

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791389

研究課題名（和文）神経栄養因子遺伝子導入による損傷後脊髄神経グリア系細胞の
微小環境制御研究課題名（英文）The control of neural-glial spinal cells microenvironment after
traumatic injury through transfection of neurotrophic factor

研究代表者

中嶋 秀明（NAKAJIMA HIDEAKI）

福井大学・医学部・助教

研究者番号：10397276

研究成果の概要（和文）：脊髄内への筋肉からの逆行性導入は、軸索流を介したアプローチであり、直接導入は前角細胞のみと理論上は考えられるが、興味深いことに脊髄損傷の環境下ではグリア系細胞への直接的導入もみられた。逆行性導入では、neuron から autocrine、paracrine 機構を介した trophic effects に加え、グリア系細胞による trophic effects の助長の可能性も示唆され、neuron や oligodendrocyte の apoptosis 抑制をひとつの機序として、神経保護効果、再生能力賦活化効果をもたらすと考えられた。

研究成果の概要（英文）：It is very important to deliver the neurotrophins with safety and effectively. Our results suggest that targeted retrograde AdV-BDNF-gene *in vivo* delivery may enhance neuronal and oligodendroglial survival sustained mechanical compression spinal cord injury. The suppression of apoptosis may one of the mechanism of these positive results. The method is a potentially suitable approach for the delivery of therapeutic genes important to promote the survival of neurons and oligodendroglia after traumatic spinal cord injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊髄損傷、神経栄養因子、逆行性導入、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷の本邦における患者数は約 10 人で、さらに毎年 5000 人のペースで増加しており、さらにその多くは若年者が占めている。脊髄損傷によりいったん出現した重篤な四肢神経麻痺症状を回復させる医療は極めて重要性が高く、近年急速に基礎的研究が進められているが、未だ臨床応用には高い壁が存在する。脊髄損傷では、内因性神経栄養因

子の欠乏による微小環境の変化が、ニューロンの細胞死、軸索変性、大部分の内因性神経幹細胞のアストロサイトへの分化誘導（脊髄再生には不利なグリア瘢痕組織を形成）など、損傷を助長させ再生を困難にしている大きな要因の背景となっている。近年、幹細胞移植療法を中心に基礎的研究が急速に進められているが、この微小環境改善の問題解決がなされなければ、臨床応用には結びつき難い。

このことから、神経栄養因子を外因性に投与することは合理的と考えられる。投与方法としては、髄内直接投与、クモ膜下腔投与、経静脈的投与などが報告されているが、それぞれ侵襲性や効率、他臓器への影響などの問題点を抱えている。我々はこれまで、脊髄に①非侵襲的②目的部位に効率的に導入③他臓器に影響を与えない、などの点で有利と考えられる筋 (target organ) からの逆行性導入を用い、その神経保護効果、内因性神経幹細胞に対する分化制御効果を、急性脊髄損傷および慢性脊髄圧迫モデルを用いて実験的に明らかにしてきた。

逆行性に導入された神経栄養因子は理論的には軸索流を介し前角ニューロンに導入され、autocrine, paracrine 機構を介し、周囲の神経グリア系細胞にも賦活化効果をもたらすものと考えられる。しかしながら興味深いことに、脊髄損傷の環境下では一部のグリア系細胞への直接的な導入も preliminary な実験にて確認されたため、逆行性導入では、ニューロンから autocrine, paracrine 機構を介した神経保護効果に加え、グリア系細胞による保護効果の助長、軸索再生効果の可能性が考えられた。

2. 研究の目的

脊髄損傷後の機能回復には、損傷後の内因子神経栄養因子発現欠乏という微小環境を改善することが必要不可欠である。本研究では、脊髄に①非侵襲的、②目的部位に効率的に導入、③他臓器に影響を与えない、などの点で有利と考えられる筋 (target organ) からの逆行性導入という新たなアプローチを用い、脊髄損傷を蒙った脊髄神経グリア系細胞の生存維持、軸索再生、再生能力の賦活化効果について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

SD ラット (8-10 週齢, 250-300 gm) を用い、第 3-4 頸椎椎弓切除を行い、硬膜上に 50 g, 5 分間の圧迫を加えて頸髄圧挫損傷モデルを作成した。損傷後胸骨乳突筋より、 β -galactosidase を組み込んだ非増殖型 adenovirus vector (AdV-LacZ) 100 μ l を注入した。注入後経時的 (3 時間~2 週) に免疫組織学的評価を行った。一次抗体として抗 β -galactosidase 抗体および NeuN, RIP, GFAP, OX-42 を用い、蛍光 2 重染色を行い、各種神経グリア系細胞に対する直接導入の効率を検討した。control として椎弓切除のみを行った後に AdV-LacZ を注入した rat を用いた。次に、同頸髄圧挫損傷モデルを用いて、BDNF (brain-derived neurotrophic factor) 遺伝子を組み込んだ非増殖型 adenovirus vector (AdV-BDNF) 100 μ l を胸骨乳突筋に注入し、特に neuron および

oligodendrocyte の apoptosis 抑制効果、再生誘導効果について検討した。apoptosis の評価としては、TUNEL 染色、activate-caspase-3 を用いた蛍光 2 重免疫染色、immunoblot による activate-caspase-3 の半定量を行った。また oligodendrocyte の progenitor cell の指標とされる NG2 の免疫染色を行った。損傷後、AdV-LacZ を注入した rat を control とし、AdV-BDNF 注入群と比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) 胸骨乳突筋から逆行性に導入された β -galactosidase は、control では灰白質を中心として β -galactosidase 陽性細胞が分布していたが、損傷脊髄では灰白質のみならず、白質にも陽性細胞の分布がみられた。

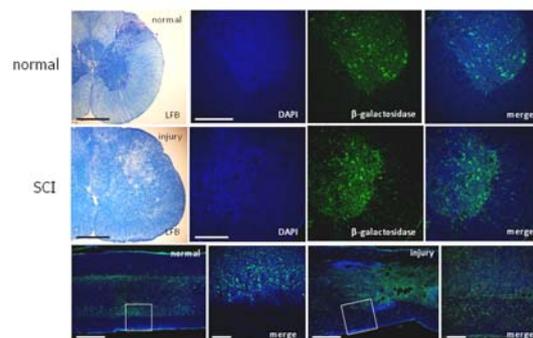


図1 逆行性導入による β -galactosidase 陽性細胞の分布 (上段: 正常脊髄、下段: 損傷脊髄)

(2) 各神経グリア系細胞マーカー (NeuN, RIP, OX-42, GFAP) との二重染色を行うと、頸髄圧挫損傷モデルでは、neuron のみならず、一部の oligodendrocyte, astrocyte, microglia にも取り込まれていることが確認された。

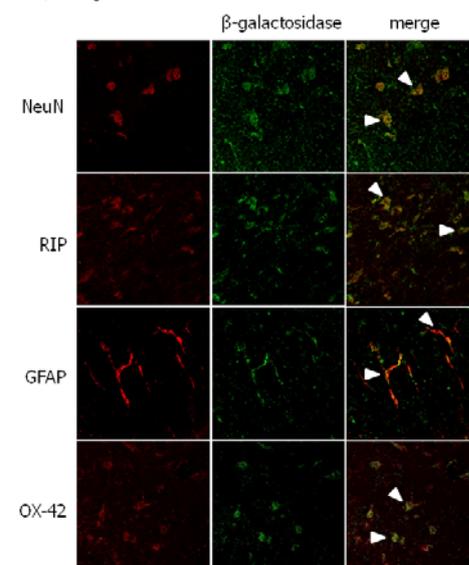


図2 神経グリア系細胞への取り込み

(3) BDNF 注入群では LacZ 注入群に比べ、TUNEL 陽性細胞数の減少が、損傷部では損傷後 1 週、その頭尾側方向では損傷後 3 日—2 週で有意に確認され、BDNF 遺伝子逆行性導入による apoptosis 抑制効果が示された。さらに、TUNEL 染色と NeuN, RIP との蛍光二重染色では、BDNF 注入群では LacZ 注入群に比べ、TUNEL/NeuN, TUNEL/RIP 陽性細胞数の減少が、損傷後 3 日~1 週以降で確認された。

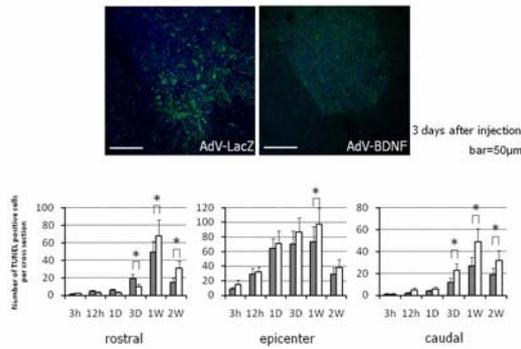


図 3 TUNEL 染色

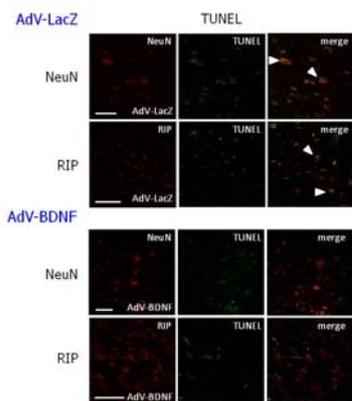


図 4 NeuN, RIP/TUNEL 蛍光二重染色

(4) activated-caspase-3 の western blotting では、BDNF 注入群では注入後 1 日目以降で有意に LacZ 注入群より発現が低下しており、免疫染色では activated-caspase-3/NeuN, activated-caspase-3 /RIP 陽性細胞数が BDNF 注入群で有意に低いことが確認された。

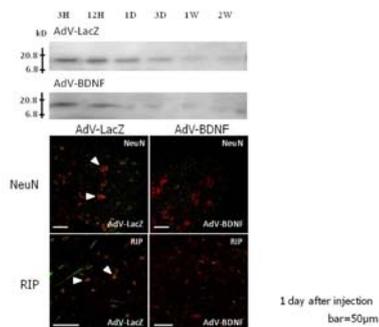


図 5 activate-caspase-3 の Western blotting および NeuN, RIP との蛍光免疫染色

(5) 損傷後 4 週における oligodendrocyte の progenitor cell の指標とされる NG2 の発現は、損傷部およびその頭尾側において BDNF 注入群で有意に高かった。

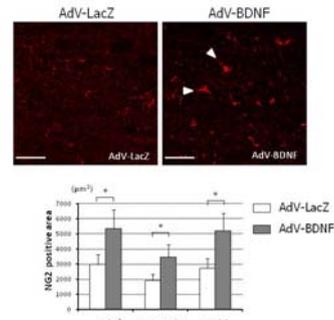


図 6 NG2 発現に与える影響

逆行性導入は軸索流を介したアプローチであり、直接導入は前角細胞のみと理論上は考えられるが、興味深いことに脊髄損傷の環境下ではグリア系細胞への直接的導入もみられた。mechanism を推測すると、軸索の破綻、astrocyte, microglia の遊走、貪食作用など損傷後の脊髄内環境および adenovirus vector の高い感染能力が関与している可能性が考えられる。逆行性導入では、neuron から autocrine, paracrine 機構を介した trophic effects に加え、グリア系細胞による trophic effects の助長の可能性も示唆され、neuron や oligodendrocyte の apoptosis 抑制をひとつの機序として、神経保護効果、再生能力賦活化効果をもたらすと考えられた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Guerrero AR, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Baba H. Tumor necrosis factor-alpha antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury. Spine in press、査読有
- ② Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Guerrero AR, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Zhu P, Baba H. High-mobility group box-1 and its receptors contribute to proinflammatory response in the acute phase of spinal cord injury in rats. Spine in press、査読有
- ③ Nakajima H, Uchida K, Yayama T, Kobayashi S, Guerrero AR, Furukawa S, Baba H. Targeted retrograde gene

delivery of brain-derived neurotrophic factor suppresses apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury in rats. Spine 35:497-504, 2010、査読有

- ④ Inukai T, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Kobayashi S, Mwaka ES, Guerrero AR, Baba H. Tumor necrosis factor- α and its receptors contribute to apoptosis of oligodendrocytes in the spinal cord of spinal hyperostotic mouse (twy/twy) sustaining chronic mechanical compression. Spine 34:2848-57, 2009、査読有
- ⑤ 内田研造、中嶋秀明、渡邊修司、馬場久敏、脊髄再生基礎科学の現状と近未来の展望、Myelopathy に対するアデノウイルスベクターを用いた逆行性神経栄養因子遺伝子療法による脊髄保護効果、脊椎脊髄ジャーナル、査読無、23 巻、2010、859-866
- ⑥ Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Sato R, Baba H. Updates on ossification of posterior longitudinal ligament. Ossification front of posterior longitudinal ligament and cellular biological assessment of chronic mechanical compressed spinal cord. Clin Calcium 19:1472-9, 2009、査読無

[学会発表] (計 8 件)

- ① 中嶋秀明 他 損傷脊髄における High mobility group box -1 (HMGB-1) の動態と役割 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会 2010 年 10 月 22 日 京都
- ② 中嶋秀明 他 脊髄損傷に対する移植ヒト骨髄間質細胞の動態と治療効果 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会 2010 年 10 月 21 日 京都
- ③ 中嶋秀明 他 脊髄損傷に対するアデノウイルスベクターを用いた神経栄養因子遺伝子逆行性導入による神経保護効果 第 29 回運動器移植・再生医学研究会 2010 年 9 月 25 日 滋賀
- ④ 中嶋秀明 他 脊髄損傷における神経栄養因子遺伝子逆行性導入による神経グリア系細胞の保護効果 第 39 回日本脊椎脊髄病学会学術集会 2010 年 4 月 23 日 高知
- ⑤ 中嶋秀明 他 慢性脊髄圧迫モデル (twy/twy) に対する神経栄養因子遺伝子導入による再生能力賦活化効果 第 9 回再生医療学会 2010 年 3 月 19 日 広島
- ⑥ 中嶋秀明 他 慢性脊髄圧迫モデル (twy/twy) に対する逆行性神経栄養因子

遺伝子導入を用いた neuron および oligodendrocyte の賦活化効果 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 2009 年 11 月 6 日 横浜

- ⑦ 中嶋秀明 他 損傷後頸髄に対する BDNF 遺伝子逆行性導入を用いた neuron および oligodendrocyte の賦活化効果 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 2009 年 11 月 5 日 横浜
- ⑧ 中嶋秀明 他 損傷脊髄内神経栄養因子遺伝子逆行性導入による神経グリア系細胞に対する賦活化効果 第 38 回日本脊椎脊髄病学会学術集会 2009 年 4 月 25 日 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 秀明 (NAKAJIMA HIDEAKI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：10397276