

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：82404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893291

研究課題名(和文) 損傷脊髄での可塑性誘導に対するエネルギー供給に関する研究

研究課題名(英文) Role for inducing neural plasticity of supplying of energetic substrate in injured spinal cord.

研究代表者

市原 克則 (ICHIHARA, Yoshinori)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 運動機能系障害研究部・流動研究員

研究者番号：50710711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷の治療標的である神経可塑性誘導の一種の再髄鞘化に対するグリコーゲンの寄与、髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトへの乳酸の効果を検討した。カプリゾンを用いたマウス再髄鞘化モデルにおいて、グリコーゲン分解酵素阻害剤は再髄鞘化を抑制した。さらに初代培養オリゴデンドロサイト前駆細胞において乳酸は細胞死を抑制し、増殖・分化を促進した。以上の結果より、グリコーゲンおよびその代謝物である乳酸はオリゴデンドロサイトに作用し、再髄鞘化に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the contribution of glycogen to remyelination as an inducible neural plasticity, which is therapeutic target of spinal cord injury. Therefore we tested the effect of inhibitor of glycogen phosphorylase, glycogen catabolic enzyme, in mice reversible demyelination model, named cuprizone model. We found that remyelination was decreased in corpus callosum of inhibitor injected mice compared to saline injected mice. To further examine the possibility whether lactate derived from glycogen affects proliferation or maturation of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs), we cultured OPCs and tested the effect of lactate. Increased cell death, decreased OPCs proliferation and inhibited differentiation to oligodendrocyte by low glucose was rescued by lactate. These results suggest that oligodendrocytes use metabolites derived from glycogen for remyelination in vivo and lactate might be used for proliferation and maturation in oligodendrocytes.

研究分野：分子生物学

キーワード：オリゴデンドロサイト 髄鞘 グルコース グリコーゲン 乳酸

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は神経機能の障害により四肢に高度な麻痺を残し、患者の Quality of Life (QOL) を著しく低下させる。ニューロリハビリテーションは神経科学の知見を基に神経回路の可塑性を誘導することで機能回復を得ようとするもので近年着目されている。こうした手法はこれまで一定の機能回復をもたらしているものの、その効果が薬剤投与など他の治療と併用することでさらなる効果を生み出さうかについては未だ検討が進んでいない。神経組織の可塑的变化にはニューロンとグリア細胞の協調的な働きが必要とされている。グリア細胞の中でもオリゴデンドロサイトは、ニューロンの軸索に髄鞘を形成することで正常な神経伝達に寄与しているが、脊髄損傷患者では髄鞘の破壊である脱髄病変が報告されている。したがって、急性期から亜急性期（運動機能の回復期）にかけての脱髄病変の再髄鞘化は損傷脊髄の機能回復に寄与する可塑性のひとつと考えられるが、再髄鞘化のメカニズムはいまだ不明な点が多い。

オリゴデンドロサイトは前駆細胞から分化し、ニューロンの軸索周囲に髄鞘を形成する。髄鞘形成はニューロンの活動度に依存して誘導される一方、髄鞘は軸索を何重にも取り巻くような形態をしているため、オリゴデンドロサイト前駆細胞からの大きな形態変化を伴う再髄鞘化には多くのエネルギーが必要だと考えられる。一般に神経組織のエネルギー源として脳脊髄液中のグルコースに加えて、アストロサイトに蓄えられているグリコーゲンが存在する。アストロサイトのグリコーゲンから産生された乳酸は、生理的にもニューロンのエネルギー源として利用されている。一方乳酸はニューロンだけでなく髄鞘形成に対しても、エネルギー枯渇状態において保護的に作用することが報告されている。しかし再髄鞘化に対し、グリコーゲン由来の乳酸がどの程度寄与しているかは不明である。

2. 研究の目的

損傷からの回復過程である再髄鞘化に対するグリコーゲンおよびその代謝産物である乳酸の寄与を明らかにする。さらに乳酸の添加がオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖・分化・細胞死に与える影響を検討することで、再髄鞘化促進を介した可塑性誘導の方法の開発の基盤とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 再髄鞘化に対するグリコーゲンの寄与の解明

マウスにおける再髄鞘化モデルであるカ

プリゾン負荷モデルを用いて、グリコーゲン分解酵素阻害剤である 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol hydrochloride (DAB) が再髄鞘形成に与える影響を、Luxol Fast Blue による髄鞘の染色および成熟オリゴデンドロサイトマーカーの Glutathione S-transferase π (GST π) 陽性細胞数により評価した。

カプリゾン誘導性脱髄・再髄鞘化モデルの作製

8週齢の雄性 C57BL/6J マウスに 0.2% カプリゾン含有食を 6 週間与えることで、脳梁部の脱髄が認められる。その後普通食でさらに 2 週間飼育することで、脱髄した脳梁部の再髄鞘化を誘導した。

再髄鞘化モデルマウスに対する薬物投与

グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤の DAB および対照である saline は、再髄鞘化開始のタイミングである普通食への変更の日から、alzet 浸透圧ポンプを用いて持続的に右側脳室内に投与した。

組織学的評価

髄鞘は Luxol Fast Blue により染色し、完全な脱髄を 0、正常な髄鞘を 3 としてスコアリングした。成熟オリゴデンドロサイトマーカー GST π 、アストロサイトマーカー Glial fibrillary acidic protein (GFAP)、ミクログリアマーカー Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) は免疫組織化学的に染色し、陽性細胞数をカウントした。

(2) 乳酸の添加がオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖・分化・細胞死に与える影響

髄鞘を構成するオリゴデンドロサイトはオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化・成熟により形成される。乳酸がオリゴデンドロサイトによる髄鞘形成を促進する機序を明らかにするために、乳酸の添加とオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖・分化・細胞死に対し、乳酸が与える影響を検討した。

オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の初代培養

胎生 16.5 日目の ICR マウスから前脳を採取し、Poly-d-lysine (PDL) でコートした T-75 flasks で、10% Fetal bovine serum が添加された Minimum Essential Medium-Eagle (MEM-E) で 5 日間培養した。450 rpm で 5 分間振った後、新鮮な培地に交換し、2 時間培養した後、200 rpm で 16 時間振った。培養液を採取し、ペトリ dish 上に 30 分間培養液を静置し、ペトリ dish への接着性の低い細胞を OPC として採取した。採取した OPC は、modified BS medium [DMEM containing 36.6mM glucose, 0.01% BSA, 5 μ g/ml insulin, 0.5 μ g/ml transferrin, 0.6

µg/ml progesterone, 16 µg/ml putrescine, 400 ng/ml sodium selenate (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.4% ASF104 (Ajinomoto, Tokyo, Japan), and antibiotics] で培養し、増殖時は、10 ng/ml PDGF-AA (PDGF) (Sigma), 10 ng/ml FGF2 (R&D, Minneapolis, MN, USA) and 5% Nerve-Cell Culture Medium (serum-free conditioned medium from rat astrocyte confluent cultures based on DMEM/F-12 with N2 supplement; Sumitomo Bakelite, Akita, Japan) を、分化誘導時は 400 ng/ml thyroxine, 40 ng/ml triiodothyronine (Sigma), x1 B27 (life technologies, USA), x1 N2 (life technologies, USA) を添加した。

細胞増殖および細胞死の評価

生細胞を Calcein-AM により標識し、Calcein-AM 陽性細胞数を継時的にカウントすること、および Bromodeoxyuridine (BrdU) 10 µM を 1 時間添加した後、4% para-formaldehyde (PFA) で細胞を固定し、免疫染色後に BrdU/DAPI 陽性率を測定することにより、細胞増殖を評価した。細胞死は、死細胞から放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) を LDH Cytotoxicity Detection Kit (Takara-bio, Japan) を用いて測定した。

OPC 細胞分化の評価

OPC の分化を、成熟オリゴデンドロサイトマーカーの Myelin basic protein (MBP) の mRNA 発現量およびタンパク陽性率の測定により評価した。Total RNA を RNeasy kit (Qiagen) で抽出し、PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) で逆転写した後、ABI Prism 7000 Sequence Detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて real time PCR 法により評価した。Primers は MBP forward 5'-ACTCACACACGAGAACTACCCA-3', reverse 5'-TG GTGTTTCGAGGTGTCACAA-3'、および GAPDH forward 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', reverse 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3' を用い、GAPDH との相対比を分化の指標とした。タンパクは Rat monoclonal MBP Antibody (AbD Serotec) を用いて染色し、DAPI との相対比により分化の指標とした。

4. 研究成果

(1) 再髄鞘化に対するグリコーゲンの寄与の解明

再髄鞘化にグリコーゲンが寄与するかを明らかにするために、カプリゾンによる脱髄後に誘導される再髄鞘化に対するグリコーゲン分解酵素阻害剤の DAB を効果検討した。

Luxol fast blue により染色し、脳梁の髄鞘を評価したところ、intact マウスに比べてカプリゾン 6 週負荷後において髄鞘が低下した。さらに 2 週間の普通食餌により再髄鞘化を認めた。これに対し、DAB により再髄鞘化が低下した。

この結果と一致し、再髄鞘化に伴い増加する GST π 陽性細胞数は、DAB 投与により有意に低下した。

一方、アストロサイト (GFAP) およびミクログリア (Iba1) に対し、DAB は明らかな影響を認めなかった。

(2) 乳酸の添加がオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖・分化・細胞死に与える影響

実験(1)により、グリコーゲンおよびその代謝物が再髄鞘化促進に寄与することが示唆された。そのため、グリコーゲンの代謝物である乳酸が、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖・細胞死・分化に直接的に与える影響を検討した。

Calcein-AM 陽性生細胞は、36.6 mM Glucose に比べて 0.4 mM Glucose により低下したが、10 mM Lactate により回復した。BrdU 陽性の増殖細胞も同様に 36.6 mM Glucose に比べて 0.4 mM Glucose により低下したが、10 mM Lactate により回復した。培養液中の LDH を指標とした細胞死は 36.6 mM Glucose に比べて 0.4 mM Glucose により増加し、10 mM Lactate により低下した。以上により、低グルコースにより低下した増殖および増加した細胞死を、乳酸は回復することが示唆された。

オリゴデンドロサイトの分化に対する乳酸の影響を検討したところ、0.4 mM Glucose により MBP mRNA 発現量は低下するが、乳酸の添加により濃度依存的に回復した。さらに MBP タンパク陽性細胞率も同様に 0.4 mM Glucose により低下し、乳酸の添加により回復した。

以上の結果より、オリゴデンドロサイトにおいてグリコーゲン由来の代謝物は in vivo での再髄鞘化のために利用されること、乳酸はオリゴデンドロサイトにおいて直接増殖・成熟に寄与することが示唆された。

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)

澤田泰宏、原田伊知郎、市原克則、吉野大輔、吉村耕一、平田宏聡 「緊張型」と「緩和型」のメカニカルストレスによる生体恒常性維持 実験医学増刊 33(10): 1617-1625. 2015

〔学会発表〕(計1件)

Yoshinori Ichihara, Toru Doi, Youngjae Ryu, Motoshi Nagao, Yasuhiro Sawada, Toru Ogata: Lactate, a possible metabolite for remyelination by oligodendrocyte progenitor cells. Neuroscience 2015, 2015.10.17-21, Chicago, USA (予定)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

市原 克則

(ICHIHARA Yoshinori)

国立障害者リハビリテーションセンター

(研究所)・研究所 運動機能系障害研究

部・流動研究員

研究者番号：50710711

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし