

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592200

研究課題名(和文) 脊髄損傷後に新生する神経回路の解明と p38 MAPK inhibitor の効果

研究課題名(英文) Analysis of regenerative axonal circuit after spinal cord injury and the effectiveness of p38 MAPK inhibitor

研究代表者

森野 忠夫 (Morino, Tadao)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20380248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：ラット脊髄損傷モデルを用いて、損傷後後肢運動機能障害に対する p38 MAPK inhibitor の効果を、行動学的・組織学的に検討した。p38 MAPK inhibitor を硬膜外投与することにより、後肢運動機能障害は 2～6 週目まで有意に改善した。そのメカニズムとして、損傷部位での炎症 (microglia 増殖)、軸索の apoptosis を抑制し、損傷部位をまたいだ神経回路再生を促進していることがトレーサーを用いた観察によって示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tested the effect of p38 MAPK inhibitor on hindlimb motor function after spinal cord contusion injury in rat and carried out studies on behavior and histological analysis. The damage of hindlimb motor function was reduced with intrathecally administrated p38 MAPK inhibitor from 2 to 6 weeks after injury. The result of present study indicated that the inhibitory mechanisms of spinal cord damage were 1) inhibition of inflammation including microglial proliferation, 2) inhibition of apoptosis on axons and 3) following acceleration of axonal regeneration. We confirmed these results with experiments using neuronal tracer.

研究分野：神経生理学

キーワード：p38 MAPK inhibitor spinal cord injury microglia apoptosis regeneration tracer

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は若年層に多く起こり、現在のところ有効な治療法が存在しないため、四肢麻痺及び不全麻痺は永続する。患者本人のQOL低下はもちろんであるが、働けなくなることで介護にコストと人手がかかることで社会的な損失も著しい。一刻も早く有効な治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

脊髄損傷後の運動機能回復のメカニズムは未だ不明である。近年、そのメカニズムとして損傷周囲の脊髄内に新たな神経回路網が構築されるとい説が報告されているが、不明な点も多い。本研究の目的は、脊損ラットに神経トレーサー等を用いて、経時的・組織学的に新たに構築された神経回路がどのようなネットワークを作るかを解明することである。さらに、我々はラット脊損後に硬膜内投与した p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor が2次損傷を抑制し、運動機能回復と新たな軸索伸展を促進することを報告してきており、p38 MAPK inhibitor が神経回路再構築をどのように促進するかを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)脊髄損傷ラット：Wister rat・メス・3-6ヶ月齢を使用し、ハロセン麻酔下に第11胸髄を露出し、MASCIS impactorを用いて、10g x 25mmの強さでcontusionによる脊髄損傷を作成した。

(2)薬剤投与：L4/5レベルから p38 MAPK inhibitor (SB203580; 10 μ g/100 μ l PBS)を損傷後に投与した。投与時期別に損傷直後に投与したものをSB0群、損傷後24、48、72時間後に投与したものをそれぞれSB24、SB48、SB72群とした、そまた、vehicle群として非活性型の p38 MAPK inhibitor を損傷直後に投与した。

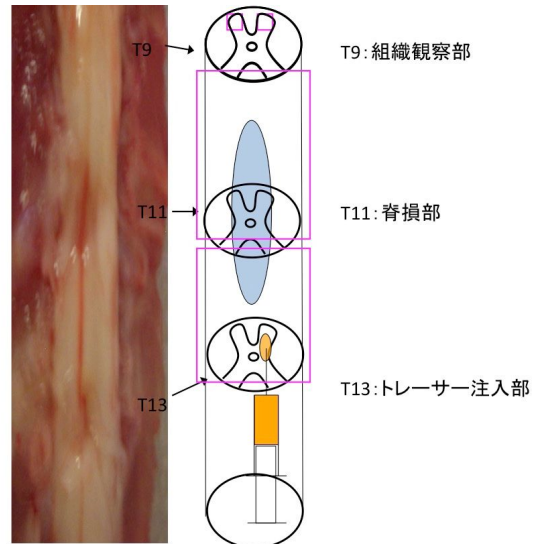
(3)後肢運動機能評価：損傷後3日、1,2,3,4,5,6週後にBBB scoreで評価を行った。

(4)組織学的検討：損傷部位の凍結切片(10 μ m)を作成し、microgliaをOX-42抗体、apoptosis細胞をTUNNEL法で免疫染色した。

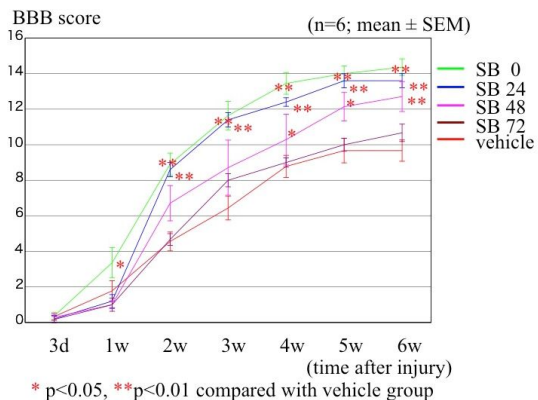
(5)トレーサー注入と評価：損傷後2週目にT13レベルの脊髄右側前角にDextran tetramethylrhodamin 3000MW (500nL Fluoro Ruby: 100ng/1mL)を注入し、その1週間後にT9レベルで10 μ mの凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡視下に観察した(図1)。

4. 研究成果

(1)行動学的検討：p38 MAPK inhibitorを硬膜内投与したSB群は、損傷後2~6週間後まで、vehicle群に比べて有意に後肢運動機能の改善が観察された(図2)。また、その効果は、損傷後早期に投与するほど効果が増強した。

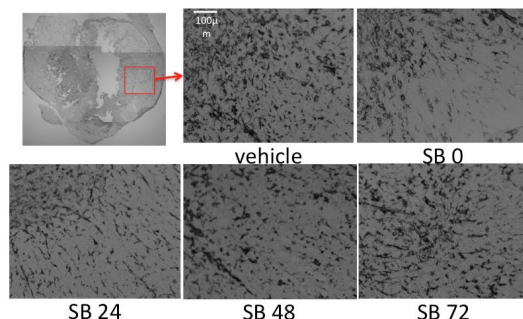


(図1) 脊髄損傷部位と、トレーサー注入部位及び組織採取部位を示したシエマ

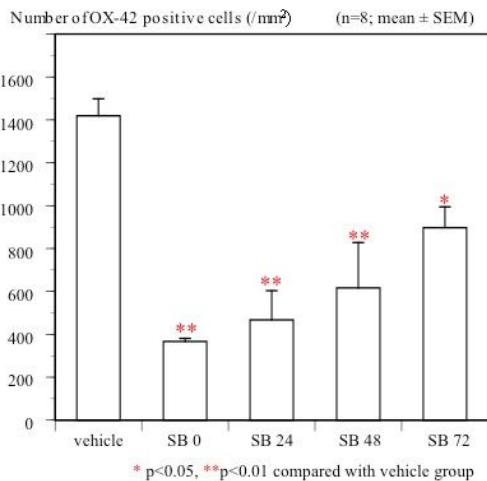


(図2) 行動学的検討(BBB score)結果

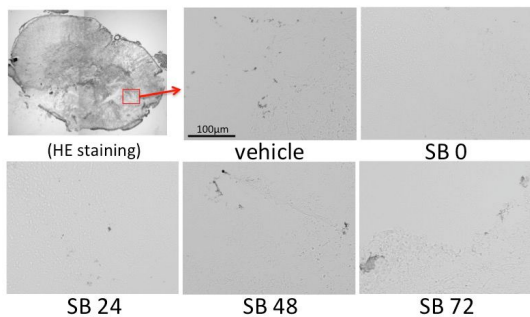
(2)組織学的検討：損傷部位のマイクログリアの数は、損傷1W後、vehicle群では損傷部位に著明なmicrogliaの増殖を認めたが、SB0、SB24、SB48群では有意にmicrogliaの増殖は抑制されていた(図3、4)。損傷部位側索伝導路でのapoptosis染色は、損傷2W後、vehicle群でapoptosis陽性細胞が観察されたが、SB0、24、48群では有意にその数が減少していた(図5、6)。



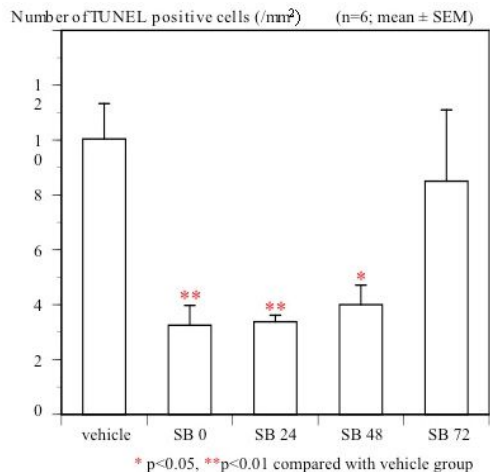
(図3) 損傷部位でのOX-42染色(microglia)



(図4) 単位面積あたりの microglia 数



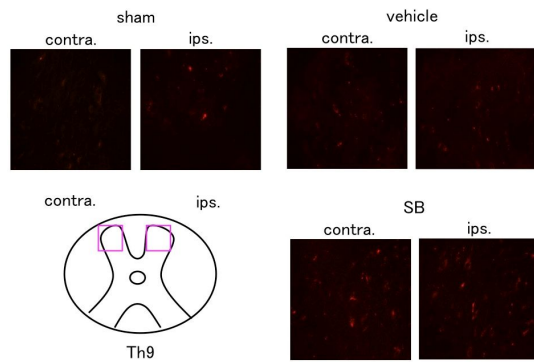
(図5) 損傷部位側索伝導路での TUNNEL 染色 (apoptosis cell)



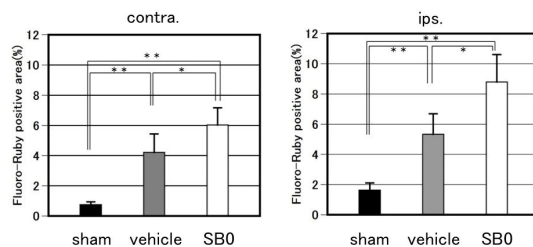
(図6) 単位面積あたりの apoptosis 細胞数

(3) トレーサーを用いた、損傷部位での残存軸索の検討: 損傷部より頭側 (T9 level) は、sham 群では後索に dextran 陽性の軸索が多数観察されたが、vehicle 群、SB 群ともに dextran 陽性の軸索は著明に減少していた (図7)。しかし、前角において sham 群では同側、対側の dextran 陽性面積はそれぞれ $1.64 \pm 0.47\%$ 、 $0.76 \pm 0.17\%$ に対して、vehicle 群ではそれぞれ $5.33 \pm 1.36\%$ 、

$4.21 \pm 1.22\%$ 、SB 群では $8.79 \pm 1.81\%$ 、 $6.02 \pm 1.14\%$ であった (図8)。



(図7) T11 脊髄損傷部に対して、T13 レベル右側の前角部に逆行性トレーサーを注入し、T9 レベルで脊髄前角を観察した。



(図8) T9 レベルで、全各部のトレーサー陽性細胞数をカウントした。

(4) 結論

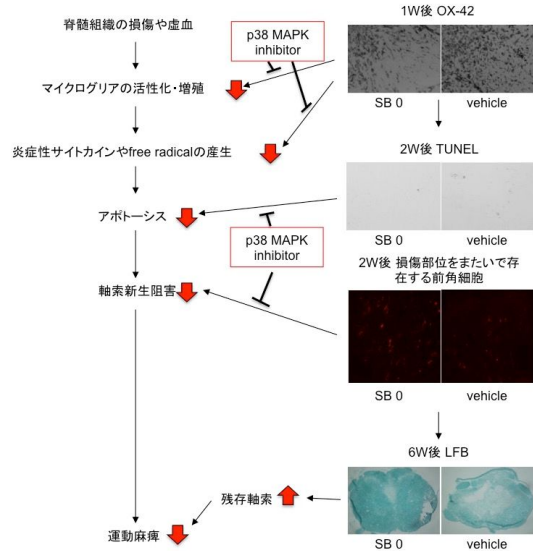
脊髄損傷後、硬膜外に p38 MAPK inhibitor を投与すると、損傷後 2~6 週目までの後肢運動機能障害が有意に軽減される。また、その効果は損傷から投与までの時間が短いほど効果があった。

p38 MAPK inhibitor は、損傷 1 週後、炎症性細胞であるマイクログリアの数を抑制した。その抑制効果も損傷から投与までの時間が短いほど効果があった。

p38 MAPK inhibitor 投与により、損傷 2 週後、軸索伝導路での apoptosis 細胞の数が減少した。その抑制効果も損傷から投与までの時間が短いほど効果があった。

p38 MAPK inhibitor を投与することによって、投与しなかった群に比べて、損傷部より尾側の前角細胞周辺に注入したトレーサーが、損傷部より頭側の運動細胞により多く取り込まれた。これは、損傷部位をまたいで神経回路が多く形成されたことを示唆する所見であった。

上記より、p38 MAPK inhibitor は、損傷部位での炎症と、それによる apoptosis を抑制することによって神経回路が修復しやすい環境を整え、実際に新たな回路が新生して後肢運動機能改善につながったと考えられた (図9)。



(図9) p38 MAPK inhibitor の脊髄損傷に対する効果の概念図

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 2 件)

Yamaoka S, Morino T, Morizane K, Horiuchi H, Ogata T, Miura H. P38 mitogen-activated protein kinase inhibition reduces chondroitin sulfate proteoglycan production after spinal cord injury in rats. Research –open journal. 2014; 1:802. doi: <http://dx.doi.org/10.13070/rs.en.1.802>. 査読あり.

Yamaoka G, Morino T, Morizane K, Horiuchi H, Miura H, Ogata T. p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor reduces neurocan production in cultured spinal cord astrocytes. Neuroreport. 2012 Jun 20; 23(9):546-50. doi: 10.1097/WNR.0b013e328354256c. 査読あり.

[学会発表](計 2 件)

森野忠夫、尾形直則、堀内秀樹、山岡慎大朗、三浦裕正。脊髄損傷後 48 時間までの p38 MAPK inhibitor 硬膜内投与は後肢運動機能を回復させる。第 29 回日本整形外科基礎学術集会。2014 年 10 月 9~10 日。城山観光ホテル。鹿児島市。

Morino T, Morizane K, Horiuchi H, Yamaoka S, Ogata T, Miura H. P38 Mitogen activated protein kinase inhibitor ameliorates motor function by inhibition of chondroitin sulfate proteoglycans after spinal cord injury in rat. EUROSPINE. 2014. 9. 30-10.3. Lyon, France.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森野 忠夫 (Morino, Tadao)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20380248

(2) 研究分担者

尾形 直則 (Ogata, Tadanori)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30291503