

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19587

研究課題名（和文）損傷脊髄中のグリア細胞・炎症細胞の遊走制御による治療法の開発

研究課題名（英文）Development of therapeutic methods by controlling migration of glial cells and inflammatory cells in injured spinal cord

研究代表者

小早川 和（Kobayakawa, Kazu）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40772322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：脊髄損傷後マクロファージから分泌されるATPがADPとなり、これが反応性アストロサイトP2Y1受容体と反応して細胞内シグナリングを経て遊走を促す可能性が示された。一方でP2Y1受容体のinhibitorであるMRS-2179を脊髄損傷後に髄注したところ、アストロサイトの求心性遊走が阻害される事が判明した。これらの結果は、損傷中心部へ遊走・集簇したマクロファージが分泌したATPがADPとなり、このADPが反応性アストロサイトのP2Y1Rを介して遊走を促進した可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄への直接の外力による一次損傷の後、マクロファージ等の炎症細胞による炎症によって起きる続発的な二次損傷が脊髄損傷を重症化させると考えられてきた。しかし今回の結果は、「これまで有害な現象とされてきた炎症細胞の遊走」が、脊髄組織修復に重要なアストロサイトの遊走を促進する事により、組織修復と運動機能回復に貢献している事が示された。今後の更なる研究により、アストロサイトの遊走を実質的に促し、炎症細胞をより狭い範囲へ収束させ、軸索伸展・再生阻害因子であるグリア瘢痕を縮小する事に成功すれば、炎症細胞浸潤抑制主義一辺倒の世界の研究の潮流に変革をもたらす重要な知見を本研究は示している。

研究成果の概要（英文）：It has been shown that ATP secreted by macrophages after spinal cord injury becomes ADP, which reacts with reactive astrocyte P2Y1 receptors and promotes migration through intracellular signaling. On the other hand, when MRS-2179, an inhibitor of the P2Y1 receptor, was injected intrathecally after spinal cord injury, it was found that the migration of astrocytes was inhibited. These results indicate that ATP secreted by macrophages that migrated and aggregated to the injury center became ADP, and that this ADP promoted migration via P2Y1R of reactive astrocytes.

研究分野：整形外科学、中枢神経損傷

キーワード：アストロサイト 脊髄損傷 マクロファージ 遊走

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

長きにわたり再生不可能と信じられてきた中枢神経にも実際には可塑性が存在する事が明らかとなり、脊髄損傷においても機能回復を促進する治療法が次々に考案され、積極的に臨床試験が行われている。国内においても GCS-F 投与、HGF 投与は既に臨床試験が行われ、高い期待が寄せられる iPS 細胞の脊髄内移植も実施された。iPS 細胞は移植後に 3 割ほどがオリゴデンドロサイトへと分化して、脱髄した神経軸索を再髄鞘化し、機能回復を促す (*Kawabata et al., Stem Cell Report, 2016*)。オリゴデンドロサイト以外にも、iPS 細胞からは GFAP 陽性のアストロサイトも分化するが、その病態生理学的役割には不明な点が多い。我々はこれまでに、アストロサイトが脊髄損傷後に活性化して反応性アストロサイトとなり、損傷辺縁部から損傷中心部へ遊走し、外傷後に脊髄へ浸潤した白血球 (好中球や単球から分化したマクロファージ) を損傷中心部へ押しやり、組織修復と機能回復に寄与する事を明らかにした (左下図、*Okada et al., Nature medicine, 2006*)。更に、遊走して損傷中心部のコラーゲンに接した反応性アストロサイトは、瘢痕形成性アストロサイトとなり、機能回復を阻害する事が明らかとなった (右下図、*Hara et al., Nature medicine, 2017*)。これらの研究結果から、アストロサイトが活性化して損傷部へ遊走しつつ炎症細胞を損傷中心部へ追い込み、自ら瘢痕化して炎症細胞を閉じ込めるプロセスが、損傷脊髄の組織修復と機能回復に重要な影響を与えたと考えられてきた。しかし近年我々は、転写因子 IRF8 欠損マウスの解析を行う過程で、「アストロサイトの遊走がマクロファージに」影響する以上に、「マクロファージの IRF8 を介した ATP, ADP に対する P2X/Y 受容体依存的な損傷中心部への遊走がアストロサイトの遊走に」影響する事を報告した (*Kobayakawa et al., Science Advances 2019*)。さらに、ADP は P2Y1 受容体を介して直接アストロサイトの遊走をも促す。これらのメカニズムを応用すれば、アストロサイトの損傷中心部への遊走を促進する事で炎症細胞の収束化とグリア瘢痕の縮小を引き起こす可能性を示している。

2. 研究の目的

上述のように、脊髄損傷後のアストロサイトの遊走を制御する事が可能であると思われた。そこで今回は、損傷脊髄中心部に ADP や P2X/Y 受容体阻害薬を髄注する事によってアストロサイトの遊走を制御し、炎症のより早期の収束とグリア瘢痕縮小を引き起こし、もって損傷脊髄の組織修復と機能回復を促す治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

アストロサイトとマクロファージの遊走の相互作用に関して詳細に解析するために、反応性アストロサイトが EGFP で標識される Nes-EGFP⁺マウスにマクロファージの遊走が障害された IRF8KO マウスの骨髄細胞を骨髄移植し、Nes-EGFP⁺/IRF8^{-/-}骨髄キメラマウスを作成し、コントロールとして WT マウスの骨髄細胞を骨髄移植した Nes-EGFP⁺/IRF8^{+/+}骨髄キメラマウスを作成した。また、反応性アストロサイトの遊走が促進された場合に、マクロファージ遊走障害の影響を調査するため、反応性アストロサイトの遊走が促進される Nes-EGFP⁺-Socs3^{-/-}マウスに IRF8KO マウスの骨髄細胞を骨髄移植した、Nes-EGFP⁺-Socs3^{-/-}/IRF8^{-/-}骨髄キメラマウスを作成し、コントロールとして WT マウスの骨髄細胞を骨髄移植した Nes-EGFP⁺-Socs3^{-/-}/IRF8^{+/+}骨髄キメラマウスを作成した。これらのキメラマウスに、IH impactor で 70kdyn の強度で第 10 胸椎レベルの脊髄に定量的な圧挫損傷を与え、損傷後に脊髄の免疫組織学的解析、下肢運動機能解析を行なった。

In vitro での遊走能を試験するため、アストロサイトの初代培養を行なった。生後 2 日目の C57BL/6J マウスの髄膜を除去した後、脳組織を DMEM と 0.25% トリプシンおよび 4mg/ml DNase I で処理し、解離した細胞を 0.25% FBS 中で 300 × g で 3 分間遠心分離した。10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含む DMEM をアストロサイト用培地として用いた。培養アストロサイトをポリ-L-リジンでコーティングした T75 フラスコに播種した。7 日間培養後に 37 °C のインキュベーターで、T75 フラスコをシェーカー上で振とうし、180 rpm で 30 分間遠心してミクログリアを除去した。さらにオリゴデンドロサイト前駆細胞を除去するために、アストロサイト用培地を加えたフラスコをシェーカー上で 240 rpm、6 時間処理した。アストロサイトは T75 フラスコから 0.25% トリプシンを用いて剥離した。また、初代マクロファージ培養は、C57BL/6J マウスから調製した。筋肉と腱を除去した後、大腿骨から骨髄細胞を抽出した。10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、および 40ng/ml M-CSF を含む RPMI 1640 をマクロファージ分化用培地として使用した。細胞をポリ-L-リジンでコーティングした T25 フラスコに播種した。37 °C の加湿 CO₂ インキュベーター内で 6 日間培養した後、EDTA を使用してマクロファージを T25 フラスコから分離した。これらの細胞と Transwell inserts を使用してトランスウェルアッセイを行なった。各ウェルに 5.0 × 10⁴ 個の細胞を播種した。各条件にて、対照群と比較した遊走細胞の増加率を評価した。

ADP 及び P2Y 受容体阻害剤投与実験には 8 週齢の C57BL/6J マウスの雌を使用した。IH impactor で 70kdyn の強度でマウス第 10 胸椎レベルの脊髄に定量的な圧挫損傷を与え、損傷後 4 日目にインフュージョンポンプを植え込み、カテーテル先を損傷中心部へ設置して、ADP を 0.25

$\mu\text{l/h}$ で持続的に髄注した。また、P2Y1 インヒビター (MRS-2179) を損傷部へ髄注したのち、損傷 2 週間までアストロサイトの中心への遊走を解析した。先行研究により、アストロサイトの遊走は損傷 2 週間まで顕著に観察される為、脊髄損傷 2 週目に薬剤投与群と、非投与群の脊髄の免疫染色によって、GFAP 陽性のアストロサイトの遊走及びその結果としてのアストロサイト性グリア瘢痕の範囲を計測し、2 群間で比較し、アストロサイトの遊走促進の有無を評価した。

4. 研究成果

脊髄損傷後にマクロファージの遊走障害が起こる $\text{Nes-EGFP}^+/\text{IRF8}^{-/-}$ キメラマウスを作製し、解析を行なった。脊髄損傷後 7, 14 日目に脊髄損傷の程度を比較したところ、いずれの時点でもマクロファージの遊走障害が起きる場合はコントロールに比べグリア瘢痕面積が有意に小さいことがわかった。また、グリア瘢痕の性質を、損傷縁のアストロサイトの細胞密度、アストロサイトの細胞面積、アストロサイトの増殖能の観点から評価した。すると、受傷後 7 日目、14 日目のいずれにおいても $\text{Nes-EGFP}^+/\text{IRF8}^{-/-}$ キメラマウスとコントロールの間に有意差は認められず、マクロファージの遊走はアストロサイトの重合、アストロサイトの瘢痕化、アストロサイトの増殖に影響を及ぼさないにも関わらず、広範な瘢痕形成が起こっていることが示された。マクロファージにおける IRF8 は、脊髄損傷後の反応性アストロサイトの移動に関与する Slc39a6 の遺伝子発現に影響を与えなかった。これらの結果は、IRF8 を介したマクロファージの移動が反応性アストロサイトの移動に影響を与えることを示すだけでなく、反応性アストロサイトの内在性の遊走能を変化させずに外部から遊走能を変化させる事を示唆するものであった。

我々はこれまでに、 Socs3 の欠損によって移動が促進される反応性アストロサイトが、マクロファージなどの炎症性細胞の中心部へのコンパクションを促進することを明らかにしてきた。この結果は、反応性アストロサイトの遊走とマクロファージの遊走に影響を及ぼしていることを示唆している。そこで、IRF8 を介したマクロファージ遊走と Socs3 を介した反応性アストロサイト遊走の相互作用を調べるために、反応性アストロサイトが $\text{Socs3}^{-/-}$ で EGFP 陽性、マクロファージが WT または $\text{IRF8}^{-/-}$ 、すなわち [反応性アストロサイト: $\text{Nes-Cre-Socs3}^{-/-}\text{EGFP}^+$ / Macrophages: WT] または [反応性アストロサイト: $\text{Nes-Cre-Socs3}^{-/-}\text{EGFP}^+$ / Macrophages: $\text{IRF8}^{-/-}$] マウスを作成した。これらのキメラマウスに脊髄損傷を作成したところ、興味深い結果が得られた。マクロファージの遊走を促進するであろう $\text{Socs3}^{-/-}$ 反応性アストロサイトの存在下でも、マクロファージの IRF8 を欠損させるとマクロファージの遊走が起こらず、アストロサイトの遊走障害が生じ、運動機能回復も低下した。 Socs3 は Stat3 の負のフィードバック因子であり、 STAT3 が RhoA を介して反応性アストロサイトの遊走を制御していることが知られている。 Socs3 の有無に関わらず IRF8 の KO による瘢痕拡大が生じるということは、マクロファージがアストロサイトを制御している機序に Stat3-RhoA pathway が関与している可能性は低いと考えられた。さらに、 Stat3 の転写下流標的である亜鉛トランスポーター LIV1 をコードする Slc39a6 の発現レベルは、IRF8 が存在してもしなくても変わらないという結果も、この仮説を支持していた。

そこで、マクロファージがアストロサイトを引き寄せる仕組みを解明するために、移動経路の代表的な受容体として P2Y 受容体に注目した。これは、P2Y1 受容体が外傷性脳損傷におけるアストロサイトの速度に関与しており、加えて P2Y1 受容体は MAP/ERK 経路を介して migration の制御を行なっていることが知られる。そこで、マクロファージが P2RY1 受容体を介してアストロサイトを誘引している可能性があるかと仮定した。初代培養アストロサイトを用いたトランスウェル浸潤アッセイを行った。まず、マクロファージがアストロサイトを誘引していることを確認するために、マクロファージと共培養した。下のウェルにマクロファージを添加した群の浸潤アストロサイトの数は、ウェルに培地のみを添加した対照群に比べ、有意に増加した。次に、マクロファージがアストロサイトを誘引する経路を明らかにするための実験を行った。P2Y1R のリガンドである ADP を添加した培地ではアストロサイトの浸潤数が増加し、P2Y1R 拮抗薬を投与したアストロサイトでは浸潤数が減少した。細胞外に分泌された ATP は ADP へと分解されるため、マクロファージが分泌する ATP 由来の ADP が P2RY1 を介してアストロサイトに引き寄せられていたと考えられた。

さらにこの現象を *in vivo* で解析するため、WT マウス脊髄損傷後に、損傷脊髄中心部にマイクロカテーテルを設置して ADP を持続髄注したところ、反応性アストロサイトの遊走が促進され、最終的に形成されるグリア瘢痕の体積が減少した。また、マクロファージが反応性アストロサイトを引き寄せるメカニズムとして ADP-P2Y1 受容体系に着目し、P2Y1 受容体の inhibitor である MRS-2179 を脊髄損傷後に髄注したところ、アストロサイトの求心性遊走が阻害される事が判明した。これらの結果は、損傷中心部へ遊走・集簇するマクロファージが分泌した ATP が ADP となり、この ADP が反応性アストロサイトの P2Y1R を介して遊走を促進した可能性を示している。本研究成果は主に Scientific reports 誌より報告した (Ono et al., Scientific reports, 2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ono Gentaro, Kobayakawa Kazu, Saiwai Hirokazu, Tamaru Tetsuya, Iura Hirotaka, Haruta Yohei, Kitade Kazuki, Iida Keiichiro, Kawaguchi Kenichi, Matsumoto Yoshihiro, Tsuda Makoto, Tamura Tomohiko, Ozato Keiko, Inoue Kazuhide, Konno Dai-Jiro, Maeda Takeshi, Okada Seiji, Nakashima Yasuharu	4. 巻 13
2. 論文標題 Macrophages play a leading role in determining the direction of astrocytic migration in spinal cord injury via ADP-P2Y1R axis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-38301-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kitade Kazuki, Kobayakawa Kazu, Saiwai Hirokazu, Matsumoto Yoshihiro, Kawaguchi Kenichi, Iida Keiichiro, Kijima Ken, Iura Hirotaka, Tamaru Tetsuya, Haruta Yohei, Ono Gentaro, Konno Daijiro, Maeda Takeshi, Okada Seiji, Nakashima Kinichi, Nakashima Yasuharu	4. 巻 40
2. 論文標題 Reduced Neuroinflammation Via Astrocytes and Neutrophils Promotes Regeneration After Spinal Cord Injury in Neonatal Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 2566 ~ 2579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2023.0044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kijima Ken, Ono Gentaro, Kobayakawa Kazu, Saiwai Hirokazu, Okada Seiji, Nakashima Yasuharu et al	4. 巻 14
2. 論文標題 Zinc deficiency impairs axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury by modulating macrophage polarization via NF- B pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1290100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tamaru Tetsuya, Kobayakawa Kazu, Saiwai Hirokazu, Konno Daijiro, Kijima Ken, Yoshizaki Shingo, Hata Kazuhiro, Iura Hirotaka, Ono Gentaro, Haruta Yohei, Kitade Kazuki, Iida Kei-ichiro, Kawaguchi Ken-ichi, Matsumoto Yoshihiro, Kubota Kensuke, Maeda Takeshi, Okada Seiji, Nakashima Yasuharu	4. 巻 359
2. 論文標題 Glial scar survives until the chronic phase by recruiting scar-forming astrocytes after spinal cord injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 114264 ~ 114264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2022.114264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小早川 和、幸 博和、岡田 誠司、前田 健、中島 康晴	4. 巻 57
2. 論文標題 Lecture 脊髄損傷の病態解明と新規治療法の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床整形外科	6. 最初と最後の頁 809 ~ 813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1408202373	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 脊髄損傷の病態解明による新規治療法の開発
3. 学会等名 第18回 名古屋脊椎脊髄 Webセミナー 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 脊髄損傷の病態理解と新規治療法の探求
3. 学会等名 第5回脊髄損傷再生治療研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 脊髄損傷の病態解明と神経回路再生への課題
3. 学会等名 第4回日本再生医療とリハビリテーション学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 脊髄損傷の病態に基づく治療法の開発と神経回路再生への課題
3. 学会等名 第4回日本脊椎外傷フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小早川 和, 岡田 誠司, 幸 博和, 田丸 哲弥, 井浦 広貴, 春田 陽平, 小野 玄太郎, 北出 一季, 前田 健, 中島 康晴
2. 発表標題 脊髄損傷の病態解明と新規治療法の開発
3. 学会等名 第57回日本脊髄障害医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小早川 和, 幸 博和, 小野 玄太郎, 北出 一季, 中島 康晴
2. 発表標題 脊髄損傷後の自然修復メカニズムの探求
3. 学会等名 第49回日本臨床バイオメカニクス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小早川 和, 岸川 準, 幸 博和, 飯田 圭一郎, 松下 昌史, 川口 謙一, 松本 嘉寛, 横田 和也, 久保田 健介, 林 哲生, 森下 雄一郎, 益田 宗彰, 坂井 宏旭, 河野 修, 前田 健, 中島 康晴
2. 発表標題 臨床データによる頸髄損傷予後予測のためのartificial neural network構築
3. 学会等名 第51回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小早川 和, 幸 博和, 岸川 準, 飯田 圭一郎, 川口 謙一, 松本 嘉寛, 前田 健, 中島 康晴
2. 発表標題 頤髄損傷患者の臨床データから構築したArtificial neural networkによる予後予測法の開発
3. 学会等名 第10回Japan Association of Spine Surgeons with Ambition (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田丸 哲弥, 小早川 和, 幸 博和, 井浦 広貴, 春田 陽平, 小野 玄太郎, 北出 一季, 今野 大治郎, 岡田 誠司, 中島 康晴
2. 発表標題 慢性期グリア癥痕の病態の解明
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 脊髄損傷の病態解明のための臨床的基礎研究
3. 学会等名 第52回日本脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 脊髄損傷の病態解明と治療への応用
3. 学会等名 日本スポーツ整形外科学会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 脊髄再生のための脊髄損傷後の病態解明
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 グリア細胞制御に着目した脊髄損傷の基礎研究
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 グリア瘢痕を標的とした脊髄再生研究の現状と未来
3. 学会等名 第58回日本脊髄障害医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 脊髄損傷後のリハビリテーションが機能回復に寄与する分子生物学的メカニズムの解明
3. 学会等名 第54回 日本リハビリテーション医学会 九州地方会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazu Kobayakawa
2. 発表標題 Centripetal Migration Of Infiltrating Macrophage Drives Spontaneous Regeneration After Spinal Cord Injury
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2024 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------