

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861157

研究課題名(和文) 脊髄二次性損傷の炎症・免疫制御機構の解明と運動機能再建

研究課題名(英文) To clarify the mechanism of secondary spinal cord injury

研究代表者

内田 晋(Uchida, Susumu)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60648848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 800,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷後の完全対麻痺の改善を目指す事を主眼としてこの実験計画を立案した。脊髄損傷後の機能回復の妨げになる要因として直接的な脊髄損傷に加えてその後引き続き起こる二次的な損傷がそのメカニズムに深く関与する事が以前から知られている。特に過去の先行研究からIL-23やIL-17などの炎症サイトカインが主病態における炎症反応の抑制するとの期待のもとこれらの特異的サイトカイン欠損動物を用いる事でその実験を実験計画に従って遂行していく事とした。実験動物を容易に入手できなくなった問題や実験動物の損傷モデル作成後長期にわたり生存できないなどの要因が妨げとなり本実験の目標達成には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：This experimental design was drafted with the main focus on the improvement of paraplegia after spinal cord damage. Previous reports have suggested the secondary spinal cord damage which happens continuously after a direct cord injury participate in the mechanism deeply as the factor on the prevention of restoration.

We assumed that the experiment is being executed with an experimental design by inflammatory site Cytokines of IL-23 and IL-17 also using these peculiar site Cytokine lost animals with the one of the expectation an inflammatory reaction in the center clinical condition restrains from the preceding study in the past in particular. I extend over a long term after the problem that you couldn't get any more an experimental animal easily and a damage model construction of an experimental animal, you can't live, a factor disturbed and didn't come to target achievement of our experiment.

研究分野：脊髄損傷

キーワード：脊髄損傷 サイトカイン 運動機能障害

## 1 . 研究開始当初の背景

脳神経系が損傷を受けるとその部位に対応した運動・知覚障害などの重篤な神経症状を生じる。「中枢神経系はひとたび損傷を受けると再生することはない」は S. Ramón y Cajal 以来不動のセントラルドクマであった。脊髄損傷では一次損傷に引き続き起こる **進行性の壊死・空洞形成 (progressive necrosis and cavitation) である二次損傷**が惹起するためにその予後さらに悪化させる (Fujiki, J Comp Neurol.1996; Brain Res.2005; Steward, Exp.Neurol. 1999)。予後を決定づけるキーの一つは二次性損傷の阻止である。

一方、損傷の程度によらず中枢神経系の可塑性に基づく神経ネットワークの再構築は機能回復のもう一つのキーである。

脳損傷の一病態である脳梗塞において炎症メカニズムが注目されている。脳梗塞では、血流障害によって脳組織が損傷し、その脳組織が壊死することによって次に大きな炎症が惹起、これが数日間続き、梗塞の拡大と神経症状の悪化に関連している。脳梗塞後における炎症メカニズムには不明な点が多かった。炎症性サイトカイン、インターロイキン (IL) は梗塞領域の拡大に重要な役割を果たしている。梗塞直後は、まずマクロファージが脳内に浸潤し IL-23 を産生、数日以内に  $\gamma\delta$ T 細胞が脳内に浸潤し IL-23 の刺激を受け産生された IL-17 により、さらに炎症を促進し神経細胞死を加速する。この過程は T 細胞の浸潤抑制や  $\gamma\delta$ T 細胞の除去によって梗塞領域の拡大を防止する (Shichida, Nature Medicine.2009)。この背景には脳梗塞後のマウスの組織中に (peroxiredoxin: Prx) が多量に産生され、炎症細胞を活性化し脳梗塞領域の拡大する。

この病態は中和抗体や特異的サイトカイン欠損マウス (IL-23KO マウスや IL-17KO マウス) により、梗塞領域縮小、神経症状が改善する (Shichida, Nature Medicine.2012)。

本研究では特異的サイトカイン欠損マウス (IL-23KO マウスや IL-17KO マウス) を用いて脊髄損傷における **進行性の壊死・空洞形成 (progressive necrosis and cavitation)** である二次損傷形成過程を形態学的、神経生理学的に詳細検討を計画した。

同時に野生型マウスでも他の動物と比較して高いとされる元来有する神経再生機能・可塑性 (Fujiki, J Comp Neurol.1996; Steward, Exp.Neurol. 1999) の優劣を IL-23KO, IL-17KO マウスにおいて検討する。

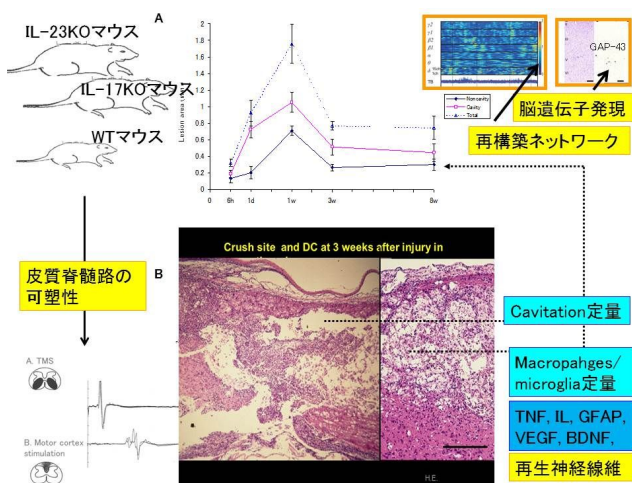
これらを通じて脊髄損傷後の進行性壊死・空洞形成を回避する分子生物学的なキーを明確にすると同時に、その後に必須である神経ネットワーク再建に向けた系統的戦略を構築する。

## 2 . 研究の目的

脊髄損傷後の「二次性損傷形成」「運動制御機構」を解明し失われた機能回復を目指す。二次性神経損傷のキー・ノックアウトマウスを用い、神経回路損傷後の機能代償機構を研究することで、運動機能の再建、脳の学習・可塑性をどのようにして促進可能かを明らかにする。以下の三項目を検証する：(1) ノックアウトマウスは **進行性の壊死・空洞形成 (progressive necrosis and cavitation)** である二次損傷形成過程が縮小する仮説を炎症メカニズムの観点から形態学的、神経生理学的に検証する。(2) 損傷領

域および再生神経線維の脊髄損傷固有のパラメータを抽出する。(3) 機能回復した一次運動野遺伝子発現の変化・シグナル伝達阻害剤の影響を検証する。

### 3. 研究の方法



#### 研究方法概要：

特異的サイトカイン欠損マウス (IL-23KO マウスや IL-17KO マウス) では 進行性の壊死・空洞形成 (progressive necrosis and cavitation) である 二次損傷形成過程縮小する仮説 を形態学的、神経生理学的に検証し、炎症メカニズムのプレーヤー macrophages/ microglia 活性化および再生神経線維の形成様式を WT コントロールと定性的・定量的に比較する。各群の脳内ネットワークの再構築を形態学的・電気生理学的な裏付けと可逆的・非可逆的ブロック法で検証。

IL-23KO, IL-17KO および WT として

C57Bl/6J マウスを用いる。3グループとも各 time point(n=5)ごとに上記パラメータ検索を行う。損傷部位近傍の組織学的検索 (B) が主眼であるが、灌流固定直前まで非侵襲的・一次運動野刺激による運動誘発電位 (MEP) 記録を行い組織所見との相関の有無を検討する。損傷部位は 一次性損傷と、その後経時的に増大する二次性損傷とも に 進行性壊死・空洞形成領域 (macrophages など浸潤してきた炎症細胞 (黒線) とさらなる神経障害・炎症の進行による空洞 (紫線) とその総和 (点線)) を上図のごとく定量評価 (A)。損傷側近傍では再生神経線維が損傷部位を超えて末梢に向け再生するが glial scar がその伸長を阻止する。IL-23KO, IL-17KO および WT とも全ての time course で定性的・定量的評価。

動物は脊髄損傷後 1,2,4,7,14,21,28,56,84 日後にそれぞれのグループごとに 4% パラフォルムアルデヒドで経時的に灌流固定し、組織学的評価 (GFAP 染色 (reactive astrocyte), Mac-1 染色 (macrophages/microglia) 及び Laminin, TGF- $\beta$ 1, NGF, BDNF, NT-3 他の神経栄養因子の遺伝子 mRNA 発現) および行動学的・電気生理学的評価 (Tarlov score + motor evoked potentials; MEPs) で評価。損傷側近傍の再生神経線維の評価に neurofilament 染色, rtPCR および、一次運動野の BDA トレーサーにより皮質脊髄路の可塑性評価を同時に行う。行動学的・形態学的・電気生理学的評価のすべての項目は、これまでの業績に則り客観的指標として定量評価する予定であった。

## 4 . 研究成果

先行研究から IL-23 や IL-17 などの炎症サイトカインが主病態における炎症反応の抑制するとの期待のもとこれらの特異的サイトカイン欠損動物を用いる事でその実験を実験計画に従って遂行していく事とした。実験動物を容易に入手できなくなった問題や実験動物の損傷モデル作成後長期にわたり生存できないなどの要因が妨げとなり本実験の目標達成には至らなかった。

脊髄損傷に対する抗炎症効果を有する既存薬剤の効果を検証した既報(Fujiki M, Uchida S et. Al., Geranylgeranylacetone limits secondary injury, neuronal death, and progressive necrosis and cavitation after spinal cord injury. Brain Res. 2005 Aug 16;1053(1-2):175-84.)に準じ、新規病態系における相同薬剤効果を検証・実証した(Kawasaki Y, Fujiki M, Uchida S, Morishige M, Momii Y, Ishii K.A Single Oral Dose of Geranylgeranylacetone Upregulates Vascular Endothelial Growth Factor and Protects against Kainic Acid-Induced Neuronal Cell Death: Involvement of the Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Pathway. Pathobiology. 2017.)。

## 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)

1. Kawasaki Y, Fujiki M, Uchida S, Morishige M, Momii Y, Ishii K.

A Single Oral Dose of Geranylgeranylacetone Upregulates Vascular Endothelial Growth Factor and Protects against Kainic Acid-Induced Neuronal Cell Death: Involvement of the Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Pathway. Pathobiology. 2017. 10:101-108, Jan 18. doi: 10.1159/000452862.(査読あり)

[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:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/neurosurgery/index.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

内田 晋 (UCHIDA SUSUMU)

大分大学・医学部・助教・脳神経外科学

研究者番号 60648848

研究者番号：

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

藤木 稔 (FUJIKI MINORU)

大分大学・医学部・教授・脳神経外科学

研究者番号 90231563