

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3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22790246
 研究課題名(和文) 脊髄損傷の運動機能障害に対するデノソミンの薬理作用と神経回路網の構築機序の解析
 研究課題名(英文) Effect of 1-deoxy-nor-sominone (Denosomin) on functional recovery of the injured spinal cord
 研究代表者
 勅使川原 匡 (TESHIGAWARA KIYOSHI)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：40403737

研究成果の概要(和文)：

新規化合物 1-deoxy-nor-sominone (Denosomin) の脊髄損傷マウスへの投与が、損傷脊髄領域における神経軸索の再伸展を促進させ、マウスの後肢運動機能障害を回復させることを明らかにした。Denosomin は、損傷脊髄領域におけるアストロサイトの細胞増殖、細胞死保護、さらに細胞骨格タンパクであるビメンチンの細胞外分泌を促進させていた。Denosomin 投与による神経軸索の伸長作用は、アストロサイトから分泌されるビメンチンを介した作用だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：

In this study, we clarified that a novel compound, 1-deoxy-nor-sominone (Denosomin) ameliorates spinal cord injury (SCI) via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. Denosomin increased astroglial proliferation, inhibited astroglial death and increased the secretion of vimentin in cultured astrocytes. Furthermore, vimentin promoted axonal outgrowth in cultured neurons. This study is the first to demonstrate this novel role of vimentin in SCI and drug-mediated modification of the property of reactive astrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：脊髄損傷、アストロサイト、神経細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、世界中で250万人以上が脊髄損傷によって重篤な運動機能障害を患っており、毎年、10万人以上が新たに脊髄に損傷を受けている。一方、脊髄損傷によって損なわれた運動機能の回復は、現在の臨床治療技術では非常に困難な状況にある。

脊髄損傷は、損傷部位における神経細胞のネクローシスや炎症性グリア細胞の浸潤、

ミエリンの脱落などの複数の要因により、脳と脊髄を結ぶ上行性・下行性脊髄路が分断され、身体の運動・感覚機能が麻痺した状態を指す。また、損傷部位(グリア瘢痕)におけるミエリン関連タンパクや細胞外基質が神経細胞の軸索伸展を阻害することで、損なわれた脊髄路の再生を困難なものにしている。

脊髄損傷による運動機能障害を改善するための多くの研究がこれまで報告されて

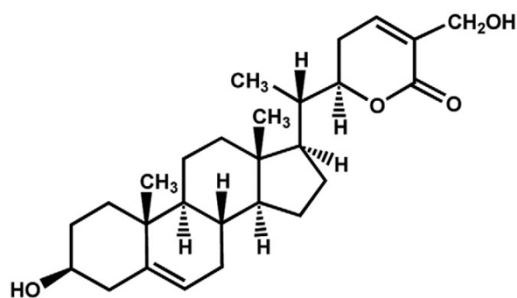
いる。例えば、ミエリン関連タンパクの働きを阻害することで神経細胞の軸索伸張が促進され、運動障害の改善が認められる。また、薬物療法として、細胞死抑制剤 Calpain inhibitor の投与による運動機能の改善や神経栄養因子 GDNF の投与による軸索伸張の促進などが報告されている。しかし、いずれも臨床治療に有効な段階までには至っていない。近年、神経幹細胞や人工多能性幹細胞の移植による再生医療も注目されているが、倫理面・安全面において解決すべき課題が多く残されている。何より、損傷を受けた脊髄において神経軸索がグリア瘢痕内を通過して伸張し、かつ運動機能を回復させるための神経回路網を再構築する分子機序自体が十分に解明されていない。

2. 研究の目的

新規化合物 1-deoxy-nor-sominone (Denosomin) による脊髄損傷における運動機能障害の改善効果、および神経回路網の再構築機序の解明を目的とする。

Denosomin は、化合物 Sominone の誘導体である (Fig. 1)。Sominone は、インド生薬アシュワガンダ由来成分である Withanoside IV の腸内代謝産物である。Withanoside IV や Sominone は、神経細胞に対して軸索伸張の促進作用をもつ。Denosomin は、Sominone と化学構造が類似しているが、Sominone に比べて合成が容易という利便性がある。また、未知の化合物の薬理作用を解析することで、神経回路網の形成機序に関する新たな情報伝達経路やタンパク分子が発見できる可能性が期待される。

Fig. 1: Structure of 1-deoxy-nor-sominone (Denosomin)



Denosomin is synthetic compound as an analogous derivative of sominone. Sominone is aglycon of Withanoside IV, which is one of the constituents of an ayurvedic tonic medicine Ashwagandha (root of *Withania somnifera* Dunal).

3. 研究の方法

(1) モデル動物を用いた個体レベルでの薬理解析

① 脊髄損傷マウス (SCI マウス) を作製し、Denosomin または Withanoside IV を経口的に 3 / 7 / 14 日間連日投与した。薬物投与期間中の SCI マウスの後肢運動機能を、水平梯子を渡る歩行機能の評価 (Horizontal Ladder Test)、肢関節の可動範囲を主な指標とした

歩行機能の評価 (Basso Mouse Scale, BMS スコア)、独自の評価基準による後肢が下半身を支持する筋力の評価 (Body Support Scale, BSS スコア) などによって検討した。

② Denosomin 投与後の SCI マウスの脊髄を採取し、凍結切片標本を作製した。損傷脊髄における神経細胞・グリア細胞・グリア瘢痕などの病態所見を免疫組織化学的手法によって解析した。損傷脊髄での細胞増殖・細胞死に対する Denosomin 投与の影響を BrdU 取込み法や TUNEL 染色法によって検討した。

③ Denosomin 投与後の SCI マウスの脊髄を採取し、RNA 抽出をおこなった。損傷脊髄における遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイ法・定量的 RT-PCR 法によって網羅的に解析した。

(2) 初代培養系細胞を用いた細胞レベルでの薬理解析

① 初代培養系ラット脊髄細胞および大脳皮質細胞の Denosomin 処置による影響を検討した。この初代培養系はトリプシン処理による分散培養法であり、神経細胞・グリア細胞の混合培養系となる。加えて、この培養実験系に対する Cytosine β -D-arabinofuranoside (Ara-C) 処置によって神経細胞の単離培養、また振盪培養法によってアストロサイトの単離培養をそれぞれおこない、Denosomin 処置による影響を検討した。神経突起の長さやシナプスの形成量を、免疫細胞化学的手法によって定量解析した。各種の培養細胞の計数や BrdU 取込み法・TUNEL 染色法によって増殖細胞率・死細胞率を検討した。スクラッチ培養法によってアストロサイトの細胞移動能を解析した。

② Denosomin 処置後の初代培養系神経組織細胞から RNA 抽出をおこない、遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイ法・定量的 RT-PCR 法によって網羅的に解析した。また同様に、Denosomin 処置後の初代培養系神経組織細胞または単離培養アストロサイトからタンパク抽出し、SDS-PAGE 電気泳動法 (一次元または二次元) をおこなった後、タンパク産生の変化を LC-MS/MS 質量解析法によって網羅的に解析した。

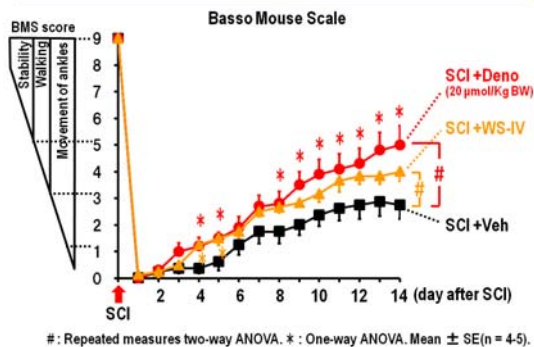
4. 研究成果

(1) SCI マウスの運動機能評価

Horizontal Ladder Test の評価では Denosomin 投与群の歩行機能に改善が認められたものの、対照群と比べて統計的な有意差がみられなかった。Denosomin 投与量は、10 μ M/Kg にておこなった。一方、Denosomin 投

与量を 20 $\mu\text{M}/\text{Kg}$ にて試行した BMS スコアおよび BSS スコアにおいては、対照群と比べて統計的に有意な歩行機能の改善が Denosomin 投与群に認められた。BMS スコアおよび BSS スコアによる評価では、Withanoside IV 投与群と比べても Denosomin 投与群に歩行機能の改善傾向が認められた (Fig. 2)。BMS スコアおよび BSS スコアの評価と比べて Horizontal Ladder Test の評価では、梯子歩行が平地歩行よりも繊細な歩行感覚を要する点や Denosomin 投与量などの実験条件の違いにより、歩行機能の改善効果が統計的に有意な差に至らなかったと考えられる。

Fig. 2: Recovery from hindlimb dysfunction by Denosomin in SCI mice



(2) SCI マウスの損傷脊髄の組織学的解析

対照群の脊髄の損傷内部では、ミクログリアの非常に強い活性化 (炎症反応) がみられた。また、アストロサイトが、損傷部周囲においてミクログリアを取り囲むように典型的なグリア瘢痕を形成していた。これに対して Denosomin 投与群では、ミクログリアの活性化は著しく減少し、また、アストロサイトは損傷部周囲のグリア瘢痕領域だけでなく、損傷内部にも顕著に浸潤していた。これらグリア細胞の分布を脊髄の損傷内部と損傷部周囲に区分して定量解析したところ、Denosomin 投与群はミクログリアの活性化が損傷内部と損傷部周囲の双方で有意に減少し、また、アストロサイトが損傷内部で有意に増加していた。さらに Denosomin 投与群では、脊髄の損傷内部に神経軸索が多数存在していた。対照群の脊髄の損傷内部には、神経軸索がほとんど存在していなかった。脊髄の損傷内部と損傷部周囲における神経軸索は、統計的にも有意に増加していた。

(3) 初代培養系神経細胞に対する Denosomin の薬理作用

初代培養系ラット脊髄細胞に対する Denosomin 刺激は、神経細胞の軸索および樹状突起のどちらの伸展も有意に促進させた。また、Denosomin 刺激は、培養神経細胞のシナプス形成密度も有意に増加させた。Denosomin 刺激による培養神経細胞の突起伸

展作用 (軸索および樹状突起) は、Somnone 刺激の場合と比べて同等の効果があつた。これらの解析は、ラット大脳皮質由来の初代培養系においても同様の結果を得た。Ara-C 処置によって単離培養されたラット大脳皮質由来の神経細胞は、Denosomin 刺激によって軸索伸展が促進されたものの、通常のトリプシン処理による初代培養細胞 (神経細胞・グリア細胞の混合培養系) に Denosomin 刺激をおこなった場合と比べると軸索伸展の促進効果は弱かった。また、単離培養された神経細胞に Denosomin 刺激をおこなっても、樹状突起の伸展は促進されなかった

(4) 初代培養系アストロサイトに対する Denosomin の薬理作用

単離培養アストロサイトに対する Denosomin 刺激は、アストロサイトの細胞増殖率を有意に増加させた。また、スクラッチ培養法によって細胞移動能を検討したが、スクラッチ領域へのアストロサイトの移動能は Denosomin 刺激によって影響されなかった。トリプシン処理による初代培養系ラット脊髄細胞および大脳皮質細胞 (神経細胞・グリア細胞の混合培養系) に対する Denosomin 刺激の場合も、グリア細胞全体としての細胞増殖率は有意に増加していた。神経細胞の数は全ての実験条件の群間において変化がなかった。単離培養アストロサイトは、過酸化水素水処置によって細胞死を顕著に誘発されるが、この細胞死の誘発は Denosomin の同時処置によって有意に抑制された。

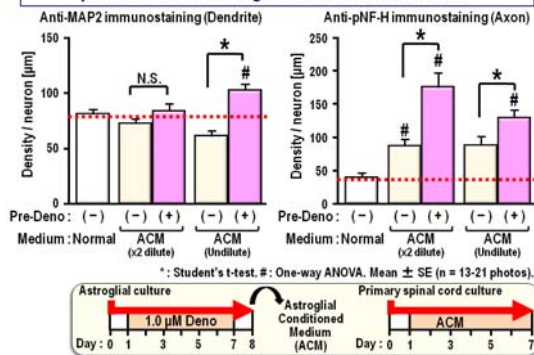
(5) SCI マウスの損傷脊髄における細胞増殖および細胞死保護に対する Denosomin の薬理効果

SCI 3 日目および 7 日目の損傷脊髄領域における増殖細胞数および死細胞数を検討した。Denosomin 投与群の増殖細胞数は、脊髄の損傷部周囲と損傷内部のどちらにおいても増加傾向がみられた。細胞増殖は、損傷内部と比べて損傷部周囲において顕著にみられ、SCI 3 日目の Denosomin 投与群の脊髄の損傷部周囲では統計的にも有意に増殖細胞数が増加していた。対照群の脊髄の損傷領域では、SCI 3 日目の損傷内部において細胞死が顕著に現れた。SCI 7 日目に至ると、損傷内部における細胞死はほとんどみられなくなるとともに、損傷部周囲において死細胞数が増加していた。Denosomin 投与群の脊髄では、損傷内部における死細胞数が全体的に減少傾向にあり、SCI 7 日目の損傷部周囲における死細胞数は統計的にも有意に減少していた。

(6) アストロサイトを介した Denosomin による神経突起の伸展促進作用

Denosomin 刺激条件下で培養された単離培養アストロサイトに、初代培養系ラット脊髄細胞を Denosomin 非存在下で重層培養すると、Denosomin 非刺激条件下のアストロサイトとの共培養と比べて、神経細胞の軸索および樹状突起の伸展が有意に促進された。また、Denosomin 刺激条件下で培養された単離培養アストロサイトのメディウム上清を初代培養系ラット脊髄細胞に処置すると、Denosomin 非刺激条件下のメディウム上清と比べて、軸索および樹状突起の伸展が有意に促進された (Fig. 3)。

Fig.3: Denosomin-pretreated astroglial conditioned medium promotes neurite outgrowth in cultured neurons



(7) 損傷脊髄において Denosomin 刺激によって発現量が増加する因子の網羅的探索

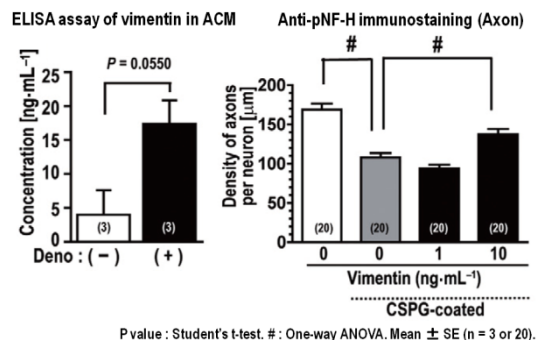
SCI マウスの損傷脊髄や初代培養系ラット脊髄細胞における Denosomin の標的因子を網羅的に探索した。プロテオーム解析では特定の Denosomin 標的因子を同定することができなかった。一方、ゲノミクス解析では、SCI マウスの損傷脊髄における約 43,000 個の遺伝子に対して、対照群で減少 (または増加) し、Denosomin 投与群で増加 (または減少) する遺伝子を 210 個 (または 785 個) 同定することができた。これらの同定遺伝子の中には肢の運動機能に関与することが報告されている遺伝子も含まれており、今後、Denosomin の標的因子の候補として詳細な解析をおこなうことが重要と考えられる。

(8) Denosomin 刺激によってアストロサイトから分泌される軸索伸展促進因子の同定

プロテオーム解析によって、Denosomin 刺激された単離培養アストロサイトにおいて、細胞骨格タンパクであるビメンチンの産生量が増加することを明らかとした。さらに、単離培養アストロサイトの抽出タンパクおよびメディウム上清の中のビメンチン量を ELISA 法によって定量解析したところ、いずれにおいても Denosomin 刺激によってビメンチンの発現量が有意に増加していた。軸索伸展阻害因子の一つであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の存在下で初代培養系ラット大脳皮質細胞を培養すると、神

経軸索の突起伸展は阻害されるが、ビメンチンを同時処置すると CSPG による神経軸索の伸展阻害は有意に抑制された。(Fig. 4)

Fig.4: Vimentin is secreted from Denosomin-stimulated astrocytes and promotes axonal outgrowth in cultured neurons



(9) Denosomin の作用機序 (まとめ)

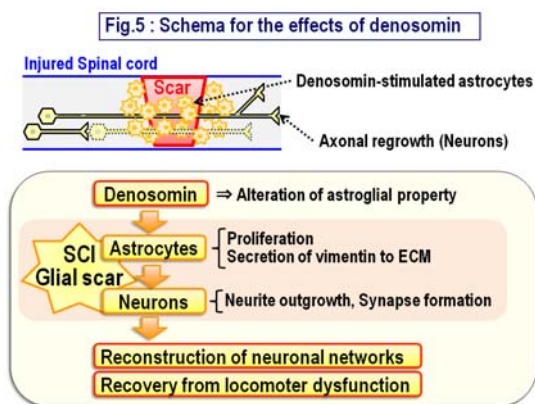
本研究は以下の事柄を明らかとした。

- ① SCI マウスの歩行障害は Denosomin 投与によって回復する。その損傷脊髄では神経軸索の再伸展・アストロサイトの増殖・ミクログリアの活性化抑制がみられる。
- ② 初代培養系神経細胞への Denosomin 刺激は、神経突起の伸展を促進させ、シナプス形成の密度を増加させる。
- ③ Denosomin 刺激は、単離培養アストロサイトの細胞増殖を促進させる。しかし、アストロサイトの細胞移動能に影響しない。
- ④ Denosomin 刺激された単離培養アストロサイトおよびそのメディウム上清は、神経細胞の突起伸展を促進させる。
- ⑤ Denosomin 刺激された単離培養アストロサイトは、細胞骨格タンパクであるビメンチンの分泌を誘導する。また、初代培養系神経細胞に対するビメンチン刺激は、神経軸索の突起伸長を促進させる。

脊髄損傷によって形成されるグリア瘢痕 (アストロサイト) は、一般に軸索再生の阻害要因と考えられている。しかし一方で、アストロサイトには、炎症の収束や神経細胞の保護といった役割もあり、神経軸索の再生に対して有益と思われる側面もある。アストロサイトには、神経軸索の再生に有益な性質が本質的に兼ね備えられており、Denosomin はそれを強く顕在化させたと考えられる。この Denosomin によるアストロサイトの性質変化によって、Astrocyte 自身の増殖と軸索伸展因子としてのビメンチンの分泌が促進され、それが神経細胞に対して突起伸展とシナプス形成を促進させ、結果として SCI によって損なわれた神経回路網が再構築され、運動機能傷害が回復したと考えられる (Fig. 5)。

この薬物によるアストロサイトの機能調節が直接的に神経軸索の再生を促進させ

るという現象はこれまでに報告がなく、グリア瘢痕におけるアストロサイトの未だ知られていない生理的役割の存在を示唆するとともに、脊髄損傷に対する新しい治療戦略の一つとなる可能性をも示唆していると考え



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)Teshigawara K, Kuboyama T, Shigyo M, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C. A novel compound, Denosomin ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *Br J Pharmacol*. 168(4):903-919(2013). 査読有.

(2)Hirata Y, Hosaka T, Iwata T, Chung le TK, Jambaldorj B, Teshigawara K, Harada N, Sakaue H, Sakai T, Yoshimoto K, Nakaya Y. Vimentin binds IRAP and is involved in GLUT4 vesicle trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*. 405(1):96-101(2011). 査読有.

(3)Teshigawara K, Hosaka T, Yamaguchi M, Terada E, Kisyuku Y, Fukunaga K, Hirata Y, Jambaldorj B, Harada N, Sakai T, Nakaya Y. Long-term treatment with hyperbaric air improves hyperlipidemia of db/db mice. *J Med Invest*. 57(3, 4):224-231(2010). 査読有.

[学会発表] (計 20 件)

(1)執行 美智子、勅使川原 匡、久保山 友晴、長田 愛子、Kenji Sugimoto、松谷 裕二、東田 千尋、新規化合物Denosominはvimentinを分泌するアストロサイトを介して、脊髄損傷後の軸索伸展を促進する、Neuro 2013 (日本神経科学大会、日本神経化学学会大会、日本神経回路学会大会 合同大会) (京都、2013年6

月20-23日)

(2)和氣 秀徳、森 秀治、高橋 英夫、劉 克約、勅使川原 匡、西堀 正洋、高ヒスチジン糖タンパク質の好中球走化性に対する影響、日本薬理学会 (福岡、2013年3月21-23日)

(3)劉 克約、富 麗、和氣 秀徳、勅使川原 匡、西堀 正洋、ピロカルピンで誘発癲癇モデルにおける抗HMGB1単クローン抗体の効果、日本薬理学会 (福岡、2013年3月21-23日)

(4)森岡 祐太、安藤 香織、友野 靖子、和氣 秀徳、勅使川原 匡、劉 克約、西堀 正洋、ラットランゲルハンス島におけるadvanced glycation end-productsの免疫組織化学的検出、日本薬理学会 (福岡、2013年3月21-23日)

(5)Kuboyama T, Teshigawara K, Shigyo M, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C. A novel compound, Denosomin induces vimentin-secretion from astrocytes, resulting in promotion of axon elongation. *Neuroscience 2012* (New Orleans, Louisiana (USA), October 13-17/2012)

(6)Shigyo M, Kuboyama T, Teshigawara K, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C. Denosomin improves SCI via axonal growth by increasing astrocyte-secreted vimentin. *Neuroscience 2012* (New Orleans, Louisiana (USA), October 13-17/2012)

(7)劉 克約、張 継勇、和氣 秀徳、勅使川原 匡、高橋 英夫、森 秀治、西堀 正洋、虚血時のBBB透過性亢進を濾出したEvans blue/Albuminの追跡検討、日本薬理学会 (京都、2012年3月14-16日)

(8)和氣 秀徳、森 秀治、高橋 英夫、劉 克約、勅使川原 匡、西堀 正洋、高ヒスチジン糖タンパク質はHMGB1-ヘパリン複合体誘導血管新生を抑制する、日本薬理学会 (京都、2012年3月14-16日)

(9)森岡 祐太、友野 靖子、和氣 秀徳、劉 克約、勅使川原 匡、高橋 英夫、森 秀治、西堀 正洋、ラットリンパ節細胞を用いた抗AGEモノクローナル抗体の作製、日本薬理学会 (京都、2012年3月14-16日)

(10)福安 悠介、劉 克約、和氣 秀徳、西村 義人、勅使川原 匡、西堀 正洋、虚血時に脳神経細胞内HMGB1は、核からペルオキシソーム/ミトコンドリアに移動する、日本薬理学会 (京都、2012年3月14-16日)

(11) **勅使川原 匡**、久保山 友晴、松谷 裕二、東田 千尋、新規化合物 1-deoxy-nor-sominone (Denosomin) によるアストロサイトを介した脊髄損傷の改善作用、日本神経化学会 (石川、2011 年 9 月 26-28 日)

(12) 執行 美智子、長田 愛子、**勅使川原 匡**、久保山 友晴、松谷 裕二、東田 千尋、脊髄損傷の運動機能回復に關与するDenosominの軸索伸展作用、日本神経化学会 (石川、2011 年 9 月 26-28 日)

(13) **勅使川原 匡**、生薬成分を基に合成された新規化合物デノソミンの脊髄損傷による運動機能障害の改善効果、ほくりく健康創造クラスター若手研究者交流会・分科会 (富山、2011 年 8 月 1 日、分科会発表)

(14) **勅使川原 匡**、長田 愛子、久保山 友晴、松谷 裕二、東田 千尋、新規化合物 1-deoxy-nor-sominone (Denosomin) によるアストロサイトを介した神経突起の伸展作用、日本薬理学会年会 (パシフィコ横浜、2011 年 3 月 22-24 日、東日本大震災のため誌上開催)

(15) 山口 美輪、保坂 利男、**勅使川原 匡**、寺田 依里、福永 恵子、西脇 由佳、平田 容子、酒井 徹、中屋 豊、加圧空気療法 (Hyperbaric air therapy: HBAT) は糖尿病マウスの脂質異常症を改善する。日本統合医療学会 IMJ2010 徳島大会 (徳島大学、2010 年 12 月 11 日-12 日)

(16) Nagata A, **Teshigawara K**, Matsuya Y, Tohda C. The molecular mechanism of 1-deoxy-nor-sominone (Denosomin) for repairing spinal cord injury. Neuroscience 2010 (San Diego, California (USA), November 13-17/2010)

(17) **勅使川原 匡**、長田 愛子、松谷 裕二、東田 千尋、新規化合物 1-deoxy-nor-sominone (Denosomin) による損傷脊髄における神経回路網の再構築作用、日本神経科学大会 Neuro2010 (神戸コンベンションセンター、2010 年 9 月 2-4 日)

(18) 長田 愛子、**勅使川原 匡**、松谷 裕二、東田 千尋、脊髄損傷改善作用を有する 1-deoxy-nor-sominone (Denosomin) の分子メカニズムの検討、日本神経科学大会 Neuro2010 (神戸コンベンションセンター、2010 年 9 月 2-4 日)

(19) 平田 容子、保坂 利男、**勅使川原 匡**、阪上 浩、酒井 徹、中屋 豊、Vimentinは、

GLUT4 小胞蛋白IRAPと結合し糖取り込みを調節する。日本糖尿病学会 (岡山、2010 年 5 月 27-29 日)

(20) Jambaldorj B, Hosaka T, Terada E, Kishuku Y, Hirata Y, **Teshigawara K**, Chung le TK, Sakai T, Sakaue H, Matsumoto T, Nakaya Y. CSP1 involved in insulin resistance by attenuating Glut4 vesicle docking with plasma membrane. 日本糖尿病学会 (岡山、2010 年 5 月 27-29 日)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 好中球活性化調節剤

発明者: 西堀正洋、森秀治、和氣秀徳、高橋英夫、劉克約、**勅使川原 匡**

権利者: 国立大学法人 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-129232 号

出願年月日: 2012 年 6 月 6 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勅使川原 匡 (TESHIGAWARA KIYOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 40403737

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者