

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462311

研究課題名(和文) 損傷脊髄の再髄鞘形成に対するアミロライドの効果(小胞体ストレス応答能増強による)

研究課題名(英文) Effect of amiloride on endoplasmic reticulum stress response in the injured spinal cord of rats

研究代表者

渡辺 雅彦(WATANABE, Masahiko)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：40220925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は、脊髄損傷後のオリゴデンドロサイト前駆細胞(以下OPC)の遅発性細胞死の原因として小胞体ストレス経路に着目し、in vivoの実験において解析を行った。利尿薬であるアミロライドの投与により、OPCの小胞体ストレス誘導性アポトーシスが抑制され、再髄鞘形成や後肢機能障害の軽減にも影響しているかを検討した。結果、アミロライド投与群において、有意に後肢機能の改善を認めた。OPCはアミロライド投与によってアポトーシスが抑制され、成熟オリゴデンドロサイトへ分化し、再髄鞘形成さらに後肢機能改善へ寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：After spinal cord injury, secondary injury results in an expanding area of glial cell apoptosis. Oligodendrocyte precursor cells (OPC), that are involved in remyelination, have been shown to actively proliferate, but a majority of these cells succumb to apoptosis instead of differentiating into functional oligodendrocytes. In this study, We focused on endoplasmic reticulum (ER) stress as a cause of apoptosis of oligodendrocyte precursor cell following spinal cord injury, and examined it in vivo. We labeled proliferating OPCs and demonstrated that amiloride treatment led to greater numbers of OPCs and also oligodendrocytes in the injured spinal cord. The increased MBP expression suggests that the increased numbers of mature oligodendrocytes led to improved remyelination, which significantly improved motor function recovery.

研究分野：整形外科学

キーワード：脊髄損傷 小胞体ストレス オリゴデンドロサイト前駆細胞 アミロライド

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷患者数は、全世界で 250 万人とされ、多くの患者が障害を抱え不自由な生活と苦難を強いられている。脊髄損傷遺残麻痺の軽減に向けて基礎的研究の進歩は目覚ましいが、損傷時の脊髄細胞障害と再生障害の詳細なメカニズムについては未だ解明されていない点も多い。外傷性脊髄損傷において、一旦死滅した脊髄細胞を再び取り戻すには、損傷した部分への細胞移植が最も効果的と考えられる。しかし、細胞移植療法に関しては多くの基礎的実験結果は報告されているものの、臨床応用には未だ多くの課題が残されている。

外傷性脊髄損傷における障害は、外力による物理的破壊のみならず、これに引き続いて生じる二次障害で形成されることが知られている。実験的脊髄損傷モデルでは、直接的外力(一次障害)によって生じる脊髄組織の挫滅による物理的細胞破壊や出血性壊死とそれに引き続いて生じる生化学的、病理学的変化(二次障害)により損傷が拡大する現象が認められている(Watanabe et al., J Neurotrauma 1998)。二次障害の主体をなすのがアポトーシスである。さらにアポトーシスは再生のために誘導・増殖された細胞も障害する。われわれがこれまで行ってきた外傷性脊髄損傷における脱髄とオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化・誘導の検討では、脱髄部周囲でオリゴデンドロサイト前駆細胞は一時的に増殖するが、その後再髄鞘形成が得られない。(Watanabe et al., J Neurosci Res 2002, Watanabe et al., Glia 2004, Suyama et al., J Neurotrauma 2007)この要因の一つとして、増殖したオリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスが考えられる。これらアポトーシスを抑制することは、二次障害による損傷の拡大を軽減することのみならず、再生(再髄鞘形成)の意味においても大変重要となる。

中枢神経系におけるアポトーシスの経路として小胞体内におけるタンパク修飾異常が挙げられている。外傷のストレスにより小胞体内でのタンパク修飾異常が起こり、異常タンパクが集積しアポトーシスへ至る。この異常タンパクに対する自己防御機能として unfolded protein response (UPR) がある。UPR は小胞体シャペロン GRP78 が主体となるが、小胞体シャペロンの異常がアルツハイマー病や、パーキンソン病に大きく関与していることが報告されている。われわれは、グルタミン酸やツシカマイシンによるストレス下にグリア細胞の培養を行い、GRP78 の発現増強を確認した。その結果は、ストレスが軽度のうちは GRP78 により異常タンパクが分解されるが、ストレスが過度になるとその処理能

力を超えてアポトーシスに至るという Larner らの報告と矛盾しない結果であった。また、遺伝子導入により GRP78 を強発現することによりアポトーシスを抑制することも報告した。(Suyama et al., Neuroscience Letters, 2011, PloS one, 2014) in vivo においても、損傷により脊髄細胞内に GRP78 が強発現し、その発現程度は細胞腫により異なり、オリゴデンドロサイト前駆細胞では他の細胞腫に比して優位に発現が低いことを証明した。(Matsuyama et al., Spinal Cord, 2014) また小胞体ストレス応答能を増強するとされる FDA で認可された利尿剤アミロライドの効果を報告した。アミロライドは培養オリゴデンドロサイト前駆細胞の小胞体ストレス応答能を高め、また in vivo でも GRP78 の発現を高め、オリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスを軽減した。(Kuroiwa et al., Eur J Neurosci, 2014) 本研究では、アミロライド投与で生存したオリゴデンドロサイトが、再髄鞘形成や後肢感覚機能障害の軽減にも影響しているかどうかを長期的観察にて検討した。

また近年、細胞死を誘導する新たな経路としてインフラマソームを介した細胞死が注目されている。インフラマソームは、パターン認識受容体 (NLRPs)、Caspase, ASC などから構成され、IL-1, IL-18 前駆体を切断・活性化し、細胞死 (pyroptosis) を引き起こす。他分野では小胞体 (ER) ストレスによるインフラマソームの活性化も報告されているが、損傷脊髄における関連は未だ不明である。われわれはこれまでに、OPC が ER ストレスに対して脆弱であることを報告した。ただし OPC がなぜ ER ストレスに対して脆弱であるのかという点については依然不明である。この解明を目的として、脊髄損傷モデルラットを用いて、細胞腫ごとのインフラマソーム構成タンパクの発現を、免疫組織化学的に評価し検討した。

2. 研究の目的

- (1) 脊髄損傷後のアミロライド投与によって、生存したオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の分化と再髄鞘形成の検討。
- (2) 損傷脊髄内における細胞腫ごとのインフラマソーム発現の検討。

3. 研究の方法

- (1) 脊髄損傷後のアミロライド投与によって、生存したオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の分化と再髄鞘形成の検討：
10 週齢雌 SD ラットを用いて、IH-impacter を使用し、脊髄圧挫損傷モデルラットを作成した。アミロライド投与群 (A 群)、PBS 投与群 (C 群) の 2 群に分け、損傷 24 時間後より

14日まで各 10mg/kg/day を腹腔内投与した。各群に対し損傷後の細胞分裂の tracing を目的として、損傷後 3 日間 12 時間毎に BrdU (50mg/kg/回) を腹腔内投与した。後肢運動機能評価として BBBscore (n=14)、疼痛関連行動評価として von Frey test (n=5) を用いて測定した。オリゴデンドロサイトの生存・分化を BrdU+NG2 (OPC)、BrdU+APC (オリゴデンドロサイト) の二重免疫染色を用いて、免疫組織学的に評価した (n=3)。髄鞘形成の評価として、Western blotting (myelin basic protein: MBP、n=5) を行い、2 群間で比較し統計学的評価を行った。

(2) 損傷脊髄内における細胞腫ごとのインフラマソーム発現の検討：

10 週齢雌 SD ラットを用いて、IH-impacter を使用し、損傷強度を 100kdyn (Low-degree injury group: LI) と 200kdyn (High-degree injury group: HI) に分けて脊髄圧挫損傷モデルを作成した。損傷後 1, 3, 7, 14 日に脊髄を摘出し凍結切片を作成した。インフラマソーム構成タンパクのマーカーとして、抗 NLRP3, ASC, Caspase-2 抗体を用い、各種細胞マーカー抗体 (抗 NG2, GFAP, NeuN 抗体) を用いて蛍光二重免疫染色を施行し、損傷強度と、細胞腫ごとのインフラマソーム構成タンパクの発現を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 脊髄損傷後のアミロライド投与によって、生存したオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の分化と再髄鞘形成の検討：
BBBscore では損傷後 17 日目以降において有意に A 群で高く (損傷後 17 日, $p < 0.05$)、それは観察期間中継続して認めた (損傷後 56 日, $p < 0.01$)。von Frey test では、損傷後 14 日において C 群と比較し、A 群で有意に刺激反応時間の増加を認め、痛覚過敏の改善を認めた ($p < 0.05$)。免疫染色では損傷後 14 日で A 群は C 群と比較して BrdU 陽性 NG2 陽性細胞は有意に高値であった ($p < 0.05$)。損傷後 56 日で A 群において C 群と比較し、BrdU 陽性 APC 陽性細胞は有意に高値であった ($p < 0.05$) (図 1)。Western blotting にて MBP は、損傷後 28 日、56 日において C 群と比較し、A 群で有意に高かった ($p < 0.05$) (図 2)。

(2) 損傷脊髄内における細胞腫ごとのインフラマソーム発現の検討：
損傷後 1, 3, 7 日の OPC における NLRP3, ASC, Caspase-2 の発現率は、損傷群が非損傷群と比較し有意に高かった ($P < 0.01$) (図 3)。また損傷後 1 日における OPC での NLRP3, ASC, Caspase-2 の発現率は、アストロサイトと比較して有意に高値を示した ($P < 0.01$) (図 4)。損傷強度別の評価では、損傷後 1 日で OPC における ASC 発現率は HI 群が LI 群より有意に

高かった ($P < 0.05$) (図 5)。

(3) 考察および結論

損傷によって増加したオリゴデンドロサイト前駆細胞は、amiloride 投与により小胞体ストレス誘導性アポトーシスが抑制され、成熟オリゴデンドロサイトへと有意に生存・分化することが示唆された。

脊髄損傷後の OPC でインフラマソーム構成タンパクの発現は高く、OPC がインフラマソームを介した細胞死に対しても脆弱性があることが示唆された。

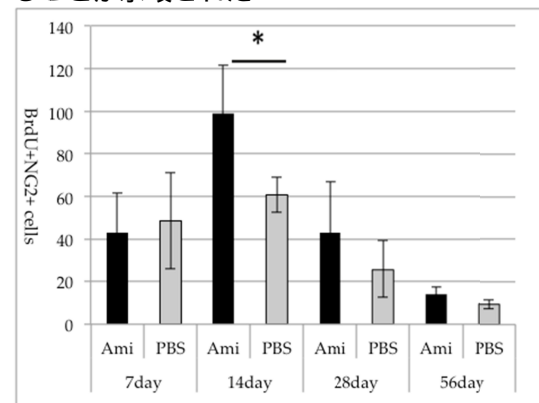


図 1

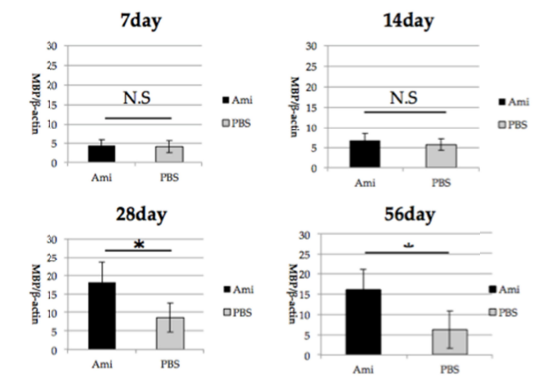


図 2

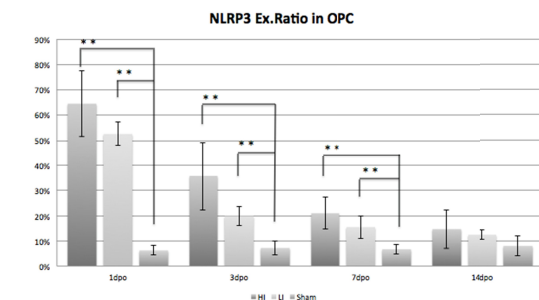


図 3

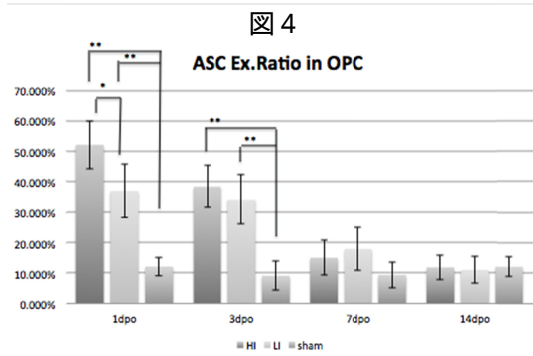
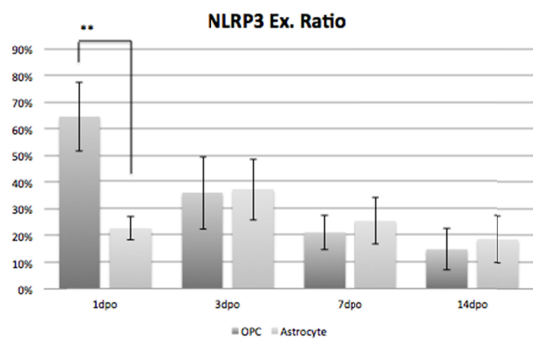


図 5

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3件)

Effect of amiloride on endoplasmic reticulum stress response in the injured spinal cord of rats

Masahiro Kuroiwa, Masahiko Watanabe, Hiroyuki Kato, Kaori Suyama, Daisuke Matsuyama, Takeshi Imai, Joji Mochida
European Journal of Neuroscience, Vol. 40, pp. 3120-3127, 2014

(査読有)

Endoplasmic reticulum stress response in the rat contusive spinal cord injury model -susceptibility in specific cell types

Daisuke Matsuyama, Masahiko Watanabe, Kaori Suyama, Masahiro Kuroiwa, Joji Mochida
Spinal Cord, vol. 52, pp. 9-16, 2013

(査読有)

GRP78 suppresses lipid peroxide and promotes cellular antioxidant levels in glial cells following hydrogen peroxide exposure,

Kaori Suyama, Masahiko Watanabe, Kou Sakabe, Asako Otomo, Yoshinori Okada, Hayato Terayama, Takeshi Imai, Joji Mochida,

PLOS ONE, vol.9, pp.e86951, 2013
(査読有)

〔学会発表〕(計15件)

Amiloride Promotes Oligodendrocyte Survival And Remyelination After Spinal Cord Injury In Rat
Takeshi Imai, Masahiko Watanabe, Hiroyuki Kato, Kaori Suyama, Sho Yanagisawa, Joji Mochida
Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting
2016.03.05 Florida Disney 's Coronado Spring Resort

脊髄損傷ラットにおけるアミロライド投与によるオリゴデンドロサイトの生存および髄鞘形成への影響
今井洗、渡辺雅彦、加藤裕幸、隅山香織、柳澤聖、持田譲治
第30回日本整形外科学会基礎学術集会
2015.10.22 富山市富山国際会議場

Spinal Cord Injury Current and Future Treatment Strategies
Masahiko Watanabe, Joji Mochida
Spine Across the Sea 2015
2015.7.28 Hawaii Fairmont Orchid Hawaii

Amiloride promotes oligodendrocyte survival and remyelination after spinal cord injury in rats
Masahiko Watanabe, Hiroyuki Kato, Takeshi Imai, Daisuke Matsuyama, Masahiro Kuroiwa, Joji Mochida
The 4th ISCOS & ASIA joint scientific meeting
2015.5.14 Montreal Fairmont The Queen Elizabeth

脊髄損傷ラットにおけるアミロライド投与の小胞体ストレス応答能を介したオリゴデンドロサイト前駆細胞の生存および再髄鞘形成への影響
今井洗、渡辺雅彦、加藤裕幸、隅山香織、黒岩真弘、持田譲治
第44回日本脊椎脊髄病学会
2015.4.17 福岡 福岡国際会議場

Amiloride promotes oligodendrocyte survival and remyelination after spinal cord injury in rats
Takeshi Imai, Masahiko Watanabe, Hiroyuki Kato, Kaori Suyama, Masahiro Kuroiwa, Syo

Yanagisawa, Joji Mochida
2014.11.17 Washington DC Convention
center

脊髄損傷における小胞体ストレス応答能
増強の効果と応用

渡辺雅彦
第29回日本整形外科学会基礎学術集会
2014.10.10 鹿児島 城山観光ホテル

脊髄損傷ラットにおけるアミロライド投
与によるオリゴデンドロサイトの生存およ
び髄鞘形成への影響

今井洸、渡辺雅彦、加藤裕幸、隅山香織、柳
澤聖、持田譲治
第29回日本整形外科学会基礎学術集会
2014.10.09 鹿児島 城山観光ホテル

The role of the endoplasmic reticulum
stress response in neural apoptosis of
the injured spinal cord.

Hiroyuki Kato, Masahiko Watanabe,
Takeshi Imai, Joji Mochida
第53回ISCOS(The International Spinal
Cord Society) Annual Scientific Meeting
2014.09.02 MECC Maastricht Convention
center

グリア細胞における小胞体シャペロン
GRP78の抗酸化因子制御効果
隅山香織、渡辺雅彦、寺山隼人、持田譲治、
坂部貢

第119回日本解剖学会総会・全国学術集会
2014.03.27 栃木県下野市

GRP78 suppresses lipid peroxidation of
glial cell membrane by oxidative stress in
traumatic spinal cord injury

Kaori Suyama, Masahiko Watanabe, Koh
Sakabe, Yoshinori Okada, Hayato Terayama,
Takeshi Imai, Joji Mochida J
60th Annual Meeting of Orthopaedic
Research Society
2014.03.15 New Orleans Hilton New Orleans
River side hotel

Effect of amiloride to endoplasmic
reticulum stress response in injured
spinal cord.

Masahiro Kuroiwa, Masahiko Watanabe,
Hiroyuki Kato, Takeshi Imai, Kaori Suyama,
Daisuke Matsuyama, Joji Mochida
Society for Neuroscience 2013 annual
meeting
2013.11.09 San Diego Convention center

グリア細胞における抗酸化因子制御に対
する小胞体シャペロン GRP78 の関与
隅山香織、渡辺雅彦、坂部貢、持田譲治
第48回日本脊髄障害医学会
2013.11.14 福岡 アクロス福岡

損傷脊髄における小胞体ストレスに対す
るアミロライドの効果

黒岩真弘、渡辺雅彦、加藤裕幸、隅山香織、
松山大輔、今井洸、持田譲治
第28回日本整形外科学会基礎学術集会
2013.10.17 幕張 幕張メッセ

抗酸化因子グルタチオンを介した小胞体
ストレス応答による脊髄損傷における細胞
膜脂質過酸化の抑制

隅山香織、渡辺雅彦、坂部貢、岡山義則、
黒岩真弘、持田譲治
第28回日本整形外科学会基礎学術集会
2013.10.17 幕張 幕張メッセ

〔図書〕(計1件)

The role of the endoplasmic reticulum
stress response in neural apoptosis of the
injured spinal cord.

Masahiko Watanabe, Hiroyuki Kato,
Masahiro Kuroiwa, Takeshi Imai, Kaori
Suyama, Daisuke Matsuyama, Joji Mochida.
Neuroprotection and regeneration of the
spinal cord ed. Uchida K, Nakamura M, Ozawa
H, Katoh S, 査読有り,31-41,2014
Springer

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 雅彦 (WATANABE Masahiko)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：40220925

(2) 研究分担者

隅山 香織 (SUYAMA Kaori)
平成 25～26 年度
東海大学・医学部・助教
研究者番号：20433914