

機関番号：82404

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300190

研究課題名 (和文) 脊髄再生に寄与する後根シュワン細胞を活性化する運動療法刺激の検討

研究課題名 (英文) Activation of endogenous Schwann cells to promote remyelination in injured spinal cord

研究代表者

緒方 徹 (OGATA TORU)

国立障害者リハビリテーションセンター (研究所)・

研究所 運動機能系障害研究部・部長

研究者番号：00392192

研究成果の概要 (和文)：脊髄損傷の機能回復に関わる髄鞘再生を誘導するためシュワン細胞に着目した。運動療法刺激が後根知覚神経からのシュワン細胞遊走が活性化する、という計画当初の仮説は動物実験では確認できなかった。一方、シュワン細胞の機能制御の基礎検討として増殖因子の下流で働く Hes 遺伝子を同定した。また、機能制御の効果を評価する比較移植実験系を確立し、シュワン細胞の機能制御を脊髄損傷治療に取り入れるための基盤を構築した。

研究成果の概要 (英文)：To promote remyelination in injured spinal cord, we focused on Schwann cell and its functional modulation. The hypothesis that Schwann cell migration from dorsal roots is enhanced by exercises was not confirmed by rat spinal cord injury model. To develop other methods for functional modulation, we identified the function of Hes gene in downstream of growth factors, and also established in vivo evaluation model for functional modulation. These findings are supposed to contribute for developing therapeutic approaches using Schwann cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	9,600,000	2,880,000	12,480,000

研究分野：神経科学、リハビリテーション

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：シュワン細胞、髄鞘形成、細胞内シグナル

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷に対する新しい治療法の開発は細胞移植などを中心に広く行われているが、動物実験レベルにおいてもその効果には限界があり、今後もさらに多方面からの治療戦略の検討が必要とされている。報告された様々な治療実験の結果を検証すると、その治

療効果が最終的には内在性のシュワン細胞の遊走、あるいは再髄鞘化によって得られていると結論付けるものが数多く見られる。シュワン細胞は末梢神経の髄鞘を形成するグリア細胞で脊髄損傷の際に後根 (こうこん) 神経から脊髄内に遊走し組織修復と脱髄病

変の再髄鞘化に寄与することが以前から知られている。したがって、この後根神経のシュワン細胞を効率よく非侵襲的に賦活化することができれば、より現実的な治療手段になりうると予想される。

シュワン細胞の増殖・遊走は神経軸索からの液性因子、あるいは細胞膜上の接着因子からの影響を強く受け、神経活動に依存した神経軸索からの刺激がシュワン細胞の増殖を促進していると考えられている。したがって介入によって神経活動を高めることによって神経再生を促進できる可能性があり、薬理的なアプローチとともに運動療法が神経活動の賦活化する方法として検討されている。すでに末梢神経ではトレッドミル・トレーニングがシュワン細胞の増殖を誘導し、その結果神経軸索再生が誘導される、という報告もなされている。

申請者は上記の背景に加え、これまで脊髄損傷における髄鞘形成細胞の研究（基盤 B (H17-19)）およびシュワン細胞の分子メカニズムの研究（Ogata T, et al., *Mol. Neurobiol*, 2006）を行った経験を元に、脊髄損傷後の後根神経からのシュワン細胞の遊走と増殖を促進するためには薬理的なアプローチと運動刺激のアプローチの双方が必要と考える。実際臨床現場で治療に役立たせるためには二つのアプローチを融合することが必要になると予想されるが、現段階ではいずれのアプローチも基礎的知見に乏しいのが現状である。そこで本研究では脊髄損傷後の後根シュワン細胞の動態を解析することで、その増殖・遊走能を高める分子機構を明らかにし、さらに運動療法刺激や薬理的介入によりその機能を高めることを試みる。

2. 研究の目的

脊髄損傷への新たな治療法開発において、

末梢神経グリア細胞であるシュワン細胞による再髄鞘化誘導というアプローチを検討する。その上で、髄鞘形成に関連する分子制御メカニズムの知見を深めるとともに、動物実験モデルにおいてシュワン細胞の機能制御方法を開発する。

3. 研究の方法

①運動療法刺激による後根神経節由来のシュワン細胞の賦活化に関する研究
ラット脊髄損傷モデルへの運動療法とシュワン細胞動態変化の検討
1-1)ラット脊髄損傷におけるトレッドミル訓練による後肢機能変化と随伴する組織中のシュワン細胞分布変化。
1-2)ラット脊髄損傷における後肢運動抑制による歩行機能変化と随伴する組織中のシュワン細胞分布変化。

②シュワン細胞の機能制御およびその評価の精度を高めるための in vivo 比較移植実験系の確立

2-1) 遺伝子導入後のシュワン細胞を、コントロールの細胞をそれぞれ別の蛍光色でラベルすることで、組織中で細胞機能解析を可能にする、二色移植法の開発
2-2) 二色移植法によるシュワン細胞の移植実験（蛍光蛋白のみ）
2-3) 脊髄損傷モデルに対する二色シュワン細胞移植実験系の確立

③増殖因子による髄鞘形成制御メカニズムの解明。

研究期間内では髄鞘形成を負に制御し、また細胞増殖を促進する因子として知られる FGF2 の細胞内シグナルを検討した。

3-1) モデル細胞として中枢神経系の髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイト前駆細胞を用いた。

3-2) 増殖因子にて細胞を処理した際に変化を転写因子発現を候補遺伝子を中心にを行った。

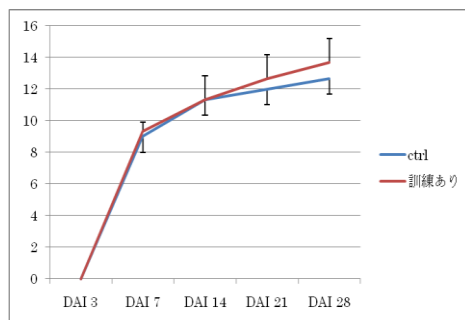
・増殖因子が転写因子発現変化を誘導するにいたる細胞内シグナルを、阻害因子または遺伝子導入によって検討した。

4. 研究成果

①運動療法刺激による後根神経節由来のシュワン細胞の賦活化に関する研究

1-1) トレッドミル訓練による脊髄損傷ラットの機能改善はわずかだった。

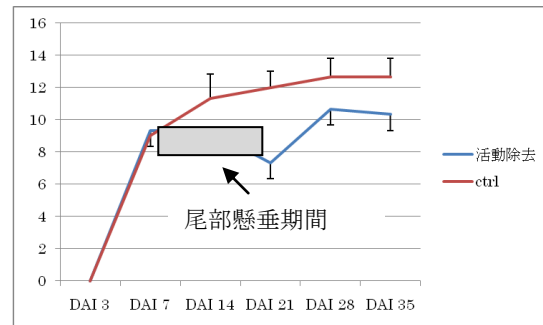
ラット胸髄レベル脊髄損傷モデルに対し、受傷後 1 週目よりトレッドミル訓練を行い、その後の後肢運動機能を評価スケールである BBB スコア (最高 21 点、高値ほど良好な運動機能) にて評価した。その結果傾向としてトレッドミル訓練群がコントロール群に比べ良好な運動機能を示す傾向が見られたものの、統計的な有意差はつかなかった。受傷後 1 週目よりトレッドミル訓練が可能な重症度にあわせてため、モデルが軽症となり差がつきにくかったのが一因と考えられた。



1-2) 脊損後に後肢活動抑制条件を付加したところ、運動機能の低下が見られた。

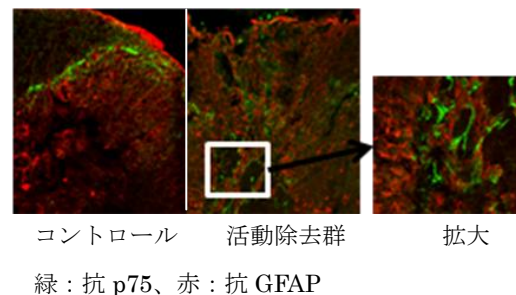
トレッドミル訓練付加による運動機能改善が十分確認できなかったため、逆に活動度を抑制する条件 (尾部懸垂) を脊損後に加えた。その結果、受傷後 7 日目から 2 週間の後肢活動抑制によって長期的な運動機能の回

復に低下が見られた。



1-3) 後肢活動度除去による運動機能回復の低下は、後根神経節シュワン細胞の遊走の程度とは関連性が見られなかった。

脊損後の運動療法 (後肢の活動度) と後根神経節由来のシュワン細胞の脊髄内への遊走との関連を評価するために、1-2) の条件で差が見られた個体間で組織学的解析を行った。シュワン細胞の同定は抗 p75 抗体での免疫染色で行った。その結果、後肢活動度抑制群とコントロール群との間に組織学的な差は見られなかった。



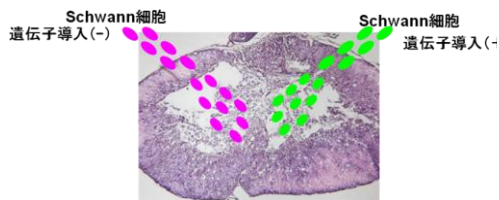
→以上の結果から、後根神経節から遊走するシュワン細胞が脊髄損傷後の機能回復に寄与している可能性は否定できないものの、その活性度を運動療法によって変化させることは困難であるとの結論を得た。

したがって、シュワン細胞を治療に利用するためには、より直接的にシュワン細胞に対し遺伝子導入などで機能制御を試みる必要性があると考えた。

②シュワン細胞の機能制御およびその評価の精度を高めるための in vivo 比較移植実験系の確立

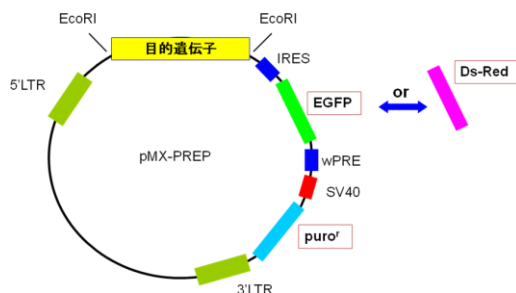
2-1) 二色移植実験の概要

シュワン細胞に対し遺伝子導入をして機能制御を試みた際に、その効果を正確に、また簡便に評価する方法として、二色移植実験を考案した。すなわち、実験群の細胞とコントロール群の細胞を蛍光色により識別可能な状態とし、同じ個体に移植した後に組織学的にそれぞれの群の機能を評価することが可能になる。



2-2) レトロウィルスを用いたベクターの構築

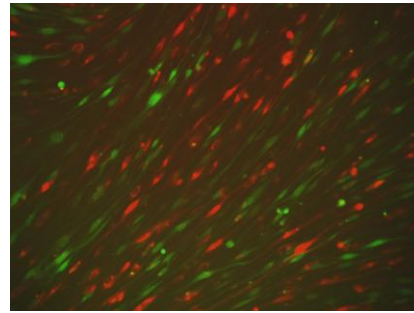
二色移植実験のために、二つの遺伝子を同時に発現するレトロウィルスベクター（国際医療センター研究所・鈴木春巳先生のご好意により供与）を改変し、緑色または赤色の蛍光を発現するベクターを構築した。導入遺伝子と緑色蛍光を同時に導入することで、識別が可能となる。



2-3) 培養系での二色移植細胞の確認

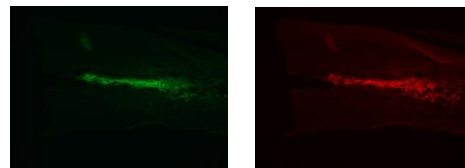
緑色あるいは赤色蛍光遺伝子を導入したシュワン細胞を培養皿上に播種した。緑色と赤色は互いに重なることなく区別可能で、そ

の割合は 1:1 であり、遺伝子導入効率に偏りがないことが示された。



2-4) 二色細胞移植により損傷脊髄内で二種類の細胞が識別可能であった。

In vitro で確認された細胞を脊髄損傷後のラット損傷部に対し受傷後 7 日で移植した。3 週間後の組織像において移植細胞は残存しており、培養実験と同様に緑色または赤色の蛍光を発することで二群を比較可能であった。



ラット損傷脊髄へ移植後 3 週の組織像

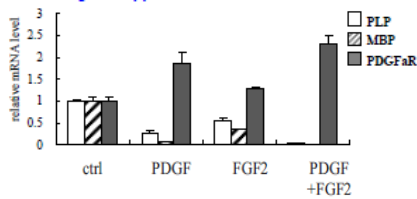
→ 今後、特定の遺伝子をシュワン細胞に導入し移植することで、どのような機能制御が組織修復の促進に働くかを調べることができる。そうした知見は将来的に（内在性の）後根神経節由来のシュワン細胞に対する機能制御治療にもつながるものと考えられる。

③増殖因子による髄鞘形成制御メカニズムの解明

3-1) 増殖因子 FGF2 は髄鞘形成細胞の分化を抑制した。

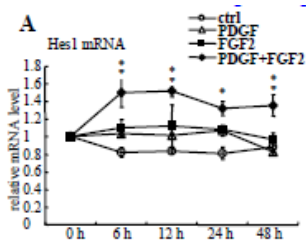
シュワン細胞の機能制御ターゲットを絞り込むために、その細胞機能に関わる増殖因子の働きを解析した。シュワン細胞と同じ髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトに対し、増殖因子 PDGF および FGF2 を加えたと

ころ、FGF2 の投与により、分化（髄鞘形成）の指標である MBP、PLP の遺伝子発現の低下が見られた。

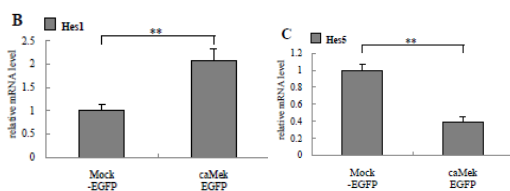


3-2) FGF2 刺激により分化抑制転写因子の Hes1 が誘導されていた。

FGF2 投与による分化抑制のメカニズムを確認するために、細胞内で発現が変化する転写因子を候補を絞ってスクリーニングした。その結果、分化を負に制御する Hes1 が選択的に上昇することがわかった。

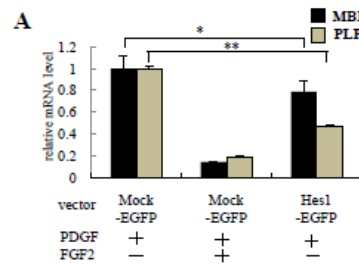


また、同じ転写因子ファミリーに属する Hes5 は FGF2 投与では上昇しないことも確認された。



3-3) Hes1 の遺伝子導入により分化に対し抑制的な効果が得られた。

Hes1 の遺伝子導入により FGF2 処理と同様に分化マーカーの発現低下が観察された。



→ 今後、シュワン細胞の機能制御を考える場合に分化のタイミングへの制御は重要と考えられる。今回の知見から細胞内の Hes 分子の発現量を制御することで、そうしたタイミングをコントロールできる可能性が示唆された。

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）

- ① Ogata T, Ueno T, Hoshikawa S, Ito J, Okazaki R, Hayakawa K, Morioka K, Yamamoto S, Nakamura K, Tanaka S, Akai M., Hes1 functions downstream of growth factors to maintain oligodendrocyte lineage cells in the early progenitor stage, Neuroscience, 査読有, 2011, 176:132-41

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 緒方 徹, Molecular and Electrophysiological approaches for functional recovery in patients with injured spinal cord, 2nd International Symposium on Rehabilitation Research, 2010.9.9、ソウル（韓国）
- ② Toru Ogata, Takaaki Ueno, Kozo Nakamura, Masami Akai, Molecular Link between bFGF signals and bHLH transcription factors in regulating proliferation and maturation of oligodendrocyte progenitor cells、第

39 回北米神経科学学会、2009. 11. 15、ワシントン DC (米国)

③緒方 徹、伊藤 順一、上野 高明、星川 慎弥、中村 耕三、赤居 正美、脊髄損傷におけるグリア前駆細胞の活性化と組織修復、第 24 回日整会基礎学会、2009. 11. 5、横浜

④星川 慎弥、伊藤 順一、上野 高明、田中 栄、中村 耕三、緒方 徹、抗アポトーシス遺伝子導入シュワン細胞のラット脊髄損傷モデルへの移植およびその新しい組織学的評価法の確立、第 24 回日整会基礎学会、2009. 11. 5、横浜

⑤緒方 徹、上野 高明、伊藤 順一、中村 耕三、田中 栄、赤居 正美、脊髄損傷治療における Hes ファミリー分子の役割、第 32 回日本神経科学大会、2009. 9. 16、名古屋

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 徹

(OGATA TORU)

国立障害者リハビリテーションセンター

(研究所)・研究所 運動機能系障害研究

部・部長

研究者番号：00392192

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし