

令和元年5月23日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21134

研究課題名(和文) 脊髄損傷における軸索ガイダンス分子DCCを用いた効率的な軸索伸長法の開発

研究課題名(英文) Development of the effective axonal extension method using axon guidance molecule DCC in spinal cord injury

研究代表者

大川 都史香 (Ohkawa, Toshika)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90418880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者の所属施設では、慢性期完全脊髄損傷に対する自家嗅粘膜移植法の臨床研究を行っており、嗅粘膜移植法に付加する新規の神経伸長促進法を開発することを目標とした。PLA2G6遺伝子がコードするカルシウム非依存性ホスホリパーゼA2 (iPLA2) は膜リン脂質のリモデリングにおいて重要な役割を果たす。PLA2G6ノックアウトマウスの脊髄損傷モデルを用いた研究により、iPLA2 が損傷後の脱髄や炎症反応の惹起に関与していると考えられた。嗅粘膜移植法にiPLA2 の阻害剤あるいは抗体を付加することで、手術操作に伴う正常脊髄の損傷後の脱髄や炎症反応の惹起を軽減させ、軸索伸長を促進できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性期完全脊髄損傷に対する自家嗅粘膜移植術による随意筋の下肢筋電図の出現や体幹支持性の向上には非常に長期のリハビリ期間を要している。本研究により、嗅粘膜移植術にiPLA2 の阻害剤あるいは抗体を付加することで、術後のリハビリ期間の短縮および神経機能改善の向上を期待できる。また、iPLA2 は膜リン脂質のリモデリングに重要な役割を果たしており、iPLA2 を用いた脊髄損傷の基礎研究により2次損傷増悪機構の病態解明につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：We conducted the clinical study of olfactory mucosa autografts (OMA) for chronic spinal cord injury (SCI). In this study, we investigated the new axonal extension method in OMA. Calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) which PLA2G6 gene encodes plays an important role in remodeling of membrane phospholipids. The spinal cord injury models of PLA2G6 knockout mice revealed that iPLA2 could exacerbate demyelination and inflammation after SCI. Using the inhibitor or the antibody of iPLA2, there is a possibility that we may reduce demyelination and inflammation after the injury of normal spinal cord in OMA surgery. As a result, we may promote the axonal extension after OMA.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脊髄損傷 軸索ガイダンス 嗅粘膜移植術 ホスホリパーゼ リゾリン脂質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本の脊髄損傷患者は毎年約 5,000 人以上発生している。受傷原因としては、交通事故と高所転落が多いとされてきたが、近年では転倒などの外傷を契機とする高齢患者の麻痺症例も増加している。

受傷後 12 ヶ月以上が経過した完全運動麻痺を呈する慢性期脊髄損傷患者では、症状が固定し、自然経過による運動機能改善が認められる可能性が極めて低いと考えられる。そのような慢性期完全脊髄損傷に対して、申請者の所属施設では自家嗅粘膜移植法の臨床研究を 2002 年より行い(研究代表者：岩月幸一)、2011 年にわが国の先進医療の指定を受け現在に至る。本法が施行された胸髄損傷 8 例中 3 例において、随意筋の下肢筋電図の発現を認め、1 例においてはリハビリ期間の後に杖歩行が可能となっている。

生体内で正しく神経回路網が形成されるための基本原理として軸索ガイダンスという概念があり、神経接着因子や神経軸索ガイダンス分子、神経活動性シグナルが関わっているとされる。当プログラムで実施しているリハビリテーションは神経活動性シグナルによる軸索ガイダンスに相当すると考えられるが、現状では歩行可能となるまでに移植後 3 年のリハビリ期間を要している。

2. 研究の目的

上述のような背景をふまえて、本研究では神経軸索ガイダンス分子、特に DCC に着目し、嗅粘膜移植法に付加する新規の神経伸長促進法を開発することを目的とし、研究を開始した。当初は、徐放化した軸索ガイダンス分子を脊髄損傷モデル動物に留置し軸索伸長が促進できるかを検討しようとしたが、徐放化した分子を直接脊髄内に留置する手法は困難であった。そこで、膜リン脂質のリモデリングにおいて重要な役割を果たす PLA2G6 遺伝子がコードするカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A2 (iPLA2) に着目した。損傷脊髄ではエネルギー枯渇やフリーラジカルによる脂質酸化に加え、ホスホリパーゼ A2 (PLA2) により脂質分解が進行するなど、軸索伸長を阻害する現象が起こっていると考えられる。ヒト神経変性疾患モデルマウスとして知られている PLA2G6 ノックアウト (KO) マウスを用いて、軸索伸長を阻害する分子を探索し、嗅粘膜移植術後の軸索伸長を促進する手法を見つけることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PLA2G6 KO マウスと野生型 (WT) マウスの脊髄損傷モデルの下肢運動機能の比較
実験には C57BL/6 マウスを用いた。8~12 週齢 PLA2G6 KO 及び WT マウス (n=4 ずつ) の第 10 胸髄高位に Infinite Horizons Impactor を用いて、挫滅損傷 (70kdyn) を作成した。損傷直後から 4 週間後まで Basso Mouse Scale (BMS) を用いて下肢運動機能を評価した。

(2) 脊髄損傷モデルの組織学的評価

上記 (1) の実験で使用した脊髄損傷モデルのマウスを損傷 4 週間後に冷リン酸緩衝液にて全身灌流した後、冷 4% パラホルムアルデヒドにて全身灌流固定を行った。Sucrose 処理後に損傷部脊髄の凍結切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

(3) 質量分析による脂質代謝産物の解析

8~12 週齢 PLA2G6 KO 及び WT マウス (n=3 ずつ) の第 10 胸髄高位に挫滅損傷 (70kdyn) を作成し、損傷 1 週間後の損傷部の凍結標本を用いて質量分析 (島津テクノロジー) を行い、脂質代謝産物を解析した。

4. 研究成果

PLA2G6 KO 及び WT マウス (n=4 ずつ) の第 10 胸髄高位に挫滅損傷 (70kdyn) を作成し、下肢運動機能を評価した。両群間の平均週齢数、平均体重、平均圧挫力に有意差は認めなかった。PLA2G6 KO マウスの BMS は、脊髄損傷 1 週後、2 週後、3 週後、4 週後において有意に高く、脊髄損傷後の下肢運動機能の低下が少ないという結果が得られた (図 1)。

脊髄損傷モデルの組織学的評価では、WT マウスと比較して KO マウスでは損傷部の空隙形成および脱髄が軽減される傾向にあった (図 2)。

損傷部脊髄の質量分析ではリゾホスファチジン酸が KO マウスで低下しており、損傷後の脱髄や炎症反応の惹起に関与している可能性が考えられた (図 3)。

本研究の結果より、iPLA2 が脊髄損傷後の 2 次増悪機構に関与している可能性があることが示唆された。嗅粘膜移植法に iPLA2 の阻害剤あるいは抗体を付加することで、手術操作に伴う正常脊髄の損傷後の脱髄や炎症反応の惹起を軽減させ、軸索伸長を促進できる可能性がある。今後、阻害剤あるいは抗体投与により脊髄損傷が軽減されるかを動物実験モデルで検証する必要がある。

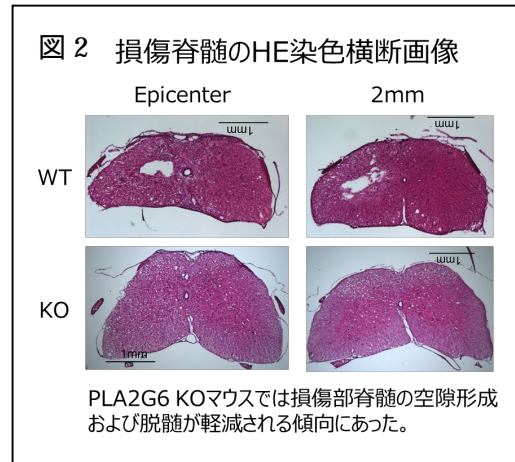
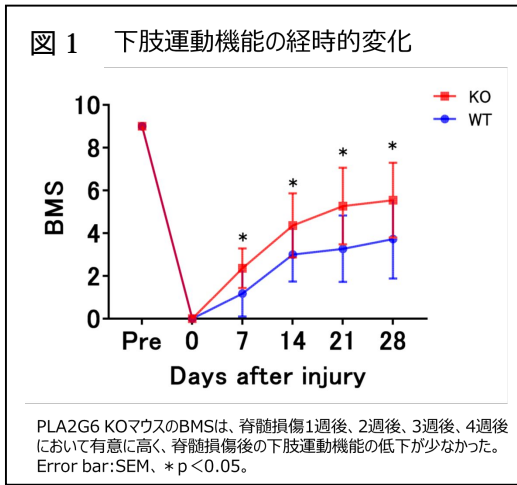


図3 マウス損傷脊髄の抽出試料中のLPA濃度(ng/ml)

検体	WT1	WT2	WT3	Mean	±	SD	KO1	KO2	KO3	Mean	±	SD
C16:0	27.0	17.5	17.4	20.7	±	5.5	14.7	17.6	23.0	18.4	±	4.2
C17:0	-	-	-	-	-	-	0.507	0.570	0.804	0.627	±	0.157
C18:0	13.1	9.79	9.56	10.8	±	2.0	11.9	11.4	13.9	12.38	±	1.36
C18:1	8.07	6.41	3.95	6.14	±	2.08	2.91	5.42	5.00	4.44	±	1.34
C18:2	-	-	-	-	-	-	0.415	-	-	0.138	±	0.239
C20:0	-	-	-	-	-	-	-	0.730	-	0.243	±	0.421
C20:1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.801	0.267	±	0.462
PA (Total)	4967	4099	3416	4161			2136	2831	3947	2971		

リゾスファチジン酸(LPA)濃度がKOマウスで低い傾向にあった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Ken Kodama, Tomohiro Maniwa, Yukio Kimura, Yuriko Yagi, Yoko Yamamoto, Toshika Ohkawa, Masashi Takeda, Hiroki Kishima, Genju Koh, Takamasa Toyofuku, Concurrent combination of irradiation and immune checkpoint inhibitor for recurrent pleomorphic carcinoma of the lung, International Cancer Conference Journal, 査読有, 7, 2018, 43-47

<https://doi.org/10.1007/s13691-017-0315-9>

Ohnishi YI, Iwatsuki K, Ishihara M, Ohkawa T, Kinoshita M, Shinzawa K, Fujimoto Y, Yoshimine T, Promotion of astrocytoma cell invasion by micro RNA-22 targeting of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2, J Neurosurg Spine, 査読有, 26(3), 2017, 396-403
DOI: 10.3171/2016.8.SPINE16248

Ninomiya K, Iwatsuki K, Ohnishi YI, Ohkawa T, Yoshimine T, Significance of the pars interarticularis in the cortical bone trajectory screw technique: An in vivo insertional torque study, Asian Spine J, 査読有, 10(5), 2016, 901-906

Ninomiya K, Iwatsuki K, Ohnishi Y, Ohkawa T, Yoshimine T, Clear Zone Formation around Screws in the Early Postoperative Stages after Posterior Lumbar Fusion Using the Cortical Bone Trajectory Technique, Asian Spine J, 査読有, Dec9(6), 2015, 884-888

Ohkawa T, Iwatsuki K, Ohnishi Y, Ninomiya K, Yoshimine T, Isthmus-guided Cortical Bone Trajectory Reduces Postoperative Increases in Serum Creatinine Phosphokinase Concentrations, Orthop Surg, 査読有, Aug7(3), 2015, 232-238
DOI: 10.1111/os.12189

Ninomiya K, Iwatsuki K, Ohnishi Y, Ohkawa T, Yoshimine T, Intranasal delivery of bone marrow stromal cells to spinal cord lesion, J Neurosurg Spine, 査読有, Jul23(1), 2015, 111-119
DOI: 10.3171/2014.10.SPINE14690

Ohnishi Y, Iwatsuki K, Ishihara M, Shikina T, Shinzawa K, Moriwaki T, Ninomiya K, Ohkawa T, Umegaki M, Kishima H, Yoshimine T, Isolation of human adult olfactory sphere cells as a cell source of neural progenitors, Stem Cell Res, 査読有, Jul15(1), 2015, 23-29
DOI: 10.1016/j.scr.2015.04.006

Ohnishi Y, Iwatsuki K, Ohkawa T, Ninomiya K, Moriwaki T, Yoshimine T, Differences between Cervical Schwannomas of the Anterior and Posterior Nerve Roots in Relation to the Incidence of Postoperative Radicular Dysfunction, Asian Spine J, 査読有, Apr9(2), 2015, 263-270
DOI: 10.4184/asj.2015.9.2.263

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。