

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650327

研究課題名(和文) 運動ニューロンの網羅的発現遺伝子解析によるリハビリテーション効率の定量化

研究課題名(英文) Identification of possible biomarkers for the efficient physiotherapy after the CNS injury.

研究代表者

岡田 誠司 (OKADA, SEIJI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30448435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：これまでリハビリの効果判定とmolecular biologyを繋ぐ研究は数少なかった。我々は、核ソーティングやレーザーマイクロダイセクションによる運動ニューロン選択的な解析技術と、次世代シーケンサーによる網羅的解析を組み合わせることで、廃用あるいはリハビリがモーターニューロンに与える影響を遺伝子発現を指標として定量化することを試みた。その結果、廃用により運動ニューロン数や細胞サイズに変化はなく軸索輸送蛋白や神経伝達物質の発現は保たれていたが、興奮性シナプス蛋白の発現は遺伝子および蛋白レベルで低下していた。本解析法は将来的にリハビリの効率評価となりうる指標の同定に繋がると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To quantify the efficacy of physiotherapy after the central nervous system injury, we evaluate gene expression changes between before and after rehabilitation/disuse by combining selective nuclear/cellular sorting of motor neurons and transcriptome analysis using next-generation sequencer. After the complete transection of spinal cord at mid-thoracic level, we collected motor neurons located in the level of lumbar intumescence with laser micro dissection at three months after injury, and performed gene expression analysis. This method will contribute to identify the possible biomarkers for establishment of efficient rehabilitation programs.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション医学 ギガシーケンサー

1. 研究開始当初の背景

わが国に於いて脳卒中は3大死亡原因のひとつであるが、実際は死亡に至るケースよりもむしろ麻痺等の重篤な後遺症を抱え、周囲の介護を要するケースが数多く見られる。事実、脳卒中は寝たきり要因の第1位であり、今後も人口の高齢化とともに発症数は年々増加すると予測されており、健康社会の実現のためには予防はもちろんのこと、脳卒中患者の社会復帰を目的としたリハビリテーション医療が今後さらに重要性を増してゆくのは間違いないと考えられる。しかし、脳卒中や脊髄損傷などの中枢神経障害に対するリハビリテーション効果は現状では十分とは言えず、その効果判定基準が経験則に基づくため、リハビリテーションの Protokol やメカニズムを科学的に客観的に検証することは困難であった。特に、これまでにリハビリテーションの評価を分子生物学的な解析と結びつけた研究は数少ない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、齧歯類中枢神経損傷モデルと独自に開発した細胞・細胞核回収技術ならびにハイスループット解析技術を組みあわせて、リハビリテーション等の四肢自動他動運動が中枢神経運動ニューロンに与える変化を分子生物学的に評価することである。特に、次世代シーケンサーを用いた発現遺伝子変化の網羅的解析により、将来的にはリハビリテーションの効率評価となりうる指標の同定に繋げることを目標とした。

3. 研究の方法

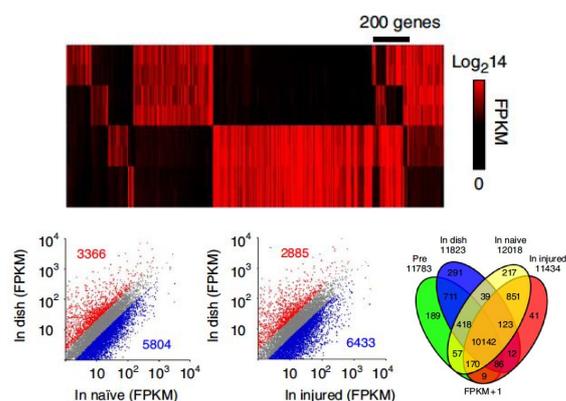
実験の方法は、C57Bl/6 マウス(8週齢、雌)に対して腹腔内麻酔薬投与により全身麻酔を行った後、大脳皮質組織を摘出した後、トリプシン等で酵素処理した後に、脱核誘導剤サイトカラシンDを添加することにより核を取り囲むアクチン骨格のみを脱重合させ、ホモジナイザー処理により核のみを抽出する。運動ニューロン核を選択的にセレクションするため、ChAT や HB9 を指標として免疫染色を行い、セルソーター (Aria2) にて運動ニューロンの核のみを回収する。また、代替法として、Emx-Cre マウスや Islet1-GFP トランスジェニックマウス等の運動ニューロン選択的に GFP を発現させた遺伝子改変マウスから GFP 陽性核のみを FACS で採取し、運動ニューロン核を選択的に回収する計画を立てた。抽出したサンプルから mRNA を採取し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析が可能かどうかを検討した。リハビリ前後でのトランスクリプトーム解析を行うために、Robotech 社製レッドミル装置を用いてマウスに下肢強制他動運動を行い、運動ニューロンに於ける発現変化を網羅的に抽出することを試みた。解析途中で、運動ニューロンからの採取核からサイズの小さい分子の漏れだしが問題となったため、

核による選別よりも細胞自体を選択的に採取する必要があると考えられ、さらに脳梗塞モデルよりも下肢完全麻痺モデルが解析に適していると判断したため、マウス第9胸髄を完全切断し下肢完全麻痺モデルを作成した。脊髄前角部に於いては大脳皮質と同様に細胞核回収では mRNA の leaking が著しいと判断されたため、第1腰髄部(膨大部)に於ける運動ニューロンを選択的にレーザーマイクロダイセクションを用いて採取し、発現遺伝子の解析を行った。トランスクリプトーム解析は illumina 社製 SolexaGA または Hi-Seq を用いてシーケンシングした後、Tophat ならびに Cufflinks を用いてマッピングならびにアノテーションを行い、発現の強度は FPKM で比較定量した。

4. 研究成果

我々は成体哺乳類の脳や脊髄から細胞核のみを選択的に採取し、核内タンパク質を指標としてセルソーターを用いたニューロンやグリアの選択的解析法を確立し、2011年に報告した(Okada et al., Flow cytometric sorting of neuronal and glial nuclei from central nervous system tissue. *J Cell Physiol.* 226:552-, 2011)。本研究では、この方法に基づいて成体マウス大脳皮質より核を抽出し、運動ニューロン核の選択的採取を試みた。論文のとおり核の採取自体に問題はなく、また HB9 抗体や ChAT 抗体を用いた運動ニューロン選択的な採取核の免疫染色も可能であった。これらの核を FACS にて回収し発現遺伝子の解析を行ったが、リアルタイム PCR を行い GAPDH 等のハウスキーピング遺伝子の発現を定量したところ、時間の経過とともに mRNA の漏出が認められ、核内の mRNA 量が極端に減少することが明らかとなった。これは、GFP トランスジェニックマウスを用いた解析に於いても同様であり、指標となる GFP 蛋白すら格外へ漏出してしまいうため、いかなる GFP マウスを用いても同様の結果になることが推測された。すなわち、65Kd 以下の分子(mRNA ならびにタンパク質)は本方法では運動ニューロン選択的に核を採取できてもその解析は殆ど困難であり、また mRNA 自体も核外リボソーム部の方が豊富であると考えられた。そこで方針を切り替え、レーザーマイクロダイセクションを用いた運動ニューロンの選択的回収を試みた。大脳皮質領域では運動野に於いてもどのニューロンが運動ニューロンであるかの同定が困難であったため、その形態から比較的分かり易い脊髄腰膨大部に焦点を当て解析を行うこととした。まず、成体マウスを経心臓的にホルマリンで環流固定を行った後、同部位での axial 切片を作成、Nissle 染色を行った後に前角部の Nissle 陽性大型細胞をレーザーマイクロダイセクション顕微鏡下に採取、発現遺伝子の確認を行った。無固定サンプルを用いた免疫染色後であっても細胞の選別と回

析により、実際の発現遺伝子変化をマイクロアレイのような相対変化ではなく、絶対的定量できることを確認した。



このように直接的なリハビリ効率の効果判定に繋がる遺伝子の同定には至っていないが、バイオインフォマティクスと新規解析技術の融合による本研究成果は、リハビリテーションが特定の運動ニューロンにもたらす分子的变化を網羅的に解析することが可能となる技術の確立に繋がった。以上の成果は Nature Communications, Journal of Neurochemistry, American Journal of Pathology, Stem Cells, Journal of Neuroinflammation, Journal of Cellular Physiology, Spine などをはじめとした査読付き国際英文雑誌に 20 編以上掲載され、リハビリテーション科学の研究推進に大きく資するものと考えている。

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 23 件)

1. Saiwai H, Kumamaru H, Ohkawa Y, Kubota K, Kobayakawa K, Yamada H, Yokomizo T, Iwamoto Y, Okada S. Ly6C+Ly6G-myeloid-derived suppressor cells play a critical role in the resolution of acute inflammation and the subsequent tissue repair process after spinal cord injury. *J Neurochem*. 125:74-88, 2013. doi:10.1111/jnc.12135.
2. Matsumoto Y, Takahashi Y, Harimaya K, Nakagawa T, Kawaguchi K, Okada S, Hayashida M, Doi T, Sakamoto Y, Matsunobu T, Oda Y, Iwamoto Y. Dedifferentiated chondrosarcoma of the cervical spine: a case report. *World J Surg Oncol*. 11:32-37, 2013. doi: 10.1186/1477-7819-11-32.
3. Kubota K, Doi T, Murata M, Kobayakawa K, Matsumoto Y, Harimaya K, Shiba K, Hashizume M, Iwamoto Y, Okada S.

Disturbance of ribcage development causes progressive thoracic scoliosis: The creation of a nonsurgical structural scoliosis model in mice. *J Bone Joint Surg*. 95:e1301-7, 2013. doi: 10.2106/JBJS.L.01381.

4. Kumamaru H, Kobayakawa K, Saiwai H, Kubota K, Yokota K, Ohkawa Y, Shiba K, Iwamoto Y, Okada S. The therapeutic activities of engrafted neural stem/progenitor cells are not dormant in the chronically injured spinal cord. *Stem Cells*. 31:1535-47, 2013. doi: 10.1002/stem.1404.
5. Matsumoto Y, Harimaya K, Doi T, Okada S, Hayashida M, Iwamoto Y. Minimum five-year follow up of selective anterior thoracolumbar or lumbar fusion for adolescent idiopathic scoliosis. *J Spine Res*. 4:933-40, 2013.
6. Takao T, Morishita Y, Okada S, Maeda T, Katoh F, Ueta T, Mori E, Yuge I, Kawano O, Shiba K. Clinical relationship between cervical spinal canal stenosis and traumatic cervical spinal cord injury without major fracture or dislocation. *Eur Spine J*. 22:2228-31, 2013. doi: 10.1007/s00586-013-2865-7.
7. Matsumoto Y, Fujiwara T, Imamura R, Okada Y, Harimaya K, Doi T, Kawaguchi K, Okada S, Yamada Y, Oda Y, Iwamoto Y. Hematoma of the ligamentum flavum in the thoracic spine: report of two cases and possible role of the transforming growth factor beta-vascular endothelial growth factor signaling axis in its pathogenesis. *J Orthop Sci*. 18:347-54, 2013. doi: 10.1007/s00776-011-0150-3.
8. Kumamaru H, Ohkawa Y, Saiwai H, Yamada H, Kubota K, Kobayakawa K, Akashi K, Okano H, Iwamoto Y, Okada S. Direct isolation and RNA-seq reveal environment-dependent properties of engrafted neural stem/progenitor cells. *Nat Commun*. 3:1140-, 2012. doi: 10.1038/ncomms2132.
9. Yugué I, Okada S, Ueta T, Maeda T, Mori E, Kawano O, Takao T, Sakai H, Masuda M, Hayashi T, Morishita Y, Shiba K. Analysis of the risk factors for tracheostomy in traumatic cervical spinal cord injury. *Spine*. 37:E1633-8, 2012. doi: 10.1097/BRS.0b013e31827417f1.
10. Maeda T, Ueta T, Mori E, Yuge I,

- Kawano O, Takao T, Sakai H, Okada S, Shiba K. Soft-tissue damage and segmental instability in adult patients with cervical spinal cord injury without major bone injury. *Spine*. 37:E1560-6, 2012. doi: 10.1097/BRS.0b013e318272f345.
11. Kumamaru H, Saiwai H, Kobayakawa K, Kubota K, van Rooijen N, Inoue K, Iwamoto Y, Okada S. Liposomal clodronate selectively eliminates microglia from primary astrocyte cultures. *J Neuroinflammation*. 9:116-, 2012. doi: 10.1186/1742-2094-9-116.
 12. Harada A, Okada S, Konno D, Odawara J, Yoshimi T, Yoshimura S, Kumamaru H, Saiwai H, Tsubota T, Kurumizaka H, Akashi K, Tachibana T, Imbalzano AN, Ohkawa Y. Chd2 interacts with H3.3 to determine myogenic cell fate. *EMBO J*. 31:2994-3007, 2012. doi: 10.1038/emboj.2012.136.
 13. Kubota K, Saiwai H, Kumamaru H, Kobayakawa K, Maeda T, Matsumoto Y, Harimaya K, Iwamoto Y, Okada S. Neurological recovery is impaired by concurrent but not by asymptomatic pre-existing spinal cord compression after traumatic spinal cord injury. *Spine*. 37:1448-55, 2012. doi: 10.1097/BRS.0b013e31824ffda5.
 14. Hara-Miyauchi C, Tsuji O, Hanyu A, Okada S, Yasuda A, Fukano T, Akazawa C, Nakamura M, Imamura T, Matsuzaki Y, Okano HJ, Miyawaki A, Okano H. Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior. *Biochem Biophys Res Commun*. 419:188-93, 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.141.
 15. Kubota K, Saiwai H, Kumamaru H, Maeda T, Ohkawa Y, Aratani Y, Nagano T, Iwamoto Y, Okada S. Myeloperoxidase exacerbates secondary injury by generating highly reactive oxygen species and mediating neutrophil recruitment in experimental spinal cord injury. *Spine*. 37:1363-9, 2012. doi: 10.1097/BRS.0b013e31824b9e77.
 16. Mori E, Okada S, Ueta T, Itaru Y, Maeda T, Kawano O, Shiba K. Spinous process-splitting open pedicle screw fusion provides favorable results in patients with low back discomfort and pain compared to conventional open pedicle screw fixation over 1 year after surgery. *Eur Spine J*. 21:745-53, 2012. doi: 10.1007/s00586-011-2146-2.
 17. Matsumoto Y, Harimaya K, Doi T, Kawaguchi K, Okada S, Inoguchi A, Fujiwara M, Iwamoto Y. Clinical characteristics and surgical outcome of the symptomatic ossification of ligamentum flavum at the thoracic level with combined lumbar spinal stenosis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 132:465-70, 2012. doi: 10.1007/s00402-011-1438-7.
 18. Kubota K, Okada S, Maeda T, Matsumoto Y, Sakamoto A, Harimaya K, Saiwai H, Kumamaru H, Oda Y, Iwamoto Y. Extradural nodular fasciitis arising in the spinal canal. *Spine*. 37:E133-7, 2012. doi: 10.1097/BRS.0b013e318224568a.
 19. Kumamaru H, Saiwai H, Ohkawa Y, Yamada H, Iwamoto Y, Okada S. Age-related differences in cellular and molecular profiles of inflammatory responses after spinal cord injury. *J Cell Physiol*. 227:1335-46, 2012. doi: 10.1002/jcp.22845.
 20. Tanaka M, Shiota M, Okada S, Harada A, Odawara J, Mun S, Iwao H, Ohkawa Y. Generation of a rat monoclonal antibody specific for hsp72. *Hybridoma*. 30:397-400, 2011. doi: 10.1089/hyb.2011.0015.
 21. Odawara J, Harada A, Yoshimi T, Maehara K, Tachibana T, Okada S, Akashi K, Ohkawa Y. The classification of mRNA expression levels by the phosphorylation state of RNAPII CTD based on a combined genome-wide approach. *BMC Genomics*. 12:516-, 2011. doi: 10.1186/1471-2164-12-516.
 22. Renault-Mihara F, Katoh H, Ikegami T, Iwanami A, Mukaino M, Yasuda A, Nori S, Mabuchi Y, Tada H, Shibata S, Saito K, Matsushita M, Kaibuchi K, Okada S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Beneficial compaction of spinal cord lesion by migrating astrocytes through glycogen synthase kinase-3 inhibition. *EMBO Mol Med*. 3:682-96, 2011. doi: 10.1002/emmm.201100179.
 23. Fujiwara T, Fukushi J, Yamamoto S, Matsumoto Y, Setsu N, Oda Y, Yamada H, Okada S, Watari K, Ono M, Kuwano M, Kamura S, Iida K, Okada Y, Koga M, Iwamoto Y. Macrophage infiltration predicts a poor prognosis for human ewing sarcoma. *Am J Pathol*. 179:1157-70, 2011. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.034.

〔学会発表〕(計 14 件)

岡田誠司、熊丸浩仁、久保田健介、小早川和、幸博和、岩本幸英. 脊髄損傷研究に於ける網羅的遺伝子解析の応用. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011.10.20-21 前橋)

岡田誠司、熊丸浩仁、久保田健介、小早川和、中村雅也、Renault-Mihara Francois、岡野栄之、岩本幸英. 脊髄損傷後の自己修復メカニズム. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2012.10.26-27 名古屋)

岡田誠司、幸博和、熊丸浩仁、久保田健介、小早川和、岩本幸英. 脊髄損傷研究に於ける MDSC(myeloid-derived suppressor cell)の生理的修復作用. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2012.10.26-27 名古屋)

岡田誠司、熊丸浩仁、小早川和、横田和也、斉藤武恭、岩本幸英. 慢性期脊髄損傷に対する神経幹細胞移植. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2013.10.17-18 千葉)

岡田誠司、熊丸浩仁、林田光正、松本嘉寛、播谷勝三、岩本幸英. セルソーターの脊髄再生研究への応用. 第 42 回日本脊椎脊髄病学会 (2013.4.25-27 沖縄)

岡田誠司. 脊髄圧迫病変が脊髄損傷の予後に与える影響. 第 46 回日本脊髄障害医学会 (2011.11.18-19 大阪)

岡田誠司. 損傷脊髄部での移植神経幹細胞の in situ analysis. 第 46 回日本脊髄障害医学会 (2011.11.18-19 大阪)

岡田誠司. 脊髄損傷に対する治療-ステロイド大量療法の歴史から学ぶ. 第 48 回日本脊髄障害医学会 (2013.11.14-15 福岡)

Kumamaru H, Saiwai H, Iwamoto Y, Okada S. Age-related differences in cellular and molecular profiles of inflammatory responses after spinal cord injury. The 41th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Nov 12-16, 2011, Washington DC, USA)

Saiwai H, Kumamaru H, Kubota K, Kobayakawa K, Iwamoto Y, Okada S. Delivery of Ly6C(+) myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) promote tissue repair process and functional recovery after spinal cord injury. The 41th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Nov 12-16, 2011, Washington DC, USA)

Kobayakawa K, Saiwai H, Kumamaru H, Kubota K, Ohkawa Y, Shiba K, Yokota Y, Iwamoto Y, Okada S. Hyperglycemia-induced microglial overactivation deteriorates the secondary injury via NF- B pathway

after spinal cord injury. The 43th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Nov 9-13, 2013, San Diego, USA)

Yokota K, Kobayakawa K, Iwamoto Y, Okada S. Structural and functional changes of distal site to the lesion after chronic complete spinal cord injury. The 43th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Nov 9-13, 2013, San Diego, USA)

Kobayakawa K, Kubota K, Iwamoto Y, Okada S. High glucose-induced microglial activation deteriorates the secondary injury via NF-kB pathway after experimental spinal cord injury. ORS 2013 Annual Meeting (Jan 26-29, 2013, San Antonio, USA)

Kubota K, Doi T, Kobayakawa K, Matsumoto Y, Hariimaya K, Iwamoto Y, Okada S. Neurological recovery is impaired by concurrent but not by asymptomatic pre-existing spinal cord compression after traumatic spinal cord injury. ORS 2013 Annual Meeting (Jan 26-29, 2013, San Antonio, USA)

〔図書〕(計 1 件)

Okada S. The mechanism behind functional recovery after the incomplete spinal cord injury. Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord. In Uchida K, Nakamura M, Ozawa H, Katoh S (eds):3-10. Springer, 2014. ISBN 978-431-54501-9

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003217>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 誠司 (OKADA SEIJI)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：80448430