

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500349

研究課題名（和文）浸透圧性脱髄モデルにおける脱髄修復機構の分子病態的解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular mechanism of the repair of demyelination

研究代表者

梶村 益久 (Yoshihisa Sugimura)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50456670

研究成果の概要（和文）：

浸透圧性脱髄症候群(ODS)は橋中心髄鞘崩壊(CPM)に代表される中枢性の脱髄疾患で、脱髄部に集積する活性化ミクログリアが脱髄の発症・進展に関与する可能性が考えられている。レーザーマイクロダイセクションシステム (LMD) を導入し、脱髄病変部特異的なシングルミクログリアの遺伝子プロファイル解析を行った結果、今まで報告されていない新規パスウェイが脱髄修復に関与する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

Osmotic demyelination syndrome (ODS) is a central demyelinating disease associated with a rapid correction of hyponatremia. To clarify the role of microglia in the pathogenesis of ODS, We used laser-capture microdissection to isolate single microglia and analyzed single-microglia gene-expression profiles using high-throughput microarray assays. Our data provide a new insight into the characteristic of microglia associated with injured oligodendrocytes and new molecular targets of minocycline treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：グリア細胞、レーザーマイクロダイセクション、脱髄

### 1. 研究開始当初の背景

浸透圧性脱髄症候群(ODS)は橋中心髄鞘崩壊(CPM)に代表される中枢性の脱髄疾患で、多くの場合 SIADH などにおける低ナトリウム(Na)血症の急速補正によって発症する。我々は ODS の病態において脱髄部に集積する活性化ミクログリアが炎症性サイトカインを発現し、脱髄の発症・進展に関与する可能性が考えられることを報告しているが、その詳細は明らかではない。

### 2. 研究の目的

#### (1) ODS におけるグリアの関与

(2) ミクログリアの活性化を阻害することが知られているミノサイクリンなどの ODS 予防効果を検討する。

(3) ミクログリア特異的な遺伝子発現プロファイルを解析するため、レーザーマイクロダイクセクションシステム(LMD)を導入し、脱髄病変部特異的なミクログリアの遺伝子プロファイル解析を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 雄 SD ラットに SIADH による低ナトリウム血症を誘導した後に血清 Na 濃度を急速補正し ODS を惹起し、経時的にグリア細胞のフェノタイプを解析する。

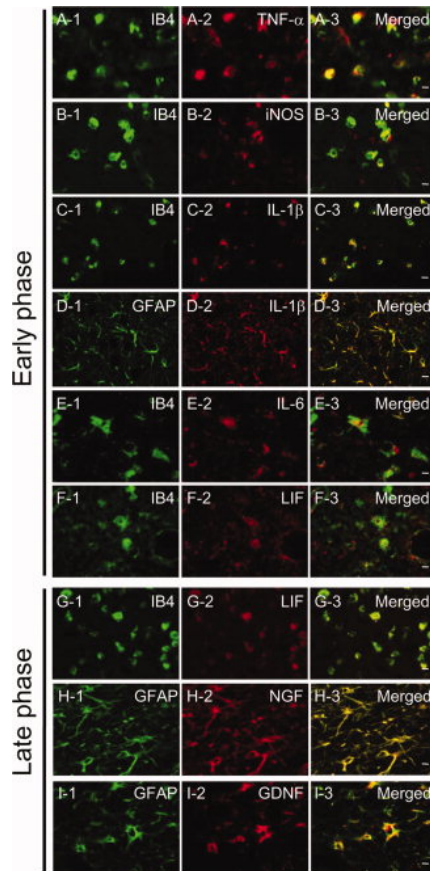
(2) 急速補正とともにミノサイクリンを投与し中枢神経症状の観察、および脳切片を作成し病理学的に脱髄を評価することによってミノサイクリンの ODS に対する予防効果を検討する。

(3) LMD を用い ODS モデル動物において脱髄病変の重篤な中心部、周辺部の髄鞘再生が起こっていると考えられる部位、脱髄が発症していない脱髄周辺部の各部位において病理学的に解析された個々のミクログリアを採取し、cDNA マイクロアレイ解析によって脱髄発症・進展などの各病態におけるミクログリアの関与を解析する。

### 4. 研究成果

(1) TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-6, IL-1 $\beta$  は脱髄発症初期にミクログリアで発現が認められ、IL-1 $\beta$  はアストロサイトでも発現が認められた(図1)。一方、NGF, GDNF は脱髄発症後期にアストロサイトで発現が認められた(図1)。また LIF は早期にはミクログリアで後期にはアストロサイトで発現が認められた(図1)。

図 1



ODS 動物モデルにおいて脱髄発症初期には炎症性サイトカインの発現の増加が病態の発症・進展に関与し、後期には neurotrophic サイトカインおよび神経栄養因子の発現の増加が病態の進展を抑制している可能性が示唆された。

(2) ミノサイクリンは用量依存性に神経症状を著明に改善させた(図2)。また、ミノサイクリンは早期脱髄部でのミクログリアの活性化及び集積を抑制し、その後の経時的な脱髄の増悪を抑制した。ミノサイクリンは補正後早期のミクログリアの炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , iNOS 及び IL-6 の発現を抑制した。さらに ODS において脱髄部のミクログリアが脱髄部への移動・集積にかかわると考えられるケモカイン MCP-1、およびミクログリアの活性化に関与すると考えられるマトリックスメタロプロテアーゼ MMP-12 を発現し、ミノサイクリンは、MCP-1 および MMP-12 の発現を抑制した(図3)。MINO の浸透圧性脱髄予防機序として、補正後早期のミクログリアの炎症性サイトカインの発現を抑制させ。また、脱髄部へミクログリアの移動・集積を抑制する機序として、MCP-1、MMP12

の関与が示唆された。ミノサイクリンは ODS 発症・進展の防止に非常に有効であると考えられた。

図 2

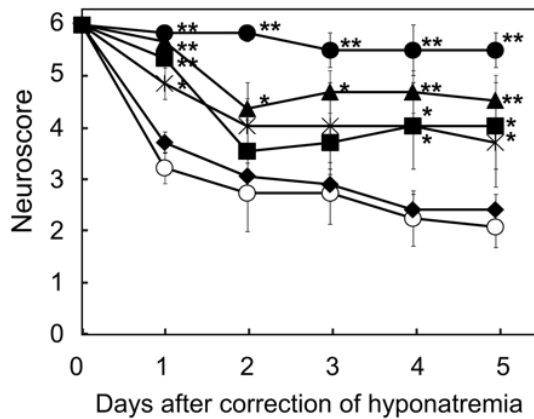
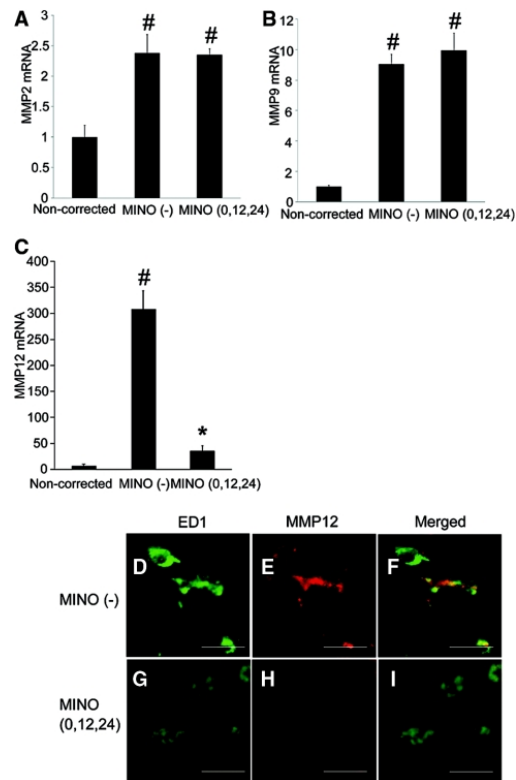


Figure 2. Minocycline administration within 24 hours after the rapid correction of hyponatremia significantly improves the neurologic symptoms. The neurologic symptoms were assessed using neuroscores as follows: 6, no impairment; 5, poorly grooming; 4, slow or awkward gait; 3, limb weakness and/or paralysis; 2, seizures, severe motor deficits; 1, complete inability to move; and 0, death. MINO (-) group (○), MINO (0,12,24) group (●), MINO (0) group (■), MINO (12) group (▲), MINO (24) group (\*), and MINO (-12) group (◆). Minocycline of 45 mg/kg body wt was injected intraperitoneally. The values are expressed as the means  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*P < 0.01; \*P < 0.05 compared with the

(3) パスウェイ解析の結果、脱髄部と非脱髄部、また脱髄部でもミノサイクリン投与によって活性化が抑制されているミクログリアで比較をすると、インテグリンを介した細胞接着、マトリックスメタロプロテアーゼに関するパスウェイ等が活性化している所見が得られ、またミクログリアで今まで報告されていない新規パスウェイが脱髄修復に関与する可能性を見出した。

図 3



### 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 8 件)

- ① Barsony J, Sugimura Y, Verbalis JG. Osteoclast Response to Low Extracellular Sodium and the Mechanism of Hyponatremia-induced Bone Loss. *J Biol Chem.* 25;286:10864-75, 2011 査読あり
- ② Morishita Y, Arima H, Hiroi M, Hayashi M, Hagiwara D, Asai N, Ozaki N, Sugimura Y, Nagasaki H, Shiota A, Takahashi M, Oiso Y. Poly(A) tail length of neurohypophysial hormones is shortened under endoplasmic reticulum stress. 査読あり *Endocrinology.* 152(12):4846-55. 2011
- ③ Iwama S, Sugimura Y, Suzuki H, Suzuki H, Murase T, Ozaki N, Nagasaki H, Arima H, Murata Y, Sawada M, Oiso Y. Time-dependent Changes in

Proinflammatory and Neurotrophic Responses of Microglia and Astrocytes in a Rat Model of Osmotic Demyelination Syndrome GLIA 59:452-62, 2011 査読あり

- ④ Suzuki H, Sugimura Y, Iwama S, Suzuki H, Ozaki N, Nagasaki H, Arima H, Sawada M, Oiso Y. Minocycline prevents osmotic demyelination syndrome by inhibiting the activation of microglia J Am Soc Nephrol. 21:2090-8, 2010 査読あり
- ⑤ Verbalis JG, Barsony J, Sugimura Y, Tian Y, Adams DJ, Carter EA, Resnick HE. Hyponatremia-induced osteoporosis. J Bone Miner Res. 25:554-63, 2010 査読あり
- ⑥ Hiroi M, Morishita Y, Hayashi M, Ozaki N, Sugimura Y, Nagasaki H, Shiota A, Oiso Y, Arima H. Activation of vasopressin neurons leads to phenotype progression in a mouse model for familial neurohypophysial diabetes insipidus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 298:R486-93, 2010 査読あり
- ⑦ Sugimura Y, Murase T, Oyama K, Uchida A, Sato N, Hayasaka S, Kano Y, Takagishi Y, Hayashi Y, Oiso Y, Murata Y. Prevention of neural tube defects by loss of function of inducible nitric oxide synthase in fetuses of a mouse model of streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 52:962-71, 2009 査読あり
- ⑧ Iwama S, Sugimura Y, Murase T, Hiroi M, Goto M, Hayashi M, Arima H, Oiso Y. Central adiponectin functions to inhibit arginine vasopressin release in conscious rats. J Neuroendocrinol. 21:753-9, 2009 査読あり

[学会発表] (計 11 件)

- ① Sugimura Y, Pathophysiology of Osmotic Demyelination Syndrome. American Society of Nephrology, Kidney Week 2011 (米国腎臓学会) 招待講演, November 10, 2011, Philadelphia
- ② Sugimura Y, Minocycline Prevents Osmotic Demyelination Syndrome by Inhibiting the Activation of Microglia, 9th

World Congress on Neurohypophysial Hormones (国際神経下垂体学会), 招待講演, July 29, 2011, Boston

- ③ Haruyuki Suzuki, Yoshihisa Sugimura, Shintaro Iwama, Hiromi Suzuki, Atsushi Kiyota, Makoto Sawada, Yutaka Oiso. COMPARATIVE ANALYSIS OF GENE EXPRESSION PROFILES OF MICROGLIA FROM DEMYELINATIVE LESIONS IN OSMOTIC DEMYELINATION SYNDROME RAT MODEL, 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, October 27, 2010, Barcelona, Spain
- ④ Sugimura Y, Suzuki H, Iwama S, Suzuki H, Kiyota A, Sawada M, Oiso Y. Gene expression profiling of microglia from the demyelinative lesions in osmotic demyelination syndrome, Neuro2010, 2010年9月2日、神戸
- ⑤ Sugimura Y, The pathogenesis of osmotic demyelination syndrome (ODS) and the therapy of ODS, 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE2010)(国際内分泌学会) 招待講演, March 27, 2010 Kyoto,
- ⑥ Sugimura Y, Murase T, Takefuji S, Takagi H, Suzuki H, Iwama S, Takagishi Y, Arima H, Sawada M, Oiso Y, Murata Y, The differing roles of nitric oxide synthase isoforms in osmotic demyelination syndrome in rats, Neuroscience 2009, October 19, Chicago
- ⑦ Suzuki H, Sugimura Y, Iwama S, Suzuki H, Arima H, Sawada M, Oiso Y, Protective effects of minocycline on osmotic demyelination syndrome in rats, Neuroscience 2009, October 19, Chicago
- ⑧ Sugimura Y, Murase T, Takefuji S, Takagi H, Iwama S, Suzuki H, Takagishi Y, Arima H, Sawada M, Oiso Y, Murata Y, The differing pathological effects of nitric oxide synthase isoforms in osmotic

demyelination syndrome in rats, The 32nd ANNUAL MEETING OF THE JAPAN NEUROSCIENCE SOCIETY, 2009年9月17日, 名古屋

- ⑨ Iwama S, Sugimura Y, Suzuki H, Suzuki H, Arima H, Murata Y Sawada M, Oiso Y, Proinflammatory and Neurotrophic Responses of Microglia and Astrocytes in a Rat Model for Osmotic Demyelination Syndrome, 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones, 2009年9月7日, Kitakyushu
- ⑩ Suzuki H, Sugimura Y, Iwama S, Suzuki H, Arima H, Sawada M, Oiso Y, Minocycline prevents osmotic demyelination by inhibiting the activation of microglia in rats, 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones, 2009年9月7日, Kitakyushu
- ⑪ 鈴木陽之, 梶村益久, 岩間信太郎, 有馬寛, 大磯ユタカ, 浸透圧性脱髄症候群ラットモデルにおけるミノサイクリンの検討, 第82回日本内分泌学会学術総会, 2009年4月23日, 群馬

[図書] (計2件)

- ① 梶村益久, 大磯ユタカ, 中山書店、ADH(AVP)不適切分泌症候群、症候群ハンドブック403, 2011, pp403
- ② 梶村益久, 大磯ユタカ, 科学評論社、高ナトリウム血症 内分泌・糖尿病科, 2009, pp393-400

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梶村益久 (SUGIMURA YOSHIHISA)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50456670

### (2) 研究分担者

大磯ユタカ (YUTAKA OISO)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：40203707

### (3) 連携研究者

澤田誠 (SAWADA MAKOTO)  
名古屋大学・環境医学研究所・教授  
研究者番号：10187297