

(様式4)

学位論文の内容の要旨

(三枝 徳栄) 印

(学位論文のタイトル)

Mesenchymal stem cells attenuate peripheral neuronal degeneration in spinocerebellar ataxia type 1 knockin mice

(間葉系幹細胞は脊髄小脳失調症1型ノックインマウスにおける末梢神経変性を減弱させる)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

脊髄小脳失調症(SCA)は脳幹、小脳、および脊髄小脳路を含む様々な脳領域における神経、ならびにそれらの求心性、遠心性に接続する神経の変性によって引き起こされる。SCAの中で、脊髄小脳失調症1型(SCA1)は、ataxin-1蛋白におけるポリグルタミン鎖の異常伸張によって引き起こされる疾患であり、中枢のみならず末梢神経の変性も観察される。私は以前に老齢SCA1ノックイン(SCA1-KI)マウスにおいて、脊髄運動神経の軸索とそれを取り囲む髄鞘両方の変性が認められることを報告した。本研究においては、SCA1-KIマウスにおいて軸索変性が髄鞘の変性に先行するか、またはその逆であるのかを調査することを目的とした。更に、間葉系幹細胞(MSCs)髄腔内投与がもたらすSCA1-KIマウスの運動神経変性に対する進行軽減効果も調べた。

初めに、SCA1-KIマウスにおける脊髄運動神経の軸索と髄鞘の変性が出現する時期を検討するために、生後1ヶ月齢、3ヶ月齢、7ヶ月齢のSCA1-KIマウスと野生型(WT)マウスを用いて、脊髄断面のパラフィン切片を作製し、免疫蛍光染色を行った。前根の神経軸索の大きさを定量化するために、横断した髄鞘を有した軸索の短軸の長さを β -tubulin染色像から測定した。髄鞘の定量化のために、髄鞘の内側の円の短軸の長さをmyelin basic protein(MBP)染色像より測定した。SCA1-KIマウスの脊髄運動神経の変性時期は、7ヶ月齢、3ヶ月齢の時点では、軸索と髄鞘両方の直径がWTマウスと比べてSCA1-KIマウスで有意に小さかった。1ヶ月齢のマウスでは、WTマウスと比べSCA1-KIマウスで有意に小さい軸索径であったが、髄鞘の直径はほぼ同一であった。これらの結果は、SCA1-KIマウスが非症候性である1ヶ月の時期に軸索変性が始まり、軸索変性に続いて髄鞘の変性が引き起こされることを示す。

MSCsをSCA1-KIマウスに投与するに先立って予備実験として、髄腔内投与したMSCsが神経軸索の存在する神経根に到達するかどうかを調べた。腰椎レベルのくも膜下腔にgreen fluorescence protein(GFP)で標識したMSCsを注射して直後の脊髄切片でHE染色を行い、注入針が硬膜とくも膜を貫通し、穿通した硬膜とくも膜を通して細胞がくも膜下腔に入っていることを確認した。また、免疫染色を行ったところ、その細胞はGFP陽性だったため、MSCsであることがわかった。このように、MSCsをくも膜下腔に入れるという実験手技の正確性を確認したため、MSC髄腔内投与1時間後と3日後に脊髄のパラフィン切片を作製し、GFPで標識されたMSCsの局在を調べた。MSCs投与の1時間後に、GFPで標識されたMSCsが神経根のMBP陽性軸索に隣接した領域に認められ、MSC投与3日後の切片でも、GFPで標識されたMSCsが前根の軸索の領域で確認された。

以上のように髄腔内投与したMSCsが軸索に到達することがわかったため、MSCs髄腔内投与がもた

らすSCA1-KIマウスの運動神経変性に対する進行軽減効果を調べることにした。投与時期はSCA1-KIマウスの軸索変性が出現し始める時期である5週齢に設定した。ハミルトンシリンジを用いて5週齢SCA1-KIマウスに 3×10^3 個のMSCsを1回頸部髄腔内注射し、7ヶ月齢で脊髓運動神経軸索と髄鞘両方の変性進行抑制を評価した。脊髓切片に対して前述の方法で軸索と髄鞘の大きさの定量を行い、WTマウス、未処置SCA1-KIマウスのそれらと比較することにより評価した。未処置のSCA1-KIマウスではWTマウスよりも軸索と髄鞘が小さく、MSCsで処置したSCA1-KIマウスは未処置のSCA1-KIマウスに比べて軸索も髄鞘も有意に大きかった。つまり非症候性の段階でMSCsを投与することで、SCA1-KIマウスにおける末梢神経系における軸索と髄鞘の変性の進行が抑制された。

SCA1患者と同様に、SCA1-KIマウスにおいても軸索を取り囲む髄鞘の変性がみられることを私は過去に報告した。しかし、髄鞘の変性が一次的に起こるのか、軸索変性の二次的な結果なのかは不明であった。これを明らかにするため、本研究ではSCA1-KIマウスにおける運動神経軸索と髄鞘の変性の継時的な変化を調査し、軸索変性が髄鞘の変性よりも早期に起こることを発見した。これは初めに起こった軸索障害が二次的な脱髄を引き起こすという角田らが提唱したインサイドアウトモデルを支持していると考えられる。

今回のMSCsによるモデルマウス神経細胞の形態的な改善は、近年報告されたSCA患者の症状改善に対するMSCsの有効性の論文の理論的基礎になると思われる。また本研究において移植されたMSCsは 3×10^3 個のみであったため、MSCsが末梢神経系において神経の変性を抑制するメカニズムは、MSCsの神経細胞やグリア細胞への直接分化ではなく、MSCsから放出される栄養因子による作用であると考えerほうが自然である。この仮説を証明するために、SCA1モデルマウスに対するMSC培養上清による治療効果を調べるプロジェクトを現在行っている。