

機関番号：15401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791400

研究課題名 (和文) miRNA制御による損傷脊髄の再生

研究課題名 (英文) Regeneration of spinal cord injury using microRNA

研究代表者

中西 一義 (NAKANISHI KAZUYOSHI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：60403557

研究成果の概要 (和文)：

マウス脊髄損傷モデルにて、PCR法による脊髄損傷後のmiR-223の発現を観察したところ、損傷12時間後、3日後で二峰性の発現のピークがみられ、損傷12時間後においては損傷部±2mmの範囲で有意に高発現しており、同部位での炎症性サイトカインの上昇を認めた。また組織学的評価では、miRNA-223陽性細胞の約60%がGr-1陽性の好中球であることが判明した。以上より損傷早期の12時間において、好中球の遊走と炎症性サイトカインの放出は損傷部±2mmの範囲に集中し、これら好中球の動態にmiR-223の関与が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

MicroRNA223 shows high levels of expression at 12 hours and 3 days after spinal cord injury using PCR in mice. And microRNA-223 and inflammatory cytokines also shows significantly high levels of expression within the range of 2mm of the head and caudal around the epicenter at 12 hours after spinal cord injury by PCR. Immunohistochemistry revealed 60% of the microRNA-223 positive cells merged with the Gr-1 positive neutrophils. Therefore, the accumulation of the neutrophils and inflammatory cytokine occurs within the range of the 2mm of head and caudal around the epicenter. And it was suggested that microRNA-223 is related to the expression of neutrophils in the early response of 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	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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・microRNA・組織再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会的ニーズ：

我が国では毎年 5000 人以上が脊髄損傷を受傷し、約 10 万人以上の脊髄損傷患者が存在している。救急医療の発達に伴い、これらの患者の生命予後は飛躍的に改善したものの、何らかの麻痺を抱えたままの生活を余儀なくされている。脊髄損傷による障害者への莫大な医療費や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。

(2) 国内外での研究報告：

近年、世界中で損傷脊髄に対する再生治療として、主に再生誘導あるいは細胞移植の研究が行われており、一部ではすでに臨床試験も実施されている。現在報告されている移植細胞には胚性幹細胞、神経幹細胞、骨髄間葉系幹細胞、鼻粘膜細胞、シュワン細胞などがあるが、細胞の採取・移植に際しての倫理的問題や安全性の問題も多く、我が国では関西医大で骨髄間葉系幹細胞移植の臨床試験が行われているのみで、明らかな有効性に関する報告はない。

(3) 近年の microRNA をはじめとした non-coding RNA の研究：

近年、タンパク質に翻訳されない non-coding RNA が新しい遺伝子カテゴリーとして注目されている。microRNA (miRNA) は、21~25 塩基程度の non-coding RNA であり、動植物に広く保存されている。miRNA は、組織特異的、発生段階特異的に発現しており、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどといった生命現象だけでなく、疾患にも重要な役割を果たしているといわれている。現在までのところ、癌、白血病、ウイルス感染などにおける miRNA の関連は報告されているが、整形外科疾患における miRNA の報告はほとんどない。すでに研究協力者は、関節リウマチの膝関節滑膜に miR-146 が高発現していることを証明し、将来の治療法の開発をめざして、その機序の解明を進めている (Nakasa T; Arthritis Rheum 2008, J Biomed Mater Res A, 2008)。そこで我々は脊髄損傷における miRNA の研究を計画した。

2. 研究の目的

・本研究では、損傷脊髄における miRNA の発現とその作用機序を明らかにする。

・miRNA の制御による、損傷脊髄のまったく新しい再生治療法の開発をめざす。

(1) 脊髄損傷モデルにおける miRNA の発現：
マウスの脊髄損傷モデルを作製し、miRNA の

発現の経時的変化を観察する。

(2) 脊髄損傷モデルにおける miRNA の発現部位と発現細胞の同定：

マウス脊髄損傷モデルにて発現上昇する特異的な miRNA をリアルタイム PCR 法にて発現分布を解析する。また特異的 miRNA の発現する細胞を *in situ* hybridization 法と免疫染色による二重染色により同定する。

(3) 脊髄損傷後の二次損傷と miRNA との関連：

脊髄の二次損傷時に発現する炎症性サイトカインと特異的 miRNA の発現分布を解析する。

(4) 特異的 miRNA の発現制御：

特異的 miRNA の制御因子の発現の有無を組織免疫染色にて解析する。

3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷モデルにおける miRNA の発現：

マウスを用い、第 11 胸椎高位にて脊髄損傷モデルを作製し損傷後 6 時間、12 時間、1 日、3 日、7 日時点で脊髄から RNA を抽出し、マイクロアレイにて網羅的に miRNA の発現を解析する。

(2) 脊髄損傷モデルにおける miRNA の発現部位と発現細胞の同定：

脊髄損傷マウスモデルから損傷 12 時間後に脊髄を摘出し RNA を抽出する。損傷部中心に頭尾側 6mm を 2mm ごとに分割し、特異的に発現上昇する miRNA-223 の発現部位を real time PCR にて解析する。損傷 12 時間後に脊髄を摘出し *in situ* hybridization 法による miRNA-223 陽性細胞の同定と免疫染色 (好中球、マイクログリア、マクロファージ) による二重染色により発現細胞を解析する。

(3) 脊髄損傷後の二次損傷と miRNA との関連：

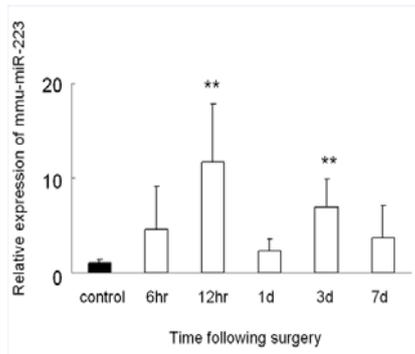
脊髄損傷マウスモデルから損傷 12 時間後に脊髄を摘出し、損傷部中心に頭尾側 6mm を 2mm ごとに分割し、炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF- α) の発現分布を解析した。

(4) 特異的 miRNA の発現制御：

miRNA-223 の発現を制御すると報告のある C/EBP α 、NFI-A を脊髄損傷 12 時間後に摘出した脊髄にて免疫染色しその発現分布を解析する。

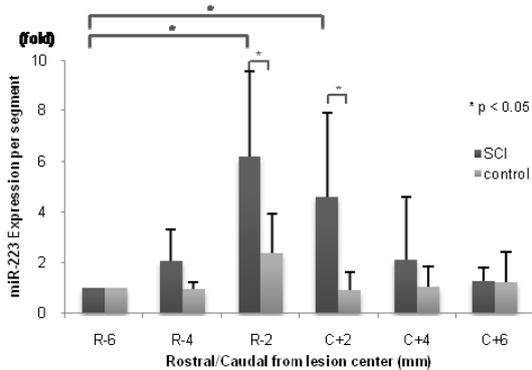
4. 研究成果

(1) 脊髄損傷後 12 時間, 3 日で miRNA-223 の発現上昇を認めた. (図 1)



(図 1)

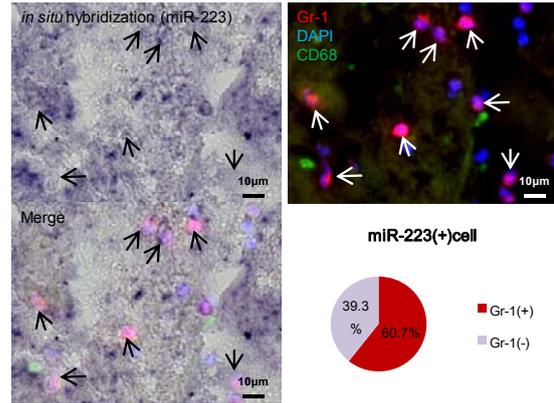
(2) 損傷部を中心に ±2mm の範囲で miRNA-223 の有意な高発現を認めた. (図 2) *in situ* hybridization でも損傷部を中心に頭尾側 2mm の脊髓灰白質部に miRNA-223 陽性細胞の発現を認めた. (図 3) 免疫染色による二重染色では miRNA-223 陽性細胞の約 60% が Gr-1 陽性の好中球であった. (図 4)



(図 2)



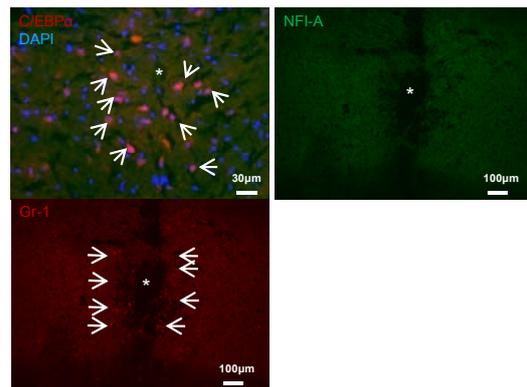
(図 3)



(図 4)

(3) 炎症性サイトカインも同様に損傷部中心に ±2mm の範囲で有意に高発現していた.

(4) miRNA-223 の発現を上昇させる C/EBP α を損傷部中心に認め, miRNA-223 の発現を抑制する NFI-A の発現を損傷部では認めなかった. (図 5)



(図 5)

以上より損傷 12 時間後において, miR-223 は損傷部 ±2mm の範囲で有意に高発現し, 同部位での炎症性サイトカインの上昇を認めた. また *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫染色による二重染色により, miRNA-223 陽性細胞の約 60% が Gr-1 陽性の好中球であることが判明した. さらに microRNA-223 の発現制御因子である C/EBP α の発現を免疫染色で確認した. 以上より損傷早期の 12 時間において, 好中球の遊走と炎症性サイトカインの放出は損傷部 ±2mm の範囲に集中し, これら好中球の動態に miR-223 の関与が示唆された. miRNA は組織特異的, 発生段階特異的に発現しており, 細胞の増殖, 分化, アポトーシスなどといった生命現象だけでなく, 疾患にも重要な役割を果たしているといわれている.

また培養等の作業が必要なく、比較的臨床応用しやすいといった利点があり新薬開発の期待される分野である。miR-223 は今後さらに研究をすすめることにより、脊髄損傷後の二次損傷を防ぐ新しい治療法のターゲットとなる可能性が示された。

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 3 件)

1. Izumi B, Nakasa T, Tanaka N, Nakanishi K, Kamei N, Yamamoto R, Nakamae T, Ohta R, Fujioka Y, Yamasaki K, Ochi M. MicroRNA-223 expression in neutrophils in the early phase of secondary damage after spinal cord injury. *Neuroscience Letters* 査読あり, 492, 2011, P114-118.

2. 泉文一郎, 中佐智幸, 田中信弘, 中西一義, 亀井直輔, 山本りさこ, 中前稔生, 大田亮, 藤岡悠樹, 越智光夫 マウス脊髄損傷モデルにおけるmicroRNA-223の発現 脊髄機能診断学 査読あり, 32 巻, 2010, P69-72.

3. Nakanishi K, Nakasa T, Tanaka N, Ishikawa M, Yamada K, Yamasaki K, Kamei N, Izumi B, Adachi N, Miyaki S, Asahara H, Ochi M Responses of microRNAs 124a and 223 following spinal cord injury in mice. *Spinal Cord* 査読あり, 48(3), 2010, P192-196.

[学会発表] (計 5 件)

1. Izumi B, Nakasa T, Tanaka N, Nakanishi K, Kamei N, Yamamoto R, Nakamae T, Ohta R, Fujioka Y, Ochi M. MicroRNA-223 was expressed in the neutrophils at the early period of secondary damage after spinal cord injury Orthopaedic Research Society 57th Annual Meeting 13 Jan 2011, Los Angeles USA.

2. Izumi B, Nakasa T, Tanaka N, Nakanishi K, Kamei N, Yamamoto R, Nakamae T, Ohta R, Fujioka Y, Ochi M. MicroRNA-223 was expressed in the neutrophils at the early period of secondary damage after spinal cord injury 7th combined meeting Orthopaedic Research Society 16 Oct 2010, Kyoto.

3. 泉文一郎, 中佐智幸, 田中信弘, 中西一義, 亀井直輔, 山本りさこ, 中前稔生, 大田亮, 藤岡悠樹, 越智光夫 マウス脊髄損傷モ

デルにおけるmicroRNA-223の発現 第25回日本整形外科基礎学術集会 2010年10月14日 京都

4. Izumi B, Nakasa T, Tanaka N, Nakanishi K, Kamei N, Yamamoto R, Nakamae T, Ohta R, Fujioka Y, Ochi M. Expression of microRNA-223 following spinal cord injury in mice. Orthopaedic Research Society 56th Annual Meeting 6 Mar 2010, New Orleans USA.

5. 泉文一郎, 中佐智幸, 田中信弘, 中西一義, 亀井直輔, 山本りさこ, 中前稔生, 大田亮, 藤岡悠樹, 越智光夫 マウス脊髄損傷モデルにおけるmicroRNA-223の発現 第32回脊髄機能診断研究会 2009年2月6日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 一義 (NAKANISHI KAZUYOSHI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：60403557

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：