

## 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 25 年 4 月 24 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390287

研究課題名（和文） 脊髄損傷における神経再生因子の同定と網羅的遺伝子解析

研究課題名（英文） Neuronal regeneration factor and comprehensive gene analysis for spinal cord injury

## 研究代表者

馬場 久敏 (BABA HISATOSHI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：00165060

研究成果の概要（和文）：メカニカルストレスに対する DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。細胞の機械的ストレスには、培養細胞に周期的牽引負荷を与えることができる細胞伸縮装置 FX-3000TM-Flexercell Strain Unit (Flexercell International) を使用した。培養脊髄細胞は妊娠 Sprague-Dawley (SD) ラットの胎生 15 日目の胎仔より採取した。クラスタリング解析では遺伝子発現パターンにより 6 つのグループに分割された。発現時間により緩徐に signal 値が上昇するグループ (cluster1, 3) において GO 解析では“apoptosis”に属する 44 遺伝子が、“response to stimulus”に属する 17 遺伝子が抽出された。Pathway 解析では MAPK signaling の有意な変動が確認され、RT-PCR でも、PDGFR、G12、CACN、trkA/B、FGFR、Raf1、MKP、HGK、JIP3、HSP72、GAD D45、GAD D153 の mRNA の増加を確認し得た。脊髄へのメカニカルストレスは、膜損傷、軸索損傷、ニューロン伝達障害、異なった転写因子の発現、グリアの神経栄養因子関連産生を生じさせると考えられるが、ニューロン自身もまた遺伝子パターンを変化させ、その生存維持に応答していると推察された。

研究成果の概要（英文）：The present study was designed to investigate the effect of cyclic tensile stresses on cultured spinal cord cells using the Flexercell Strain Unit and DNA microarray technology. Spinal cord cells were isolated for culture from 15-day Sprague-Dawley rat embryos. The application of cyclic tensile stress reduced the viability of cultured spinal cord cells significantly in a dose- and time-dependent manner. Increasing either the strain or the strain rate independently was associated with significant decreases in spinal cord cell survival. There was no clear evidence of additive effects of strain level with strain rate. GO analysis identified 44 candidate genes which were significantly related to “apoptosis” and 17 genes related to “response to stimulus”. KEGG analysis identified changes in the expression levels of 12 genes of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, which were confirmed to be upregulated by RT-PCR analysis. These data may prove useful, as the accurate knowledge of neuronal gene expression in response to cyclic tensile stress will help in the development of molecular-based therapies for spinal cord injury.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

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、脊髄神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷後に末梢神経系では生じる軸索再生が中枢神経系で起こらない要因の一つとして、損傷時の神経栄養因子の不足、軸索再生阻害因子の存在が考えられている。一方新生ラット脊髄切断モデルにおいては、切断後に旺盛な軸索伸長、軸索再生が生じ、その再生に不利なグリア瘢痕組織の形成がほとんどみられない。即ち、新生ラット損傷脊髄内の環境は損傷軸索の再生にとって permissive な環境であり、豊富な神経栄養関連因子、軸索再生因子の存在が考えられている。脊髄圧迫損傷において前角ニューロン、反応性アストロサイトが脳由来神経栄養因子 (BDNF) を産生し組織の修復と再生に関与している可能性や、軸索伸長、軸索に軸索骨格因子 (GAP-43, NF68) の関与が示唆された。しかしながら、神経栄養効果が認められると考えられてきた種々の炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) が、濃度依存性で神経毒性の作用をもつことや、in vitro で神経栄養因子の代表とされていた毛様体神経栄養因子 (CNTF) が軸索伸長阻害に関与している可能性が指摘されている。即ち既知の遺伝子、その産物であるタンパクが脊髄再生において神経栄養性、毒性の二面性の様機能を有し、外部環境を量的規制、時間依存性をもちながら形成していると推察される。近年、マイクロアレイ法により、既知遺伝子の網羅的解析が可能となり、更には未知の遺伝子解析法も開発されている。このような既知、未知遺伝子の網羅的解析法を用いて軸索再生がみとめられる胎仔ラット脊髄切断モデルと成ラット脊髄切断モデル、および成ラット脊髄完全損傷と、不全損傷を比較する事で、脊髄神経細胞の生存維持、軸索再生に関与する真の遺伝子発現が評価できると考える。

## 2. 研究の目的

脊柱管内臓器である脊髄では、脊柱伸展、屈曲の際に長軸方向への移動および脊髄内に緊張帯が生じる。特に屈曲の際において、後縦靭帯骨化などの圧迫要素がある場合には、脊髄に加わる伸張力が強まり、脊髄内に irreversible な変化が生じると考えられる。細胞への in vitro での牽引ストレス実験は、以前より、骨芽細胞、髄核細胞、靭帯細胞などに対して応用されており、その刺激による蛋白発現、シグナル伝達について明らかにされてきているが、機械刺激に脆弱とされるニューロンに対してはその報告はいまだ少ない。今回、培養脊髄神経細胞を用いてメカニ

カルストレスに対する DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞の機械的ストレスには、培養細胞に周期的牽引負荷を与えることができる細胞伸縮装置 FX-3000TM-Flexercell Strain Unit (Flexercell International) を使用した。培養脊髄細胞は妊娠 Sprague-Dawley (SD) ラットの胎生 15 日目の胎仔より採取し、3 日間培養後、5%CO<sub>2</sub> incubator 内で機械的ストレスを加えた。機械的ストレスは 1 秒間伸展/弛緩 (最大 12%牽引) を継続的に加えた。遺伝子解析は RNA 抽出後、GeneChip Rat Genome 230 2.0 (Affymetrix 社) により、クラスタリング解析、Gene ontology (GO) 頻度解析、Pathway 解析 (KEGG 解析) を行った後、特定の目的遺伝子に対しては PT-PCR での発現量を解析した。

(2) 慢性脊髄圧迫モデル (*twy/twy*) についても同様の microarray による遺伝子網羅的解析および脊髄後角での免疫組織化学的評価を行った。*twy/twy* マウス (12, 18, 24 週齢) を用い、圧迫程度を CT 画像および組織標本で評価した後、microarray による遺伝子網羅的解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 評価したラット初代脊髄培養の NeN (神経細胞マーカー) 陽性率は約 71%であった。培養細胞は牽引ストレスによって、経時的に生存率が低下していた (図 1)。各ポイントにおいての遺伝子発現データを正規化し、フィルタリングにより、23506 のプローブセットを抽出、発現率 2 以上、発現差 200 以上をみたすものを、ストレスにより変動ありとし、3421 のプローブセットを更に抽出した。クラスタリング解析では遺伝子発現パターンにより 6 つのグループに分割された (図 2)。発現時間により緩徐に signal 値が上昇するグループ (cluster1, 3) において GO 解析では “apoptosis” に属する 44 遺伝子が、“response to stimulus” に属する 17 遺伝子が抽出された。Pathway 解析では MAPK signaling の有意な変動が確認され、PT-PCR でも、PDGFR, G12, CACN, trkA/B, FGFR, Raf1, MKP, HGK, JIP3, HSP72, GAD D45, GAD D153 の mRNA の増加を確認し得た (図 3)。6 時間ストレス後の neuron の発現する NGF, BDNF, p75, GDNF はコントロールに比べて増加していた (図 4)。

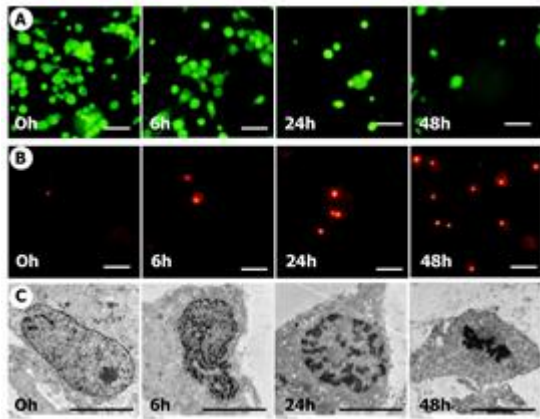


図 1. 牽引ストレスによる培養細胞の live & dead、および電子顕微鏡写真

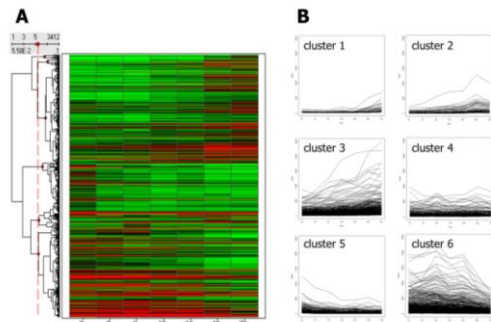


図 2. クラスタリング解析 (ヒートマップ)

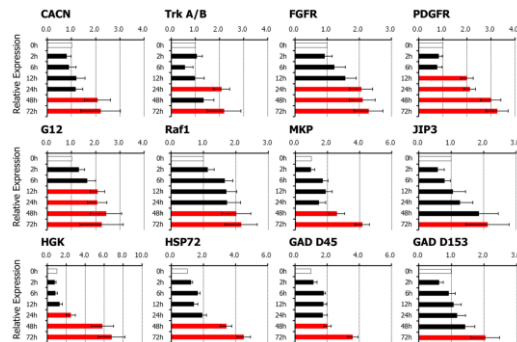


図 3. RT-PCR による経時的 mRNA 発現変化

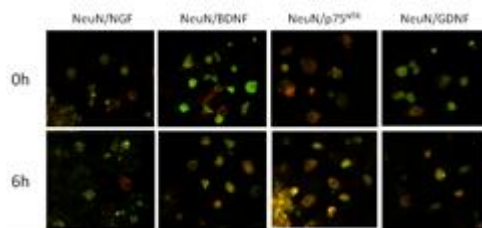


図 4. 神経栄養因子発現の経時的変化

(2) 評価した twy マウスの GO 解析では 12 週と 24 週の比較で、“response to stimulus” に属する 35 遺伝子、“defense response” に属する 15 遺伝子が抽出された。

Pathway 解析では MAPK signaling の有意な変動が確認された。組織学的検討では、p38, JNK, ERK1/2 の発現は圧迫が高度になるに従い増加した (図 5)。発現の source としては、p38 は microglia, JNK は astrocyte が主であったが、ERK1/2 は 18 週では neuron, microglia, astrocyte のいずれでも発現がみられたが、24 週では astrocyte が優位であった。

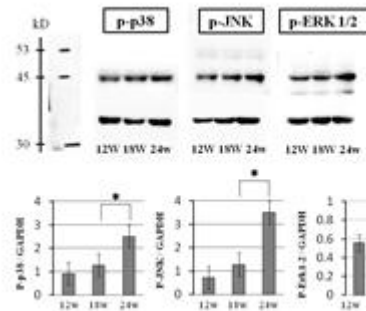


図 5. twy マウスにおける p38, JNK, ERK1/2 の経時的変化

脊椎の物性の変化としては、約 10% の伸長で髄内に緊張体が生じると White and Panjabi らが報告し、脊椎誘発電位の振幅の減少は、脊椎長さが 10%–17% で生じると報告されている。一方、in vitro の観察では、過去の報告では、軸索損傷、細胞死の観察目的での実験系が多く NG 細胞 (108-15)、PC12 などの cell line を用いての非生理的な、損傷実験が報告されている。今回の実験では、初代脊椎細胞を用いて、様々の条件による予備実験を行い、最大牽引 12% と、生理的条件に近い形での、遺伝子発現変化を観察した。牽引ストレスによる経時的な変化に対する遺伝子発現の signal の変動は大きく 6 つに分割され、様々な遺伝子が生存維持、細胞死に関与していた。脊椎へのメカニカルストレスは、膜損傷、軸索損傷、ニューロン伝達障害、異なった転写因子の発現、グリアの神経栄養因子関連産生を生じさせると考えられるが、ニューロン自身もまた遺伝子パターンを変化させ、その生存維持に応答していると推察された。

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 6 件)

1. Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Nakamura M, Johnson WE, Baba H. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation* 27:9:40, 2012 査読有 doi: 10.1186/1742-2094-9-40.
2. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright KT, Johnson WE, Baba H. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 29:1614-1625, 2012 査読有 doi: 10.1089/neu.2011.2109.
3. Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Guerrero AR, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Zhu P, Baba H. High-mobility Group Box-1 and Its Receptors Contribute to Proinflammatory Response in the Acute Phase of Spinal Cord Injury in Rats. *Spine* 36: 2122-2129, 2011 査読有 doi: 10.1097/BRS.0b013e318203941c.
4. Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Guerrero AR, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Baba H. Tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury. *Spine* 36: 1350-1358, 2011 査読有 doi: 10.1097/BRS.0b013e3181f014ec.
5. Uchida K, Nakajima H, Hirai T, Yayama T, Chen KB, Kobayashi S, Roberts S, Johnson WE, Baba H. Microarray analysis of expression of cell death-associated genes in rat spinal cord cells exposed to cyclic tensile stresses in vitro. *BMC Neurosci* 11:84, 2010 査読有 doi: 10.1186/1471-2202-11-84.
6. Nakajima H, Uchida K, Yayama T, Kobayashi S, Guerrero AR, Furukawa S, Baba H. Targeted retrograde gene delivery of brain-derived neurotrophic factor suppresses

apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury in rats. *Spine* 35:497-504, 2010 査読有 doi: 10.1097/BRS.0b013e3181b8e89b.

[学会発表] (計 6 件)

1. Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, Hirai T, Watanabe S, Baba H. Blockade of interleukin-6 signaling generates an alternative activating environment in the spinal cord after injury: Promoting a neuroprotective macrophage population with concurrent locomotive recovery in mice. 39th Annual Meeting of The Cervical Spine Research Society (CSRS 2011), 2011年12月8日, Arizona (USA)
2. Uchida K, Nakajima H, Hirai T, Watanabe S, Guerrero AR, Baba H. Microarray analysis of cell death-associated genes in rat embryo cultured spinal cord cells exposed to cyclic tensile stresses in vitro. The 27th Annual Meeting of the CSRS-ES, 2011年6月8日, Istanbul (Turkey)
3. 内田研造, 中嶋秀明, 彌山峰史, 杉田大輔, 渡邊修司, 馬場久敏. メカニカルストレスに対する培養脊髄ニューロンの MAPK キナーゼに関する遺伝子発現プロファイル. 第84回日本整形外科学会学術総会 2011年5月12日, Web開催
4. Baba H, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Takeura N, Yayama T. Some neuroprotective methods for spinal cord injury. The 13rd International Southern China Cardiology Congress (招待講演), 2011年4月21日, Guangzhou (China)
5. Uchida K, Nakajima H, Hirai T, Yayama T, Sugita D, Kobayashi S, Baba H. Cell death-associated genes expression patterns using microarray analysis in rat cultured spinal cord cells exposed to cyclic tensile stresses in vitro. 7<sup>th</sup> Combined Meeting of ORS, 2010. 10. 17, Kyoto (Japan)
6. 内田研造, 中嶋秀明, 彌山峰史, 杉田大輔, 渡邊修司, 馬場久敏. マイクロアレイを用いたメカニカルストレスに対する脊髄ニューロンの遺伝子発現解析. 第39回日本脊椎脊髄病学会, 2010. 4. 23, 高知

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬場 久敏 (BABA HISATOSHI)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号：00165060

### (2) 研究分担者

内田 研造 (UCHIDA KENZO)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号：60273009

### (3) 連携研究者

古川 昭栄 (FURUKAWA SHOEI)  
岐阜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：90159129