

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791026

研究課題名（和文） 脊髄損傷におけるケラタン硫酸の意義

研究課題名（英文） Lack of 5D4-reactive Keratan Sulfate Synthesis Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury

研究代表者

伊藤 全哉 (ITO ZENYA)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50447819

研究成果の概要：

マウス脊髄損傷においてケラタン硫酸プロテオグリカン(KSPG)の役割を解明した。一つは損傷部位に集積する KSPG が molecular barrier として新生軸索伸長阻害の役割を果たしていること、また Astrocyte の遊走能を惹起し、Glial scar をより形成してしまい同じく新生軸索伸長阻害の役割を果たしていることが解明された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	1,900,000	300,000	2,200,000

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

キーワード：ケラタン硫酸、脊髄損傷、Astrocyte、Glial scar

1. 研究開始当初の背景

現在の日本では約 10 万人の以上の脊髄損傷患者が麻痺を抱えたまま生活を余儀なくされており、毎年 5000 人以上の患者が脊髄損傷を来し、発生率は若い世代で高く個人と

社会に与える肉体的、精神的、経済的負担は極めて大きい。しかし近年の研究では損傷神経を再生する試みが幾つかなされている。NT-3 やニューロトロフィンなどの神経栄養因子の存在やコンドロイチン硫酸 (CS)、

Nogo、MAG、Socs3 などの神経再生抑制因子の発見に伴い脊髄損傷の病態解明が進んできており、臨床応用への展開が期待される。しかしいずれも小動物を利用した実験系での解明段階であり、今後は現存する神経栄養因子のさらなる発展及び新しい神経軸索再生抑制因子の発見が急務となっている。そこで我々は新しい神経軸索再生抑制因子と予測されるプロテオグリカンの1種であるケラタン硫酸 (KS) に着目した。

2. 研究の目的

同系統の CS に関しては英国の J. W. Fawcett のグループがラット脊髄損傷に対しコンドロイチナーゼ ABC を損傷部位に投薬し下肢機能の回復を報告している (Bradbury et al. Nature. 416. 636-640, 2002)。また KS に関しては米国の M. H. Tuszynski のグループが、KS は reactive microglia and macrophage 由来であり軸索伸長を阻害している可能性を示唆している (Jones et al. Journal of Neurosci. 22. 4611-4624, 2002)。J. W. Fawcett らはさらに KS 分解酵素であるケラターナーゼによって末梢神経の dorsal root ganglion において軸索伸長を認めたことを報告している (Linda et al. Journal of cell Science. 107. 1687-1695, 1994)。その他脊髄損傷後に KS が損傷領域に発現しているといった報告は散見されるが、実際に脊髄損傷において KS が軸索伸長を阻害していることを証明した報告は過去にない。本研究の目的は脊髄損傷における KS の機能の解明及び神経軸索再生にどのように影響しているかを明らかにすることである。

KS は N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とガラクトースの2糖が繰り返すグリコサミノグリカンである。そこで我々の教室は

GlcNAc の C6 位の硫酸基を転移する酵素 GlcNAc6ST-1(GlcNAc 6-sulfotransferase-1) を cDNA クローニングし、その欠損マウス (GlcNAc6ST-1^{-/-})を作成した。中枢神経系の脳損傷の実験では、GlcNAc6ST-1^{-/-}マウスでは脳損傷部位のグリア性瘢痕形成が抑制され、その結果神経再生が亢進した。この成果は論文として報告された (Zhang, H et al, Glycobiology. 16. 702-710, 2006)。以下の Figure は、野生型マウスではグリア性瘢痕を形成する GFAP の集積を認めるが KO マウスでは認めず、瘢痕を染色した CollagenIV も同様の結果となった。さらに KO マウスでは phospho-neurofilament の染色にて有意に神経再生を示していた。

3. 研究の方法

1) 脊髄損傷モデルの作成 (8週齢 C57BL6/J の野生型マウス及び GlcNAc6ST-1^{-/-}マウスの雌を用い、ネンブタール(50mg/kg)腹腔内麻酔下に後方より T10 を椎弓切除後、IH-0400impactor(Neuroscience.idea, Co., Ltd)を用いて 100kdyn にて圧挫モデルを作成する。impact force 及び displacement を全てコンピューター制御しているため、従来の切断モデルに比し非常に安定した脊髄損傷モデル作成が可能となる。(Okada et al. Nature. Med. online publish, 2006)

2) 運動機能評価

• swing test (尾を持ち逆さつりにして体幹の持ち上がりを観察)

↓

↓ 当日の体幹運動機能に差がないことを

↓ 証明した上で、

• BBB (open field にて観察) (Basso et al. Journal of Neurotrauma. 12. 1-21, 1995)

• Grid test (9mm 格子状の金網から下肢が滑

り落ちた回数を観察)

・ Foot print analysis (長さ 50cm、幅 3cm を歩行させて始まりと終わり 7cm ずつを省き Stride, width を解析)

(Bradbury et al. Nature. 416. 636-640, 2002)

上記を定時刻、double blind にて複数人の検者にて 8 週間観察。3) 電気生理学的検査 (担当: 伊藤 協力: 山岸 (Nihon Kodon 代表)) ネンブタール(50mg/kg)腹腔内麻酔下に、8 チャンネル筋電図/誘発電位システム Viking IV (Nicolet, Japan)を使用、pick up 電極は 0.3mm ステンレス製動物用双極微小電極 (Nihon Kodon, Japan) を用い、Motor Evoked Potential (頸椎刺激、8mV 100 回加算)を測定し、Latency, Duration, Amplitude の差を測定し解析を行う。(Iuliano et al. Journal of Neurological Sci. 123. 186-94, 1994)。

4) 組織学的検査

野生型マウス及び GluNAc6ST-1^{-/-}マウスの脊髄損傷後各週数において、sacrifice ののち 4%パラホルムアルデヒドにて還流固定を行い脊髄を採取。標本は 30%ショ糖液に浸して overnight の後 OCT compound にて凍結切片を作成する。まず以下の免疫染色を行う。KS,CS,GFAP(reactive astrocyte),Neurofilament, Collagen IV (fibrous tissue),IBA1(madrophage)」その後蛍光画像解析システム MetaMorph Imaging System (Molecular Devices Corporation) にて①細胞数カウント、②面積測定、③規定領域内における density value 測定、④新生軸索の Fiber count などを解析する。

4. 研究成果

[結果]

1) Grid test 及び foot stride において knockout 群の方が脊髄損傷後 3 週目より有意に改善を示した。

2) MEP : 6 週目における latency は有意に野生型マウス(2.84 vs 2.06ms)の方が延長していた。

3) 野生型マウスでは reactive astrocyte が knockout マウスに比し、受傷後 1 週目より損傷部周辺に有意に集簇していた(32 vs 20%)。

4 週目における fibrous scar の面積も knockout マウスの方が有意に小さく(0.46 vs 0.67mm²)、損傷部周辺の新生軸索も knockout マウスに有意に多く認められた (fiber count:7220 vs 2026)。

我々の得た結果は脳損傷モデルにおいて KS がグリア性瘢痕形成ならびに神経再生抑制に必須の分子であることを示す初めての知見である。従ってこの脳損傷モデルでの成果をふまえ、脊髄損傷モデルに応用する。野生型マウスと GluNAc6ST-1^{-/-}マウスを用い脊髄損傷圧挫モデルを作成し、8 週間のプロトコルを組み下肢機能検査 (BBB scoring, Foot print, Grid test)、電気生理学的検査 (motor evoked potential)、免疫組織学的評価 (HE 染色、蛍光染色、ルクソールファストブルー染色など)さらには Astrocytes 初代培養を行い遊走性を評価、また Scratch wound test にて KS の発現誘導を検討する。そこで KS 阻害 (ケラタナーゼ) による治療効果を期待できると考えている。すでに現在までの検討においては、下肢機能は有意に GlcNAc6ST-1^{-/-}マウスの方が回復がよい結果となっている。

[考察]

ケラタン硫酸は reactive astrocyte の遊走を促進し、その結果グリア性瘢痕の形成にも影響すると考えられた。それらが新生軸索の再

生阻害にもなりえる。よってケラタン硫酸の発現を抑制すれば神経再生の促進につながる可能性が示された。ケラタン硫酸は reactive astrocyte の遊走を促進し、その結果グリア性癍痕の形成にも影響すると考えられた。それらが新生軸索の再生阻害にもなりえる。よってケラタン硫酸の発現を抑制すれば神経再生の促進につながる可能性が示された。

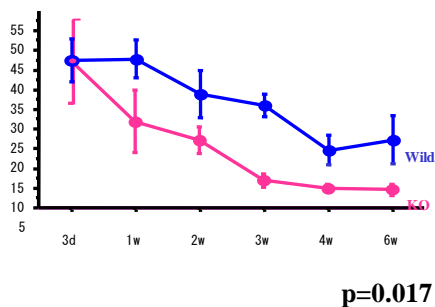
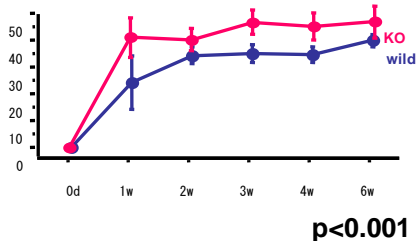
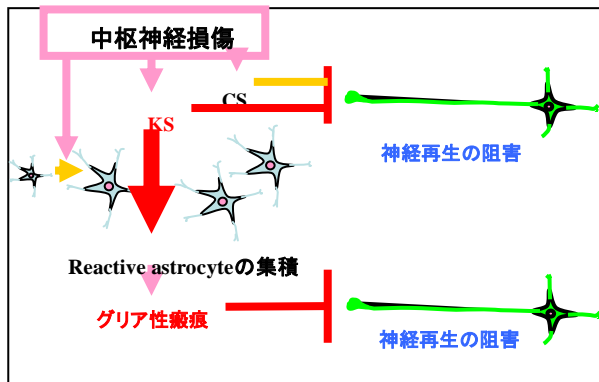


Figure を示す。Grid test における下肢の落下回数であり、KO マウスの方が有意に落下回数は少なかった。



Foot Print test における歩幅の回復を示しており、KO マウスの方が有意に歩幅が大きかった。



研究の特色・独創的な点として、上記の図に示すように、① KS による直接の神経再生の阻害、② KS による reactive astrocyte の損傷部位への誘導能 に着目している。CS においてはヒアルロン酸やテネイシンと結合することにより、固い Perineuronal net を形成しており、physical barrier として神経再生を阻害している。また CS, KS は共に直接神経軸索を阻害し molecular barrier として働く。さらに KS が reactive astrocyte の遊走を促進し、physical barrier 形成に働いていると考えている。前述した脳損傷モデルにおいて、GluNAc6ST-1-/-マウスでは損傷部位で reactive astrocyte の集積が少なく、グリア性癍痕の形成も乏しかったことから脊髄損傷部位においても同様の結果が予想される。ひいては神経再生の促進につながる可能性を示唆している。

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)

[学会発表] (計 1 件)

伊藤全哉、マウス脊髄損傷モデルにおけるケラタン硫酸の影響、日本整形外科基礎学術集会、2007/10/25-10/26、浜松

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 全哉 (ITO ZENYA)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50447819