

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	横浜 洋也
-------	----	----	-------

### 学位論文題目

脊髄損傷後のアストロサイトによる Tenascin-R の発現に関する研究

### 共著者名

板東良雄 寺山隆司 吉田成孝

### 未公表

### 研究目的

脊髄を含めた神経が傷害されるとアストロサイトなどが損傷部位に集積しグリア瘢痕が形成される。このグリア瘢痕は神経再生における最も大きな阻害要因である。グリア瘢痕には tenascin (TN) および chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) などの細胞外基質が含まれ、これらの因子が神経再生を妨げる原因となっている。TN の中でも tenascin-R (TN-R) は神経系に特異的かつ豊富に存在し、中でもグリア細胞に多く発現しており、抗接着作用や軸索伸長抑制作用などが報告されている。これまでに TN-R が細胞外にどのように分泌されるかという分泌機構に着目した研究はなく、脊髄損傷後の様な病態での分泌変化やグリア瘢痕形成機序への関与については全く知られていない。近年、様々な神経変性疾患において小胞体の機能が重要であることが明らかとなってきている。蛋白質の分泌・修飾に関わる小胞体は、細胞でのストレス反応の場としても重要である。この小胞体に局在するストレス蛋白質である 78kDa glucose-regulated protein (GRP78) および 94kDa glucose-regulated protein (GRP94) はカルシウムホメオスタシスの乱れなどにより細胞が細胞死のストレスに直面すると、これを回避するために誘導され細胞を保護する機能を持つ。また、その一方で分子シャペロンとして様々な蛋白質の分泌機構にも関与している。そこで、本研究では神経損傷のモデルである脊髄損傷の病態を用いて、GRP78 や GRP94 が TN-R の分泌に関与しているかどうかについて検討を行った。

### 材料・方法

#### (1) 脊髄損傷モデル

BALB/c 雄性マウス (7-9 週齢) を用い、第 4 腰髄右半側を腹側まで切断した脊髄損傷モデルを作成した。手術後 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 日に手術部位を中心として前後 10 mm の長さで脊髄を摘出した。また、免疫組織化学に供する試料は Zamboni 固定液を用いて灌流固定を行った後に脊髄を摘出した。切片は厚さ 14  $\mu\text{m}$  の前額断にて作成した。

#### (2) 細胞培養

アストログリオーマ C6 細胞を用いた。ストレス負荷実験では tunicamycin (Tm) または lipopolysaccharide (LPS) を培養液に混合し、4, 8, 12, 24 時間後に細胞を回収した。また、免疫細胞化学に供する細胞は Zamboni

固定液を入れ固定した。

### (3)免疫組織化学

1次抗体は anti-tenascin R 抗体、アストロサイトのマーカーである anti-GFAP 抗体、GRP78 および GRP94 を認識する抗体である anti-KDEL 抗体、オリゴデンドロサイトのマーカーである anti-CNPase 抗体、ミクログリアのマーカーである anti-F4/80 抗体、神経細胞のマーカーである anti-MAP2 抗体および anti-GRP78 抗体を用いた。1次抗体を反応させた後、それぞれに対応した2次抗体を反応させた。

### (4)ウェスタンブロット

取り出した脊髄および培養細胞をホモジナイズし、ウェスタンブロットを行った。1次抗体として anti-KDEL 抗体、anti-tenascin R 抗体、anti-actin 抗体および anti-GRP78 抗体を用いた。発色には nitroblue tetrazolium (NBT) と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) を使用した。

### (5)免疫沈降

損傷脊髄あるいは培養細胞のホモジナイズ後の上清に1次抗体を加え抗原-抗体複合体を形成させた。これに Protein G を加えて遠心をし、抗体-Protein G-sepharose を沈殿させ、沈殿物に SDS-PAGE sample buffer を加え、遠心した後の上清を用いてウェスタンブロットを行った。

### (6)RT-PCR

脊髄から抽出した total RNA に対し RT-PCR を行い、TN-R および GRP78 の増幅を行った。

### (7)アンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ODN)

GRP78 に対するアンチセンスオリゴ (AS-ODN) および配列を任意に変えた scrambled oligo DNA (SC)を合成し Lipofectamine 2000 を用いて C6 細胞に遺伝子導入した。48 時間後に細胞を回収し、免疫沈降およびウェスタンブロットを行った。

## 成績

### (1)脊髄損傷後の TN-R と GFAP、F4/80 および CNPase の発現

アストロサイト、オリゴデンドロサイトおよびミクログリアと TN-R 発現について免疫組織化学法を用いて検討した。TN-R 発現量は損傷3日後から損傷14日後にかけて増加していた。TN-R と GFAP との蛍光二重染色の結果から、一部のアストロサイトが TN-R を発現しているのが認められた。CNPase 発現量は損傷3日後やや減少し、損傷7日後に sham 手術のレベルにまで回復してきていた。TN-R と CNPase との蛍光二重染色の結果から、CNPase と TN-R の共存が認められた。F4/80 発現量は損傷3日後から活性化が認められ、細胞数も損傷7日後にわたって経時的に増加していた。TN-R と F4/80 の蛍光二重染色の結果から、F4/80 と TN-R の共存が認められた。

### (2)脊髄損傷後の GRP78 および GRP94 の分布

脊髄損傷の病態に小胞体ストレスが関与するかどうかを調べるために、GRP78 および GRP94 の分布について検討した。GRP78 および GRP94 は脊髄損傷3-14日後にかけて発現量が顕著に増加していた。蛍光二重染色の結果から、GRP78 および GRP94 と GFAP の共存は損傷3日後は比較的少数であったが損傷7-14日後には著しい増加をみた。

### (3)脊髄損傷後の TN-R と GRP78 および GRP94 の発現

ウェスタンブロットでの検討により、脊髄損傷モデルにおいて TN-R と GRP78 および GRP94 の発現は損傷1日後から経時的に増加しており、RT-PCR での mRNA 発現も顕著に増加していた。

### (4)脊髄損傷時の病態における TN-R と GRP78 および GRP94 の関係

免疫沈降法を用いて GRP78 および GRP94 と TN-R との結合を検討した。Anti-KDEL 抗体により共沈した TN-R は脊髄損傷後 3 日後から経時的に増強した。Anti-TN-R 抗体により共沈したのは主に GRP78 であり、GRP94 はほとんど認められなかった。

#### (5) C6 細胞における TN-R と GRP78 および GRP94 の関係

C6 細胞を用いて TN-R と GRP78 および GRP94 の発現を検討した。小胞体ストレスを引き起こす Tm と炎症反応を引き起こす LPS を C6 細胞に投与したところ、それぞれの発現量は経時的に増加した。免疫染色では GRP78 および GRP94 は小胞体パターンに染色され、Tm および LPS 負荷によって小胞体を中心に陽性反応が顕著に増加した。Tm や LPS などの負荷により細胞外に分泌される TN-R の量も、経時的に上昇し、細胞内での GRP78 および GRP94 と TN-R の共沈した沈降物の量も経時的に増加していた。また、TN-R との共沈は GRP94 よりも GRP78 の方が主であった。次に、GRP78 に対する AS-ODN および SC を作成し C6 細胞に一過性に導入した。Tm もしくは LPS を負荷するとコントロール (NT と SC) 細胞では GRP78 の発現増強が見られるが、AS-ODN 導入によりその発現は著明に抑制された。細胞培養液中に分泌される TN-R 量は Tm、LPS 負荷・非負荷のどちらにおいても AS-ODN 導入群では NT、SC 導入に比べて分泌量は抑制されていた。

### 考察

今回の研究で脊髄損傷後にオリゴデンドロサイトに加えてアストロサイト及びミクログリアが TN-R を発現していることを明らかとした。損傷後のグリア細胞における TN-R の発現は癒痕形成に先駆けて経時的に増加しており、損傷後 7 日後以降特に癒痕部位への細胞集積及び発現量の上昇が認められた。今回の結果と合わせ、損傷時にはグリア癒痕の主な構成細胞であるアストロサイトが TN-R を発現し、これがさらにグリア細胞の遊走や活性化を通じてグリア癒痕形成を促進している可能性が考えられる。脊髄損傷モデルにおいて、GRP78 および GRP94 の蛋白質と mRNA の発現量は顕著に増加した。GRP78 の発現量の上昇は小胞体ストレスの指標として確立しており、今回の結果から脊髄損傷後の病態に小胞体ストレスの関与が示唆された。また、TN-R と GRP78 および GRP94 との免疫沈降により両者が互いに共沈し、脊髄損傷時にさらに共沈の量が増加したことより、TN-R の分泌に GRP78 が関与している可能性が示唆される。C6 細胞に Tm や LPS を負荷した後に、TN-R と GRP78 および GRP94 の発現上昇と TN-R と GRP78 との結合の増強が認められた。すなわち小胞体ストレスにより GRP78 が誘導され、TN-R と結合しているものと考えられる。AS-ODN 投与で GRP78 発現を抑制する事により TN-R の細胞外への分泌量が減少したことから、GRP78 はストレスに反応して小胞体内に誘導され、同時に発現する TN-R と小胞体内で結合し、その分泌に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。神経損傷の際、TN-R は損傷部でのグリア細胞の集積を促し、癒痕形成ひいては神経再生阻害に大きな役割を果たしていると考えられる。

### 結論

*in vivo* および *in vitro* の系で TN-R および GRP78 の発現とその関係を検討した。脊髄損傷後アストロサイトは TN-R および GRP78 を発現し、さらに、これらの分子は小胞体内にて結合する事が TN-R 分泌に重要であることを示した。TN-R および GRP78 は損傷後に生じるグリア癒痕形成に重要な役割を果たしていることが考えられる。

### 引用文献

1. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999; 49: 377-391.
2. Pesheva P, Probstmeier R. The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog Neurobiol.* 2000; 61: 465-493.
3. Yu Z, Luo H, Fu W, Mattson MP. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Exp Neurol.* 1999; 155: 302-314.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	横 浜 洋 也
<p>審査委員長 岩 崎 寛 ㊟</p> <p>審査委員 吉 田 成 孝 ㊟</p> <p>審査委員 田 中 達 也 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>脊髄損傷後のアストロサイトにおける Tenascin-R の発現に関する研究</p>			
<p>審査結果の要旨</p>			
<p>神経が傷害されるとアストロサイトなどが損傷部位に集積しグリア瘢痕が形成される。そのグリア瘢痕には軸索再生阻害作用をもつ糖蛋白質である tenascin-R (TN-R)が含まれているが、その分泌機構やグリア瘢痕形成機序への関与については、今まで全く知られていない。そこで、中枢神経損傷時の TN-R 発現の変化と分泌に関連する因子を明らかにする事を目的として本研究が行われた。</p> <p>マウス第4腰椎右半側を切断した脊髄損傷モデルおよびアストログリオーマ C6細胞に tunicamycin (Tm) または lipopolysaccharide (LPS) を投与したものをを用いて、免疫組織化学・ウエスタンブロット法および RT-PCR により検討した。</p> <p>TN-R の発現は脊髄損傷3日後から損傷14日後にかけて経時的に増加していた。非損傷時にはオリゴデンドロサイトが TN-R を発現していたが、損傷後はアストロサイトおよびミクログリアによる発現も認められた。GRP78 も TN-R と同様に脊髄損傷後の発現上昇がみられた。損傷後の発現細胞は主にアストロサイトであった。また、免疫沈降により TN-R と GRP78 が共沈した。C6細胞に Tm, LPS 負荷などのストレスがかかった状態では TN-R と GRP78 の発現量は増加しており、免疫沈降においても TN-R と GRP78 が共沈した。C6細胞にアンチセンスオリゴ DNA を投与し、GRP78 発現を抑制する事により TN-R の細胞外</p>			

への分泌量が減少した。

今回の研究結果から、TN-R は神経損傷などのストレスに反応してアストロサイトに発現誘導され、同時に小胞体に誘導される GRP78 が TN-R の分泌に重要な役割を果たしていることを初めて明らかとした。神経損傷の際、TN-R は損傷部でのグリア細胞の遊走や活性化を通じてグリア瘢痕形成を促進し、軸索再生阻害に大きな役割を果たしていると考えられた。本研究は神経損傷時の軸索進展阻害の病態解明につながる研究であり、また、論文提出者は、審査委員から本論文およびその関連領域に関する試問に対して、適切な回答が得られ、学位論文に値するものであると判断した。