

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861215

研究課題名(和文) 損傷脊髄の再髄鞘形成に対するアミロライドの効果

研究課題名(英文) Amiloride promotes oligodendrocyte survival and remyelination after spinal cord injury in rats

研究代表者

今井 洸 (IMAI, Takeshi)

東海大学・医学部附属病院・臨床助手

研究者番号：60724672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷後に増殖したオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)は多くが細胞死へ至る。小胞体ストレスは細胞死の一要因であり、利尿剤であるアミロライドは抑制効果がある。本研究では生存したOPCの髄鞘形成を介した脊髄再生に対する影響を検討した。ラット胸髄圧挫損傷モデルを作成し、後肢運動・感覚機能、損傷後増殖したOPCの生存・分化、髄鞘形成を評価した。アミロライドにより、後肢運動・感覚機能は改善した。また、標識OPC数、標識オリゴデンドロサイト数、髄鞘マーカー、髄鞘/軸索直径比は有意に高値であり、生存したOPCは、成熟オリゴデンドロサイトへ分化し、再髄鞘形成さらに後肢機能改善へ寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：After spinal cord injury (SCI), secondary injury results in an expanding area of glial cell apoptosis. Oligodendrocyte precursor cells (OPCs) have been shown to actively proliferate within this expanding lesion, but a majority of these cells succumb to apoptosis instead of differentiating into functional oligodendrocytes. One of the factors that exacerbates secondary injury is endoplasmic reticulum (ER) stress. We previously reported that amiloride, an FDA-approved diuretic used to treat hypertension, enhances the ER stress response and suppresses apoptosis of glial cells in SCI rats. In this study, we labeled proliferating OPCs and demonstrated that amiloride treatment led to greater numbers of OPCs and also oligodendrocytes in the injured spinal cord. The increased MBP expression suggests that the increased numbers of mature oligodendrocytes led to improved remyelination, which significantly improved motor function recovery.

研究分野：整形外科

キーワード：脊髄損傷 再髄鞘形成 オリゴデンドロサイト前駆細胞 アミロライド

1. 研究開始当初の背景

脊髄は脳と四肢・体幹を結ぶ唯一の神経伝導路であり、外傷により障害を受けると四肢・体幹に麻痺や感覚異常を生じ、日常生活に重篤な障害をもたらす。外傷による脊髄損傷患者数は、全世界で250万人とされ、本邦においても年間5000人の脊髄損傷患者が発生している。多くの患者が障害を抱え、不自由な生活と苦難を強いられており、現在障害軽減に向けての様々な研究がなされている。以前は「成体哺乳類において、脊髄を含めた中枢神経系の神経軸索は、一度損傷を受けると再生しない」と考えられてきた。しかし1980年代以降細胞移植法や神経栄養因子投与・軸索伸展阻害因子の抑制等、内在性神経前駆細胞を用いた再生誘導法が基礎的研究として行われており、脊髄再生への期待が高まっている。現在、これらの基礎的研究の進歩は目覚ましいが、損傷時の脊髄細胞障害と再生阻害の詳細なメカニズムについてはいまだ不明とされている点が多く、臨床応用の段階となる治療法は確立されていない。

外傷により生じた脊髄組織の障害は、経時的にその範囲を拡大し、その程度を増強する。これは、直接的な外力(一次傷害)によって生じる脊髄組織の挫傷による出血性壊死とそれに引き続いて生じる生化学的、病理学的変化(二次傷害)により病変は拡大する現象が認められている。二次傷害因子として脊髄浮腫、脊髄血流量の変化、神経伝導物質の細胞外漏出、活性酸素、NO、サイトカイン、Caイオン、マイクログリア等が報告されている。またこれらの傷害による遅発性細胞死にアポトーシスが関与することが明らかにされている。アポトーシスは損傷周囲の生存細胞だけでなく、再生のために誘導・増殖された細胞も傷害する。神経伝達で重要な髄鞘形成に重要なオリゴデンドロサイトは二次傷害の影響を受けやすく、オリゴデンドロサイトの減少が神経線維の変性をもたらすことが知られている。外傷性脊髄損傷モデルにおいて、脱髄とオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化・誘導の検討では、脱髄部周囲でオリゴデンドロサイト前駆細胞は一時的に増殖するが、その後の再髄鞘形成が得られないことがわかっている。この要因の一つとして、増殖したオリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスが考えられる。これらのアポトーシスを抑制することは、二次傷害による損傷の拡大を軽減するだけでなく、再生(再髄鞘形成)の意味において大変重要となる。アポトーシスの経路として、小胞体ストレス応答の破綻がある。小胞体では遺伝情報に従って合成されたタンパク質の高次構造を保持している。様々な科学的、物理的、遺伝的ストレスを受けることにより異常タンパク質(unfolded protein)が生じるが、一定のストレス下では小胞体ストレス応答によってunfolded proteinを処理している(恒常性維持)。しかし、過剰なストレスや長時間のスト

レスにより小胞体ストレス応答の破綻をきたすとunfolded proteinが蓄積されアポトーシスが誘導されると報告されている。小胞体ストレスの情報伝達には3つの主調節器があることが知られている: IRE1(inositol requiring 1)、PERK(PKR-like kinase)、ATF6(activating transcription factor 6)。これらの調節器は相互に作用しながら恒常性維持とアポトーシス誘導の役割を担っている。われわれは、この経路の下流に存在する小胞体シャペロン GRP78に着目し研究を行っている。小胞体シャペロンは合成タンパクの折り畳み機能向上とタンパク凝集阻害の機能を担っている。われわれは、グルタミン酸やツニカマイシンによるストレス下にグリア細胞の培養を行いGRP78の発現増強を確認した。ストレスが軽度の内はGRP78によってunfolded proteinが修復されるがストレスが過度になるとその処理能力を超えアポトーシスへ至る。また、遺伝子導入によりGRP78を強発現することによりアポトーシスを抑制することを報告した。In vivoでも損傷により脊髄細胞内にGRP78が強発現し、その発現程度は細胞種により異なり、オリゴデンドロサイト前駆細胞では他の細胞種に比して有意に発現が低いことを証明した。この結果から、オリゴデンドロサイト前駆細胞の小胞体ストレスに対する脆弱性が再髄鞘形成阻害に関与していると考えている。すなわち、損傷脊髄内でGRP78の発現を高めアポトーシスを軽減することにより、損傷拡大の軽減とオリゴデンドロサイト前駆細胞による再髄鞘形成の促進が期待できる。直接的処置として先述の遺伝子導入は有意義と考えられるが、臨床応用することは困難である。そこでカリウム保持性利尿薬として欧米で用いられているアミロライドに着目しその効果につき検討している。アミロライドはacid-sensing ion channel 1をブロックすることにより、神経保護作用を有している。さらに、培養グリア細胞においてGRP78の発現を誘導し小胞体ストレス応答能を高めたとする報告がある。ラット脊髄損傷モデルに対し損傷後14日までアミロライドの投与を行った。その結果アミロライド投与群ではWestern Blotで有意にGRP78の発現が高く、またアポトーシスの促進に重要な働きを担っているCHOPの発現は有意に低い結果であった。Tunnel染色によるアポトーシスの脊髄内の拡大は有意に抑制され、運動機能においても有意な改善が見られた。Tunnel染色の結果からアミロライド投与によって小胞体ストレス誘導性アポトーシスが抑制され、二次傷害の拡大を抑制することを証明した。さらに、運動機能の改善にはオリゴデンドロサイト前駆細胞による再髄鞘形成も関わっていることが推測され、アミロライド投与によるオリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスの軽減と生存したオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化と再髄鞘形成に

焦点をあて検討する。アミロライドによるオリゴデンドロサイトの再髄鞘形成の促進を証明することは、臨床応用への大きな布石となる。

2. 研究の目的

アミロライドの機能障害軽減効果が、単に二次傷害の軽減のみではなく、増殖した内在性細胞(オリゴデンドロサイト前駆細胞)のアポトーシスを軽減することによる再生の賦活化によるものであることを確認する。

(1)アミロライドの投与により増殖したオリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスを軽減できるか否かを検証する。

(2)アミロライド投与により生存した同細胞が分化し成熟オリゴデンドロサイトとなり再髄鞘形成に寄与し、後肢機能改善に関与していることを検証する。

3. 研究の方法

(1)アミロライド投与の OPC の生存と分化に与える影響の検討。

BrdU を用いて、アミロライドのオリゴデンドロサイト前駆細胞の生存と分化への影響を検討する。BrdU 投与により OPC の生存、分化を trace する手法は我々の以前の報告にあるようにすでに確立された実験方法であり、また組織学的評価であることから本課題の実験方法として適している。評価は 56 日目まで行い、アミロライド投与による OPC への長期的影響を組織学的に検討する。また平行して、機能評価として BBBscore、Von Frey 式痛覚刺激検査を行った。

動物モデルの作成：10 週齢雌 SD ラットを用いた。Infinite Horizon spinal cord injury device(IH impactor, Lexington, KY)を用いて 200Kdyne の損傷強度で第 10 胸椎硬膜上に脊髄圧挫損傷を作成した。損傷ラットをアミロライド群、control 群に分け、損傷 24 時間後より損傷後 14 日までそれぞれ 10mg/kg のアミロライド、溶媒(PBS)を 24 時間毎腹腔内投与した。また、増殖した OPC を標識するために 50mg/kg の BrdU を、損傷後 24 時間より 3 日目まで 12 時間毎に腹腔内投与した。標識された OPC は、BrdU に標識されたオリゴデンドロサイトに分化成熟し髄鞘形成を行う。この変化を経時的に観察した。

後肢機能評価：損傷前及び損傷翌日より連日 the Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale(BBBscale)による後肢運動機能を評価した。また、Von Frey 式痛覚刺激装置(UGO VAGIRE 社製)を用いて足底痛覚を刺激し、その反応速度および反応圧力を測定し後肢感覚機能を評価した。

オリゴデンドロサイト前駆細胞の生存・分化：損傷 7 日、14 日、28 日、56 日に脊髄横断凍結切片を作成し、抗 BrdU 抗体と抗 NG2 抗体(OPC)、抗 APC 抗体(オリゴデンドロサイト)との二重免疫染色を行い白質における陽性細胞数をカウントした。標識されたオリゴデンドロサイト前駆細胞と、それが分化したオリゴデンドロサイトの経時的な変化を両

群で比較検討した。

我々のこれまでの研究において、アミロライドは脊髄損傷急性期における損傷部周囲でのアポトーシスを抑制しており、また in vitro の実験ではグリア細胞に対するアポトーシス抑制効果も確認されている。この効果が in vivo において OPC にも有効であれば、アミロライド投与群での OPC 生存率は上昇し、成熟オリゴデンドロサイトへの分化が得られる可能性がある。上記実験系により、アミロライド投与による OPC の生存率、成熟オリゴデンドロサイトへの分化の影響を検討した。

(2) アミロライド投与の再髄鞘形成への効果の検討。

髄鞘形成の指標として myelin basic protein(MBP)を用いて評価した。

動物モデル作成：動物モデルは(1)と同様に 10 週齢雌 SD ラットを使用し脊髄圧挫損傷モデルを作成した。アミロライド、対照群の PBS も(1)と同様のプロトコールにて投与を行った。

Western Blot：損傷後 7 日、14 日、28 日、56 日に検討を行った。麻酔下に損傷脊髄を摘出し、MBP、internal control として β -actin の抗体を用いて Western Blot を行い、蛋白レベルでの myelin protein の合成を評価した。

電子顕微鏡：透過型電子顕微鏡(JEM-1400, JEOL, Japan)にて損傷後 28 日の損傷脊髄をグリア瘢痕周囲の 10 ポイントを観察し、軸索およびその周囲の髄鞘の直径を計測した。髄鞘/軸索直径比の平均値で比較した。

4. 研究成果

BBBscore では損傷後 17 日目以降において有意に A 群で高く(損傷後 17 日, $p < 0.05$)、それは観察期間中継続して認められた(損傷後 56 日, $p < 0.01$, 図 1)。von Frey test では、損傷後 14 日において、A 群で有意に刺激反応加圧力の増加を認め、痛覚過敏の改善を認めた($p < 0.05$, 図 2)。免疫染色では A 群において、損傷 14 日で NG2 陽性細胞数、損傷後 56 日で APC 陽性細胞数が有意に高値であった($p < 0.05$, 図 3)。Western blotting にて MBP は、損傷後 28 日、56 日において A 群で有意に高かった($p < 0.05$, 図 4)。電子顕微鏡では A 群において髄鞘/軸索直径比が有意に高値であった($p < 0.05$, 図 5)。

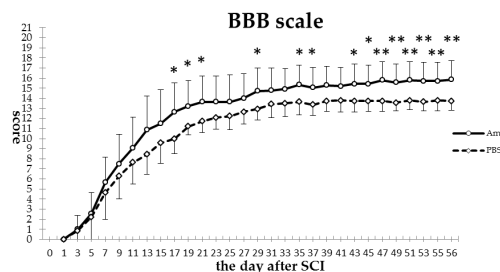


図 1

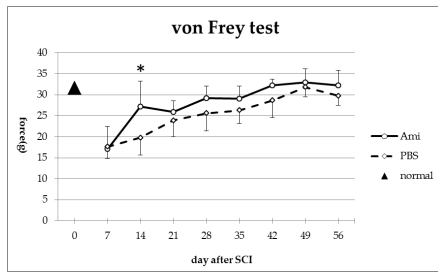


図 2

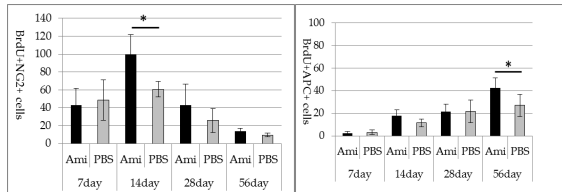


図 3

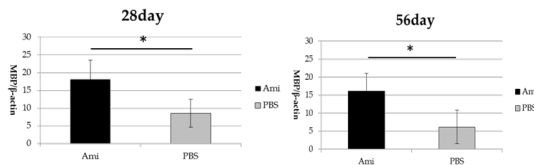


図 4

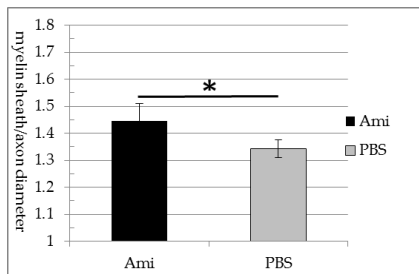


図 5

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)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) Imai Takeshi.

Amiloride promotes oligodendrocyte survival and remyelination after spinal cord injury in rats.

Orthopaedic Research Society 2016 .

2016年3月5 - 8日 . Florida USA

(2) 今井 洸 .

脊髄損傷ラットにおけるアミロライド投与によるオリゴデンドロサイトの生存および髄鞘形成への影響 .

第30回日本整形外科学会基礎学術集会 .

2015年10月22 - 23日 . 富山国際会議場(富山県富山市)

(3) 今井 洸 .

脊髄損傷ラットにおけるアミロライド投与の小胞体ストレス応答能を介したオリゴデンドロサイト前駆細胞の生存および再髄鞘形成への影響 .

第44回日本脊椎脊髄病学会学術集会 .

2015年4月16 - 18日 . 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

(4) Imai Takeshi .

Amiloride promotes oligodendrocyte survival and remyelination after spinal cord injury in rats.

Neuroscience 2014 .

2014年11月15 - 19日 . Washington, DC USA

(5) 今井 洸 .

脊髄損傷ラットにおけるアミロライド投与によるオリゴデンドロサイトの生存および髄鞘形成への影響 .

第29回日本整形外科学会基礎学術集会 .

2014年10月9, 10日 . 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 洸 (IMAI Takeshi)

東海大学・医学部付属病院・臨床助手

研究者番号 : 60724672