

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 2 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791370

研究課題名（和文）

脊髄損傷に対する耐熱性ケラターゼの効果～慢性期投与と臨床応用に向けて

研究課題名（英文）

Therapeutic effect of Keratanase for chronic spinal cord injury

研究代表者

今釜 史郎 (IMAGAMA SHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40467288

研究成果の概要（和文）：ラット脊髄損傷モデルにおいて、慢性期にケラタン硫酸分解酵素であるケラターゼを投与することで運動機能回復に効果があるかを検討した。損傷直後、損傷後 3d、5d、7d、2w、4w から投与開始したところ損傷後 2w までに治療した群では回復効果を認めしたが、4w 以降では運動機能回復を認めなかった。損傷後数日してからの投与でも下肢運動機能回復にケラターゼが有効である知見が得られた。しかし、損傷直後の投与と比較するとその回復程度はやや劣っていた。慢性期の薬剤投与は、既に形成された瘢痕が軸索伸長を阻害し、運動機能回復を妨げる。慢性期の脊髄損傷治療においては、瘢痕を減少させる試みや、複数の薬剤の併用、リハビリテーションの併用など多方面からの治療アプローチが必要と思われる。

研究成果の概要（英文）：Failure of axonal regrowth is a major obstacle to the treatment of injuries of the adult central nervous system, and proteoglycans are strong inhibitory cues. Chondroitin sulfate chains of the proteoglycan moiety have been thought to be principal in this inhibition, as the chondroitin sulfate-degrading enzyme chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. Here we show that the keratan sulfate-degrading enzyme keratanase II promoted the recovery of both motor and sensory function after spinal cord injury in rats. Consistent with this, keratanase II promoted axonal regrowth *in vivo* and *in vitro*. Functional recovery after spinal cord injury in rats with administration of Keratanase II in chronic phase was significantly better than those of vehicle control, but slightly more inferior than those in acute phase. This study showed that administration of Keratanase II in chronic phase was one of the therapeutic method for spinal cord injury, but further investigation would be needed, including degradation of glial scar, combination of several drugs, and rehabilitation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：脊髄損傷、慢性期、プロテオグリカン、ケラタン硫酸、ケラターゼ、運動機能回復、齧歯類

1. 研究開始当初の背景

多くの脊髄損傷患者が麻痺を抱えているに

も関わらず、現在有効な治療法が存在しない。脊髄損傷による悲惨な患者を減らし、重度の障害者への莫大な医療費、介護費を節減するためにも、一刻も早い有効な治療法の開発が望まれる。これまで神経栄養因子の存在やコンドロイチン硫酸 (CS) などの神経再生抑制因子による病態解明が進んできており、臨床応用への展開が期待されるがいずれも小動物を利用した実験段階である。また近年注目されている iPS 細胞移植も癌化のリスクを払拭できていない。そこで我々は新しい神経軸索再生抑制因子と予測されるプロテオグリカンの1種であるケラタン硫酸 (KS) に着目した。

本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけとして、同系統のCSに関しては英国の J.W.Fawcett らがラット脊髄損傷に対しコンドロイチナーゼ ABC を損傷部位に投薬し下肢機能の回復を報告している (Bradbury et al. Nature. 416. 636-640, 2002)。またKSに関しては米国の M.H.Tuszynski らが、KSによる軸索伸長阻害作用を示した (Jones et al. Journal of Neurosci. 22. 4611-4624, 2002)。J.W.Fawcett らはさらに KS 分解酵素であるケラタナーゼによって末梢神経の dorsal root ganglion の軸索伸長効果を報告している (Linda et al. Journal of cell Science. 107. 1687-1695, 1994)。その他脊髄損傷後にKSが損傷領域に発現する報告はあるが、実際に脊髄損傷で軸索伸長阻害を証明した報告は過去にない。

2. 研究の目的

コンドロイチン硫酸と同系統のケラタン硫酸に注目し、ケラタン硫酸分解酵素である

ケラタナーゼをラット脊髄損傷モデルに投与して、その神経回復効果を確認する。また急性期と慢性期投与で運動機能回復の差異を検討する。

3. 研究の方法

S.Dラット (雌、9週齢) を用い、エーテルとケタミン麻酔下に、一定した脊髄損傷モデル作成が可能な IH-0400 impactor (Neuroscience.idea,Co.,Ltd) を用い圧挫損傷を作製した。損傷後、酵素を充填した浸透圧ポンプ付きマイクロチューブをクモ膜下に挿入し、薬剤投与モデルとした。急性期モデルは損傷直後に、慢性期モデルは受傷後d、5d、7d、2w、4wから投与を開始した。

運動機能評価として、BBB (open fieldにて観察) (Basso et al. Journal of Neurotrauma. 12. 1-21, 1995)、Grid test (%Grip)(20mm格子状の金網を下肢を落とさず把持できた割合を観察する)、Foot print analysis (ラットの歩容をstride width、stride lengthで評価する) を行い、定時刻、double blindにて複数人の検者にて10週間観察し下肢運動機能の回復程度を評価した。

電気生理学的検査ではMEPのLatency, Duration, Amplitudeの差を測定し解析を行った。(Iuliano et al. Journal of Neurological Sci. 123. 186-94, 1994) このように電気生理学的にも運動機能回復を確認可能とした。

組織学的検査は、還流固定後凍結切片を作成し「KS, CS, GFAP(reactive astrocyte), 2B6, Gap43, CGRP, Collagen4(fibrous tissue), 5HT, neurofilament」などの免疫染色を行った。その後蛍光画像解析システム MetaMorph Imaging System (Molecular Devices

Corporation) にて新生軸索数や scar 面積などを解析した。治療群での軸索伸長促進の有無など、組織学的にも評価をした。

軸索伸長の確認としてトレーサー実験を行った。脊髄損傷後 8 週間で、麻酔下に脳へ 10%BDA (Invitrogen 社) を左右 3.5 μ l ずつ注入した。その 2 週間後 sacrifice し、前述の蛍光画像解析システムにて新生軸索の Fiber count や軸索再生、sprouting の形態などを解析した。

4. 研究成果

Control群では回復が乏しかったのに対し、K-II は良好な下肢運動機能回復を得た。損傷直後、損傷後 3d、5d、7d、2w、4w から投与開始したところ損傷後 2w までに治療した群では回復効果を認めなかったが、4w 以降では運動機能回復を認めなかった。

さらに Grid test や foot print テスト、電気生理学的検討も行い運動機能の評価したが、同様の結果であった。さらに組織学的検討として、軸索伸長の程度を定量するため損傷後 8 週間で BDA 色素を用いトレーサー実験を行った。損傷後 10 週間の定量では、対照群に対し有意に多い軸索が確認できた。Gap43 染色、5HT 染色、NF 染色も行ったが、いずれも治療群で良好な下肢運動機能を支持する結果を得た。4W 以降の慢性期では有意な差を認めなかった。

損傷後数日してからの投与でも下肢運動機能回復にケラタナーゼが有効である知見が得られた。しかし、損傷直後の投与と比較すると、その回復程度はやや劣っていた。慢性期の薬剤投与は、既に形成された瘢痕が軸索伸長を阻害し、運動

機能回復を妨げる。慢性期の脊髄損傷治療においては、瘢痕を減少させる試みや、複数の薬剤の併用、リハビリテーションの併用など多方面からの治療アプローチが必要と思われる。

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)

Shiro Imagama, Kazuma Sakamoto, Ryoji Tauchi, Ryuichi Shinjo, Tomohiro Ohgomori, Zenya Ito, Haoqian Zhang, Yoshihiro Nishida, Nagamasa Asami, Sawako Takeshita, Nobuo Sugiura, Hideto Watanabe, Toshihide Yamashita, Naoki Ishiguro, Yukihiko Matsuyama, Kenji Kadomatsu. Keratan Sulfate Restricts Neural Plasticity after Spinal Cord Injury. J Neurosci. 31(47): 17091-102. 2011. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

今釜 史郎 (IMAGAMA SHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40467288

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし