

# 論 文 内 容 要 旨

The endoplasmic reticulum stress transducer old astrocyte specifically induced substance positively regulates glial scar formation in spinal cord injury

(脊髄損傷における小胞体ストレスセンサー-old astrocyte specifically induced substance のグリア瘢痕形成の調整)

NeuroReport, 2018, in press.

主指導教員：安達 伸生教授

(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：久保 忠彦准教授

(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

住田 佳應

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【目的】

細胞内でのタンパク質の正常な成熟が阻害されると、小胞体内に不良タンパク質が蓄積する。この状態は小胞体ストレスと呼ばれ、長時間持続すると、細胞は死に至る。小胞体にはストレスを感知するセンサーが存在し、ストレスによってセンサーが活性化されると、小胞体分子シャペロンの誘導、タンパク質の発現の抑制、小胞体関連分解を促進して蓄積した不良タンパク質を排除する Unfolded protein response (UPR) と呼ばれる小胞体ストレス応答が引き起こされる。OASIS (old astrocyte specifically induced substance) はアストロサイトに特異的に発現するストレスセンサーとして知られており、胎児脳においては、小胞体ストレスによって OASIS が活性化されると、神経前駆細胞の分化を促進することも報告されている。また、脊髄損傷後に生じるアストログリオシスは、外力による一次損傷に引き続いて起こる虚血や浮腫、炎症性変化などに伴う二次損傷を抑え込む役割を果たす。その一方で、神経軸索再生の阻害因子となるという短所も有する。そこで、我々は、脊髄損傷時のアストロサイトにおける OASIS の果たす役割の解明が脊髄損傷に対する新たな治療戦略の切り口になるのではないかと考えた。本研究では OASIS ノックアウトマウスの脊髄損傷モデルを用いて、OASIS を介した小胞体ストレス応答が脊髄損傷後の運動機能回復と組織修復機転に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】 10 週齢の C57BL/6 マウス (wild-type: WT) と OASIS ノックアウトマウス (knockout: KO) を用いて、第 10 胸椎椎弓切除後、Infinite Horizontal Impactor (70kdy; Precision Systems and Instrumentation, Lexington, KY) を用いて、胸髄損傷モデルを作製した。後肢運動機能を Basso mouse scale (BMS) scoring を用いて評価した。また、損傷脊髄の凍結組織切片を作製し、組織学的に評価した。免疫組織染色を用いて、アストロサイトを glial fibrillary acidic protein (GFAP)、神経前駆細胞を Nestin、マクロファージを F4/80、再生軸索を 5HT、瘢痕形成アストロサイトを N-cadherin、オリゴデンドロサイトを myelin basic protein (MBP)、アポトーシスを cleaved casase-3 で、核の染色は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて免疫染色した。損傷部中心のアストログリオシス内の集積したマクロファージの F4/80 で染色し、面積を計測した。損傷部における GFAP と N-cadherin 共陽性のグリア瘢痕の面積も比較検討した。さらに、MBP と cleaved casase-3、DAPI が共陽性であるアポトーシスするオリゴデンドロサイトの面積を二群間で比較検討した。中心管周囲において、GFAP と Nestin 共に陽性の神経前駆細胞を評価した。また、再生軸索は損傷部とその尾側 500 $\mu$ m の地点の 2 か所でそれぞれ 5HT 陽性領域の面積を計測し、比較検討した。面積の計測は、すべて画像解析ソフトウェアの ImageJ を用いて行った。

【結果】 BMS は、受傷直後は WT 群、KO 群とも平均  $0 \pm 0$ 、受傷後 7 日目では WT 群で平均  $1.9 \pm 1.1$ 、KO 群で平均  $3.2 \pm 1.2$ 、14 日目では WT 群平均  $3.3 \pm 0.8$ 、KO 群平均  $4.4 \pm 0.9$ 、42 日目には WT 群平均  $4.0 \pm 0.9$ 、KO 群平均  $5.0 \pm 0.7$  となり、KO 群で有意に良好な運動機能改善を認めた。損傷後 7 日の免疫染色にて、両群共に、中心管の周囲に GFAP および Nestin 共陽性の反応性アストロサイトを認めており、アストロサイトの発生には明らかな差を認めなかった。損傷後 14 日では、両群共に、F4/80 陽性マクロファージがグリオシスによって囲まれており、

F4/80 陽性の面積に有意差を認めず、アストロサイトの遊走にも差は無いと考えられた。一方、損傷後 42 日目において、KO 群では GFAP および N-cadherin 共陽性のグリア瘢痕の面積が WT 群に比べて有意に小さく、損傷部尾側の 5HT 陽性の軸索を有意に多く認めた。また、損傷部周囲の cleaved caspase-3 陽性の MBP 陽性オリゴデンドロサイトが KO 群において有意に少なかった。

#### 【考察】

OASIS の欠損は脊髄損傷後のアストロサイトの発生や遊走には関与しないが、損傷部周囲の N-cadherin 陽性の瘢痕形成アストロサイトへの変化を抑制し、軸索伸展を促進した。さらに、結果として損傷部周囲での軸索の脱髄も抑制したと考えられた。OASIS を介した小胞体ストレス応答は、軸索伸展を阻害する N-cadherin 陽性アストロサイトによるグリア瘢痕の形成を促進し、結果的に損傷部周囲の軸索伸長の阻害や軸索の脱髄につながると考えられた。損傷後の脊髄再生において、最大のハードルがグリア瘢痕であり、アストログリオシスのコントロールが一番の関心事となっている。OASIS とアストログリオシスとの関係を解明することは、脊髄損傷に対する新たな治療開発の大きな一歩となる可能性がある。