

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12591

研究課題名(和文) 脊髄可塑性におけるメカノシグナルの関与に関する研究

研究課題名(英文) The contribution of mechanical stress to cell functions to lead neural plasticity in spinal cord.

研究代表者

緒方 徹 (OGATA, TORU)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・病院(併任研究所) 障害者健康増進・運動医科学支援センター・センター長

研究者番号：00392192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷治療を目的としたニューロリハビリテーションの作用メカニズムとして、神経可塑性の誘導が挙げられる。この神経可塑性は様々な環境因子の影響を受けることが報告されてきたが、神経組織の固さを介したメカニカルストレスシグナルの寄与には不明な点も多い。そこで本研究では、メカノセンサーp130Casに注目して検討を行ない、脊髄組織においてp130Casはミクログリアに豊富に発現し、損傷に伴う炎症反応の調節に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Induction of neural plasticity is thought of as one mechanism of neuro-rehabilitation for the treatment of spinal cord injury. Various factors including tissue environmental factors control to the neural cell function, which affects neural plasticity. However it is not clear that neural tissue rigidity, one putative element of the tissue environmental factors, contributes to the neural cell functions as mechanical stress signaling. In this study, we focused on p130Cas, which is previously reported as a mechanosensor and showed that p130Cas expresses in Iba1-positive microglia in spinal cord and might contribute to the inflammatory response following tissue injury.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：脊髄損傷 メカニカルストレス

## 1. 研究開始当初の背景

### グリア細胞トリハビリテーション

ニューロリハビリテーションの基本原則である神経可塑性は神経細胞同士の接続(シナプス)の新生と強化の上に成立しており、可塑的变化の方向性は脳の随意指令と感覚入力のリープの中で形成される。このような可塑性が生じる局所環境はアストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞によって調整されており、これらの細胞の機能変化が可塑性に影響を及ぼすことがすでに知られている。しかし、可塑的な変化が生じやすい環境を誘導する為に何が重要かについては不明な点が多い。

### 組織の固さとグリア細胞の機能変容との関連の可能性

神経可塑性の重要な環境因子の一つに「固さ」が挙げられることが示唆されている。例えば、成長に伴い神経の可塑性が低下していくとともに、脳の組織は固くなっていくと報告されている(de Vivo L et al., Nat Commun, 2013)。また、疾病によって生じた変性部や癒痕部は固くなり、その部分での神経可塑性を阻むこととなる。しかし、これまで細胞がその固さをどのようにして感知するかメカニズムは不明であった。

### メカニカルストレスとメカノセンサー p130Cas

近年、細胞へのストレス(刺激)として、メカニカルストレスが注目を集めているメカニカルストレスとは、生体内の細胞や組織に負される物理的・力学的な刺激である。これには生体外からの力学的負荷だけではなく、細胞の形態変化や移動に伴って生じる内因性の刺激も含まれている。例えば、細胞が基質に接着する際、接着斑を介して細胞は基質と接触し、アクチン骨格で細胞の形態を維持・調節しており、このアクチン骨格による細胞の牽引力こそが、細胞のもつ内因性メカニカルストレスの代表例である。そして、これは硬い基質上では強く、柔らかい基質上では弱くなる。つまり、細胞の接着する基質の硬軟が、細胞自身が生み出すメカニカルストレスに影響することを示す。

近年、接着斑部で機能するメカノセンサーとして、p130Cas(以下、Cas)が報告された。CasはそのSubstrate domainにおいて、伸展刺激によりリン酸化を受ける。しかし、神経組織においてCasが機能すること、また基質の変化を示唆する損傷脊髄でCasの機能が変化するかは明らかではない。

## 2. 研究の目的

上記の背景を基に、近年報告されたメカノセンサーであるCasに注目して、脊髄損傷後の癒痕という固さと可塑性がもっとも観察しやすいモデルを用いて、メカノセンサーであるCasの役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

マウスはC57BL/6Jマウスを用いて解析した。アストロサイト特異的Cas欠損マウスは、GFAP-CreERT2マウスとCas floxedマウスを掛け合わせることで作成した。また、マクロファージを含むHematopoietic and endothelial cell特異的Cas欠損マウスは、Tie2-CreマウスとCas floxedマウスを掛け合わせることで作成した。なお、本Tie2-Creマウスは、ミクログリアでも遺伝子が改変されると報告されているため、ミクログリアにおけるCas欠損の影響を評価するためのpreliminaryな検討にも用いた。

### (2) 脊髄損傷モデルマウス

10週齢のマウスに、Infinite Horizon Impactor(IH impactor)を用いて、コンピュータ制御にて一定力(60 kdyn)の圧挫損傷を加え、挫傷による脊髄損傷モデルを作製した。

### (3) 免疫染色法

損傷8週後(慢性期) PBSおよび4% PFAで還流した後、脊髄組織を採取した。4% PFAに浸漬することでさらに固定した後、20%スクロースおよび30%スクロース溶液に、overnightで浸漬した。10 μmの凍結切片を作成し、アストロサイトマーカーとしてGlial Fibrillary Acidic Protein(GFAP)、ミクログリアマーカーとしてIonized calcium binding adapter molecule 1(Iba-1)、Cas、およびPhospho-Cas(Tyr165)に対する抗体、および各種Alexa Fluor蛍光標識二次抗体を用いて、染色した。なお観察は、Keyence社のHSオールインワン蛍光顕微鏡BZ-9000を用いた。

### (4) RAW264.7細胞

単球・マクロファージ系cell lineとして、RAW264.7細胞を用いた。培地は10% FBSを添加したDMEMを用いた。ノックダウンはpSUPERベクターを、PlatEにより作成したウイルスを介して導入することで行った。ウイルス感染後、5 μg/mLのピューロマイシンでセレクションし、検討に用いた。

#### 4. 研究成果

まず初めに正常マウスの脊髄および脊髄損傷8週後(慢性期)の脊髄において、免疫染色法により、メカニカルストレスシグナルである Cas のリン酸化の変化を評価した。その結果、正常マウスの脊髄において、リン酸化 Cas 染色は Iba1 陽性ミクログリアにおいて認められ、損傷周囲の Iba1 陽性ミクログリアにおいてさらに顕著に観察された(Fig. 1)。一方、GFAP 陽性アストロサイトでは明らかな Cas のリン酸化は認めなかった。

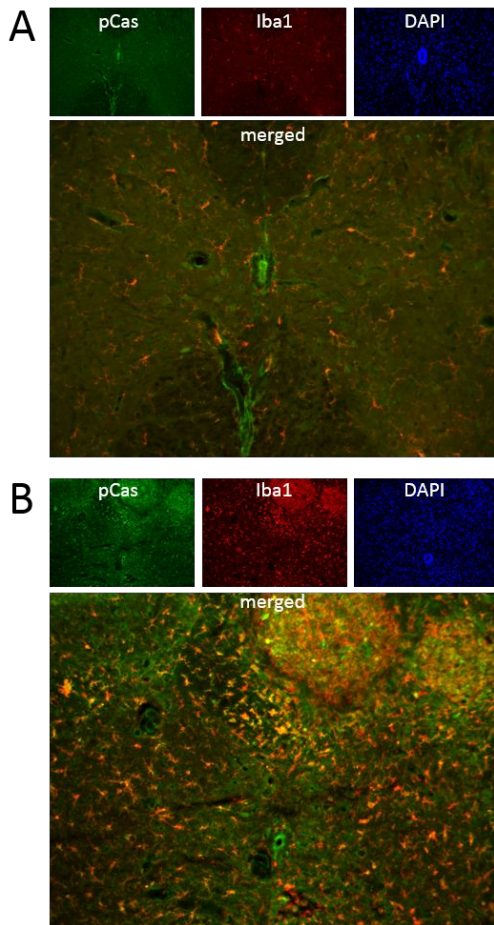


Fig 1. 損傷脊髄でのミクログリアにおけるCasのリン酸化の変化 (A)正常マウスおよび(B)脊髄損傷8週後の脊髄の免疫染色画像(緑:リン酸化Cas、赤:Iba1、青:DAPI)

ミクログリアにおいて強い Cas のリン酸化を認めたことから、ミクログリアの Cas の機能を評価するために、ミクログリアでも遺伝子改変が認められると報告されている Tie2-Cre マウスを用いて、Hematopoietic and endothelial cell 特異的 Cas 欠損マウスを作製した。

この Cas 欠損マウスを用いた結果、一定のフェノタイプは得られた。しかし、ミクログリアに比べて発現レベルは低い内皮細胞にも Cas が発現していること、Cas 発現低下細胞では増殖が低下することから Cas 欠損内

皮細胞では血管新生機能に異常が認められる可能性が考えられること、血管新生の促進が脊髄損傷治療のメカニズムの1つであることから、ミクログリアと内皮細胞の寄与を切り分けることが困難と考えられた。そのため、本マウスを用いたさらに詳細な評価を今後の検討課題とした。

一方、神経組織とは異なる組織であるが、内臓脂肪組織の1種である精巣上体脂肪組織での検討により、高脂肪食負荷後の精巣上体脂肪組織において炎症反応の促進に伴うマクロファージの蓄積(Crown like structure: CLS)が、Cas の欠損により低下することが明らかになった(Fig.2)。このことから、マクロファージ系細胞であるミクログリアにおいても、Cas が炎症反応に関連することが示唆された。

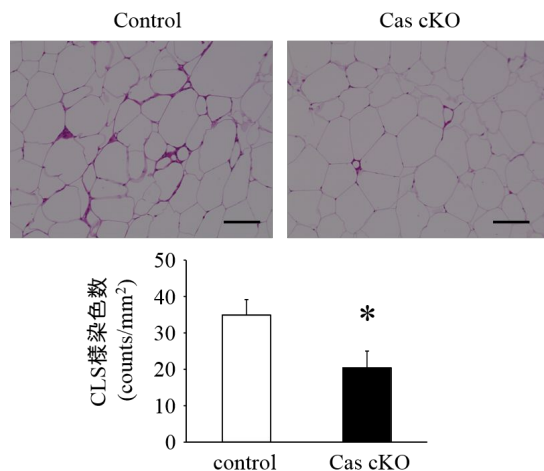


Fig 2. Cas欠損マウスの内臓脂肪のHE染色とCLS様染色数

また、単球・マクロファージ系 cell line である RAW264.7 細胞を用いて、Cas のノックダウンが炎症反応に寄与するかを、極性を評価することで評価した。その結果、Lipopolysaccharide (LPS) による M1 マーカーの mRNA 発現増加は、Cas のノックダウンによりさらに増加した。そのため、Cas は単球・マクロファージ系細胞において炎症反応に寄与している可能性が示唆された。

以上のことから、脊髄組織において Cas はミクログリアに豊富に発現し、損傷時に炎症反応を調節している可能性が示唆された。

#### 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10件)

Inoue R, Sumitani M, Ogata T, Chikuda H, Matsubara T, Kato S, Shimojo N, Uchida K, Yamada Y. Direct evidence of central nervous system axonal damage in patients with postoperative delirium: A preliminary study of pNF-H as a promising serum biomarker. *Neurosci Lett*. 2017 653:39-44. 査読有

Ryu Y, Ogata T, Nagao M, Kitamura T, Morioka K, Ichihara Y, Doi T, Sawada Y, Akai M, Nishimura R, Fujita N. The swimming test is effective for evaluating spasticity after contusive spinal cord injury. *PLoS One*. 2017 12:e0171937. 査読有

Ichihara Y, Doi T, Ryu Y, Nagao M, Sawada Y, Ogata T. Oligodendrocyte Progenitor Cells Directly Utilize Lactate for Promoting Cell Cycling and Differentiation. *J Cell Physiol*. 2017 232:986-995. 査読有

Shibahashi K, Doi T, Tanaka S, Hoda H, Chikuda H, Sawada Y, Takasu Y, Chiba K, Nozaki T, Hamabe Y, Ogata T. The Serum Phosphorylated Neurofilament Heavy Subunit as a Predictive Marker for Outcome in Adult Patients after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2016 33:1826-1833. 査読有

Uchida S, Hayakawa K, Ogata T, Tanaka S, Kataoka K, Itaka K. Treatment of spinal cord injury by an advanced cell transplantation technology using brain-derived neurotrophic factor-transfected mesenchymal stem cell spheroids. *Biomaterials*. 2016 109:1-11. 査読有

Sumitani M, Ogata T, Natori A, Hozumi J, Shimojo N, Kida K, Yamauchi H, Yamauchi T. Poor efficacy of the phosphorylated high-molecular-weight neurofilament heavy subunit serum level, a biomarker of axonal damage, as a marker of chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Biomed Rep*. 2016 4:758-760. 査読有

Ohya J, Chikuda H, Kato S, Hayakawa K, Oka H, Takeshita K, Tanaka S, Ogata T. Elevated levels of phosphorylated neurofilament heavy subunit in the cerebrospinal fluid of patients with lumbar spinal stenosis: preliminary findings. *Spine J*. 2015 15:1587-1592. 査読有

Kato S, Chikuda H, Ohya J, Hayakawa K, Takeshita K, Tanaka S, Ogata T. Phosphorylated neurofilament subunit levels in the serum of cervical compressive myelopathy patients. *J Clin Neurosci*. 2015 22:1638-1642. 査読有

Sugimori M, Hayakawa Y, Boman BM, Fields JZ, Awaji M, Kozano H, Tamura R, Yamamoto S, Ogata T, Yamada M, Endo S, Kurimoto M, Kuroda S. Discovery of Power-Law Growth in the Self-Renewal of Heterogeneous Glioma Stem Cell Populations. *PLoS One*. 2015 10:e0135760. 査読有

Ogata T, Muranaga S, Ishibashi H, Ohe T, Izumida R, Yoshimura N, Iwaya T, Nakamura K. Development of a screening program to assess motor function in the adult population: a cross-sectional observational study. *J Orthop Sci*. 2015 20:888-895. 査読有

〔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

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
緒方 徹(Ogata, Toru)  
国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・病院(併任研究所)障害者健康増進・  
運動医科学支援センター、センター長  
研究者番号：00392192