

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462232

研究課題名(和文) 脊髄損傷修復に向けた再生阻害機構制御 コンドロイチン硫酸を制御する新素材開発

研究課題名(英文) In vivo regulation of chondroitin sulfate gene to recovery from spinal cord injury

研究代表者

武内 恒成 (Takeuchi, Kosei)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：90206946

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)：脊髄損傷治療に関しては根本治療法がない。そのためにiPS細胞移植等による臨床治療が示されている。しかし損傷された神経の周辺領域ではコンドロイチン硫酸が再生阻害因子として機能し、神経再生を阻害する。そのため損傷部周囲の環境を整え、コンドロイチン硫酸の発現を制御することが重要となる。我々は新しいバイオマテリアルを用い、かつ核酸医薬をデリバリーすることで、再生環境を維持しマウスモデルにおける生理的機能回復につなげることを可能とした。さらにこの方法はiPS細胞移植時にも移植細胞と移植細胞周辺環境の制御と併用した治療方向性につなげることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Injured adult neurons in the mammalian central nervous system (CNS) rarely regenerate, because some of the intracellular and cell-surface environmental factors inhibit axon regrowth. Chondroitin sulfate (CS) is the most abundant and potent exogenous inhibitor of axonal regeneration. CSGalNacT1 is a key enzyme in CS biosynthesis. The sponge forms biomaterials impregnated with a mixture containing small molecule compounds or siRNAs was placed on the lesion area in mice suffered neural injuries. The recovery of these mice which treated with drug delivery systems reached the levels of satisfactory amelioration comparable to those of KO mice. Taken together, our results indicated that our drug and delivery system is a promising therapeutic target for treatment of the spinal cord injury and brain infarction, and many treatments of the neural damage.

研究分野：分子細胞生物学・神経科学

キーワード：再生治療 神経再生 バイオマテリアル 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷の治療に向けて、iPS 細胞/ES 細胞や幹細胞移植による治療が唱えられ多くの試みがなされつつある。しかし脊損後には、損傷炎症に続いて生じるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の発現上昇が神経の再生を阻害し、その後損傷部を取り囲むように生じる線維性瘢痕が完全に神経再生をブロックしてしまう。この初期過程で、A): コンドロイチン硫酸(CS)は本当に神経再生を阻害しているのか? B): 線維性瘢痕の形成は、コンドロイチン硫酸の発現やグリア性瘢痕の形成とリンクし相関はあるのか? さらに、C): 神経再生治療に向けてコンドロイチン硫酸などの抑制因子を如何に人為的に制御すべきか? を明らかにする目的で、申請者は、コンドロイチン硫酸基の生合成経路に重要な 2 つの糖転移酵素 Chondroitin sulfate

N-acetylgalactosaminyltransferase-1&-2 の遺伝子欠損マウスを世界に先駆けて作製し (Takeuchi et al. Biochem. J (2010))。脊髄損傷モデルマウス作成系にて解析、以下の結果を得ている (Takeuchi et al. Nature Communication (2013))。

1) CSGalNacT1 KO マウスは、野生型マウスと比べてコンドロイチン硫酸基の量が約 1/2 まで減少している (Biochem J 2010)。

2) CSGalNacT1 KO マウスは脊髄損傷後数週間で、野生型マウスよりも損傷後修復が早く、後肢回復、筋電図解析など生理機能解析すべてにおいて圧倒的に高い回復を示した。これはこれまで報告されているどの KO マウスよりも劇的な回復であった。

3) 組織化学的な解析からは CSGalNacT1 KO では、脊髄損傷領域の線維性瘢痕の面積が減少しており、免疫組織像と神経トレーサー実験からは神経軸索再生が認められた。

4) CSGalNacT1/T2 ダブル KO マウスは胎生致死である (CS が無くなり骨形成が進まないため)。

上記の問 A) B) については、確かにコンドロイチン硫酸 CS は阻害因子であり、瘢痕形成を炎症性グリア細胞の活性化や誘導とも関連して制御することも明らかとなった。しかし、CS が 1/2 程度の減少しか見ないのに (1)、CS 切断酵素である ChABC (コンドロイチナーゼ) 処理よりも回復した (2) ことは驚きであった。実は、CS 合成を抑えともう一方のヘパラン硫酸(HS)の合成誘導昂進が起こり、積極的な神経伸長促進をしていた (Nature Communication (2013))。つまり CSGalNacT1 は脊髄損傷など神経再生治療において絶妙な治療ターゲットとなることを見出した。

さらに我々は、これら基礎研究をできる限り脊髄損傷治療に活かすことを目指し、バイオマテリアルとあわせた治療応用研究を展

開している。古くから縫合糸などに用いられてきたフィブリン (絹タンパク質) を融解・再重合させて、スポンジ or シート状バイオマテリアルを成型できる日本独自の技術である。我々は、コンドロイチン硫酸を始めとする細胞外神経阻害環境を制御抑制し、さらに iPS 細胞など移植細胞を保持できる再生医療 (脊髄損傷) へ応用することを模索している。これまでに以下の背景となる予備結果を得ている。

5) フィブリンは拒絶反応がなく脊損領域に移植しても炎症は生じない。

6) 適度な強度と空洞を持ち移植再生細胞の保持に向く。移植する iPS 細胞の保持 (周りへの播種防止) にも応用可能。

7) CSGalNacT1 の siRNA の徐放効果を示し、マウス移植でロックダウン (KD) 可能かつ脊損後の治療効果をあげることができた (Nature Communication 2013)。

2. 研究の目的

以上から、CSGalNacT1 KO・KD マウスを用いた脊髄損傷修復をさらに研究するとともに、絹タンパク素材を再生阻害因子 CS 制御によるや再生環境保持・さらには移植幹細胞保持材料としての、臨床応用を睨んだ研究展開を目的とする。

本研究では、コンドロイチン硫酸(CS)による再生阻害を人為的に抑制し、CSGalNacT1 を中心とする再生環境の操作と、移植幹細胞保持材料としての効果を、脊髄損傷モデルで行い臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。期間内には以下のことを明らかにする。

1) すでに進行している CSGalNacT1 siRNA によるデリバリーによる脊髄損傷実験を確立させる。つまり核酸医薬の DDS としてのフィブリンスポンジの応用を進める。また核酸医薬とバイオマテリアル融合材料は基礎研究としては魅力があるが、実際の臨床への応用を考えると認可基準などが高く実現が難しい。そのため CS 合成酵素の阻害剤 (化学化合物) でのマウス実験を行い、DDS 効果と治療効果を評価する。

2) フィブリンスポンジは骨領域に留置することで、骨化も望める結果がある (京大再生研)。脊髄損傷領域に移植した際に神経側では DDS 材料として、さらに椎骨側で骨化が望めるか検討する。

3) マウスにおける iPS 細胞移植によって、脊損からの治療効果をフィブリンスポンジによる移植細胞保持能および生理的回復を評価を目的とする。

4) 核酸医薬の開発と併せて、核酸医薬および化合物による薬剤デリバリー能 (DDS) 評価と、治療効果の検証を目的とする。

3. 研究の方法

1) CSGaINacT1 siRNA (核酸医薬) と CS 合成酵素の阻害剤 (化合物) の DDS 効果と治療効果解析

siRNA ノックダウンによって治療効果が上がることはすでに実証したが、その詳細について技術的確立とともに徐放材としての効果を検討する。また、フィブロインスポンジを徐放剤として用いた siRNA 投与では DDS として損傷部に蛍光標識核酸がデリバリーされていることも定量的に厳密な検討を行う。

化合物が同様にデリバリー可能かを検証する。具体的にはこれまで知られる様々な薬品等を蛍光標識して DDS 能を検討、検証する。CS 発現抑制を行った際に認められた、HS 誘導による神経伸長促進効果が化合物でも起こると想定されるが、その作用も RT-PCR および免疫組織化学で厳密に定量解析を行う。

2) フィブロインスポンジの骨 (椎骨) 接触部での骨化および炎症作用の検証 および生理的回復過程の検証

スポンジのみを移植した場合、CS 発現を抑える上記 1) の実験系の場合での炎症と骨組織に与える影響を組織化学的に解析する。炎症に影響の与えない siRNA 量や化合物濃度の条件検討を多くのマウス移植を行い定量的評価解析を進め、機能的回復実験とともに長期追跡する。

3) マウス iPS 細胞その他幹細胞移植によるフィブロインスポンジの細胞保持効果の検討

脊髄損傷モデルマウスへの iPS 細胞移植を行い、フィブロインスポンジで被覆、iPS 細胞の留置能を検証する。具体的には、蛍光標識後細胞を脊損部に移植しスポンジ被覆有り無しでの短期間 (2 週間以内) での細胞の挙動を比較解析する。さらに、脊髄損傷後 3 か月以上経過したマウスを用い、脊髄損傷部線維性癒痕を除去し幹細胞および iPS 細胞移植を行う。移植後、1 カ月から 2 年程度の長期でのマウス運動生理機能回復とともに免疫組織化学を駆使し、再生能と組織の変化の詳細を解析する。これら脊髄損傷モデルマウスでは、組織から微量サンプルも得て、RT-PCR による炎症性抗炎症性サイトカイン発現定量や種々細胞マーカーによる組織変化も分子生物学的に解析し、免疫組織化学による解析データとの照合も取る。

4. 研究成果

1) CSGaINacT1 siRNA (核酸医薬) と CS 合成酵素の阻害剤 (化合物) の DDS 効果と治療効果解析

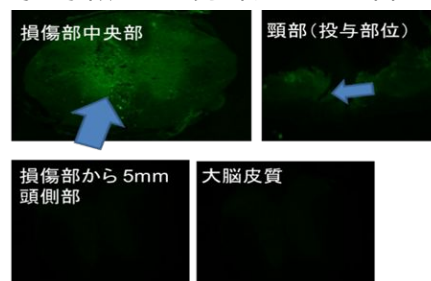
CSGaINacT1 siRNA をバイオマテリアルであるフィブロインスポンジにて脊髄損傷部に留置および DDS する方法を様々な検討した。

これらでは損傷後継続して 1 週間は徐放効果があることを、経時的観察によって蛍光標識から認めることが出来た。当該領域からの組織サンプリングから、デリバリーされる領域 (脊髄前後) およそ 5 mm 領域では標的酵素である CSGaINacT1 の遺伝子発現も 10 日間にわたって抑制されていることをリアルタイム PCR から明らかにした。同実験系では同領域の HS 発現レベルも上がっており、阻害因子である CS を抑え、神経伸長を促進する HS 発現を高めるという回復効果をもたらすことにも成功した。

同様の DDS システムで化合物がデリバリー出来るか、さらには治療効果を挙げられるかを検討した。化合物としてはこれまで治療効果が言われているコンドロイチン硫酸切断酵素 ChABC と CS 発現を抑えるキシロシドを用いた。ChABC をバイオマテリアルで投与する系では、様々な濃度を振って検討したが、直接投与と比べて顕著に回復効果と改善をもたらすことはなく、逆に組織の融合や炎症の惹起をもたらした。これは ChABC が強力な酵素であり、程度な分解を受けることも無く効果を挙げることによると考えられた。実際の臨床応用ではその危険性も高いことを示す結果となった。キシロシド投与においては CS 発現を抑えるため安定したデリバリーは出来ていると考えられたが、生理的回復には繋がらなかった。

これらを踏まえ、実際の生体応用を鑑みて、今回より直接的な DDS を検討することとした。そのためにも siRNA ではなくより現実的に治療に用いることが可能なアンチセンスオリゴ (ASO) 配列を網羅的に検討した。その結果非常に有効な ASO を見出すことが出来た。(下記参照: 特許: 特願 2017-072315)

ASO の場合にはより安定した DDS が可能であるため、髄腔内に蛍光標識オリゴを投与し、3 日後のマウスでの脊髄損傷箇所およびその近傍、脳への DDS を検討した。髄腔内投与した蛍光 ASO は マウス大脳や損傷部から離れた脊髄にはデリバリーされておらず、損傷部に限って高い濃度でターゲット貯留されていることが解った (下段図)。また、頸部注入箇所にも一部デリバリーが認められた。ASO は脊髄損傷部位など炎症系が惹起され、さまざまな因子と細胞が動員される損傷部に特に ASO がデリバリーされやすいことを示している。損傷後直後の単独 ASO 投与から容易に損傷部に特異的にデリバリーされる可能性を示唆しており、今後の治療展開に画期的な手段として見出すことが出来た。

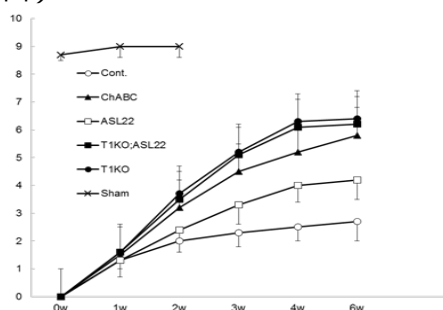


損傷後しばらく後や再手術の場合には、我々が進めているバイオマテリアルによる DDS による治療が非常に有効であることを示した。さらに、損傷直後の場合には、髄腔内投与であっても、核酸医薬の場合には十分な DDS が可能であり、治療の展望があることを示す画期的な方法になるものと考えられる。

2) フィブロインスポンジの骨(椎骨)接触部での骨化および炎症作用の検証 および生理的回復過程の検証

損傷後にフィブロインスポンジ留置、あるいは薬剤を徐放した際に、周辺領域や骨との癒着などを組織化学的さらには遺伝子定量解析から検討した。フィブロインスポンジに関しては癒着や骨組織への影響は少なく、これはコラーゲンスポンジなどと比較しても安定かつ安全な素材であることを確認した。ただ、当初期待したような骨組織への変化などは脊髄損傷後の修復までの1年の追跡解析からは見いだせなかった。しかし、骨組織近傍および皮膚直下組織からの定量 PCR 実験からは炎症性サイトカインの誘導などは無くきわめて安全であることを遺伝子解析からも明らかにすることが出来た。

さらに、上記1)で示された様々なマウスによる機能回復を追跡解析を行った。特に核酸医薬としての ASO 投与などによって機能改善が劇的に認められることを見出した(下図)



(核酸医薬投入後の生理的回復)

これは ChABC を導入した際と同等レベルでの回復(上記○)を示しており、十分に治療効果をあげている。治療の方向性としても非常に有効であることを示した。

3) マウス iPS 細胞その他幹細胞移植によるフィブロインスポンジの細胞保持効果の検討

フィブロインスポンジによって被覆することによる、様々な移植細胞の留置能を解析した。特に脊髄損傷領域にマウス iPS 細胞を移植した際に、被覆無しの場合、コラーゲンスポンジ被覆の場合などを比べた。3 か月以上の追跡により、フィブロインスポンジは非常に有効な留置能を示し、周りへの播種なども認められなかった。コラーゲンスポンジはその基材そのものが細胞を呼び込んでしま

い、周囲の炎症性細胞や移植 iPS 細胞も基材が取り込んでしまっていた。フィブロインスポンジは細胞との親和性がさほど高くなくことが炎症領域(脊髄損傷領域)と周囲組織とのバリアーとしても機能し、絶妙な環境を形成すると結論できた。

現在、核酸医薬を徐放しつつ移植細胞を保持することによって脊髄損傷個体の長期にわたる回復を検証している。

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5件)

Extracellular Signals induce Glycoprotein M6a Clustering of Lipid-rafts and associated Signaling Molecules. Honda A, Ito Y, Takahashi-Niki, Matsushita N, Nozumi M, Tabata H, Takeuchi K, Igarashi M. J Neurosci. 37(2017) : 4046-4064

Claudin-21 Has a Paracellular Channel Role at Tight Junctions. Tanaka H, Yamamoto Y, Kashihara H, Yamazaki H, Tani K, Fujiyoshi Y, Mineta A, Takeuchi K, Tsukita S. Mol. Cell. Biol. (2016)36(6):954-64

Amelioration of neuronal injury by the expressional regulation of the glycosaminoglycan. Takeuchi K. Seikagaku. (2015) 87(6):744-8.

A newly identified mouse hypothalamic area having bidirectional neural connections with the lateral septum: the perifornical area of the anterior hypothalamus rich in chondroitin sulfate proteoglycans. Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Hashimoto T, Kaneko T, Takeuchi K, Nishi M. Eur. J. Neurosci. (2015) 42:2322-2334

[学会発表](計24件)

Kosei Takeuchi

Mice lacking in an enzyme involved in chondroitin sulfate synthesis shows better recovery from spinal cord injury. "25th International Society for Neurochemistry 2015/8/21-29(ケアンズコンベンションセンター オーストラリア ケアンズ) など

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: コンドロイチン硫酸合成を阻害するアンチセンス核酸
発明者: 笠原勇矢、小比賀聡、武内恒成

権利者：同上
種類：特許出願（国内）
番号：特願 2017-072315
出願年月日：2017.3.31
国内外の別：国内

取得状況（計2件）

名称：Anti-GAP43 Antibody
発明者：武内恒成 五十嵐道弘
権利者：国立大学法人 新潟大学
種類：特許
番号：PCT/JP2012/077163
取得年月日：2017.1.10
国内外の別：国外（米国）

名称：GAP43 の免疫学的分析方法及び当該方法
法を実行するためのキット・並びに成長円錐
を検出するための試薬及び方法
発明者：武内恒成 五十嵐道弘
権利者：国立大学法人 新潟大学
種類：特許
番号：特願 2013-539717
取得年月日：2017.6.2
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060701/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 恒成 (TAKEUCHI Kosei)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号： 90206946

(2) 研究分担者

依田 浩子 (IDA Hiroko)
新潟大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号： 60293213

(3) 連携研究者

玉田 靖 (TAMADA Yasushi)
信州大学・繊維学部・教授
研究者番号： 70370666

(4) 研究協力者

()