、7 週齢 Wistar ラットの嗅脳より単離精製した高純度の OEG に BMP-2 を 3 日間処理し、その増殖に及ぼす影響を検討した。その結果、BMP-2 処理群と未処理群の間には顕著な差は見られなかった (Fig. 3)。このことから、BMP-2 処理により増加した OEG は混入していた OEG が増殖したものではなく、OSCs から分化

したものと考えられる。

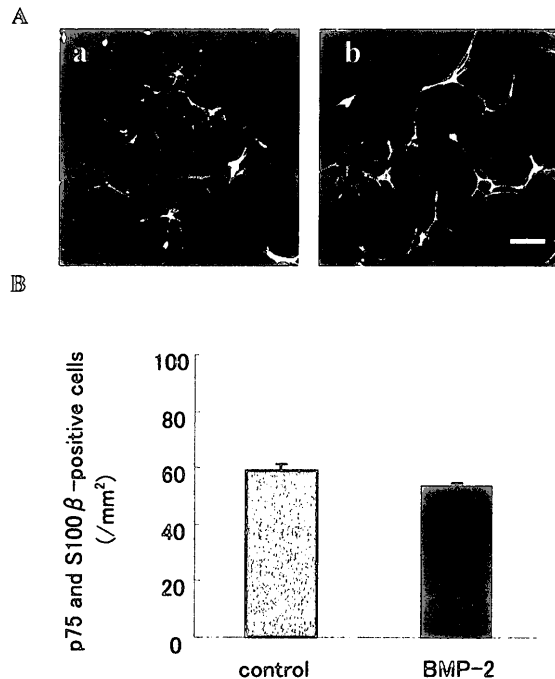


Fig. 3
(A): Cultured OEG from olfactory bulb were treated with (b) or without (a) BMP-2 (100 ng/mL) for 3 days. Then cells were reacted with antibody against p75 and S100 β . (B): Values are expressed as the mean \pm S.E. of the number of p75 and S100 β positive cells/mm² in the cultures respectively. Scale bar : 100 μ m.

4. 結論

本研究では、OSCs から OEG を分化誘導することを試みた。その結果、BMP-2 処理により、分化誘導が可能であることが明らかとなった。今後、さらに OEG への分化を促す因子を探索し、それらを組み合わせることにより OSCs を高い割合で OEG へと分化誘導することが可能となれば、脊髄損傷の治療に大きな進展をもたらすと考えられる。

5. 参考文献

- 1) Li Y, Field PM, Raisman G. 1998 J Neurosci. 18:10514-10524.
- 2) Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J. 2000. Neuron. 25:425-435.
- 3) Carr VM, Farbman AI. 1992. Exp Neurol. 115:55-59.
- 4) Carr VM, Farbman AI. 1993. Exp Neurol. 124:308-14.
- 5) Koblar SA, Turnley AM, Classon BJ, Reid KL, Ware CB, Cheema SS, Murphy M, Bartlett PF. 1998. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:3178-3181.