

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 28 日現在

機関番号：82404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560275

研究課題名(和文) 圧迫性脊髄症における炎症の制御と運動機能回復に関する研究

研究課題名(英文) The regulatory mechanism of inflammation in chronic compressive myelopathy

## 研究代表者

緒方 徹 (OGATA, Toru)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・病院(併任研究所) 障害者健康増進・スポーツ科学支援センター・センター長

研究者番号：00392192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：様々な神経疾患の中で炎症反応は病態進行の重要な要素である。圧迫性脊髄症においてもこうした炎症反応の関与が考えられるが、その病態は明らかではない。本研究ではアストロサイトの炎症反応における機能を検討した。中枢神経の炎症反応モデルとして脊髄圧迫モデルは精度の問題があったため、主に薬剤誘導性脱髄モデルを用いた検討を行った。アストロサイトは炎症とともに活性化し、細胞内シグナル分子Erk2を阻害することで炎症反応の軽減が得られた。さらに細胞培養の検討からミクログリアから放出されるケモカインCCL2がアストロサイトを活性化する可能性が示唆され、治療介入のターゲットになりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Inflammation has a crucial role in various types of disorders in central nervous system, including compression myelopathy. In this study we investigated the role of astrocytes in progression of inflammation. Because of the lack of reproducibility in spinal compression model, we mainly used chemically induced demyelination model. We found that astrocytes are activated during inflammation, which is dependent on Erk2 signaling pathway activation. Furthermore, in vitro experiments suggested that CCL2, a chemokine, plays crucial role in activating astrocytes. We assume that signaling pathways in astrocytes are potential therapeutic target.

研究分野：神経科学

キーワード：グリア細胞 炎症反応 アストロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

### 脊髄症への手術治療後の問題点

圧迫性脊髄症（頸椎症性脊髄症）は脊柱管の加齢変化により変性した椎間板、椎体により脊髄が圧迫されることによって生じる脊髄神経の機能障害で、四肢の麻痺は年齢とともに緩徐に進行し、ADL 障害をもたらすばかりでなく、下肢機能障害から転倒し骨折に至るケースも多く観察される。現在、重度の頸椎症性脊髄症に対しては圧迫を取り除く除圧手術が一般的に行われているが、圧迫の程度と神経機能障害やリハビリテーションに対する応答性には大きな個人差があり、そのことが手術適応の判断を困難にしている。したがって、脊髄への慢性的物理的圧迫と脊髄機能とを結びつけるメカニズムの解明が必要となっている。

### 脊髄症における炎症反応

近年、臨床症例の剖検例の解析から、狭窄した脊髄における炎症反応の所見が報告されている。また動物モデルの検討からこうした炎症反応を減弱させることで脊髄組織傷害を軽減し、機能が維持されることも報告されている。したがって、慢性圧迫における炎症メカニズムの解明がこの分野の今後の課題と考えられる。神経組織における炎症反応はこれまで主にミクログリアによって制御されていると考えられてきたが、近年あらたにアストロサイトの関与も報告されている。本研究では慢性的な脊髄圧迫における組織炎症へのアストロサイトの関与に着目し、そのメカニズムの解明を目指す。

## 2. 研究の目的

動物モデルを用いた慢性脊髄圧迫モデルにおいて、運動機能障害の発症前・発症後のそれぞれのタイミングでアストロサイトの機能を変化させることで炎症反応が制御できるかを検証する。本研究は、炎症のメカニズムを明らかにすることで、将来的な治療法開

発への土台を気づくことを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 中枢神経慢性炎症モデルの作成

今回の研究のモデルとして下記の実験系を準備する

後縦靭帯骨化を生じる twy マウスの導入

マウス脊柱管に対するスペーサー挿入による慢性圧迫モデルの作成

化学的脱髄反応を誘導するカプリゾン投与による脱髄モデルの作成

いずれもモデルとしての長所と限界があるため、複数の実験系で整合性を確認しながら実験を進めることにより強固な知見を得ていくこととする。

### (2) 慢性圧迫モデルの解析系

運動機能解析の方法として

3次元動作解析による歩行パターン解析

四肢協調運動の評価に有効なロータロッドテスト

炎症反応の解析として

組織学的解析・生化学的解析を行う。

特に GFAP 陽性の反応性アストロサイトと Iba1 陽性の活性型ミクログリアから構成されるグリオシスの出現時期を同定する。

### (3) アストロサイト機能への介入

本研究ではアストロサイト内の細胞内シグナル Erk2 の抑制を遺伝子工学的に試みる。具体的にはアストロサイトで Cre リコンビナーゼを発現させる、Nestin-Cre のトランスジェニックマウスあるいは GFAP-CreERT2 トランスジェニックマウスと Erk2 flox マウスを交配させたコンディショナル・ノックアウトマウスを作成する。

## 4. 研究成果

### (1) 中枢神経慢性炎症モデル

慢性脊髄圧迫のモデルとしてマウス頸椎の椎弓下にスペーサーを挿入する脊髄慢性

圧迫モデルの作成を試みた。しかし、この方法では、再現性のある実験系の確率は困難であった。また Twy マウスの使用も個体間のばらつきが大きいことと、繁殖を要するため研究期間内で成果をあげることが困難と考えられた。その上で、再現性に優れた化学的脱髄モデルであるカプリゾンを用いた脳梁部の脱髄モデルを主に使用することとなった。

カプリゾン投与モデルはマウスの餌に銅キレート剤であるカプリゾンを 0.2%の比率で混合して、6 週間投与することで脳梁を中心とした脱髄を誘導するモデルである。脱髄は投与開始から 4 週目より組織学的に顕在化し、6 週後に通常餌に切り替えると可逆的に戻る。この経過を行動評価としてロータロッドテスト (図 1) を行ったところ、カプリゾン投与群では回転するロータロッドから落ちずに歩行できる時間が短くなり、脳梁を中心とする脱髄により四肢の協調運動が阻害されることが示唆された。



図 1

### (2) アストロサイトでの Erk2 シグナル抑制

本研究では Erk2 floxed マウスを Nestin-Cre または、GFAP-CreERT2 のトランスジェニックマウスと交配させることでアストロサイト特異的な Erk2 シグナルの抑制を試みた。CreERT2 を用いた手法が時間的なタイミングも制御できるため、当初はこちらの利用を予定し、マウスを導入後、タモキシフェンの経口投与あるいは腹腔内投与による Cre の誘導を試みた。しかし、組織学的に GFAP 陽性細胞における Cre の発現誘導は確認できるものの、最終的に行動解析を実施する

ことを念頭に置くと、そのノックアウト効率は不十分と考えられた。一方、Nestin-Cre のトランスジェニックマウスでは、理論的には中枢神経系のすべての (Nestin 陽性細胞由来の) 細胞で Cre が誘導されることとなるが、これまでの報告で Erk2 の選択的欠損マウスは Erk1 によってその機能の多くが代償され、正常な発育をすることが報告されている事、カプリゾン投与後の経過で Erk シグナルの活性化は主にアストロサイトで強いこと、の知見を踏まえ、この Nestin-Cre トランスジェニックマウスと Erk2 floxed マウスを交配させ、実験に用いることとした。

### (3) 脱髄モデルでの炎症シグナル活性化と Erk2 の役割

カプリゾン投与による脱髄には炎症反応が伴うことが報告されている。野生型マウスと Erk2 欠損マウスのそれぞれにカプリゾンを投与し、時間経過とともに組織中の炎症性サイトカインの発現を RT-PCR 法にて解析した。その結果、図 2 に示すように様々なサイトカイン、ケモカインが Erk2 の欠損によって低下することが明らかとなった。

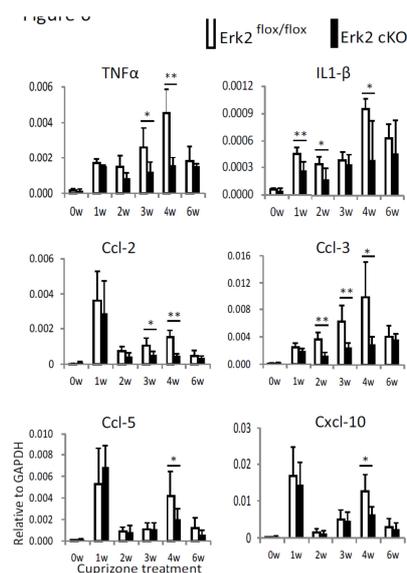


図 2 Erk2 欠損による炎症メディエーターの発現低下

#### (4) Erk2 欠損によるグリオシスの軽減

中枢神経の炎症病変ではミクログリアの集積とアストロサイトの活性化が生じ、それぞれ、Iba1、GFAP の免疫染色でその状態を観察することができる。Erk2 の欠損マウスにカプリゾン投与し、組織所見を確認したところ、GFAP と Iba1 の双方の染色性が低下していることが分かった(図3)。このことは、GFAP 陽性のアストロサイトでの Erk2 欠損の影響がミクログリアにもおよび、全体の炎症反応を軽減させていることを示唆するものと考えた。

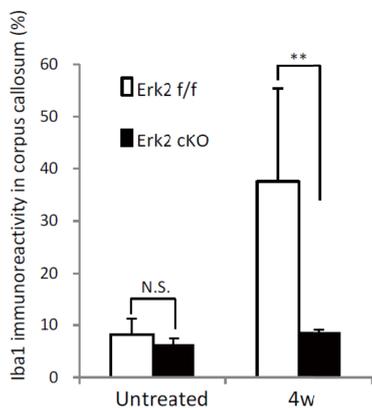
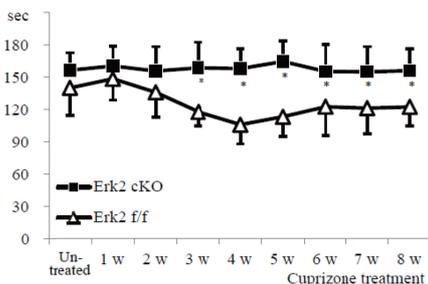


図3 Erk2 欠損による Iba1 染色領域の減少

#### (5) Erk2 欠損マウスでは行動学的な障害が軽減していた。

Erk2 の欠損により炎症の軽減が示唆されたことを踏まえ、行動学的な変化をロータロッドテストにて検討した。その結果、図4に示すように Erk2 欠損マウスではカプリゾン投与によるロッド上の歩行時間短縮が見られなくなり、カプリゾン投与によって生じる脱髄と運動機能障害が軽減することが明らかとなった。



#### 図4 Erk2 欠損マウスにおける運動機能低下の改善

#### (6) 培養アストロサイトは Erk2 依存的に CCL2 を産生する。

これまでの知見から、GFAP 陽性のアストロサイトにおける Erk2 シグナルの活性化によって炎症反応におけるアストロサイトの活性が誘導され、それがミクログリアと相互作用をしながら中枢神経の炎症反応を制御していることが示唆された。そこで、ミクログリアとアストロサイトの相互作用の中で Erk2 依存的に制御される分子を同定する為に、培養細胞での実験を行った。

Erk2 欠損マウス由来のアストロサイトと野生型マウス由来のアストロサイトをそれぞれ培養し、(野生型)ミクログリアの培養液を添加することで、その活性化を試みた。ミクログリアの培養液には様々な炎症性関連物質が放出されていると想定されており、その添加によってアストロサイトの Erk2 シグナルが活性化されることが確認された。さらに、Erk2 欠損細胞と野生型細胞の比較から、いくつかのケモカインの発現が低下していることが示された(図5)。In vivo モデルでの Erk2 欠損によるケモカイン発現変化と比較すると、Ccl2 の発現が一貫して Erk2 によって制御されていることが示された。

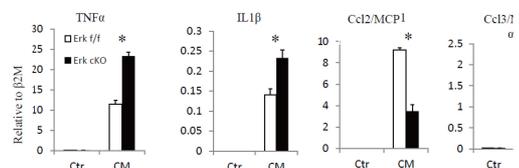


図5 Erk2 欠損アストロサイトにおける Ccl2 発現低下

#### (7) 考察

本研究では、中枢神経の炎症反応におけるミクログリアとアストロサイトの相互作用とその行動学的影響を検討した。当初予定し

ていた慢性脊髄圧迫モデルは再現性のある実験系の設定が困難であったため、カプリゾンモデルによる検討を行った。アストロサイトはミクログリア由来の液性因子によって活性化し、その Erk2 シグナルの働きによってケモカイン、とくに Ccl2 を産生し、それがさらなる炎症反応の増強につながるということが研究結果から示唆された。ケモカインの一つである Ccl2 はアストロサイトとミクログリアの相互増強作用を仲介する重要な分子であると考えられ、今後、治療のターゲット分子になりうると考えられる。カプリゾンモデルと脊髄圧迫モデルの間には相違点と共通点があるが、いずれの場合も、非外傷性のグリオシスを伴う炎症反応が病態である点で共通している。今後の研究の方向として、動物実験モデルあるいはヒト臨床モデルにおける Ccl2 の発現解析と病態との関連付けを行うことで、実際の臨床応用につながることを期待される。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

緒方 徹 (OGATA Toru)

国立障害者リハビリテーションセンター  
(研究所) 病院 (併任研究所) 障害者健康増進・スポーツ科学支援センター・センター長

研究者番号: 00392192

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: