

平成21年3月31日現在

研究種目:若手研究(B)
 研究期間:2007~2008
 課題番号:19791023
 研究課題名(和文) 脊髄損傷再生医療における神経栄養因子を用いた内・外因性神経幹細胞の分化制御
 研究課題名(英文) Differentiation control of endogenous and exogenous neural stem cells using neurotrophic factors in spinal cord injury study
 研究代表者
 中嶋 秀明(NAKAJIMA HIDEAKI)
 福井大学・医学部・助教
 研究者番号:10397276

研究成果の概要:筋肉内から軸索流にのり、逆行性に脊髄内へ神経栄養因子を導入する損傷脊髄に非侵襲的な手法を用い、神経保護効果、賦活化効果について検討を行った。本導入方法は、直接導入と遜色ない導入効率を示し、障害高位に応じて target organ (筋)を選択することが可能であった。また、脊髄損傷下では前角細胞のみならずグリア系細胞への導入も可能であることが示唆され、逆行性神経栄養因子遺伝子導入を用いた障害脊髄内の微小環境の改善が、脊髄神経グリア系細胞の神経保護効果、再生能力の賦活化効果、分化誘導などを介して、さらなる脊髄再生、機能回復に繋がるものと予想された。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・整形外科学

キーワード:脊椎脊髄病学

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊髄損傷再生は従来不可能とされてきたが、適切な環境が導入されれば損傷脊髄にも組織再生能があることが認められ、傷害された脊髄組織の再生と機能回復を目的とした様々なアプローチが試みられている。脊髄損傷では内因性の神経栄養因子の欠乏による微小環境の変化が損傷を助長させ再生を困難にしている要因のひとつとされている。そのため損傷脊髄内への神経栄養因子補充は合理的であり、その組織修復効果、軸索伸

長効果については異論ないとされている一方、その投与方法に関しては極めて多くの議論がある。投与方法としては、髄内直接投与、クモ膜下腔投与、経静脈的投与などが報告されているが、それぞれ侵襲性や効率、他臓器への影響などの問題点を抱えている。至適投与方法の検討を要する。

(2) 我々は、脊髄に①非侵襲的②目的部位に効率的に導入③他臓器に影響を与えない、などの点で有利と考えられる muscle (target organ)からの逆行性導入の手法を用い、神経

栄養因子遺伝子の脊髄内導入を試みてきた。この新たな投与方法による脊髄損傷に対する効果、target organ の選択の検討を要する。(3) 逆行性導入による神経幹細胞、内因性因子への影響、分化誘導の可能性についての検討を要する。

2. 研究の目的

(1) target organ から逆行性に導入された神経栄養因子は理論的には軸索流を介し前角細胞に導入され、autocrine, paracrine 機構を介し、周囲の神経グリア系細胞にも賦活化効果をもたらすものと考えられる。本研究では、逆行性導入による各神経グリア系細胞 (neuron, oligodendrocyte, astrocyte, microglia) に対する神経栄養因子導入、賦活化効果について検討した。

(2) 脊髄損傷の高位に応じた target organ 選択の可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物には SD ラット (8-10 週齢, 250-300 gm) を用い、第 3-4 頸椎椎弓切除を行い、硬膜上に 50 gm, 5 分間の圧迫を加えて頸髄圧挫損傷モデルを作成した。損傷後胸骨乳突筋より、 β -galactosidase を組み込んだ非増殖型 adenovirus vector (AdV-LacZ) を注入した。注入後経時的に (3 時間~2 週) 免疫組織学的評価を行った。一次抗体として抗 β -galactosidase 抗体および NeuN, RIP, GFAP, OX-42 を用い、蛍光 2 重染色を行い各種神経細胞に対する直接的な導入効率を検討した。control として椎弓切除のみを行った後に AdV-LacZ を注入した rat を用いた。次に、同頸髄圧挫損傷モデルを用いて、BDNF (brain-derived neurotrophic factor) 遺伝子を組み込んだ非増殖型 adenovirus vector (AdV-BDNF) を胸骨乳突筋に注入し、neuron および oligodendrocyte の apoptosis 抑制効果について検討した。neuron および oligodendrocyte に対する BDNF 導入効率を検討し、apoptosis の評価としては、TUNEL 染色、activate-caspase-3 を用いた蛍光 2 重免疫染色、immunoblot による activate-caspase-3 の半定量を行った。また oligodendrocyte の前駆体の marker である NG2 の免疫染色を行い、oligodendrocyte の分化への寄与を検討した。損傷後、AdV-LacZ を注入した rat を control とした。

(2) 胸骨乳突筋、僧帽筋鎖骨枝、僧帽筋頸椎枝、広背筋、上腕二頭筋、上腕三頭筋、胸腹斜筋、前脛骨筋、腓腹筋の 9 つの筋を target organ の候補とし、それぞれに

β -galactosidase (LacZ) 遺伝子を注入し、注入後 1 週での X-gal 染色にてその分布や導入効率を評価した。

4. 研究成果

(1) 胸骨乳突筋から逆行性に導入された β -galactosidase のほとんどは、control (非損傷 rat) では脊髄灰白質の NeuN 陽性細胞に取り込まれていた。頸髄圧挫損傷モデルでは、neuron のみならず、脊髄後方 (圧挫部) を中心に一部の oligodendrocyte, astrocyte, microglia にも取り込まれていた (図 1)。頸髄圧挫損傷モデルを用いた神経保護効果の検討では、BDNF 注入群では、LacZ 注入群と比較して、BDNF/NeuN, /RIP 陽性細胞が多くみられた。BDNF 導入群では、TUNEL/NeuN, /RIP 陽性細胞数、activated-caspase-3/NeuN, /RIP 陽性細胞数が有意に低く、western blotting では注入後 1 日目以降で activated-caspase-3 の発現低下が認められた (図 2)。また、NG2 の発現は BDNF 注入群で有意に高かった (図 3)。

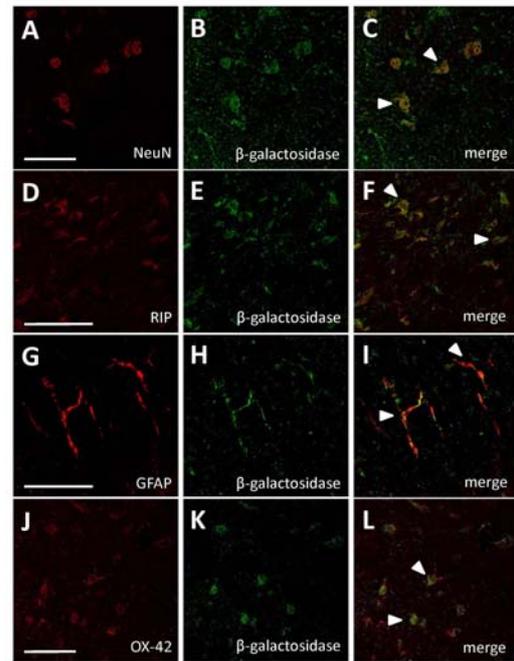


図 1 各神経細胞に対する逆行性導入

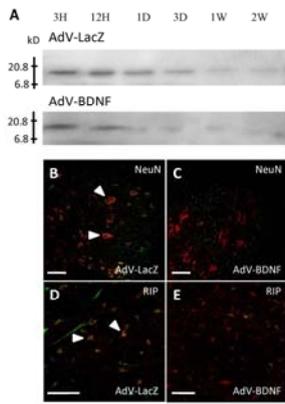


図 2 active caspase-3 の発現

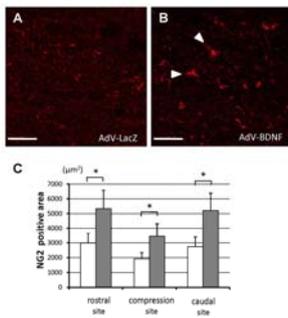


図 3 NG2 (oligodendrocyte 前駆体) の発現

逆行性導入は軸索流を介したアプローチであるため、直接導入は前角細胞のみと考えていたが、興味深いことに脊髄損傷の環境下ではグリア系細胞への直接的な導入も確認された。mechanism は不明であるが、軸索の破綻、astrocyte, microglia の遊走、食食作用など損傷後の脊髄内環境が関与している可能性が考えられる。逆行性導入では、neuron から autocrine, paracrine 機構を介した trophic effects が神経保護効果の主な mechanism と考えられるが、グリア系細胞による trophic effects の助長の可能性も示唆され、neuron や oligodendrocyte の apoptosis 抑制をひとつの機序として、神経保護効果、再生能力賦活化効果をもたらすと考えられた。

(2) 頸髄では胸骨乳突筋および僧帽筋頸鎖骨枝で Nissl 染色陽性細胞数を 100 とすると導入効率 80-90% の高い導入効率を得られた。胸腹斜筋や広背筋からも高い導入効率を得られたが、再現性にはやや乏しい状態であった。上腕二頭筋や上腕三頭筋からはその支配

領域のみに陽性細胞は分布したが、導入効率は約 50% 程度であり、また reactivity も低い状態であった。前脛骨筋や腓腹筋からはほとんど頸髄には導入されなかった (図 4)。

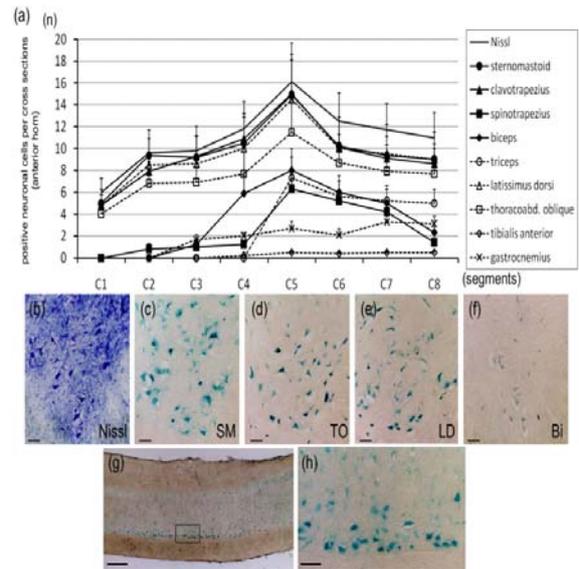


図 4 頸髄への逆行性導入

胸髄は元来前角細胞数が少なく、逆行性導入には不向きな環境と考えられた。胸腹斜筋や広背筋から約 60-70% の導入効率は得られたが、再現性には乏しい状態であった (図 5)。

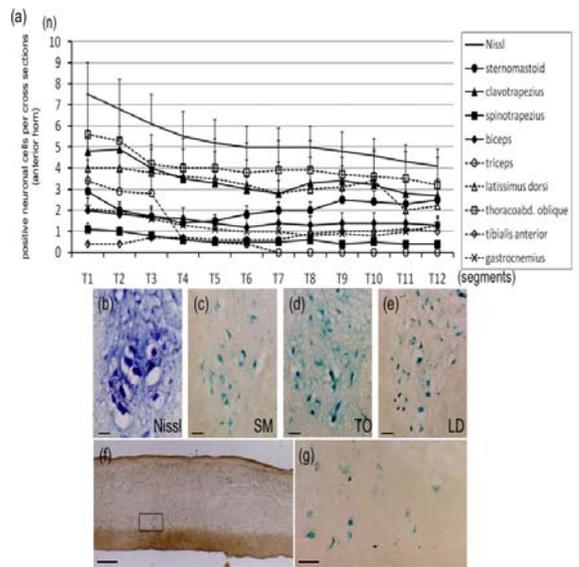


図 5 胸髄への逆行性導入

腰髄へは、前脛骨筋と腓腹筋から 60-80% と高い導入効率を示した。興味深いことに、胸骨乳突筋や胸腹斜筋などからも、導入効率や reactivity は落ちるものの、導入が可能であ

った (図 6)。

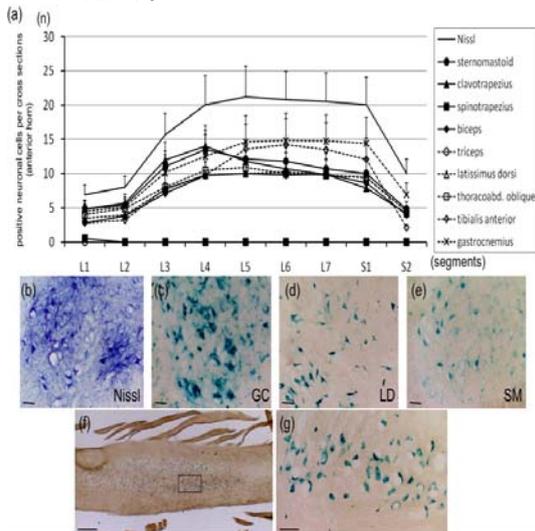


図 6 腰髄への逆行性導入

今回の結果から、至適 target organ は、上中位頸髄には胸骨乳突筋、中下位頸髄には僧帽筋鎖骨枝、腰髄には前脛骨筋もしくは腓腹筋と考えられた。adenovirus vector が非常に強力な retrograde tracer として働くため、解剖学的細胞構築とは異なる segment での発現もみられ、またその発現は直接導入と遜色ない導入効率を示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Uchida K, Nakajima H, Takamura T, Furukawa S, Kobayashi S, Yayama T, Baba H. Gene expression profiles of neurotrophic factors in rat cultured spinal cord cells under cyclic tensile stress. *Spine* 33:2596-2604, 2008 (査読有)
- ② Nakajima H, Uchida K, Kobayashi S, Inukai T, Yayama T, Sato R, Mwaka E, Baba H. Target muscles for retrograde gene delivery to specific spinal cord segments. *Neurosci Lett* 435: 1-6, 2008 (査読有)
- ③ Uchida K, Nakajima H, Inukai T, Takamura T, Kobayashi S, Furukawa S, Baba H. Adenovirus-mediated retrograde transfer of neurotrophin-3 gene enhances survival of anterior horn neurons of twy/twy mice with chronic mechanical compression of the spinal cord. *J Neurosci Res* 86: 1789-1800, 2008 (査読有)
- ④ Nakajima H, Uchida K, Kobayashi S, Inukai T, Horiuchi Y, Yayama T, Sato R, Baba H. Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde

transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene. *J Neurotrauma* 24: 703-712, 2007 (査読有)

⑤ 中嶋秀明. 脊髄損傷に対するアデノウイルスベクターを用いた BDNF 遺伝子導入による神経保護効果. *整形外科* 59: 1330, 2008 (査読有)

⑥ 中嶋秀明, 内田研造, 犬飼智雄, 高村敬晴, 彌山峰史, 佐藤竜一郎, 馬場久敏. twy mouse および SCI model におけるアデノウイルスベクターを用いた BDNF/NT-3 gene transfer の解析. 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究 平成 16 年度総括研究報告書 86-91, 2007 (査読無)

⑦ 中嶋秀明, 内田研造, 犬飼智雄, 高村敬晴, 小林茂, 馬場久敏. 頸髄損傷モデルに対する BDNF 遺伝子逆行性導入による前角細胞保護効果. *中部日本整形外科災害外科学会雑誌* 50: 887-888, 2007 (査読無)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 中嶋秀明 他 脊髄損傷モデルに対する逆行性神経栄養因子遺伝子導入が及ぼす神経細胞保護効果 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 2008 年 10 月 24 日 奈良
- ② 中嶋秀明 他 慢性脊髄圧迫モデル (twy/twy) に対する脊髄前角細胞への選択的神経栄養因子遺伝子導入 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 2008 年 10 月 23 日 奈良
- ③ 中嶋秀明 他 損傷後頸髄神経細胞に対する逆行性神経栄養因子遺伝子導入 第 111 回中部日本整形外科災害外科学会学術集会 2008 年 4 月 12 日 京都
- ④ 中嶋秀明 他 前角細胞への逆行性遺伝子導入における Target Organ の選択 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 2007 年 10 月 26 日 浜松
- ⑤ 中嶋秀明 他 脊髄損傷に対するアデノウイルスベクターを用いた BDNF 遺伝子導入による神経保護効果 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 パネルディスカッション 2007 年 10 月 25 日 浜松

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 秀明 (NAKAJIMA HIDEAKI)
 福井大学・医学部・助教
 研究者番号: 10397276