

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592204

研究課題名(和文)慢性圧迫性脊髄障害に対するオートファジー亢進薬剤による神経保護作用の解析

研究課題名(英文)The effect of autophagy activator to neural cells under hypoxic condition

研究代表者

田邊 史(Tanabe, Fumito)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：90619199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞はヒトiPS細胞から樹立された神経幹細胞AF22を使用した。1%O₂下では20% O₂下と比較してオートファジーのマーカーであるLC3-IIの発現が亢進した。またオートファジー活性化剤であるLiClの投与で1% O₂、20% O₂ともにAF22の細胞増殖能が亢進することがWST assayで示された。さらに他のオートファジー亢進剤であるラパマイシンの投与でも同様に1% O₂、20% O₂ともにAF22の細胞増殖能が亢進することがWST assayで示された。低酸素で培養した際のヒトiPS細胞由来AF22の分化能を検討したが20% O₂と比較して1% O₂では分化能に影響がないことが示された。

研究成果の概要(英文)：We used the neural stem cell cell line AF22 which is derived by human iPS cell. The expression of LC3-II, which is a marker of autophagy, was upregulated in 1%O₂ condition compared to 20% O₂ condition. LiCl which is an autophagy activator increased the proliferation of AF22. In addition, rapamycin which is another autophagy activator increased the proliferation of AF22 under 1% O₂ and 20% O₂ conditions. Furthermore, differentiation capacity of AF22 was not changed under 1% O₂ condition.

研究分野：脊髄損傷

キーワード：神経幹細胞 iPS細胞 オートファジー 低酸素

1. 研究開始当初の背景

慢性圧迫性脊髄症による四肢の感覚障害・痺れや疼痛・麻痺は、脊髄の長期の機械的圧迫・虚血・低酸素により生じる脊髄神経軸索の変性や脊髄神経細胞死が原因であると考えられている。圧迫が著明で疼痛や麻痺症状が著しい患者には脊柱管拡大術などの手術を施行する。一方、軽度の痺れや麻痺では侵襲の大きな手術を行っても回復が望めないため理学療法などの保存的治療を行う。しかし、圧迫性脊髄症の保存治療に有効な薬剤は現在のところ開発されていない。

近年、アルツハイマー病やパーキンソン病などの中枢神経変性疾患において、異常な凝集蛋白の蓄積やオートファジーの変調が病因のひとつであるとされ、注目されている。加齢とともに発症、進行し、神経細胞が脱落する中枢神経変性疾患と同様に、age-related spine とされる圧迫性脊髄症においても、凝集蛋白 p62 の蓄積やオートファジーが、不可逆的神経変性変化に關与する可能性が示唆されている。また、薬剤でオートファジーを活性化すると、神経変性疾患モデルの運動障害が軽減したとの報告もあり、慢性圧迫性頸髄症の新たな病態の解明や治療アプローチにつながる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

頸椎の加齢性変化(骨棘、椎間板膨隆、靭帯肥厚)・椎間板ヘルニア・後縦靭帯骨化などにより生じる慢性圧迫性脊髄症において、四肢の痺れ・疼痛や麻痺が進行する場合、現在のところ手術的加療が中心であり、有効な薬物療法は開発されていない。本研究では薬剤によるオートファジーの活性化により慢性圧迫性脊髄症の新規薬物治療法を開発し臨床応用するための研究を行う。また再生医療分野で注目されているヒト iPS 細胞の増殖と分化におけるオートファジーの機能解析を行う。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞から樹立された神経幹細胞 AF22 と骨南部肉腫細胞を培養して western blot でオートファジーの活性化を評価した。オートファジー活性化剤や阻害剤を投与して細胞の増殖能を低酸素環境下で評価した。

4. 研究成果

細胞はヒト iPS 細胞から樹立された神経幹細胞 AF22 を使用した。慢性圧迫では神経細胞は低酸素下にさらされると考えられている。また神経の再生のために移植される iPS 細胞や神経幹細胞も低酸素環境下にさらされるので低酸素 1%O₂ で AF22 を培養してオートファジーの解析を行った。1%O₂ 下では 20% O₂ 下と比較してオートファジーのマーカである LC3-II の発現が亢進した (Fig.1)。

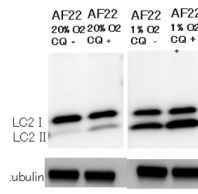
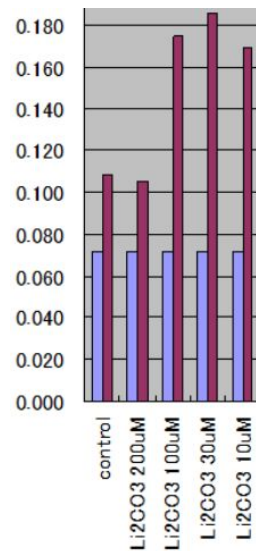


Fig. 1

またオートファジー活性化剤である LiCl, rapamycin の投与で 1% O₂, 20% O₂ とともに AF22 の細胞増殖能が亢進することが WST assay で示された (Fig.2, 3)。

20% O₂



1% O₂

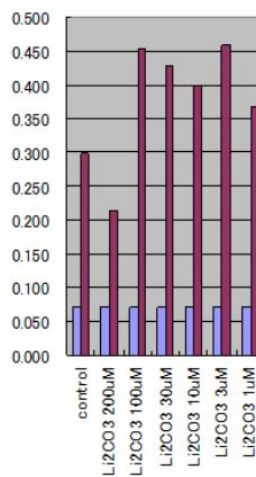
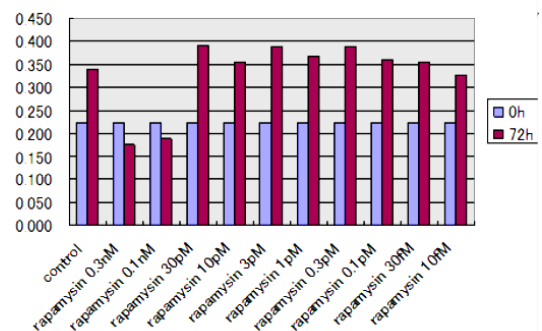


Fig.2

rapamycin O2 20%



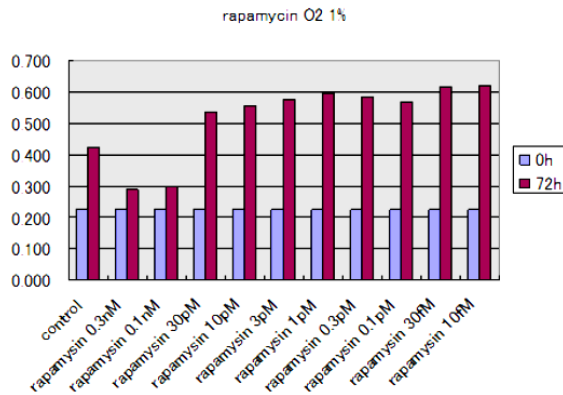


Fig.3

神経幹細胞移植による脊髄の再生のためには移植した細胞を目的に応じた細胞系譜へと誘導する必要がある。低酸素で培養した際のヒト iPS 細胞由来 AF22 の分化能を検討したが 20% O₂ と比較して 1% O₂ では分化能に影響がないことが示された (Fig.4)。

Cell: AF22
 Medium: N2medium+neurobasal(1:1) with B27(1:50) 分化誘導:免疫染色

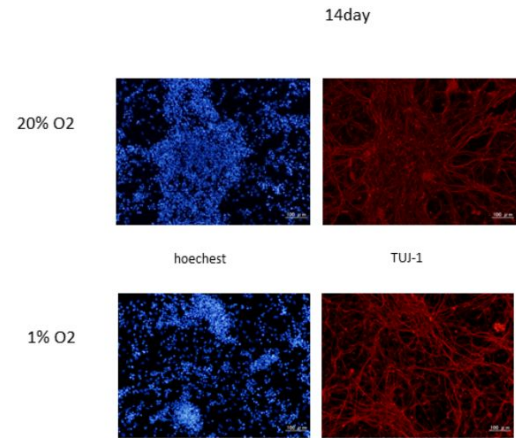
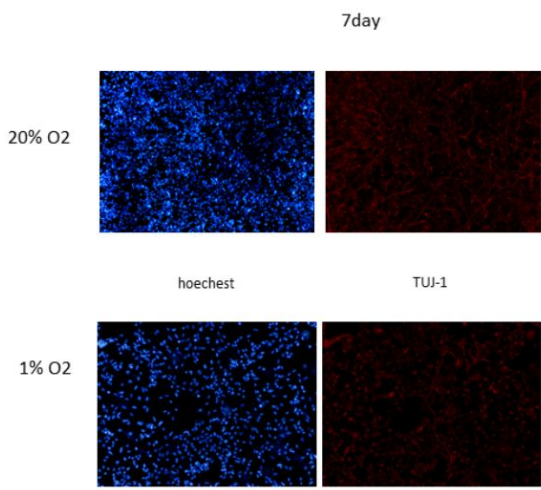
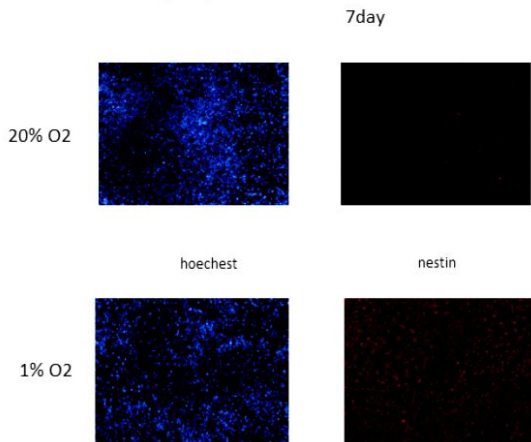


Fig.4

これらの結果よりオートファジーの活性化は神経細胞の保護に有効であることが示唆された。また神経幹細胞の増殖にもオートファジーの活性化が有効であることが示唆された。また低酸素下で培養してもニューロンへの分化能力には差がないことが示された。

一方で申請者らは骨肉腫の細胞株において 1% O₂ 下ではオートファジーが亢進していることを見出した (Fig.5)。

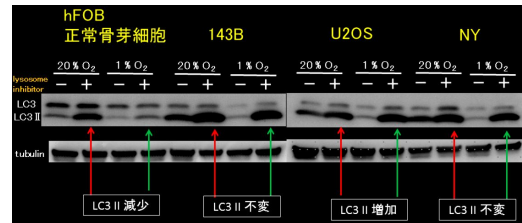


Fig. 5

さらにオートファジー活性化に重要な遺伝子である ATG5 と ATG7 を siRNA でノックダウンすると 1% O₂ 下では骨肉腫細胞の増殖が抑制されることが示された (Fig.6)。

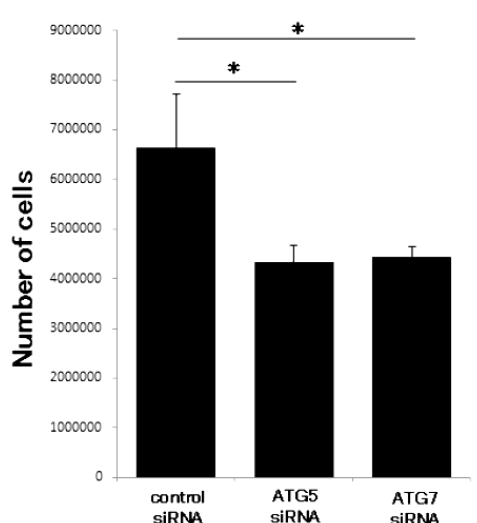


Fig.6

さらにオートファジー活性化に重要な遺伝子である ATG5 と ATG7 を siRNA でノックダウンすると 1% O₂ 下では骨肉腫細胞の浸潤能が抑制されることが membrane assay で示された (Fig.7)

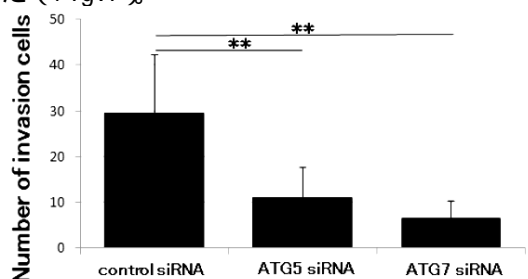


Fig.7

これらの結果は圧迫性神経障害である頸椎症でオートファジーを活性化すると神経損傷の治療に有効であることが示唆されたが、一方でオートファジーの活性化は悪性腫瘍の増殖と浸潤・転移能を亢進させる可能性があるのでさらなる慎重な検討が必要である。

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)

Risk factors for venous thromboembolism after spine surgery.

Tominaga H, Setoguchi T, Tanabe F, Kawamura I, Tsuneyoshi Y, Kawabata N, Nagano S, Abematsu M, Yamamoto T, Yone K, Komiya S. Medicine (Baltimore). 2015 Feb;94(5):e466. 「査読有」

〔学会発表〕(計1件)

第42回日本生体電気・物理刺激研究会
低酸素刺激による骨肉腫細胞のオートファジーの変化と増殖・移動能制御の解析

瀬戸口啓夫、小宮節郎

東京慈恵医科大学

平成27年3月14日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田邊 史 (Tanabe Fumito)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：60626836

(2)研究分担者

小宮 節郎 (Komiya Setsuro)

鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30178371

瀬戸口 啓夫 (Setoguchi Takao)

鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・特任
准教授

研究者番号：40423727