

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500328
 研究課題名（和文） 神経損傷における分子画像診断法の確立：細胞移植療法後のアロジニアの解析
 研究課題名（英文） In vivo molecular imaging for nerve injury

研究代表者
 石井 賢 (ISHII KEN)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：00276289

研究成果の概要：Glial fibrillary acidic protein(GFAP)プロモータ下に firefly luciferase (fluc) を発現するマウスを使用した坐骨神経損傷モデルにおいてシュワン細胞が GFAP を発現し、再髄鞘化に寄与していた。また Cox2 プロモータ下に fluc を発現するマウスを用いた痛みの可視化実験では、神経圧挫モデルにおいて損傷部から末梢部にかけて Cox2 の発現が確認できた。また神経損傷部位の炎症部位の特定に蛍光プローブを用いることで、その可視化が可能であった。以上のように神経損傷における分子画像診断法は今後の臨床応用も含め極めて重要な手法の一つである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：in vivo imaging、分子画像診断、炎症、痛み、神経損傷、シクロオキシゲナーゼ - 2 (Cox2)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷や脳虚血などの中枢神経損傷や末梢神経損傷に対する各種幹細胞を用いた移植療法の有用性が報告されている。研究代表者が所属する慶大整形外科と生理学研究チームは、rat や monkey を用いた神経損傷動物において神経幹細胞移植による運動機能回復を報告し、世界的に高く評価された。今後は、各種幹細胞の移植効果や動態解析、損傷した神経の病態解明のために種々の画像

診断法の応用が必要不可欠である。

In vivo imaging の進歩は、生きた動物において非侵襲性かつリアルタイムに遺伝子発現や細胞の追跡を可能にした。発光酵素である firefly luciferase(fluc)とその基質である luciferin の反応による微弱な発光を超高感度 CCD カメラにより検出する bioluminescence imaging (BLI) は imaging 法の中で最も注目されている手法の 1 つで

ある。研究代表者と Weissleder 教授 (MGH) らは mouse の脳虚血モデルにおける移植神経幹細胞の動態を BLI を用いて評価し、報告した (Stroke, 2004)。その後、研究代表者らは脊髄損傷モデルにおける移植神経幹細胞の動態解析を報告した (FASEB J, 2005)。また、蛍光イメージング法も同様に、様々な遺伝子発現や種々の蛍光発光を検出可能で、移植細胞の生体内での分化や増殖、様々な遺伝子発現をも検出可能である。複数の蛍光を同時に観察できることや各種蛍光プローブを使用できることがこの system の最大の利点である。一方、Magnetic Resonance Imaging (MRI) はこれらのイメージングと比較して解像度が高いことが特徴である。Weissleder 教授は、dextran cross-linked iron oxide (CLIO)-tat などの Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIO) を開発し、標識した骨髄系幹細胞の *in vivo* imaging を実現した。

2. 研究の目的

そこで本研究の目的は、損傷神経における遺伝子・蛋白発現の可視化と各種治療効果における画像診断法の確立である。具体的には研究開始当初の背景で述べた各種イメージング法を利用して、神経損傷における損傷部の遺伝子・蛋白質の可視化と画像診断の確立に最も重点を置き、研究を遂行した。

3. 研究の方法

1) 坐骨神経を用いた外傷性末梢神経障害において、Glial fibrillary acidic protein (GFAP) プロモータ下に fluc を発現する mouse を使用した GFAP のリアルタイムの発現とその意義について検討した。

2) 外傷性末梢神経障害における痛みとアロジニアの可視化を実施するため、シクロオキシゲナーゼ - 2 (Cox2) 遺伝子プロモータ

下に fluc を発現するトランスジェニックマウスを購入し、その発現を経時的に観察した。

3) 末梢神経損傷モデルに引き続いて起こる炎症の可視化を各種特異的蛍光プローブを用いて評価した。

4. 研究成果

1) *In vivo* imaging による解析では、損傷直後より坐骨神経損傷部位から末梢にかけて GFAP 遺伝子の発現が観察された。Photon counts による定量分析では、遺伝子発現は 2 日でピークに達し、その後約 1 ヶ月かけて緩やかに減少していた (図 1)。

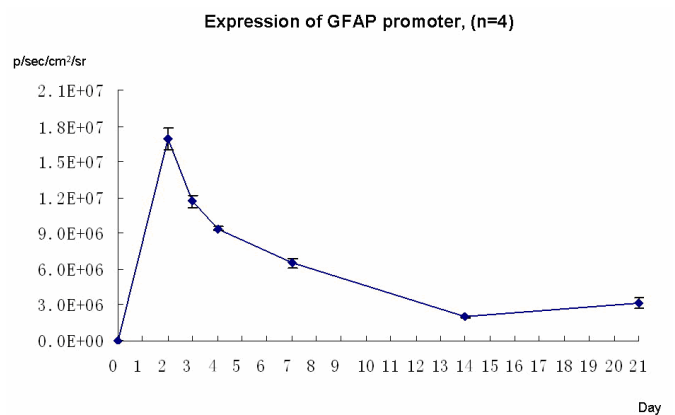


図 1 損傷坐骨神経における経時的 GFAP 発現。

組織学的検討では、損傷 3 日をピークに損傷付近から末梢にかけて多くの細胞浸潤が観察され、それらは炎症性細胞や GFAP 陽性細胞であった。損傷 7 日では、より多くの GFAP 陽性細胞が存在しその多くは promyelinating シュワン細胞の転写因子である Oct6 (SCIP) を発現していた。損傷 14 日では、多くの GFAP 陽性細胞が myelinating シュワン細胞の転写因子である Krox20 を発現していた。また、Western blot 法による蛋白発現は、これらの免疫組織学所見を反映していた。また、電子顕微鏡においても GFAP 陽性細胞によるミエリン形成が確認された。成体の末梢神経における GFAP

は, non myelinating シュワン細胞のマーカーの1つとして知られている。今回の結果より、成体末梢神経損傷後の GFAP 陽性細胞は、myelinating プロセスに關与する転写因子を発現していたことから、再髓鞘化に關与している脱分化したシュワン細胞の可能性が示唆された。

2) Cox2遺伝子プロモーター下にflucを発現するトランスジェニックマウスにおいて各種坐骨神経損傷(切断、圧挫)を作製後、経時的にflucの発現を観察した。しかしながら、マウスにおいていくつかの臓器にCox 2発現が観察されたため、神経損傷部でのfluc発現の詳細な検討が不可能であった。そこで、Zenogen社と協力して組織別の発現を調査し、脳や腸管などの組織での発現を確認した(表1)。

	Luc(u/mg) COX2-luc
Liver	0.31
Spleen	1.60
Kidney	1.55
Heart	7.51
Lung	9.60
Intestine	89.57
Brain	2104.66
Skin	28.15
Muscle	20.57

表1 Cox2-luc マウスにおける組織別Cox2発現

表に示すごとく、通常に状態でも特に脳と腸管においてCox 2が発現していることが確認できた。神経損傷モデルにおいては、それらの発現抑制法を試行錯誤し、一定期間の絶食期間をもうけることにより腸管のCox2発現の抑制に成功した。この環境下において各種坐骨神経損傷モデルを作成した。神経切断モデルにおいては明らかなCox 2の発現が損傷部には観察されなかったが、神経圧挫モデルにおいては損傷部を中心にその末梢への

シグナルが検出された。

3) 2)で示した各種坐骨神経損傷モデルを用いて各種プローブ投与後に蛍光イメージング法を用いて損傷部の分子発現や炎症を可視化した。この実験において神経炎症部位の特定が可能となり、そのプローブとその手法については現在国内外への特許出願準備中である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

石井賢、外傷性疾患における分子画像診断法の確立に向けて、医研センタージャーナル、第57号、5-8、2008、査読無

[学会発表](計7件)

Yoshiyuki Ueda, Ken Ishii, Yoshiaki Toyama, Hideyuki Okano, Masaya Nakamura、Self-assembling peptide nanofiber scaffold (SAPNS) reduces the fibrous scar production and promotes regeneration of corticospinal tract fibers in the injured spinal cord、Society for Neuroscience Meeting (USA), Washington DC, Nov. 16, 2008

石井賢、炎症・再生領域におけるIVISを用いた分子画像診断法、第3回IVISユーザー会、11月14日、2008、東京

山田理、石井賢、向野雅彦、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也、顆粒球マクロファージ刺激因子の脊髄損傷に対する治療効果の検討、日本整形外科学会基礎学術総会、10月24日、2008、京都

植田義之、石井賢、戸山芳昭、岡野栄之、中村雅也、ラット脊髄損傷モデルにおける自己組織化ペプチドを用いた軸索再生の試み、日本整形外科学会基礎学術総会、10月24日、2008、京都

Osamu Yamada, Ken Ishii, Masaya

Nakamura, Masahiko Mukaino, Hirotsumi Watabe, Yoshiaki Toyama and Hideyuki Okano、Effects of granulocyte macrophage colony stimulating factor following spinal cord injury in mice、日本神経科学学会、7月10日、2008、東京

Yoshiyuki Ueda, Ken Ishii, Yoshiaki Toyama, Hideyuki Okano, Masaya Nakamura、Self assembling peptide nanofiber scaffold (SAPNS) reduces the fibrous scar production and promotes regeneration of corticospinal tract fibers in the injured spinal cord、日本神経科学学会、7月10日、2008、東京

石井賢, Xin Qi, 岡野 J. 洋尚, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也、末梢神経損傷後の再髄鞘化における GFAP 陽性細胞の役割、日本脊椎脊髄病学会、4月26日、2007、金沢

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 賢 (ISHII KEN)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00276289

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし