

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870045

研究課題名(和文) 脊髄損傷におけるmTOR阻害薬ラパマイシンの炎症・二次損傷抑制効果の検討

研究課題名(英文) mTOR inhibitor rapamycin reduces inflammation and secondary neural tissue damage after spinal cord injury

研究代表者

菅野 晴夫 (Kanno, Haruo)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40646808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究成果から、mTOR阻害薬ラパマイシンが、脊髄損傷における運動障害・知覚障害を有意に改善することが分かった。さらに、脊髄内の損傷中心部においてマイクログリア活性を抑制して、炎症性サイトカインの発現を減少させることも明らかになった。これらの結果は、脊髄損傷に対するmTOR阻害薬ラパマイシンの投与がもたらす、脊髄障害の改善のための治療効果を裏付ける重要な知見になると考えられる。これらの研究成果は関連する国内および海外の学会で発表し、現在、国際的な科学雑誌にも論文投稿済みである。

研究成果の概要(英文)：In this study, the rapamycin treatment significantly improved not only locomotor function, but also mechanical and thermal hypersensitivity in the hindpaws after SCI. In an immunohistochemical analysis, activation of microglia in the injured spinal cord was significantly decreased in the rapamycin-treated mice. In addition, the expressions of inflammatory cytokines in the injured site was significantly attenuated by rapamycin treatment. These results indicated rapamycin administration in acute phase reduced inflammation and secondary neural tissue damage in the injured site and attenuated the locomotor impairment and the development of neuropathic pain after SCI. The present study demonstrated that rapamycin has significant therapeutic potential for SCI. We have presented these data in several academic meetings in Japan and other countries. We also submitted the results of this study to an international scientific journal.

研究分野：脊髄損傷

キーワード：脊髄損傷 ラパマイシン mTOR

1. 研究開始当初の背景

(1) Mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル経路は、生体内において遺伝子発現や細胞増殖、免疫応答、炎症などの多様な働きを制御しており、近年様々な研究分野で注目されている(Kanno et al, Cell Cycle 2012)。mTOR を抑制する薬剤であるラパマイシンは、細胞増殖や炎症反応を抑制する作用をもち、免疫抑制薬や抗腫瘍薬として広く臨床応用されている。過去の基礎研究から、多くの疾患モデルにおいてラパマイシンが炎症反応および組織傷害を抑制する効果があることが証明されている。また近年の報告から、ラパマイシンは脳外傷や脳梗塞モデルにおいて神経組織傷害の抑制効果があることが分かっている。

(2) 最近の我々は、マウス脊髄損傷に対するラパマイシン投与が脊髄内の mTOR を抑制し、神経細胞の脱落、白質の傷害を減少させ、運動機能を改善することを明らかにした (Sekiguchi, Kanno et al., J Neurotrauma 2012)。しかし、これまで脊髄損傷において mTOR の抑制がどのような分子生物学的メカニズムで神経組織傷害を抑制するのか検討した報告はない。そこで今回我々は、上述したラパマイシンの炎症抑制作用に着目し、脊髄損傷においてラパマイシンが炎症反応や二次損傷を抑制するか否かを明らかにする研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、mTOR 阻害薬ラパマイシンが脊髄損傷における炎症反応を抑制して、二次損傷による神経組織傷害を抑制するか否かを、マウス脊髄損傷モデルを用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) **脊髄損傷モデルの作製**：成体雌 C57BL6J マウス(10-12 週齢)を用いて、吸入麻酔下に第 10 胸椎の椎弓を切除し、NYU Impactor Device を用いて重さ 10g の Impact rod を高さ 3mm から脊髄に落下させ、脊髄損傷を作製した。Sham 群として、椎弓切除のみを行い脊髄損傷をさせない群も作製した。

(2) **ラパマイシンの投与**：損傷 4 時間後にラパマイシンを腹腔内に単回投与した。非投与群ではマウスに溶媒のみを腹腔内投与した。

(3) **脊髄組織標本の作製**：損傷後 1 日および 42 日の時点で、ペントバルビタールナトリウムによる深麻酔下に、4%パラフォルムアルデヒドで経心的灌流固定を行った。その後、脊髄を摘出し、パラフィン包埋を行い、損傷高位の横断面で厚さ 7 $\mu$ m のパラフィン切片標本を作製した。

(4) **組織学的解析**：パラフィン切片標本を用い、免疫染色で炎症性細胞であるマクロファージ・ミクログリアの組織内細胞浸潤、活性化を組織学的に評価した。

(5) **免疫化学的および遺伝子学解析**：損傷後 24 時間、3 日目の時点で脊髄を採取し、Western blot 法で、脊髄組織内のリン酸化 S6 キナーゼを解析し、ラパマイシンによる mTOR 経路の抑制効果を確認した。さらに脊髄内の炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の発現量の解析も行った。

(6) **行動学的解析**：損傷後、4、24 時間、3、7、14、21、28、35、42 日目にマウスの運動機能を Basso Mouse Scale (BMS) の total score および BMS subscore, および Inclined plane test で評価した。さらに後肢の知覚障害の評価を Von Frey test (Chaplan et al, J Neurosci Methods 1994)、Hargreaves test で評価した。

4. 研究成果

(1) これまでの研究で、mTOR 阻害薬ラパマイシンの投与が、脊髄損傷における運動障害および知覚障害を有意に改善することを組織学的・行動学的な解析によって明らかにした。行動学的解析では、マウス脊髄損傷モデルに対するラパマイシンの投与によって、Basso Mouse Scale (BMS) score で評価した体幹および後肢の運動機能が有意に改善した(図 1)。

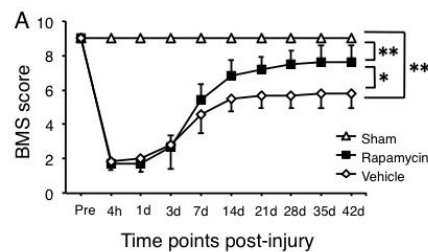


図 1 : BMS score による運動機能評価

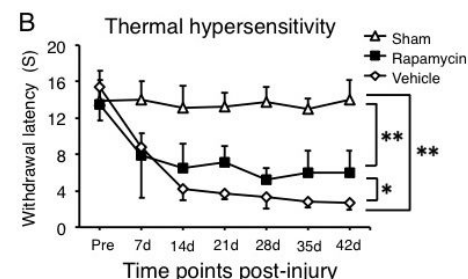
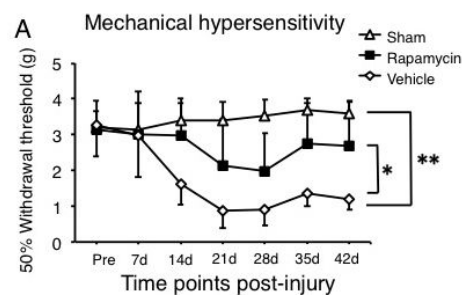


図 2 : アロデニアの評価

また、von Frey test、Hargreaves test で評価した機械的刺激および熱刺激に対する後肢のアロデニアが有意に改善した（図2）。

(2)組織学的解析および免疫学的解析では、ラパマイシンの投与によって、腰髄後角のミクログリアの活性化が抑制され（図3）、p-38の活性も有意に減少し（図4）、脊髄損傷後の神経障害性疼痛が抑制されることがわかった。さらに脊髄の損傷中心部において、炎症を惹起するM1 type ミクログリアを減少させて、TNF- $\alpha$  や IL-1 等の炎症性サイトカインの発現を抑制することが明らかになった。

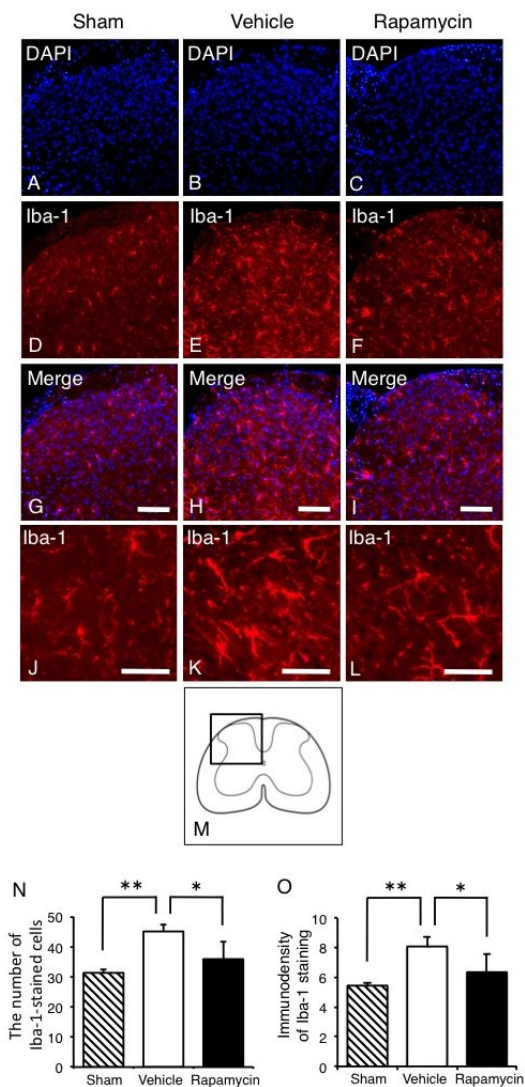


図3：腰髄後角部の Iba-1 染色によるミクログリア活性の評価

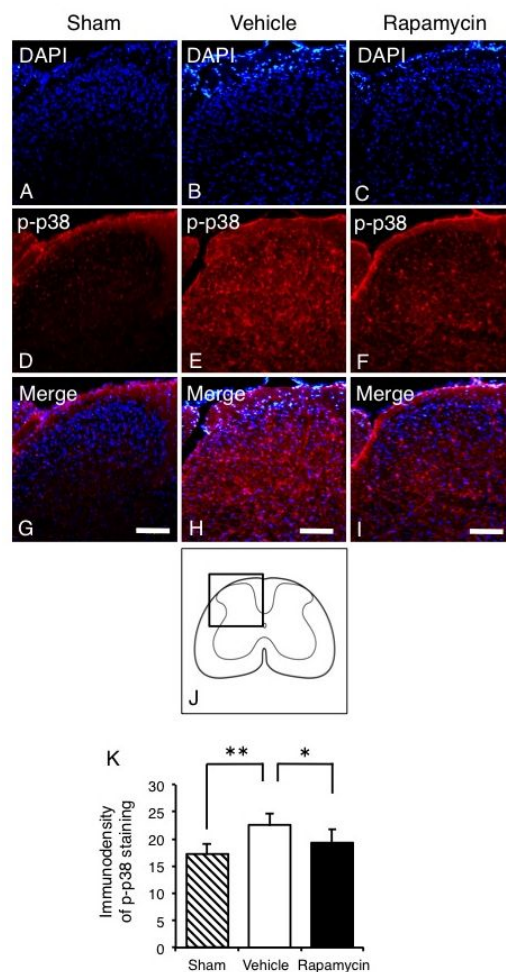


図4：腰髄後角部のリン酸化 p38 染色によるミクログリア活性の評価

(3)以上の結果は、脊髄損傷に対する mTOR 阻害薬ラパマイシンの投与がもたらす、脊髄障害の改善のための治療効果を裏付ける重要な知見になると考えられる。これらの成果をもとに、神経軸索再生やグリア瘢痕形成への影響もさらに検討して、将来的な臨床治験の実現に向けて研究を進展させて行くことが期待される。これらの研究成果は関連する国内および海外の学会で発表し、現在、国際的な科学雑誌にも論文投稿済みである。

ラパマイシンを含む mTOR 阻害薬は国内外で様々な疾患の治療に臨床応用されている薬剤であり、本研究の成果が、今後の脊髄損傷治療への臨床応用に繋がることが望まれる。

## 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 5 件)

菅野晴夫、館田聡、八幡健一郎、小澤浩司、

井樋栄二 .mTOR 阻害薬ラパマイシンによる脊髄損傷治療：ミクログリア活性と炎症反応の抑制効果の解析 . 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 . 2015 年 10 月 22 日～23 日 . 富山国際会議場 ( 富山県富山市 ) .

菅野晴夫、館田聡、八幡健一郎、小澤浩司、井樋栄二 . 脊髄損傷急性期のラパマイシン投与による運動機能・アロディニアの改善：ミクログリア活性と炎症抑制効果の検討 . 第 88 回日本整形外科学会学術総会 . 2015 年 5 月 21 日～24 日 . 神戸ポートピアホテル ( 兵庫県神戸市 ) .

菅野晴夫、館田聡、八幡健一郎、小澤浩司、井樋栄二 . 脊髄損傷急性期のラパマイシン投与によるミクログリア活性と炎症抑制効果の検討 . 第 44 回日本脊椎脊髄病学会 . 2015 年 4 月 16 日～18 日 . 福岡国際会議場 ( 福岡県福岡市 ) .

菅野晴夫、館田聡、八幡健一郎、小澤浩司、井樋栄二 . Rapamycin suppresses microglial activation and inflammation after spinal cord injury in mice. 2015 年 3 月 28 日～3 月 31 日、Annual Meeting of Orthopaedic Research Society 2015、Las Vegas (USA) .

菅野晴夫、館田聡、八幡健一郎、小澤浩司、井樋栄二 . Rapamycin suppresses astrocyte and microglial activation and reduced development of neuropathic pain after spinal cord injury in mice. 2014 年 3 月 15 日～3 月 18 日、Annual Meeting of Orthopaedic Research Society 2014、New Orleans (USA) .

〔図書〕( 計 1 件 )

Kanno Haruo, Ozawa Hiroshi、Springer Japan . Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord : Chapter 3. Autophagy in Spinal Cord Injury: Pathogenic Roles and Therapeutic Implications . 2014.p19-30

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者：

菅野 晴夫 ( Kanno, Haruo )

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40646808