

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791029

研究課題名(和文)

脊髄損傷に対するコンドロイチナーゼABC、ケラタナーゼの治療効果

研究課題名(英文)

Therapeutic effect of Chondroitinase ABC and Keratanase for spinal cord injury

研究代表者

今釜 史郎 (IMAGAMA SHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40467288

研究成果の概要(和文)：

ラット脊髄損傷急性期にコンドロイチナーゼABC、ケラタナーゼを投与し、脊髄損傷後の運動機能回復効果を検討した。運動機能評価、電気生理検査、組織学的検査などを行い、いずれもコンドロイチナーゼABC、ケラタナーゼ投与群ではコントロール群に対し著大な回復効果を示した。

これまで注目されてきたコンドロイチン硫酸同様、ケラタン硫酸も脊髄損傷後に重要な役割を果たしていることが判明した。そして驚くべきことに、これらの効果は臨床応用が検討されているコンドロイチナーゼABCの効果を上回っていた。今後、臨床応用を見据え、さらなる研究をすすめる必要がある。

研究成果の概要(英文)：

Failure of axonal regrowth is a major obstacle to the treatment of injuries of the adult central nervous system, and proteoglycans are strong inhibitory cues. Chondroitin sulfate chains of the proteoglycan moiety have been thought to be principal in this inhibition, as the chondroitin sulfate-degrading enzyme chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. Here we show that the keratan sulfate-degrading enzyme keratanase II promoted the recovery of both motor and sensory function after spinal cord injury in rats. Consistent with this, keratanase II promoted axonal regrowth *in vivo* and *in vitro*. Unexpectedly, keratanase II and chondroitinase ABC exerted comparable effects *in vivo* and *in vitro*, but these two enzymes worked neither additively nor synergistically. Neurite outgrowth was inhibited by the keratan sulfate/chondroitin-proteoglycan aggrecan but not by an artificial proteoglycan, keratan sulfate/chondroitin-albumin, or by heat-denatured proteoglycans. Our data indicate that keratan sulfate is required for the inhibitory property of proteoglycans and is a candidate target for therapy of neuronal injuries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：脊髄損傷、プロテオグリカン、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、プロテ

オグリカン分解酵素、ケラターゼ、運動機能回復、齧歯類

1. 研究開始当初の背景

現在、日本だけでも約10万人以上の脊髄損傷患者が麻痺を抱えているにも関わらず、現在有効な治療法が存在しない。脊髄損傷による悲惨な患者を減らし、重度の障害者への莫大な医療費、介護費を節減するためにも、一刻も早い有効な治療法の開発が望まれる。これまで神経栄養因子の存在やコンドロイチン硫酸（CS）などの神経再生抑制因子による病態解明が進んできており、臨床応用への展開が期待されるがいずれも小動物を利用した実験段階である。そこで我々は新しい神経軸索再生抑制因子と予測されるプロテオグリカンの1種であるケラタン硫酸（KS）に着目した。

本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけとして、同系統のCSに関しては英国のJ.W.Fawcettらがラット脊髄損傷に対しコンドロイチナーゼABCを損傷部位に投薬し下肢機能の回復を報告している(Bradbury et al. Nature. 416. 636-640, 2002)。またKSに関しては米国のM.H.Tuszynskiらが、KSによる軸索伸長阻害作用を示した(Jones et al. Journal of Neurosci. 22. 4611-4624, 2002)。J.W.FawcettらはさらにKS分解酵素であるケラターゼによって末梢神経のdorsal root ganglionの軸索伸長効果を報告している(Linda et al. Journal of cell Science. 107. 1687-1695, 1994)。その他脊髄損傷後にKSが損傷領域に発現する報告はあるが、実際に脊髄損傷で軸索伸長阻害を証明した報告は過去にない。

2. 研究の目的

コンドロイチン硫酸と同系統のケラタン硫酸に注目し、ケラタン硫酸分解酵素であるケラターゼをラット脊髄損傷モデルに投与して、その神経回復効果を確認する。

3. 研究の方法

S.Dラット（雌、9週齢）を用い、エーテルとケタミン麻酔下に、一定した脊髄損傷モデル作成が可能なIH-0400 impactor (Neuroscience

idea,Co.,Ltd)を用い圧挫損傷を作製した。損傷後、酵素を充填した浸透圧ポンプ付きマイクロチューブをクモ膜下に挿入し、薬剤投与モデルとした

運動機能評価として、BBB (open fieldにて観察) (Basso et al. Journal of Neurotrauma. 12. 1-21, 1995)、Grid test (%Grip)(20mm格子状の金網を下肢を落とさず把持できた割合を観察する)、Foot print analysis (ラットの歩容をstride width、stride lengthで評価する)を行い、定時刻、double blindにて複数人の検者にて10週間観察し下位運動機能の回復程度を評価した。

電気生理学的検査ではMEPのLatency, Duration, Amplitudeの差を測定し解析を行った。(Iuliano et al. Journal of Neurological Sci. 123. 186-94, 1994) このように電気生理学的にも運動機能回復を確認可能とした。

組織学的検査は、還流固定後凍結切片を作成し「KS, CS, GFAP(reactive astrocyte), 2B6, Gap43, CGRP, Collagen4(fibrous tissue), 5HT, neurofilament」などの免疫染色を行った。

その後蛍光画像解析システム MetaMorph Imaging System (Molecular Devices

Corporation) にて新生軸索数や scar 面積などを解析した。治療群での軸索伸長促進の有無など、組織学的にも評価をした。軸索伸長の確認としてトレーサー実験を行った。脊髄損傷後 8 週間で、麻酔下に脳へ 10%BDA (Invitrogen 社) を左右 3.5 μ l ずつ注入した。その 2 週間後 sacrifice し、前述の蛍光画像解析システムにて新生軸索の Fiber count や軸索再生、sprouting の形態などを解析した。

4. 研究成果

C-ABC を positive control におき、ケラタン硫酸 (KS) 分解酵素であるケラタナーゼ (K-II) をラット脊髄損傷直後にくも膜下に 2 週間持続投与した。BBB スコアを用いた下肢運動機能評価では、control 群では回復が乏しかったのに対し、C-ABC、K-II とともに良好な下肢運動機能回復を得た。さらに Grid test や foot print テストも行い運動機能を評価したが、同様の結果であった。客観的指標として、電気刺激を用いた検討でも、C-ABC、K-II 投与群ではその振幅、Latency、Duration とともに、良好に回復していた。臨床応用を考えた場合、疼痛の有無も重要となるが、下肢痛覚、温痛覚試験では、いずれの投与群も allodynia を生じなかった。さらに組織学的検討として、脊髄損傷周囲の癒痕を定量したところ、治療群では有意に癒痕形成が少なかった。術後の脊髄炎症反応 (CD-11b 染色) も有意に治療群で少ない結果であった。軸索伸長の程度を定量するため損傷後 8 週間で BDA 色素を用いトレーサー実験を行った。損傷後 10

週間の定量では、対照群に対し有意に多い軸索が確認できた。Gap43 染色、5HT 染色、NF 染色も行ったが、いずれも治療群で良好な下肢運動機能を支持する結果を得た。さらに GlcNAc6ST-1 欠損マウス (KS のノックアウトマウス) の脊髄損傷圧挫モデルでも神経軸索再生が有意に促進し、下肢運動機能回復も良好であった。以上の検討により、これまで注目されてきた CS 同様、KS も脊髄損傷後に重要な役割を果たしていることが判明した。そして驚くべきことに、これらの効果は臨床応用が検討されている C-ABC の効果を上回っていた。今後、臨床応用を見据え、さらなる研究をすすめる必要がある。

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 1 件)

Shiro Imagama, Zenya Ito, Kazuma Sakamoto, Yukihiro Matsuyama, Haoqian Zhang, Kenichi Hirano, Kei Ando, Toshihide Yamashita, Naoki Ishiguro, Kenji Kadomatsu. N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1-deficient Mice Show Better Functional Recovery after Spinal Cord Injury. J Neurosci. 28 : 5937-47, 2010.

[学会発表] (計 1 件)

今釜史郎

「脊髄損傷におけるプロテオグリカンの役割」

浜松基礎医学セミナー（浜松医科大学）

2010.3.4

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今釜 史郎（IMAGAMA SHIRO）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40467288

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし