

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02903

研究課題名(和文)重症病態における神経再生阻害因子RGMの機能解明とRGMを標的とした治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of functional involvement of RGM, an inhibitory factor for neuronal regeneration, and development of RGM-targeted therapy in critical illness.

研究代表者

松本 直也 (Matsumoto, Naoya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：50359808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：RGMaは神経再生阻害因子である。その機能抑制にて、脊髄損傷後の機能回復が促進される。本研究では外傷性脳損傷におけるRGMa mRNA発現を、マウス頭部外傷モデルを用いて解析したものである。炎症サイトカインの上昇に一致してRGMaとその受容体Neogeninは1日目に最も発現が抑制され、3日目まで有意差をもって低下し、その後正常レベルまで回復した。炎症環境がRGMaとNeogeninの発現を抑制し内在性の神経再生を誘導しようとするものの、速やかなRGMaシグナルの回復により脳損傷修復が阻害されるものと推測された。RGMaは新たな外傷性脳損傷回復の治療標的となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭部外傷によって引き起こされる脳損傷は恒久的な後遺症を残し、患者や家族の心理的、経済的負担は甚大である。高齢化社会を迎えた今、頭部外傷患者が増加の一途をたどっており社会的な問題となっている。哺乳類の中脳神経は一旦損傷すると再生しない。幹細胞移植を代表とする再生医療が華やいているが、期待したレベルまでの成果が得られていない。本研究により、神経再生阻害因子であるRGMaが脳損傷にตอบสนองしてダイナミックな発現変化を示し、超急性期にRGMa機能を抑制することで神経再生・保護が促進される可能性が示唆された。すでに脊髄損傷に対して臨床試験が進められている抗RGMa抗体治療の頭部外傷への拡大応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：RGMa is a key protein to regulate nerve regeneration negatively. Its inhibition enhances axonal growth and promotes functional recovery in spinal cord injury. The purpose of this study is to clarify traumatic brain injury-responsive RGMa expression in a murine model. mRNA expressions of inflammatory cytokines were remarkably increased at day 1 and gradually decreased over time. mRNA expressions of RGMa and its receptor, Neogenin were significantly suppressed in the damaged cortex until day 3. RGMa expression was suppressed most at day 1 and up-regulated over time. In the acute phase, RGMa and Neogenin were significantly decreased under inflammatory milieu. Contrary to the subsequent inflammatory remission, RGMa expression recovered rapidly to normal level. Intrinsic regenerative response to acute brain injury might be hampered by following up-regulation of RGMa, hinting the possibility of functional RGMa inhibition as a new effective maneuver against traumatic brain injury.

研究分野：救急医学

キーワード：RGMa 頭部外傷 neogenin 再生医療 ミクログリア 脳損傷 炎症 マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭部外傷によって引き起こされる脳損傷は、麻痺や失語、嚥下障害、意識障害等の恒久的な後遺症を残し、患者や家族の心理的、経済的負担は甚大なものである。特に高齢化社会を迎えた今、転倒、転落、交通事故による頭部外傷患者が増加の一途をたどっており、社会的な問題となっている。哺乳類の中枢神経は一旦損傷すると再生しない。これを克服するための再生医学が華やいでいる。幹細胞移植治療が代表例だが、なかなか臨床応用への道が拓かれない。損傷時から、患者に適合した細胞の移植までに時間がかかり得ることが一つの問題点である。損傷部環境が幹細胞の再生誘導を阻害している可能性もある。再生を促進する方向性に力を注いでも個体の再生応答力には限界があることも示唆されている。個体の老化時に特に顕著であるが、むしろ臓器の恒常性を維持するために本来個体に備わっている再生阻害因子が、再生応答が要求される状況に直面してもその優位性を堅持しているのではないだろうか。我々は、臓器損傷からの効率的な再生を図るには、再生因子を賦活化するだけでなく、再生阻害因子を失活化することが必要であるという発想に至った。

(2) 1990年代後半から中枢神経系再生システムの解明研究が盛んとなった。当初は NGF, BDNF, IGF 等の神経幹細胞の維持・分化を促進する因子群に注目が集まっていたが、2000年以降、Nogo を代表とする中枢神経再生阻害因子群の発見を契機に、これらの阻害因子の機能をブロックすることが神経再生に重要であることが認識され始めた。Repulsive guidance molecule (RGM)は発生の途上で神経の回路形成を制御する因子として同定された。RGM はその受容体である Neogenin を介して、神経細胞の軸索誘導を阻害し、神経細胞のアポトーシスを誘導する。2006年になりラット脊髄損傷モデルにおいて、RGMa が損傷神経細胞の軸索再生阻害因子であり、抗 RGM 中和抗体を投与すると神経再生が促進されることが発見された。しかし、頭部外傷を含めた脳損傷における RGM シグナル動態は国内外を含めて未だ解析されておらず、我々は頭部外傷においても抗 RGM 抗体治療が有効ではないかと考えた。

2. 研究の目的

RGMa は神経再生を阻害する因子として注目されてきた。RGMa の発現を抑制すると、細胞レベルの実験では損傷を受けた神経の軸索伸張が促進することが、動物実験においては脊髄損傷後の神経機能が回復することが示されている。また、RGMa 発現は炎症機構と連動していることも明らかにされてきた。しかし、頭部外傷における RGMa 発現の動態が示された研究は皆無であった。本研究では、マウスの頭部外傷モデルを用いて、損傷脳局所における炎症に関連するマーカーと RGMa シグナル関連分子の遺伝子発現を経時的に評価し、頭部外傷に対する新たな治療戦略を提示するものである。

3. 研究の方法

(1) **動物実験**：すべての動物実験は長崎大学動物実験委員会の承認のもと、動物実験規約を遵守して行われた。本研究の評価のために使用された動物は、Charles River Laboratory Japan 社から購入した 8-12 週齢の C57BL/6J マウスである。頭部外傷実験前の少なくとも 5 日間は環境に慣れるために動物実験施設にて飼育され、飲水、摂食は自由にした。頭部外傷後の二次性脳損傷の伸張にエストロゲン周期が影響するという報告がなされているため、雄のみを使用した。頭部外傷モデルは Controlled cortical impact 装置を用いて作成された。メドトミジン(0.75mg/kg)、ミダゾラム(4mg/kg)、ブトルファノール(5mg/kg)の3種混合薬による鎮痛・鎮静下ですべての手技が行われた。脳定位固定装置を用いて頭部外傷部位の再現性を担保した。頭蓋骨の直視下、プレグマから 2mm 外側の右側にドリルにて 4mm 径で穿頭し硬膜を露出した上で、インパクト装置を用いて 4.0-4.5m/s の速度で径 3mm、深度 1mm の脳損傷を誘導した。穿頭部は閉鎖し、頭皮を縫合してアチパメゾール(0.75mg/kg)にてリバースをかけた。シャム群は、上記過程においてインパクト装置による脳損傷以外のすべての手順を経たものとした。

(2) **サンプル調整**: 損傷群, シャム群の両者ともに, それぞれ 1, 3, 7, 14 及び 21 日目に損傷を評価するグループに分けた。いずれのマウスもシリンダーテストによる神経学的評価を行なった後に二酸化炭素投与にて安楽死とした。脳を取り出し, 右側の損傷部領域とその対側となる左側領域を切り分けて RNAlater にて保存した。損傷部に関しては周囲 2-3mm を, 非損傷部は対称域を 4mm 辺の正方形にカットして組織を摘出した。

(3) **RT-PCR を用いた定量的な遺伝子発現解析**: 各組織をホモジナイズした上, RNeasy Mini Kit で total RNA を抽出した。Prime-Script RT Reagent Kit で cDNA に逆転写した後に, SYBER Premix EX Taq II を用いてリアルタイム PCR を施行した。相対定量のために使用したハウスキーピング遺伝子は Rps18 である。今回, 定量の対象とした遺伝子は, RGMa とその受容体である neogenin, 炎症性サイトカインとして IL-1 β , IL-6, TNF- α , ケモカイン受容体として CCR2, それぞれマクロファージ, 活性化ミクログリアのマーカーである CD11b と Iba1 である。

(4) **シリンダー・テスト**: 頭部外傷後の神経学的評価としてシリンダー・テストを施行した。これは, 左右の上肢の使用頻度の非対称性を評価するものである。マウスを 9cm 径の高さ 16.5cm の透明なシリンダー内に静置し, 後足立ちした時に手掌全体が壁に接触した回数を計測した。(左前足接触回数 + 総前足接触回数) / (右前足接触回数 + 総前足接触回数) をスコア値とした。

(5) **統計解析**: 統計学的解析は GraphPad Prism version 8.0 で行い, 標準偏差で表記した。一元配置分散分析で多重比較を行い, Dunnett 法で post hoc 検定をした。p 値が 0.05 未満を統計学的有意とした。

4. 研究成果

(1) **RGMa と neogenin mRNA 発現の経時的変化**: 脳損傷部における RGMa mRNA の発現は, 損傷 24 時間後に急速に低下し最低値を示した。その後, 少なくとも損傷 3 日目までは有意な発現低下を認めたが, 経時的に増加し損傷 7 日目までには有意差なく正常レベルまでに回復していた。14 日目には, 有意差は無いものの更なる増加傾向にあった (Fig. 1A)。RGMa 受容体である neogenin の mRNA 発現は, 24 時間後から有意に減少し 3 日目に最低値を示した。7 日目までは有意に減少していたが, 損傷 14 日目には発現の正常化が認められた (Fig. 1B)。一方, 損傷部とは対側対象部の大脳皮質領域では RGMa, neogenin 共にむしろ一過性に発現が上昇する時期があったが, 有意な低下は示さなかった (Fig. 1A, B)。

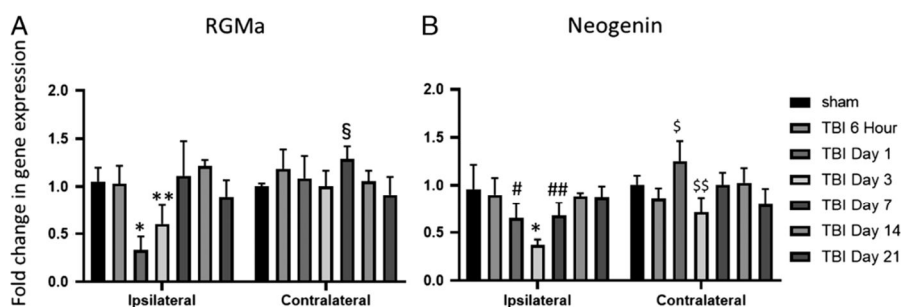


Figure 1. Time-course change of repulsive guidance molecule a (RGMa) and neogenin messenger RNA (mRNA) expression (sham, n = 12; TBI at 6 hours and days 1, 3, 7, 14, and 21 n = 6 each). The mRNA of RGMa expression (A) was suppressed most at day 1 and remained significantly decreased until day 3 in the damaged cortex. The RGMa expression then increased over time after injury and returned to the same level as that in the sham group at day 7. In contrast, the expression of RGMa did not show a similar change in the contralateral cortex as that occurring in the injured cortex. The RGMa in the contralateral cortex did not decline significantly after the injury. In the damaged cortex, mRNA of neogenin expression (B) was decreased after controlled cortical impact, minimized at day 3, and gradually recovered to the same level as the sham after day 7. However, the expression of neogenin did not show a similar change in the contralateral cortex as that occurring in the injured cortex. Data are shown as mean \pm SD. *Indicates significant difference between sham, 6 hour, and day 7, 14, 21. **Indicates significant difference between sham, 6 hour, day 7, 14. §Indicates significant difference between sham, day 3, 21. #Indicates significant difference between sham, 6 hour. ##Indicates significant difference between sham. \$Indicates significant difference between sham, 6 hour, day 3, 7, 21. \$\$Indicates significant difference between sham, day 1, 7, 14.

(2) 炎症性サイトカインの mRNA 発現の経時的变化：損傷大脳皮質部における炎症を評価するために、代表的な炎症性サイトカインである TNF- α , IL-1 β , IL-6 の mRNA 発現を経時的に測定した。いずれのサイトカインも損傷 6 時間後には急速に発現が増加し, TNF- α と IL-6 においては有意差が示された (Fig. 2A, C)。IL-1 β と IL-6 に関しては増加傾向は有意差を持って 1 日目までは持続し (Fig. 2B, C), 3 日目までにはいずれのサイトカインも急速に元のレベルまで発現が低下していた。外傷性脳損傷に引き続いて急激に炎症が誘導される一方で, 比較的速やかに炎症が鎮静化することがわかった。興味深いことに, この動態は RGMa, neogenin とは相反する関係にあった。損傷対側の大脳皮質においては上記炎症性サイトカインの発現は認められなかった。

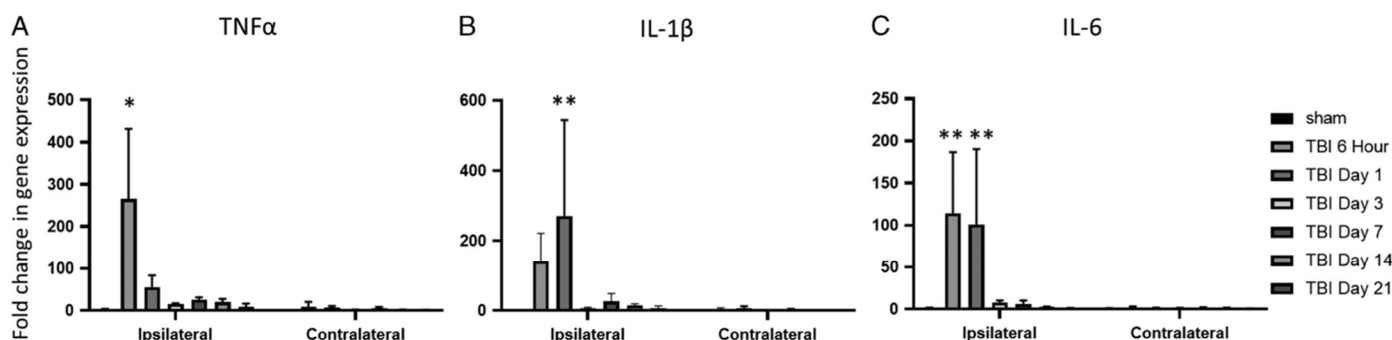


Figure 2. Time-course change of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA) expression (sham, $n = 12$; TBI at 6 hours and day 1, 3, 7, 14, and 21, $n = 6$ each). To confirm TBI-induced inflammation within the cortex, the mRNA expression of the representative inflammatory cytokines was measured. The mRNA of TNF- α (A), IL-1 β (B), and IL-6 (C) was remarkably increased at 6 hour and day 1 and then decreased over time in the damaged cortex. The contralateral cortex did not show a marked increase in the inflammatory cytokines compared to the injured cortex. Data are shown as mean \pm SD. *Indicates significant difference between sham, day 1, 3, 7, 14, 21. **Indicates significant difference between sham, days 3, 7, 14, 21.

(3) 損傷部におけるミクログリア活性化とマウロファージ浸潤：RGMa に関する先行研究報告や, 我々が予備実験として行った頭部外傷脳標本の組織学的検索から, RGMa の発現源としてミクログリア, 並びに脳血管関門破綻で浸潤し得るマクロファージが代表候補に挙げられた。発現評価用の細胞マーカーとして前者は Iba1 を, 後者に対しては CD11b と CCR2 を選択した。CD11b と CCR2 は有意差を持って損傷後 1 日目から 7 日目まで増加していた。その後徐々に発現は減少するものの, 評価を行なった最長の 21 日目まで高値を示していた (Fig. 3B, C)。一方, Iba1 の発現は損傷 24 時間後には急速かつ著明に低下した。この有意な低下は 3 日目まで持続し, その後徐々に正常レベルまで増加を続けた (Fig. 3A)。この動態は RGMa の発現に酷似するものであった。CD11b, CCR2, Iba1 のいずれに関しても, 対側大脳皮質において損傷 7 日目に一過性の有意な発現増強が認められた (Fig. 3)。

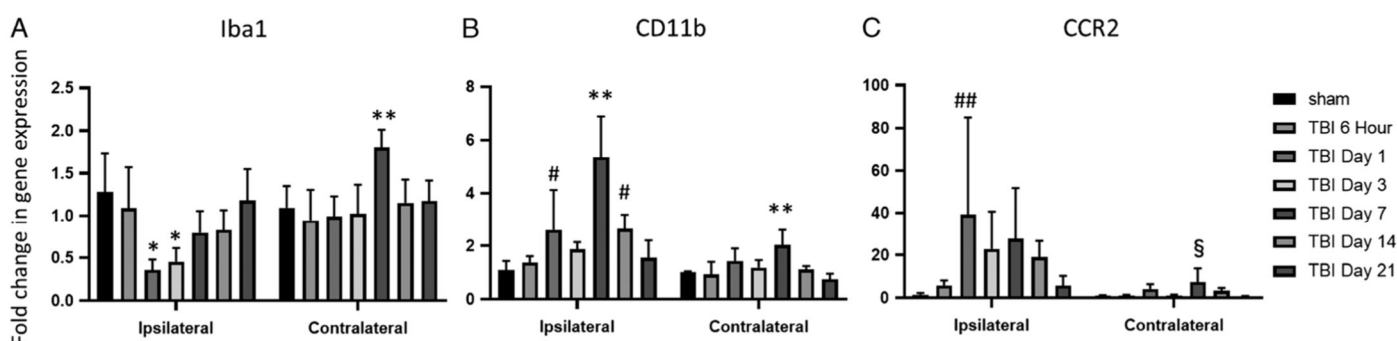


Figure 3. Time-course change of messenger RNA (mRNA) expression of monocyte markers (sham, $n = 12$; TBI at 6 hours and days 1, 3, 7, 14, and 21, $n = 6$ each). We chose monocyte markers Iba1 for microglia and CD11b and CCR2 for reactive macrophages. To analyze the cells from which RGMa is expressed and in which inflammation is induced, their monocyte markers were measured and compared. The mRNA levels for Iba1 (A) were decreased after controlled cortical impact, suppressed most at day 1, remained significantly decreased until day 3, and then increased over time after injury in the damaged cortex. The mRNA of CD11b (B) and of CCR2 (C) was significantly increased from day 1 to day 7 and gradually decreased over time but maintained consistently higher values at all experimental time points. In the contralateral cortex, Iba1 (A) did not show an early postinjury decline as in the injured cortex, although it increased significantly on day 7. CD11b (B) and CCR2 (C) in the contralateral cortex were elevated only on day 7. Data are shown as mean \pm SD. *Indicates significant difference between sham, 6 hour, day 21. **Indicates significant difference between sham, 6 hour, day 1, 3, 14, 21. #Indicates significant difference between sham. ##Indicates significant difference between sham, 6 hour, day 21. §Indicates significant difference between sham, 6 hour, day 3, 21.

(4) シリンダーテスト：神経学的スコアは、シャム群に比し頭部外傷群では損傷 6 時間後から評価の最長期間である 21 日目まで有意に低下をしていた。本研究で展開した頭部外傷モデルの確からしさが示された (Fig. 4)。

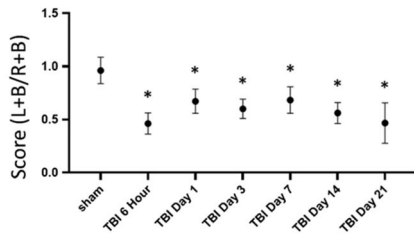


Figure 4. Cylinder test (sham, n = 12; TBI at 6 hours and days 1, 3, 7, 14, and 21, n = 6 each). We used the cylinder test to evaluate neurobehavioral functions in each mouse at 6 hours and 1, 3, 7, 14, and 21 days following TBI. The neurological score was consistently lower in the controlled cortical impact group compared with the sham group throughout the experimental period. Data are shown as mean \pm SD. *Indicates significant difference between sham.

(5) 頭部外傷における RGMa 発現動態変化の意義：以上の結果から，外傷後に強い炎症が誘導される脳損傷部において RGMa の発現が一時的に抑制され，炎症の軽減と共にその発現が急速に回復することが明らかになった。今までに，脳梗塞や脊髄損傷において RGMa の発現が増強することが示されてきたが，脳損傷の超急性期に RGMa の発現が一過性に抑制されることを示したのは本研究が初めてである。RGMa-neurogenin シグナルは，発達を終えた正常脳の機能維持のために，余計な神経回路が構築されないようにするための安定化因子である。脳損傷後の一過性の低下は，生物が本来内在している神経再生のためのスイッチングになっているのではないかと考察した。一方，RGMa 発現はその後急速に正常レベルまで回復する。RGMa は様々な免疫担当細胞において発現し，炎症を制御する機能を有していることがわかっている。炎症に伴う組織損傷を契機に再生機構が誘導される反面，炎症の収束過程として中枢神経環境を安定化させるために RGMa の発現回復が合理的に誘導されるものと考えられる。正常レベルの RGMa がすでに再生障害に働いていることを鑑みると，RGMa の発現が回復する損傷後 7 日目までに RGMa 発現を制御することが，中枢神経再生への治療介入として重要であることが本研究により明らかになった。外傷性脳損傷に引き続き，CD11b と CCR2 の発現がしばらくの間増加することが確認された。脳血管関門の破綻に伴いマクロファージが血中から損傷脳組織へ移行し，サイトカインを産生しながら炎症環境を増強していると考えられる。一方，本研究における Iba1 の発現経過から，同じ単球系であり脳に内在するミクログリアに関しては，脳損傷の超急性期にその活性化が抑制されることが示唆された。先行する脊髄損傷モデルの動物実験では，ミクログリアから RGMa が発現されることが確認されている。また，LPS にて活性化されたミクログリアの RGMa が神経突起や軸索の伸長を抑制することが明らかにされている。本研究より，頭部外傷においては，一時的にミクログリアの活性化が抑制されるものの，持続する炎症により RGMa 発現が回復して，中枢神経再生を阻害するものと考えられた。以上から本研究により，頭部外傷に伴う脳損傷に対して超急性期から RGMa の発現を制御することで，損傷脳の回復が得られる可能性が示唆された。すでに脊髄損傷に対して臨床試験が進行している抗 RGMa 抗体投与治療が現実的な有力候補となり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uemura Eri, Tajima Goro, Murahashi Shimon, Matsumoto Naoya, Tokunaga Ayako, Miura Miyuki, Murase Takehiko, Ikematsu Kazuya, Tasaki Osamu	4. 巻 90
2. 論文標題 The expression of repulsive guidance molecule a after traumatic brain injury: Time-course changes in gene expression in a murine model of controlled cortical impact	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Trauma and Acute Care Surgery	6. 最初と最後の頁 281 ~ 286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TA.0000000000003041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Eri Uemura, Goro Tajima, Naoya Matsumoto, Ayako Tokunaga, Miyuki Miura, Takehiko Murase, Kazuya Ikematsu, Osamu Tasaki
2. 発表標題 The Expression of Repulsive Guidance Molecule A (RGMA) After Traumatic Brain Injury: The Time-Course Gene Expression Changes in the Murine-Controlled Cortical Impact Model
3. 学会等名 79th Annual Meeting of AAST & Clinical Congress of Acute Care Surgery (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上村恵理, 田島吾郎, 村瀬壮彦, 村橋志門, 梅原敬弘, 松本直也, 池松和哉, 田崎修
2. 発表標題 頭部外傷モデルにおける神経阻害因子RGMa発現の経時変化
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田島 吾郎 (Tajima Goro) (00437427)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田崎 修 (Tasaki Osamu) (90346221)	長崎大学・病院(医学系)・教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関