

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31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591907

研究課題名（和文） 脊髄損傷2次障害に対するG-CSF・SCF併用療法（小胞体ストレス応答の解析）

研究課題名（英文） The coadministration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to secondary injury after spinal cord injury(Analysis of endoplasmic reticulum stress response)

研究代表者：

渡辺 雅彦（WATANABE MASAHIKO）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：40220925

研究成果の概要（和文）：本研究において我々は、脊髄損傷後のオリゴデンドロサイト前駆細胞（以下 OPC）の遅発性細胞死の原因として小胞体ストレス経路に着目し、in vivo, in vitro の実験において解析を行った。またマウス脊髄損傷モデルにおいて、G-CSF、SCF の内在性細胞、運動機能回復に及ぼす影響について検討した。結果、SCF と G-CSF の投与により内在性 OPC、マイクログリアの増殖活性化を認め、運動機能の改善を認めた。オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化抑制には小胞体ストレスによるアポトーシスが関与しており、小胞体ストレス応答能を高めることによりアポトーシスの抑制、再髄鞘形成へとつながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, We focused on endoplasmic reticulum(ER) stress as a cause of apoptosis of oligodendrocyte precursor cell (OPC) following spinal cord injury, and examined it in vivo, and in vitro. In addition, We investigated the effects of G-CSF and SCF on intrinsic cells, and motor function recovery in spinal cord-injured mice. The results showed that the combined administration of SCF and G-CSF in mouse contusive spinal cord injury model not only improved motor function, but also induced the accumulation of intrinsic microglia and the active proliferation of intrinsic OPC. Our results suggest that apoptosis by the ER stress is involved in the differential inhibition of OPC, and To increase the tolerance of ER stress response of OPC may result in remyelination of damaged spinal cord.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

われわれはこれまでに脊髄損傷後の損傷拡大に対して、内在性細胞による軸索の回復を目的として、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell, 以下 OPC) の分化に注目し解析を行ってきた。我々は、多発性硬化症に即した化学的脱髄モデルにおいて脱髄刺激により損傷部周囲で OPC が分化、増殖し再髄鞘形成を行うことを確認した (Watanabe et al. J Neurosci. Res. 2002)。しかし外傷性脊髄損傷に即した脊髄圧挫モデルでは、OPC の増殖は認めるもののオリゴデンドロサイトへの分化は十分に得られず、そのほとんどは遅発性細胞死により消失する。我々はこの OPC の遅発性細胞死の原因として小胞体ストレス経路に着目した。近年、遅発性細胞死の一因として、小胞体ストレスによるタンパク質修飾異常が着目されている。損傷によるストレスが小胞体でのタンパク質生成を障害し、異常蛋白の蓄積が、細胞死を促進する因子を誘導し遅発性細胞死へと至る。我々はこの小胞体ストレス経路において異常蛋白を分解、消去する小胞体シャペロンである GRP78 と、pro-apoptotic transcription factor である CHOP と指標にして、C6 細胞株及びラット脊髄圧挫損傷モデルを用いて小胞体ストレス経路の検討を行った。また我々は軸索伝導障害に対しての薬理的治療として、マウス脳梗塞モデルにおいて運動機能の改善が報告された薬剤である G-CSF、また GCSF 同様の hematopoietic cytokine である SCF をラット脊髄圧挫損傷モデルに投与し、その有効性、小胞体ストレス経路に与える影響を検討した。

2. 研究の目的

(1) マウス脊髄圧挫損傷モデルにおいて、hematopoietic cytokine である GCF、SCF の治療効果、及びグリア細胞に与える影響を検討すること。

(2) 小胞体ストレスに対するグリア系細胞株への GRP78 遺伝子導入の与える影響評価し、GRP78 の小胞体ストレスに対する細胞保護効果を検討すること。

(3) ラット脊髄圧挫損傷モデルにおいて、小胞体ストレス応答蛋白発現の損傷強度、細胞種による差を免疫組織学的に評価し、脊髄損傷後の神経細胞遅発性細胞死への小胞体ストレス応答蛋白の関与を検討すること。

3. 研究の方法

(1) マウス脊髄圧挫損傷モデルにおける hematopoietic cytokine の治療効果の検討：

GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を採取し、8 週から 10 週令マウス (C57BL6J) に 850Gy10 分間の放射線を照射した後、尾静脈より骨髄細胞を 5 万注入した。6 週後にドナー骨髄細胞の生着を確認した後、移植したマウスの第 9、10 胸椎椎弓切除後 25g の重錘を 5 分間静置し、圧挫損傷を作成した。損傷マウスを G-CSF 群 (G-CSF 300 μ g/kg/day)、SCF 群 (SCF100 μ g/kg/day+G-CSF300 μ g/kg/day)、control 群 (PBS2 μ l/day) の 3 群にわけ、損傷 1 日よりそれぞれ上記薬剤の皮下投与を連日 10 日間行った。また細胞の増殖活性を評価するために損傷 15 日目より連日 BrdU (50mg/kg/day) を皮下投与した。28 日目に凍結切片を作成し、神経系細胞マーカー (NeuN, NG2, GFAP)、マイクログリア/マクローファージマーカー (F4/80)、血球系マーカー (CD45) と GFP 抗体で免疫二重染色を行い前索、側索、後索において同面積あたりの細胞数を比較検討した。同様に BrdU 抗体についても組織学的検討を行った。後肢運動機能の評価は損傷作成後から 12 週後まで BBB scale を用いて評価した。

(2) グリア系細胞株を用いた GRP78 の細胞保護作用の検討：

細胞障害性因子に対する GRP78 のグリア細胞保護効果の評価するため、均一かつ安定した状態で大量に培養を継続できるラット C6 細胞を 6 センチ径のディッシュに播種、10%FBS 入り DMEM 培地、37°C、5%二酸化炭素環下で培養し、以下の検討を行った。①培地に小胞体ストレス誘導薬剤であるツニカマイシン 6, 12 μ g/ml と、L グルタミン酸 40mM をそれぞれ 48、72 時間投与して C6 細胞を培養し評価した。②ベクターに GRP78 遺伝子を組み込み、GRP78 発現と同時に GFP を発現するように設計したプラズミドを作成し、エレクトロポレーション法で C6 細胞株へ導入し、①と同様の条件で培養した。AnnexinV と PI にて細胞死を標識し、GFP 陽性細胞 (GRP78 を発現中の細胞) と GFP 陰性細胞における AP 陽性率をフロサイトメトリーを用いて評価した。

(3) ラット脊髄圧挫損傷における小胞体ストレス応答の検討：

SD ラット雌に Th10 椎弓切除を行い、IH-impactor を用いて 100Kdyne、200Kdyne の異なる損傷強度で圧挫損傷モデルを作成した。損傷後 1・3・5・7・14 日後に還流固定後脊髄を摘出し、損傷中心より 7 mm 遠位部で脊髄横断切片を作成した。sham 群は損傷を与えず椎弓切除のみを行い、その後は同様の処置にて脊髄横断切片を作成した。軽度損傷群

(100Kdyne、以下 LI 群)と高度損傷群 (200Kdyne、以下 HI 群)のそれぞれの横断切片を GRP78、CHOP と各種細胞マーカー (OPC:NG2、オリゴデンドロサイト:APC、ニューロン:NeuN、アストロサイト:GFAP)を用いて二重免疫染色を行った。各染色には DAPI を使用した。各細胞における GRP78、CHOP が強発現している細胞数をカウントし、発現率を比較検討した。

4. 研究成果

(1) マウス脊髄圧挫損傷モデルにおける hematopoietic cytokine の治療効果の検討：免疫組織染色では各群における GFP 陽性細胞数に差を認めず、G-CSF、SCF の骨髄細胞の集積に対する効果は明らかではなかった。GFP 陽性細胞の 95%以上は F4/80 および CD45 陽性であり、骨髄由来のマクロファージが大半であると考えられたが、一部マイクログリアへ分化した可能性も否定できないと思われた。G-CSF 群、SCF 群の一部に GFP と共陽性を示す NG2 陽性の細胞を認め、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) への分化を示した。共陽性を示す GFAP 陽性の細胞は認めず、明らかな GFP 陽性の神経細胞も認めなかった。細胞の増殖活性では、GFP 陽性細胞の約 10% に BrdU 陽性細胞を認め、control 群、G-CSF 群に比べ SCF 併用群で有意に増加していた。GFP 陰性の BrdU 陽性細胞についても同様に SCF 群で有意に増加を示しており、骨髄由来細胞のみならず脊髄内在性細胞の増殖活性も亢進していた。運動機能 (BBB) は損傷直後から 28 日目までは全ての群で同様の改善傾向を示したが、28 日目以降に徐々に差を認め 12 週間には SCF 群 (平均 BBB=19.5) において G-CSF 群 (平均 BBB=14)、PBS 群 (平均 BBB=9.5) と比べ有意な改善を認めた。SCF と G-CSF の投与により骨髄由来細胞や内在性 OPC の増殖活性の上昇を認め、これらの増殖活性化されたマイクログリアやマクロファージの神経保護作用、神経栄養作用、食食作用によると考えられる運動機能の改善を認めた。

(2) グリア系細胞株を用いた GRP78 の細胞保護作用の検討：

全てのツニカマイシン投与条件下で投与前と比較して GRP78 と AP 陽性細胞の有意な発現増加を認めた。高濃度グルタミン酸投与では、48 時間後は AP 陽性細胞のみ有意な増加を認め、GRP78 陽性細胞の有意な増加は 72 時間の時点で認めた (n=4, p<0.05)。GRP78 導入効率は平均 41% だった。全てのツニカマイシン投与条件下と L グルタミン酸 40mM 投与条件下で、GFP 陽性細胞の AP 陽性率は、GFP 陰性細胞中の AP 陽性率と比較して有意に低い結果となった (n=4, p<0.05, 図 1A-E)。結果から、GRP78

は興奮性アミノ酸に対しても反応すると考えられた。さらに、ツニカマイシンで直接小胞体ストレスを誘導した際と、高濃度グルタミン酸投与により細胞障害を生じさせた際の双方において、予め GRP78 を過剰発現させた細胞の生存率が有意に増加したことから、GRP78 は外傷性脊髄損傷における細胞保護効果を有する可能性が示唆された。

図 1A:3ug/mL tunicamycin

図 1B:6ug/mL tunicamycin

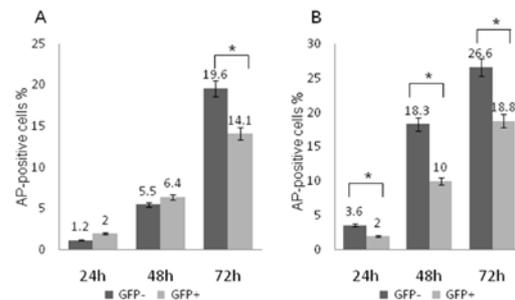


図 1C:12ug/mL tunicamycin

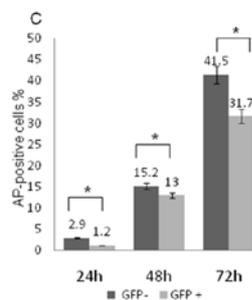
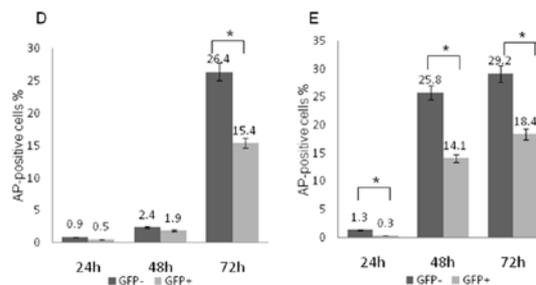


図 1D:10mM L-glutamate

図 1E:40mM L-glutamate



(3) ラット脊髄圧挫損傷における小胞体ストレス応答の検討：

組織全体での GRP78 発現率は sham 群と比較

して LI 群、HI 群で損傷初期に有意に高値を示した。損傷 1 日目において、HI 群において GRP78 の発現率が高い傾向にあったが有意な差は認めなかった。脊髄組織全体での GRP78 発現率は経時的に漸減傾向にあった。脊髄組織中の CHOP 発現率は LI 群、HI 群の両群において経時的に漸増傾向にあった。損傷 7 日目において CHOP は LI 群と比較して HI 群において有意に高値を示した(図 2)。細胞ごとの GRP78 の発現は OPC では損傷 3 日目に、それ以外の細胞種では損傷 1 日目にピークを認め、その後経時的に漸減した。アストロサイトでは損傷 1 日目に他の細胞種より有意に高い GRP78 発現率を示し、OPC では低値を示した(図 3)。CHOP 発現率は各細胞種において経時的に漸増傾向にあり、損傷 5~7 日目にピークを迎えた。アストロサイトの CHOP 発現率は他の細胞種と比較して低い傾向にあったものの、それぞれの細胞間に有意差は認めなかった(図 4)。上記より細胞保護的な小胞体シヤペロンである GRP78 は損傷初期に発現し、損傷強度により発現強度が上昇することが示唆された。また GRP78 の発現率の高いアストロサイトは小胞体ストレス応答能が高く、小胞体ストレスに対して他の細胞種にはない特有の応答機構を有する可能性が考えられた。対照的に GRP78 発現率の低い OPC は小胞体ストレス応答能が低く、脊髄損傷後の再髄鞘形成障害の一因となっている可能性が考えられた。また、Pro-apoptotic factor である CHOP は遅発性に上昇することが確認された。

図 2: 脊髄組織中における GRP78 CHOP の発現率

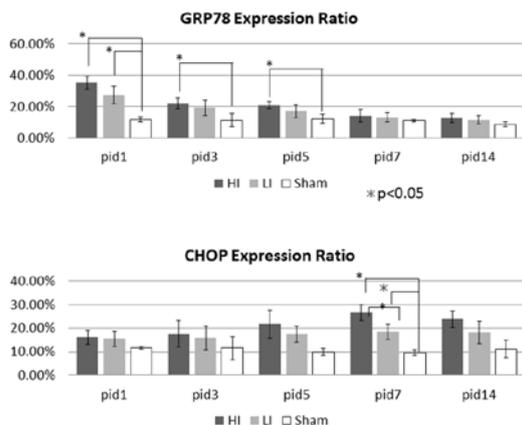


図 3: 細胞種毎の GRP78 の発現率

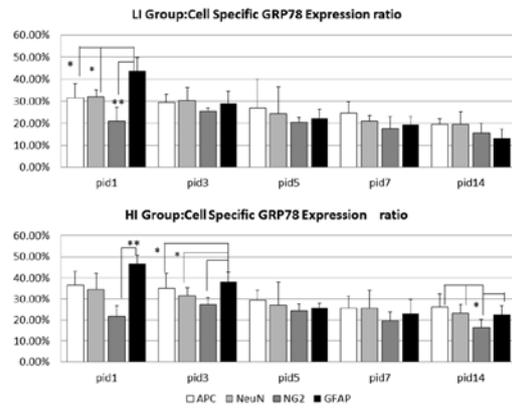
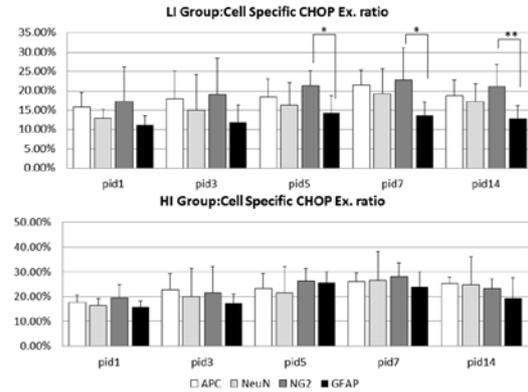


図 4: 細胞種毎の CHOP の発現率の比較



(4) 考察:

二次損傷の拡大に関して、小胞体ストレス経路に関する今回の研究では、損傷ストレスに応じて GRP78 の上昇を認めるが、損傷が過度になると CHOP が発現し、遅発性細胞死に至るという結果であった。グリオーマ細胞株を用いた研究において、ツニカマイシンで直接小胞体ストレスを誘導した際と、高濃度グルタミン酸投与により細胞障害を生じさせた際の双方において、予め GRP78 を過剰発現させた細胞の生存率が有意に増加したことから、GRP78 の外傷性脊髄損傷における細胞保護効果の可能性が示唆された。細胞種ごとの小胞体ストレス応答に関する免疫組織学的検討では、GRP78 発現がアストロサイトで最も高く、対照的に CHOP は低い傾向にあり、このことよりアストロサイトは小胞体ストレス応答能が高く、他の細胞種にはない特有のストレス応答機構を有している可能性が考えられた。また、OPC では GRP78 発現が有意に低い結果にあり、小胞体ストレス応答能が低く、そのことが再髄鞘化の阻害因子となっている可能性が考えられた。以上より GRP78 の上昇はすなわち小胞体ストレス応答能を高めることであり、OPC のアポトーシスの抑制、再髄鞘化につながる可能性が考えられた。

(5) 結論: 外傷性脊髄損傷におけるグリア系細胞、グリア前駆細胞の分化、及びその後の

細胞死につき検討を行った。オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化抑制には小胞体ストレスによるアポトーシスが関与しており、小胞体ストレス応答能を高めることによりアポトーシスの抑制、再髄鞘化へとつなが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 3 件)

- ① 脊髄損傷後の遅発性細胞死における小胞体ストレス関連タンパク質の関与

渡辺雅彦、隅山香織、松山大輔、黒岩真弘、持田讓治

日本整形外科学会雑誌(in press、査読有)

- ② Overexpression of GRP78 protects glial cells from endoplasmic reticulum stress

Kaori Suyama, Masahiko Watanabe,
Kou Sakabe, Yoshinori Okada,
Daisuke Matsuyama, Masahiro
Kuroiwa, Joji Mochida

Neuroscience Letters 504, page 271-276,
2011(査読有)

- ③ Efficacy of the coadministration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor in the activation of intrinsic cells after spinal cord injury in mice Laboratory investigation.

Takahiro Osada, Masahiko Watanabe,
Atsuhiko Hasuo, Kaori Suyama,
Daisuke Sakai, Hiroshi Kawada,
Mitsunori Matsumae, Joji Mochida

Journal of Neurosurgery: Spine 13,
page 516-523, 2010(査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Endoplasmic reticulum stress response in the rat contusive spinal cord injury model

Daisuke Matsuyama, Masahiko Watanabe, Kaori Suyama, Masahiro Kuroiwa,
Joji Mochida

Society for neuroscience annual meeting,
2011.11.14, Washington Convention Center

- ② 脊髄損傷における酸化ストレスに誘導されるグリア系細胞障害に対する GRP78 の保護作用

隅山香織、渡辺雅彦、坂部貢、岡田義則、松山大輔、持田讓治

第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会、
2011.10.20、群馬県前橋商工会議所

- ③ ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける小胞体ストレス応答の変化に関する組織学的検討

松山大輔、渡辺雅彦、隅山香織、黒岩真弘、持田讓治

第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会、
2011.10.20、群馬県前橋商工会議所

- ④ 外傷性脊髄損傷における GRP78 のグリア細胞保護作用

隅山香織、渡辺雅彦、松山大輔、黒岩真弘、持田讓治

第 30 回日本運動器移植・再生医学研究会、
2011.09.25、福岡国際会議場

- ⑤ ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける小胞体ストレス応答

松山大輔、渡辺雅彦、隅山香織、黒岩真弘、持田讓治

第 30 回日本運動器移植・再生医学研究会、
2011.09.25、福岡国際会議場

- ⑥ ER stress reaction of oligodendrocyte precursor cell due to traumatic spinal cord injury in rat

Daisuke Matsuyama, Masahiko Watanabe, Kaori Suyama, Joji Mochida

Society for neuroscience annual meeting,
2010.11.15, San Diego Convention Center

- ⑦ グリア系細胞における外的細胞障害因子に対する小胞体ストレス関連タンパク質の反応

隅山香織、渡辺雅彦、岡田義則、松山大輔、持田讓治

第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、
2010.10.15、京都国際会議場

- ⑧ ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける NG2 陽性細胞の小胞体ストレス応答の組織学的検討

松山大輔、渡辺雅彦、隅山香織、持田讓治
第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、
2010.10.15、京都国際会議場

⑨ 外的ストレスによる中枢神経系細胞障害
に対する Grp78 タンパクの反応; in vitro
での検討

隅山香織、渡辺雅彦、岡田義則、田村 太、
蓮尾敦広、持田讓治

日 本 整 形 外 科 学 会 雑 誌 :
83(8), S1067, 2009. 11. 05, パシフィコ横浜

⑩ Response of Grp78 protein in glial cell line
for cytotoxic factor by traumatic stress

Kaori Suyama, Masahiko Watanabe, Yoshinori
Okada, Futoshi Tamura,

Daisuke Matsuyama, Joji Mochida

Society for neuroscience annual meeting ,
2009.10.20, Chicago McComik Place

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 雅彦 (WATANABE MASAHIKO)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：40220925

(2) 研究分担者

隅山 香織 (SUYAMA KAORI)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：20433914