

Title	Targeted Expression of Anti-Apoptotic Protein p35 in Oligodendrocytes Reduces Delayed Demyelination and Functional Impairment After Spinal Cord Injury
Sub Title	オリゴデンドロサイトにおける抗アポトーシス蛋白p35の標的発現は脊髄損傷後の遅発性脱髄を減少させ運動機能回復を促進させる
Author	田村, 睦弘
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.4 (2005. 12) ,p.23-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20051202-0023

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Targeted Expression of Anti-Apoptotic Protein *p35* in Oligodendrocytes Reduces Delayed Demyelination and Functional Impairment After Spinal Cord Injury

(オリゴデンドロサイトにおける抗アポトーシス蛋白*p35*の標的発現は脊髄損傷後の遅発性脱髄を減少させ運動機能回復を促進させる)

田 村 睦 弘

内容の要旨

脊髄損傷後の機能障害はニューロンの細胞死や軸索断裂に加え、髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイト (OLG) のアポトーシスにより重症化すると考えられているが、これを直接証明した報告はこれまでにない。本研究では、OLGのアポトーシスを選択的に抑制した*p35* transgenic mouseを用いて脊髄損傷モデルを作製し、損傷後の脱髄や運動機能障害について解析し、脊髄損傷にOLGのアポトーシスの意義を明らかにすることを目的とした。

方法は、1) 実験動物：MBPのpromotor下にアポトーシス抑制遺伝子*p35*を発現する生後7週齢のMBP-cre*p35* transgenic mouseを用いた (Tg群N=10)。*p35*の発現はRT-PCR法にて確認した。2) 脊髄損傷モデル作製：全麻下に第7胸椎椎弓切除後、MASCISの方法に準じて硬膜上に重錘を落下させ損傷モデルを作製した。対照としてcontrol cre mouseとwild-typeのC57BL/6 mouseを用いた (C群各N=10)。経心臓的灌流固定後、以下の検討を行った。3) 組織学的検索：①一般組織染色：LFB/HE重染色を行った。②髄鞘染色：Toluidine Blue染色を行い画像解析ソフトを用いて脊髄後索部の髄鞘面積を定量化した。③免疫染色：OLGのマーカーであるnGSTを用いて染色後、後索部の陽性細胞数を定量化した。さらにHoechst33342との2重染色にてOLGのアポトーシス像を観察した。④電顕：脊髄後索皮質脊髄路を中心に髄鞘の微細構造を観察した。4) 運動機能評価：BBB scaleと行動解析装置 (SCANET) を用いて行った。

その結果、1) 髄鞘染色ではTg群で後索の髄鞘はC群と比較して有意に温存されていた。2) 免疫組織染色では、Tg群の後索部に残存するOLGはC群と比較し有意に多かった。また、C群ではTg群と比較して多くのOLGのアポトーシス像を認めた。3) 電顕像ではTg群の髄鞘は比較的温存されていた。一方C群では著明な脱髄を認めた。4) 運動機能評価ではTg群ではC群と比較して損傷後の下肢運動機能は良好であった。

OLGは数多くの髄鞘を形成するが、損傷によりニューロンの細胞死や軸索の断裂が起こると、それをとりまくOLGのアポトーシスが引き起こされ、その結果損傷を免れた組織にも脱髄が起こり重篤な機能障害をきたす。今回の結果から、*p35* transgenic mouseでは1次損傷を免れたOLGのアポトーシスが抑制され、脱髄が減少したために良好な機能回復が得られたものと考え、*p35*によって脊髄損傷後のOLGのアポトーシスを抑制し、機能障害を軽減することができたことは、OLGのアポトーシスの抑制が脊髄損傷治療の一手段となりうる可能性を示唆しており、意義深いものと考え。

論文審査の要旨

脊髄損傷後の機能障害はニューロンの細胞死や軸索断裂に加え、髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイト (OLG) のアポトーシスにより重症化すると考えられているが、これを直接証明した報告はこれまでにない。そこで本研究では、OLGのアポトーシスを選択的に抑制した*p35* transgenic mouseを用いて脊髄損傷モデルを作製し、損傷後の脱髄や運動機能障害について解析し、脊髄損傷におけるOLGのアポトーシスの意義を明らかにした。実験はMyelin Basic Protein (MBP) のpromotor下にアポトーシス抑制遺伝子*p35*を発現するMBP-cre*p35* transgenic mouseを用いた (Tg群)。全麻下MASCISの方法に準じて硬膜上に重錘を落下させ損傷モデルを作製した。対照群としてcre mouseとwild-typeのC57BL/6 mouse (C群)、椎弓切除のみを行なった群 (Sham群) を用いた。以上について組織学的検索、運動機能評価を行なった。髄鞘染色ならびに電顕像ではTg群で後索の髄鞘はC群と比較して有意に温存されており、損傷の頭尾側でも両群とも軽度脱髄を認めた。免疫組織染色では、Tg群の後索部に残存するOLGはC群と比較し有意に多く、C群ではTg群と比較して多くのOLGのアポトーシス像を認めた。運動機能評価ではTg群ではC群と比較して損傷後の下肢運動機能は良好であった。

審査では、脊髄切断モデルの方が挫滅が少ないため実験結果がより明瞭に出るのではないかと質問された。これに対して、実際の脊髄損傷に近い病態で解析をするという理由でMASCISの重錘落下法を選択したと回答された。また、脊髄損傷の病態の中での血流障害の重要性について質問がなされ、本研究では虚血や血管新生を直接評価する実験はなされていないが、損傷後の虚血や出血、脊髄損傷後の血管新生が、本研究の病態に深く関わっていることが考えられるとの推察が述べられた。また、再髄鞘化が起こった可能性についての質問に対しては、軸索-髄鞘比 (g-ratio) による両群間の比較では有意差がなく、軸索と髄鞘は形態学的には差異を認めなかったが脊髄損傷後に再髄鞘化が起こった可能性は十分考えられると回答された。さらに、*p35*の持続的発現が脊髄障害を引き起こす可能性についての質問に対して、*p35* transgenic mouseで椎弓切除のみ行なったSham群では、組織や運動障害を認めなかったことよりその可能性は低いと回答された。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、*p35*によって脊髄損傷後のOLGのアポトーシスを抑制し、機能障害を軽減できたことから、将来の臨床応用においてOLGのアポトーシスの抑制が脊髄損傷治療の一手段となりうる可能性を示唆した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭
解剖学 仲嶋 一範 内科学 鈴木 則宏
外科学 河瀬 斌
学力確認担当者：北島 政樹、仲嶋 一範
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成17年 7月12日