

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 6 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560280

研究課題名(和文)軽度な脊髄損傷の新規薬物治療法の開発

研究課題名(英文)Novel drug therapy development for mild spinal cord injury

研究代表者

高木 都 (Takaki, Miyako)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00033358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低分子化合物セロトニン4刺激薬、クエン酸モサプリドが腸壁内神経系再生促進剤として働く。そこで、他領域にわたる神経の再生・新生作用の可能性とそのメカニズムを明らかにしてその制御を可能とする基盤となるエビデンスを得ることを目指した。本研究では、軽度の脊髄損傷ラットモデルにおける損傷した脊髄神経の再生・機能回復をクエン酸モサプリドがもたらすかどうかを検討した。その結果、脊髄を動脈瘤クリップで短時間圧迫する方法で軽度の脊髄損傷モデルをコンスタントに作るのは困難であるとの判断をした。そこで、新生マウス脊髄後根神経節細胞に対するクエン酸モサプリドの効果の予備的検討を進め、可能性のある結果が得られている。

研究成果の概要(英文)：A small molecule chemical compound, 5-HT4 receptor stimulant, mosapride citrate facilitates regeneration of injured enteric nervous systems. We intend to focus on finding possibilities and their underlying mechanisms for neural regeneration of nerves in multiple fields. In the present study, we investigated whether mosapride citrate can facilitate regeneration and functional recovery of injured spinal cord nerves. We tried many trials to make moderate spinal cord injury model by short-term clipping but failed to make constantly the moderate spinal cord injury model. We judged it is difficult to make this model at present and then we performed preliminary studies to examine the effects of mosapride citrate on the short cultured spinal dorsal root ganglionic neurons isolated from neonatal mice. At present, we found some positive results, although this study should be continued.

研究分野：医学

キーワード：リハビリテーション医学 再生医療 脊髄損傷モデル 薬物治療 5-HT4受容体

1. 研究開始当初の背景

各種大腸肛門疾患、術後障害、先天異常などに加え、近年は加齢やパーキンソン病による排便機能障害者も急増しており、それによる生活の質 (Quality of Life: QOL) の低下や診療需要の増加は計り知れない。排泄行為は、生物学的な行為であると同時に自律性を伴う社会的な行為でもあることから、その障害による身体的、心理的負担は容易に想像できた。申請者は、数年に亘って、直腸切離吻合モデルにおける排便機能障害を 5-HT₄ 受容体刺激薬投与により損傷した腸壁内神経の再生・新生を促進し、排便機能障害を速やかに回復させることを示した (クエン酸モサプリド用途特許 5089556 号; Neurogastroenterol. Motil. 22: 806-814, 2010)。しかし、腸壁内神経以外の神経の損傷に対する効果はこれまで全く検討されていない。重度脊髄損傷マウスが歩行可能になる神経幹細胞と抗てんかん薬を併用した HINT 法が JCI, 2013 に中島らによって報告されているが、臨床的に遭遇する軽度損傷した脊髄神経の再生・機能回復を臨床应用到に有利な薬物治療法だけでできるかどうかの検討はこれまで全くなされていない。

(2) 脊髄損傷は直接の外力によりもたらされる組織の挫滅、出血、軸索の断裂などの一次的障害と、その後起こってくる虚血や炎症を中心とした二次的障害に分けられる。この二次的な障害は受傷から、数日間にかけてゆっくりと進行してくるものであり、通常は、脊髄損傷の薬物療法は、この二次的障害を抑制することが目標になっている (T. Morino et al. Neuroscience Research 46, 309, 2003)。しかし、本研究の 5-HT₄ 受容体刺激薬クエン酸モサプリドによる薬物療法は、神経堤由来の神経幹細胞を、血流を介して受傷部位に動員し、神経細胞へと分化させるというモサプリドの特徴的な作用を活かして、脊髄神経の再生・新生を促進するというこれまでにない特色ある試みである。腸壁内神経に限局せず、広範な領域に大胆に展開する大変有意義な計画である。

(3) 本研究は歩行障害や排尿機能障害に悩む多くの患者の失われた脊髄損傷により喪失した機能の回復を早期に可能にし、患者本人はもちろん介護者の身体的・精神的負担を軽減・消滅させ共に QOL の改善をもたらすことができる非常に意義ある研究である。さらにモサプリドの効果がこれまで腸神経に限られていたため、治験研究の展開に消極的であった製薬企業を動かし「死の谷」克服へ向けた第一歩となりうる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

最近発見した排便反射を促進する作用を有する低分子化合物 5-HT₄ 刺激薬、クエン酸モサプリドが腸壁内神経系再生促進剤として用途特許 (5089556 号) を取得した。そこで、多領域にわたる神経の再生・新生作用の可能性とそのメカニズムを明らかにし、その制御の可能性を可能にするための基盤となるエビデンス

を得る。これまでは、腸壁内神経系再生作用に的を絞っていたが、本研究では軽度の脊髄損傷ラットモデルにおける損傷した脊髄神経の再生・機能回復をクエン酸モサプリドがもたらすかどうかを検討する。この研究が成果をあげれば、脊髄損傷のみならず、神経回路の損傷を伴う脳卒中などの病気に対する再生医療技術が飛躍的に促進することが期待され、「死の谷」と呼ばれる基礎研究と実用化のギャップを埋める画期的成果をあげる第一歩となる。

3. 研究の方法

まず、下肢の運動機能障害を起こすが、排尿機能障害までは起こさない軽度な脊髄損傷モデルラットの作成をする。基本的には Saruhashi ら (Arch Orthop Trauma Surg 129: 1279-1285, 2009) の論文を参考に、吸入麻酔薬イソフルレンによる全身麻酔下に第 12 胸髄 (TH12) を動脈瘤クリップで当初 3 秒、ついで 10 秒間圧迫する。最終的には 7 秒間の圧迫を行った。再現性のよいモデルを完成するためには、かなりの試行錯誤が必要であった。動物行動学的検索と脊髄神経の組織学的検索を行い目的とする軽度の脊髄損傷モデルを開発することとした<非治療例とする>。ついで、このモデルに対するクエン酸モサプリド 100 μM の効果を検討する。脊髄表面の局所投与はジェルスポンジに浸漬させて行なった<治療例とする>。動物行動学的検索と脊髄神経の組織学的検索を行い効果が得られたと判断できれば、選択的 5-HT₄ 受容体遮断薬の効果を検討する。脊髄損傷の治療は、リハビリテーション医学分野ではとりわけ重要である。

4. 研究成果

(1) 軽度脊髄損傷モデルラットの研究成果

当初は動脈クリップで TH12 を 3 秒間圧迫した。術後翌日から、下肢麻痺と自力排尿が観察されたが (図 1)、その後 2 週間経過観察を続けると、下肢麻痺は自然回復をしてしま

2014.9.1 吸入麻酔下脊髄損傷ラット4日目自力排尿下肢麻痺
3秒 深め



図 1

ところが、より長い 10 秒間の TH12 圧迫を行うと下肢麻痺と自力排尿が観察されたが術後 2 週間で死亡してしまった。

そこで、両期間の中間の 7 秒間の TH12 圧迫を行うと両側下肢麻痺と自力排尿、痛覚麻



図 2

痺、左足首の関節拘縮を2週間観察できた(図2)ので、脊髄を取り出し、組織切片を作成しトルイジンブルー染色を行った(図3)。

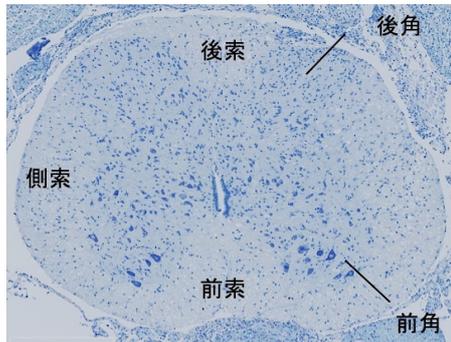


図 3

しかし、組織学的には正常な脊髄と変わらず損傷は認められなかった。

さらに、同じ条件下で実験を重ねたが、痛覚麻痺はコンスタントに生じるが、その他の症状は確実には生じないのでこの方法で軽度の脊髄損傷モデルを作るのは困難であるとの判断をした。

しかし、臨床的応用を考えるならば、クエン酸モサプリド 100 μM の局所投与(LT)の効果は予備的に見ておく必要があると考え、7秒間の圧迫刺激を行い、1週間後に痛覚麻痺が起こっているのを確認してから(図4)、

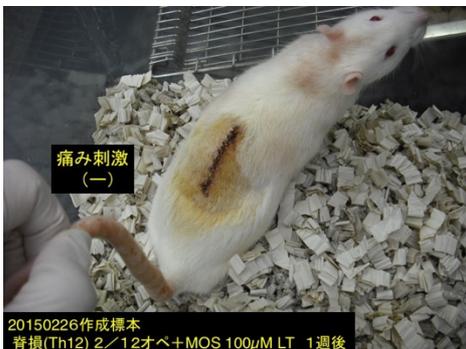


図 4

脊髄(TH 1 2)を摘出し組織切片を作成し同様にトルイジンブルー染色を行った(図5)。

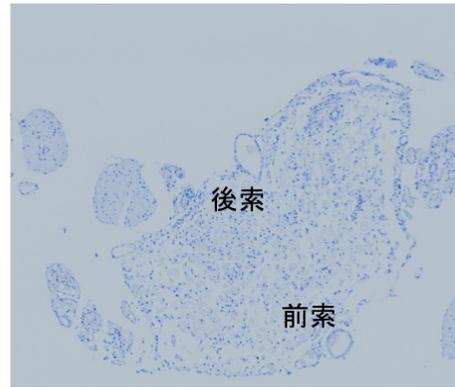


図 5

その結果、脊髄は損傷を受けているが、明らかなクエン酸モサプリド 100 μM のLT効果は観察できなかったが、増悪させるような傾向は見られなかった(図5)。

この結果からもこの軽度の脊髄損傷モデルラットの実験の継続は難しいと考えたが、他のアプローチでクエン酸モサプリドの効果を検出できれば、脊髄損傷患者に対する臨床応用の可能性は十分にあると考えた。

(2) 新生マウス脊髄後根神経節(DRG)細胞に対するクエン酸モサプリドの効果の検討

濃度の異なるクエン酸モサプリドを含む培地にて脊髄後根神経節細胞の培養を4日間行い、樹状突起の成長がみられた細胞数の変化と総樹状突起長の変化について比較検討した。

培地については、クエン酸モサプリドを溶質とし、ジメチルスルホキシド(DMSO 1ml)を溶媒とした「溶液A(クエン酸モサプリド 50mM/L)」を作成し下記4群にて観察を行った。1 μM 濃度の培地、10 μM 濃度の培地を各4 Dish、Control 1、Control 2を各2 Dish 観察している。

- ① 1 μM : F-12 NGF (Nerve Growth Factor)(-)25ml に溶液 A 0.5 μl を加える。(0.002% DMSO)
- ② 10 μM : F-12 NGF (-) 20ml に溶液 A 4 μl を加える。(0.02% DMSO)
- ③ Control 1 : F-12 NGF (-)、実験開始後2日目に0.002% となるよう DMSO を追加。
- ④ Control 2 : F-12 NGF (-)、実験開始後2日目に0.02% となるよう DMSO を追加。

計測部位は Dish 下面に油性マジックで十字にラインを引き、顕微鏡にて中心部周囲の12エリアを各10倍で撮影し、樹状突起の成長がみられる細胞と総細胞数を4日間計測した。

総樹状突起長は、上記で撮影した中心部周囲の4エリアについて計測した。計測には ImageJ ソフトウェアを使用し、ペンタプレットにて各エリア内の樹状突起の長さを計測し、その合計を総樹状突起長とした。樹状突起は3日目以降多数確認され、目視での確認が困難なため実験開始後2日間に

ついて計測した。

その結果、樹状突起伸長細胞数の変化（図6）と変化率（図7）を培養4日目までの期間にわたって経日変化を調べると、クエン酸モサプリドを培地に加えた dish では有意な増加を示した。

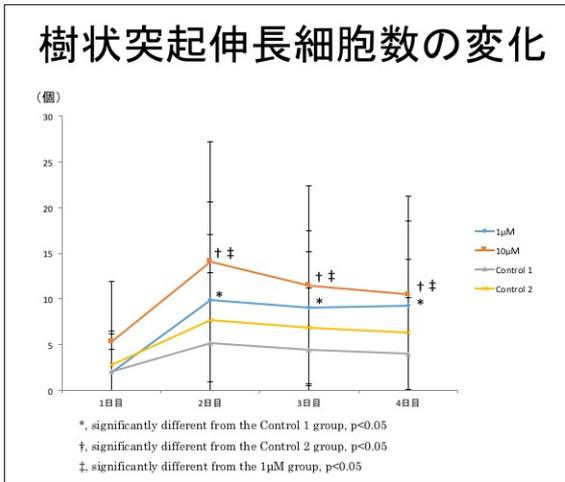


図 6

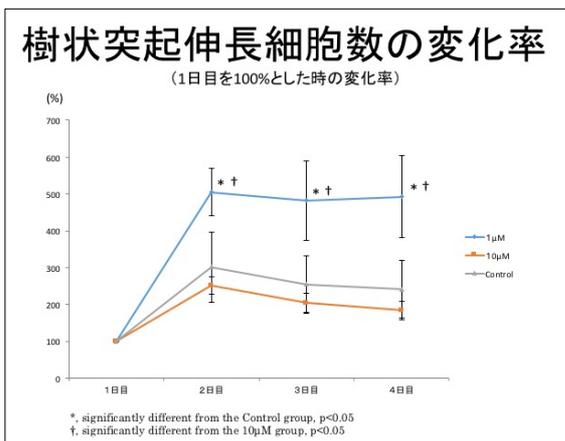


図 7

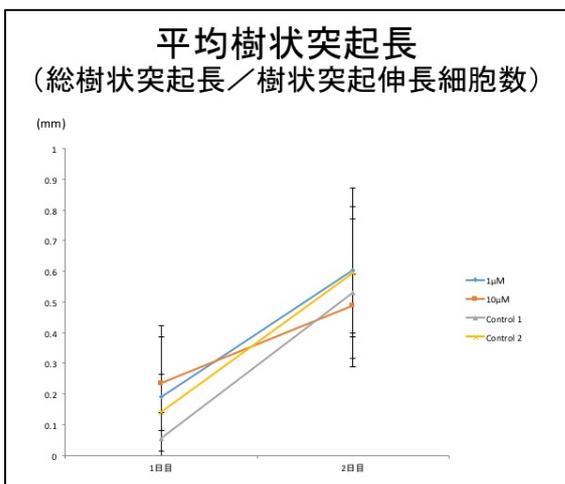


図 8

しかし、総樹状突起長/細胞数 (=平均樹状突起長) では有意な増加は見られなかった(図8)。

この結果は、クエン酸モサプリドが DRG 細胞の樹状突起伸長作用を有する可能性を示していると思われる。

平均樹状突起長について有意差が見られなかったのは、第一に、各処理群の最初の細胞数に有意な違いがあったこと、第二に、細胞数が多すぎて樹状突起の長さ測定に誤差を生じやすい状況があったことなどが考えられる。

従って、今後の方針としては、各群における dish あたりの細胞数を減らして、さらにほぼ同数の細胞数を播種して培養することとする。検討する視野は4視野程度に絞って測定誤差を生じないようにする。

クエン酸モサプリドによる効果が見られたらその 5-HT₄ 受容体遮断薬を同時に加えることによりその効果が拮抗されるかどうかを検討する。

軽度な脊髄損傷モデルは作成するのが非常に困難であることが今回の研究で分かったので、脊髄損傷に対するクエン酸モサプリドの効果は、代わりに脊髄後根神経細胞という知覚神経限定ではあるが、効果が得られれば脊髄損傷を回復させる可能性を示唆するのに十分なエビデンスが得られる研究となると確信している。

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 7 件)

- ①Aoki K, Obata K, Kurihara M, Kuniyasu H, Kirita T, Takaki M: Possible peripheral mechanism for taste disorder in S-1 administered rats. Int J Clin Oncol 査読有 19, 549-556, 2014. DOI: 10.1007/s10147-013-0572-3
- ②Yamada A, Torimoto K, Obata K, Hirayama A, Fujimoto K, Takaki M: Persistent overexpression of SERCA2a affects bladder functions under physiological conditions, but not in bladder outlet obstruction-induced sub-acute pathological conditions. J Physiol Sci 査読有 64 (1), 21-30, 2014.
- ③Takaki M, Goto K, Kawahara I. [Review] 5-HT₄ receptor agonist-induced actions and enteric neurogenesis in the gut. J Neurogastroenterol Motility 査読有 20 (1), 17-30, 2014.
- ④Owaki H, Sadahiro S, Takaki M: Characterizations of the α₁-adrenoceptor subtypes mediating contractions of the human internal anal sphincter. J Pharmacol Sci 査読有 127, 424-429, 2015.
- ⑤Yamashita A, Asahi J, Takaki M, Nakashima T, Kamiwada K, Watanabe S, Murakami D, Hirano T. Effects of ethanol on mouse embryonic stem cell

differentiation. Int J Pharm Pharmaceut Sci 査読有 7 (5), 274-278, 2015.

- ⑥Goto K, Kawahara I, Kuniyasu H, Takaki M: A protein tyrosine kinase receptor, c-RET signaling pathway contributes to the enteric neurogenesis induced by a 5-HT₄ receptor agonist at an anastomosis after transection of the gut in rodents. J Physiol Sci 査読有 65, 377-383, 2015. DOI 10.1007/s12576-015-0377-4
- ⑦Goto K, Kawahara I, Inada H, Misawa H, Kuniyasu H, Nabekura J, Takaki M. Activation of 5-HT₄-receptors facilitates neurogenesis from transplanted neural stem cells in the anastomotic ileum. J Physiol Sci 査読有 66, 67-76, 2016. DOI: 10.1007/s12576-015-0396-1
- [学会発表] (計 17 件)
- ①後藤 桂, 川原 勲, 鍋倉淳一, 國安弘基, 高木 都: マウス回腸切離吻合術後の肉芽組織深部における 5-HT₄ 受容体活性化による移植神経幹細胞からの腸壁内神経系再生・新生促進作用第 56 回日本平滑筋学会総会プログラム・抄録集 48 頁 第 56 回日本平滑筋学会総会, 2014 年 8 月 7 日 新横浜プリンスホテル, 横浜
- ②後藤 桂, 川原 勲, 羅 奕, 國安弘基, 高木 都: 5-HT₄ 受容体活性化による損傷した腸壁内神経細胞の再生・新生作用促進効果の起こるメカニズム 第 24 回日本病態生理学会大会, 2014 年 8 月 9 日北九州国際会議場, 北九州
- ③浅田啓嗣, 北岡ひとみ, 高木 都: 膝関節屈曲角度変化に伴う膝蓋骨挙動の加齢変化第 24 回日本病態生理学会大会, 2014 年 8 月 9 日北九州国際会議場, 北九州
- ④高木 都, 後藤 桂, 川原 勲, 鍋倉淳一, 國安弘基: クエン酸モサプリドによるマウス回腸切離吻合術後の肉芽組織深部における移植した中枢神経由来神経幹細胞からの腸壁内神経系再生・新生促進作用—2 光子励起顕微鏡を用いた in vivo イメージング法による解析 第 7 回 J-FD 研究会 2014 年 11 月 8 日 第一ホテル東京, 東京 第 7 回 J-FD 研究会 最優秀演題賞 (7th Japan-Fanctional Dyspepsia Research Society Best Presentation Award)
- ⑤高木 都, 後藤 桂, 川原 勲, 中井淳一: 「Thy1-G6-2A-mCherry トランスジェニックマウスにおける腸壁内神経細胞の in vivo カルシウムイメージング」-共焦点レーザー顕微鏡下での予備的検討- 第 4 2 回自律神経生理研究会 2014 年 12 月 6 日 日本光電本社研修センター, 東京
- ⑥Koji Obata, Hironobu Morita, Miyako Takaki :Mechanism of negative inotropic effect on rat left ventricular in hyper-thermia: role of TRPV1. J

Physiol Sci 65 (Suppl. 1), S214, 2015 第 92 回日本生理学会大会 2015 年 3 月 22 日 神戸国際会議場 展示場, 神戸ポートアイランド

- ⑦Kei Goto, Isao Kawahara, Hiroki Kuniyasu, Hiroyuki Inada, Junich Nabekura, Miyako Takaki: 5-HT₄ receptor-mediated facilitation of neurogenesis of enteric neurons from transplanted brain-derived neural stem cells in the deep tissue of mouse small intestine underwent transection and anastomosis. J Physiol Sci 65 (Suppl. 1), S176, 2015 第 92 回日本生理学会大会 2015 年 3 月 22 日 神戸国際会議場展示場, 神戸ポートアイランド
- ⑧森本安彦, 浅田啓嗣, 高木 都: 骨芽細胞と神経細胞の共培養実験系における相互作用について日本病態生理学会雑誌 24 巻 2 号 28 頁 2015 年 第 25 回日本病態生理学会大会 2015 年 8 月 1 日 愛媛大学城北キャンパス, 松山【奨励賞受賞】
- ⑨小畑孝二, 森田啓之, 高木 都: 左心室力学的エネルギー学的性質へのミオシンアクチベーターと SERCA アクチベーターの効果日本病態生理学会雑誌 24 巻 2 号 30 頁 2015 年 第 25 回日本病態生理学会大会 2015 年 8 月 1 日 愛媛大学城北キャンパス, 松山
- ⑩高木 都, 後藤 桂, 川原 勲, 國安弘基: 5-HT₄ 受容体活性化による損傷腸壁内神経の新生促進効果における受容体型チロシンキナーゼ c-RET 情報伝達経路の関与日本病態生理学会雑誌 24 巻 2 号 42 頁 2015 年第 25 回日本病態生理学会大会 2015 年 8 月 2 日 愛媛大学城北キャンパス, 松山
- ⑪浅田啓嗣, 森本安彦, 高木 都: 共培養系による滑膜細胞・神経細胞間相互作用の解析日本病態生理学会雑誌 24 巻 2 号 42 頁 2015 年 第 25 回日本病態生理学会大会 2015 年 8 月 2 日 愛媛大学城北キャンパス, 松山
- ⑫Koji Obata, Hironobu Morita, Miyako Takaki :Mechanism of positive inotropic action of a new myosin activator, omecamtiv mecarbil on LV mechanical work and energetics. J Physiol Sci 66 (Suppl. 1), S162, 2016 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 24 日 札幌コンベンションセンター, 札幌
- ⑬Keiji Asada, Yasuhiko Morimoto, Yu Okumura, Miyako Takaki : Calcium imaging of dorsal root ganglionic neurons and fibroblast-like synoviocytes to mechanical stimulation in co-culture system. J Physiol Sci 66 (Suppl. 1), S146, 2016 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 24 日 札幌コンベンションセンター, 札幌
- ⑭高木 都, 後藤 桂, 川原 勲, 鍋倉淳一, 國安弘基: スポンサーシップシムposium 2 「脳・神経-消化管の機能障害の基礎と臨

床」：損傷した消化管壁内神経の再生新生，第 16 回日本神経消化器病学会 J Neuro-gastroenterol Motil 21 (2) (Suppl2.) S64, 2015 2014 年 11 月 7 日 学術総合センター(一橋講堂), 東京

⑮高木 都：「素晴らしい研究生活を振りかえって？」第 8 回愛媛大学先端医学ウインタースクール特別講演 2015 年 2 月 28 日 ホテルアジュール汐の丸, 愛媛県今治市

⑯高木 都 Miyako Takaki：JPS シンポジウム「ペプチド・アミンを介する脳・腸関連 Brain-gut association via peptides and amines」：5-HT₄ 受容体を介する移植した脳由来神経幹細胞からの腸壁内神経分化促進作用 5-HT₄ receptor-mediated facilitation of neurogenesis of enteric neurons from transplanted brain-derived neural stem cells. *Physiol Sci* 65 (Suppl. 1), S32, 2015 第 92 回日本生理学会大会 2015 年 3 月 22 日 神戸国際会議場, 神戸ポートアイランド

⑰高木 都, 後藤 桂, 川原 勲, 鍋倉淳一：5-HT₄ 受容体活性化による損傷した腸壁内神経の再生・新生 第 57 回日本平滑筋学会総会特別講演 第 57 回日本平滑筋学会総会プログラム・抄録集 26p 2015 年 8 月 27 日 山口大学小串キャンパス総合研究棟, 宇部 [図書] (計 1 件)

高木 都：「プログレッシブ生命科学」編集：米田悦啓・岡村康司・金井好克・西田幸二 高木分担執筆 7-3 生体リズム①秒単位のリズム iii) 消化管の蠕動運動 pp. 114-117, A5 判 総頁 312 頁, 2014/9/10 第 1 版第 1 刷 南山堂

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：腸壁内神経系再生促進剤

発明者：高木 都・勝井錬太・國安弘基

権利者：大日本住友製薬株式会社

種類：用途特許

番号：特許第 5089556 号

取得年月日：平成 24 年 9 月 21 日

国内外の別：国内

[その他] 特別講義・セミナー

高木 都 福井大学医学部大学院医科学特論

(人体解剖学・神経科学)「腸壁内神経系の

再生・新生」2015 年 4 月 27 日 18:00-19:

30 in 福井大学医学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 都 (TAKAKI, Miyako)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00033358

(2) 連携研究者

國安弘基 (KUNIYASU, Hiroki)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00253055

(3) 研究協力者

川原 勲 (KAWAHARA, Isao)

奈良県立医科大学大学院医学研究科・社会人

大学院生・理学療法士

後藤 桂 (GOTO, Kei)

奈良県立医科大学大学院医学研究科・社会人

大学院生・理学療法士