

令和元年6月14日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05450

研究課題名(和文) 脊髄損傷後の自己修復メカニズムに関わる因子の同定と新規治療法の確立

研究課題名(英文) Cell-autonomous migration of macrophages via interferon regulatory factor 8 is crucial for the functional recovery after spinal cord injury

研究代表者

岡田 誠司 (Okada, Seiji)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30448435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷不全麻痺に於いては受傷後約1ヶ月程度まではかなりの運動機能回復が認められるが、細胞生物学的にどのようなメカニズムで脊髄損傷後の機能回復がもたらされるのかは殆ど解明されていなかった。我々は、脊髄損傷後に浸潤したマクロファージは、IRF8-プリン受容体を介した補体C5aへの能動的な走化性により損傷中心部へ移動することが組織修復に重要であり、このメカニズムが不全麻痺における神経機能の自然回復機構に寄与していること明らかにした。これらの結果はこれまでの治療法とは全くコンセプトの異なる新たな脊髄損傷に対する治療戦略を提唱している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経外傷に於いてはマクロファージなどの炎症細胞浸潤を認めるが、これらの浸潤してきた細胞の運命は殆ど解明されていなかった。我々は、脊髄損傷後の浸潤してきたマクロファージの能動的な移動が組織修復と運動機能回復に重要であることを見出した。この知見は中枢神経外傷に対する新しい治療戦略を提唱するのみならず、神経生理学や細胞生物学に於いても新規の知見であり、今後益々の細胞制御による病態治療研究の発展が期待されるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Traumatic spinal cord injury (SCI) brings numerous inflammatory cells, including macrophages, from the circulating blood to lesions, but the fate of these cells is unknown. We herein demonstrate that macrophages actively migrate toward the lesion epicenter after SCI, depending on the gradient of chemoattractant C5a. However, macrophages lacking interferon regulatory factor 8 (IRF8) can not migrate and remain widely scattered in the injured cord, resulting in a poor pathological and functional outcome. Conversely, pharmacological IRF8 activation promoted macrophage-autonomous migration with a significant increase in the purinergic receptors expression, thereby improving the functional recovery. Our findings revealed the importance of the bidirectional interaction between infiltrating macrophages and CNS cells, providing a novel therapeutic target for CNS injury.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：脊髄損傷 炎症細胞

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は患者に永続的な四肢麻痺や膀胱直腸障害を残す非常に悲惨な病態であるが、完全麻痺患者は受傷者全体の約 40%以下に過ぎない。残りの 60%以上は不全麻痺患者であり、これらの患者に於いては、受傷間もない時期は完全麻痺を呈するが、受傷後約 1ヶ月程度まではかなりの運動機能回復が認められる。この自然回復は『Spinal Shock からの離脱』という曖昧な理解がされるのみであり、細胞生物学的にどのようなメカニズムで脊髄損傷後の機能回復がもたらされるのかは殆ど解明されていなかった。

2. 研究の目的

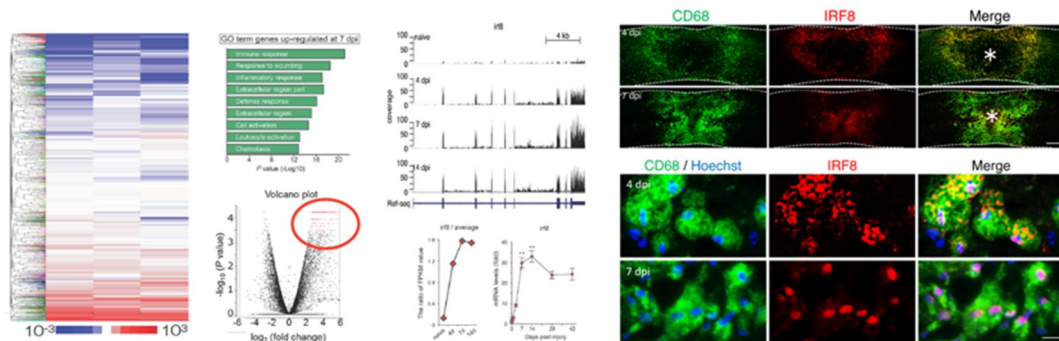
本研究の目的は、マウス不全麻痺せき損モデルに於いて機能回復が認められる時期に脊髄に発現している全遺伝子の網羅的な解析を行い、自己修復メカニズムに関わる因子を同定することで新規治療法開発へ繋げることである。

3. 研究の方法

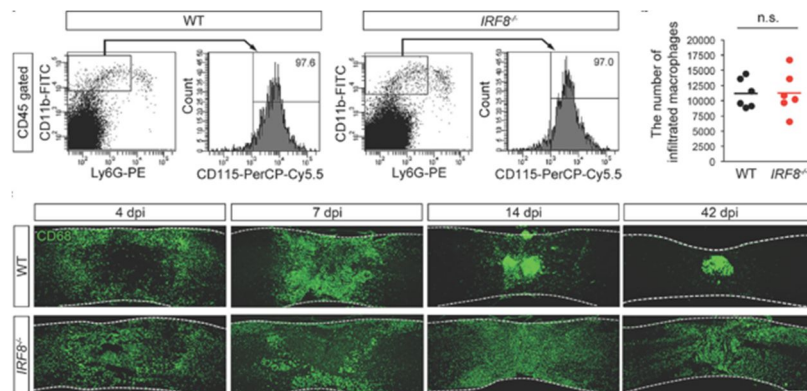
正常脊髄、損傷後 4 日、7 日、14 日の損傷脊髄における RNA-Seq を行い、約 2 万個の遺伝子に関して Heat map により視覚的にこの過程で発現上昇/低下する変異パターンを確認した。Cuffdiff 解析を行った結果、白血球遊走に関する 3 つの候補因子を同定し (IRF8, GP49a, Sul1)、このうち Wiggle plot でも特に発現上昇が維持されていた interferon regulatory factor 8(IRF8)について、脊髄損傷後の自己修復メカニズムに与える影響を解析した。

4. 研究成果

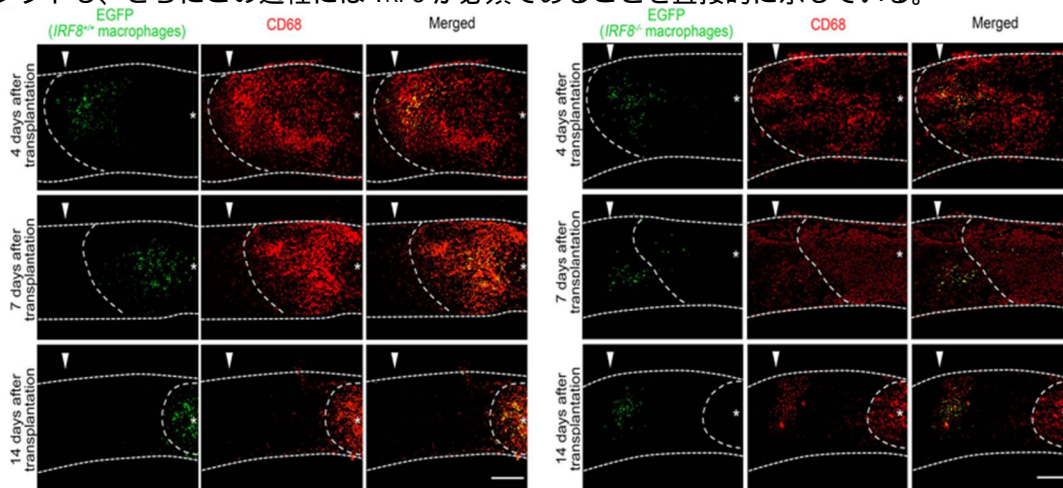
損傷脊髄において IRF8 はニューロンやグリア細胞には発現しておらず、損傷後に浸潤してくる CD68 陽性マクロファージおよび脊髄内在性のマクロファージであるミクログリアに発現が限定していた。興味深いことに下図右の如く、損傷後 4 日の時点では IRF8 は主に細胞質に存在するが、損傷後 7 日では核に集積するパターンを呈しており、IRF8 が転写因子であることを鑑みると損傷後 7 日から浸潤マクロファージに於いて IRF8 シグナルが ON となるものと考えられた。



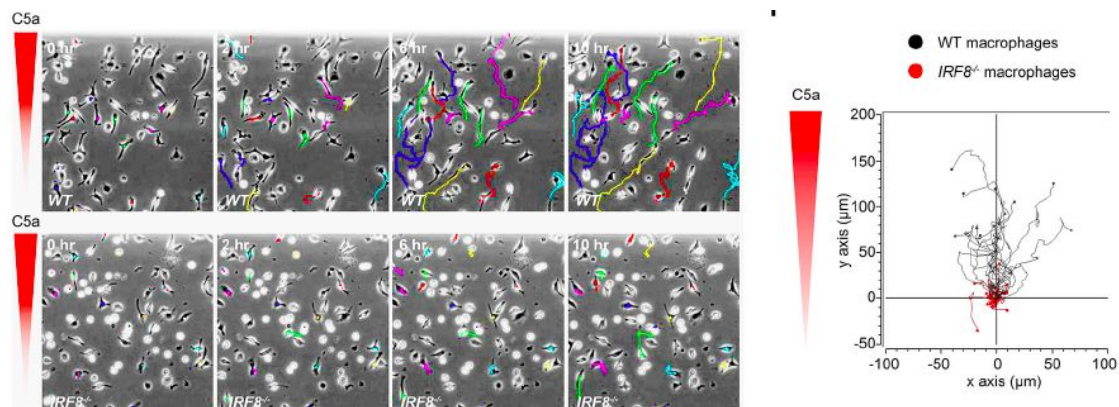
次に、IRF8 がせき損後の病態に与える影響を解析するために、IRF8 ノックアウト (KO) マウスを用いた脊髄損傷モデルを作成し、病理切片解析を行った。もともと IRF8 は単球系の細胞の分化に深く関わるということが報告されており、白血病分野で特に研究が進んでいる。しかし、脊髄損傷においては興味深いことに、浸潤してきた単球/マクロファージの数は同等であり、IRF8 が損傷後の浸潤に影響を与えないことは FACS を用いた定量的解析により確認している (下図)。注目すべきことに、野生型 (WT) マウスと IRF8 KO マウスでは、経時的な免疫組織切片解析の結果、脊髄損傷後に浸潤したマクロファージの分布過程が劇的に異なることが明らかとなった。すなわち、WT マウスにおいては損傷後 4~42 日にかけて、反応性アストロサイトが損傷中心部へ向かって migration することにより浸潤した CD68 陽性マクロファージは収束化 (compaction) されるが (Okada et al., Nat Med, 2006)、IRF8 KO マウスにおいてはこの compaction が著しく阻害されており、より広範囲に浸潤マクロファージが散在することが明らかとなった (下図)。



マクロファージの収束化は組織修復に重要であり、特にマクロファージの compaction が障害された STAT3 選択的欠損マウス (Nes-STAT3^{-/-}) に於いては著しい脱髄と著明な運動機能障害が生じることが分かっている (Nat Med, 2006)。この結果と同様に、マクロファージが広範囲に残存した IRF8KO マウスにおいては野生型マウスと比較して広範囲の脱髄領域が確認され、運動機能回復も障害されていた。なぜ、マクロファージの収束化が阻害されるのかの原因については、せき損後に浸潤したマクロファージ自身が損傷中心部へ向かって migration し、その過程に於いて IRF8 が必須であることを証明した。せき損後に浸潤したマクロファージが『移動』していることを示すために、我せき損後 3 日目に損傷部から頭側 2mm の位置に、異所性に GFP でラベルしたマクロファージを移植した。経時的な免疫染色の結果、GFP 陽性の正常マクロファージを移植した場合は、せき損後に浸潤して来たホストマクロファージと同様に徐々に損傷中心部へ向かってその分布はシフトしていったが、一方で IRF8KO マウス由来のマクロファージを移植した場合は移植細胞は移植部位に停滞し、ホストのマクロファージのみが損傷中心部へシフトしていた。この結果は、せき損後に浸潤して来たマクロファージ自身が能動的に損傷中心部へ徐々にシフトし、さらにこの過程には IRF8 が必須であることを直接的に示している。

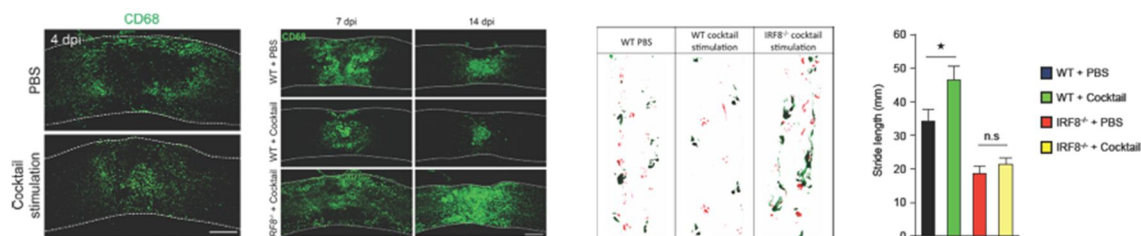


この IRF8 依存性のマクロファージ移動メカニズムを調べるためには、転写因子である IRF8 のターゲット遺伝子を同定する必要がある。標的遺伝子同定のための客観的網羅的特定手法である ChIP シークエンスにより IRF8 の標的遺伝子の探索を行った横浜市立大学との共同研究を行い、ADP 受容体である P2Y12 受容体を候補遺伝子の一つとして同定した。実際にマクロファージの走化性に関与するといわれる補体 C5a を用いた実験では、WT マウス由来のマクロファージは C5a 濃度勾配に従って migration するが、IRF8 KO マウス由来のマクロファージでは著しく走化性が低下していた (下図)。また、損傷脊髄切片に於いても C5a の分布は損傷中心部が最も高く、常に浸潤したマクロファージを中心に引きつけるように発現していた。ただし、C5a の受容体である C5ar1 および C5ar2 遺伝子発現は IRF8 KO マウスと WT マウスで差がなく、一方で P2Y12 受容体の発現は KO マウスで著しく低下していた。すなわち、C5a の刺激によって放出された ATP が加水分解されて ADP が産生されるが、IRF8 KO マウスにおいてはその標的である ADP 受容体 P2Y12 が発現しないためにマクロファージの走化性が障害され、脊髄損傷後の修復がなされなかったものと考えられた。

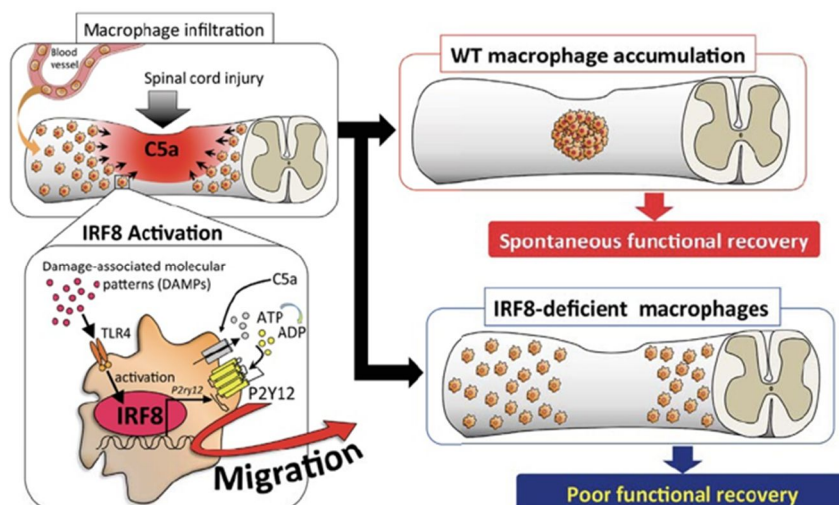


これらの知見から、逆に IRF8 を活性化することで脊髄損傷後の修復機転を高め、新規治療法の確立へと繋がるのではないかと考えた。IRF8 は IFN- γ と LPS の同時投与で活性が著しく高められることが既に報告されているため、WT マウスに対して両者の cocktail stimulation を行い、マクロファージの compaction と脊髄損傷後の運動機能予後が改善するかを検討した。Cocktail stimulation は亜急性期でのマクロファージの能動的凝集を促進させることが目的であるため、損傷後 2 日、4 日、6 日の時点での直接損傷中心部への投与を行った。その結果、下図に示すよ

うに既に損傷後4日の時点で対照群に比してマクロファージの収束化が既に認められ、細胞内に於ける IRF8 の核への凝集も確認された。さらに、損傷後7日および14日の時点でも両者で有意な差が認められ、foot print analysis による下肢運動機能評価に於いても有意な効果が確認できた。しかも、IRF8 KO マウスに cocktail stimulation を行ってもその効果は全く確認できなかった。また、IRF8 の活性化は脊髄後角部のマイクログリアを過剰に反応させ、アロディニアを引き起こすという報告があるため、paw withdrawal threshold を計測したが、コントロールと有意な差は認めなかった。



これらの結果をまとめると、下図のような Graphical abstract になる。脊髄損傷後に浸潤したマクロファージは、IRF8-プリン受容体を介した補体 C5a への能動的な走化性により損傷中心部へ移動することが組織修復に重要であり、このメカニズムが不全麻痺における神経機能の自然回復機構に寄与している。IRF8 シグナルの不活化は組織修復機構を破綻させ、脊損後の麻痺を重篤化させるが、逆に IRF8 シグナルの活性化は浸潤したマクロファージの中心部への移動を促進し、損傷後の組織修復と良好な機能回復に繋がる。



これらの結果は、これまでの治療法とは全くコンセプトの異なる新たな脊髄損傷に対する治療戦略を提唱している。以上の結果をまとめた論文は、Science Advances に掲載された (Kobayakawa et al., Science Adv.2019 May 15;5(5):eaav5086)。

5. 主な発表論文等 (計 24 件、すべて査読あり)

(研究代表者に下線、研究代表者が corresponding author の場合は*印)

1. Kobayakawa K, Ohkawa Y, Yoshizaki S, Tamaru T, Saito T, Kijima K, Yokota K, Hara M, Kubota K, Matsumoto Y, Harimaya K, Ozato K, Masuda T, Tsuda M, Tamura T, Inoue K, Edgerton VR, Iwamoto Y, Nakashima Y, Okada S*. Macrophage centripetal migration drives spontaneous healing process after spinal cord injury. Sci Adv. 2019 May 15;5(5):eaav5086. doi: 10.1126/sciadv.aav5086.
2. Baba S, Matsumoto Y, Kawaguchi K, Iida K, Saiwai H, Okada S, Matsunobu A, Shioyama Y, Nakashima Y. Post-carbon-ion radiotherapy vertebral pathological fractures in upper cervical primary malignant spinal tumors treated by occipito-cervical fusion. Arch Orthop Trauma Surg. 2019 Apr 3. doi: 10.1007/s00402-019-03183-x.
3. Kijima K, Kubota K, Hara M, Kobayakawa K, Yokota K, Saito T, Yoshizaki S, Maeda T, Konno D, Matsumoto Y, Nakashima Y, Okada S*. The acute phase serum zinc concentration is a reliable biomarker for predicting the functional outcome after spinal cord injury. EBioMedicine. 2019 Mar;41:659-669. doi:

- 10.1016/j.ebiom.2019.03.003.
4. Saiwai H, Okada S, Kawaguchi KI, Saito T, Hayashida M, Matsushita A, Matsumoto Y, Nakashima Y. Prone position surgery for a professional sumo wrestler with thoracic ossification of the posterior longitudinal ligament resulting in intraoperative brachial plexus injury by hypertrophic pectoral muscles. *J Clin Neurosci*. 2019 May;63:227-230. doi: 10.1016/j.jocn.2019.01.047.
 5. Yokota K, Kubota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Maeda T, Katoh H, Ohkawa Y, Nakashima Y, Okada S*. Pathological changes of distal motor neurons after complete spinal cord injury. *Mol Brain*. 2019 Jan 9;12(1):4. doi: 10.1186/s13041-018-0422-3.
 6. Yamada H, Ozawa T, Kishi H, Okada S, Nakashima Y, Muraguchi A, Yoshikai Y. B Cells Expressing Cyclic Citrullinated Peptide-Specific Antigen Receptor Are Tolerized in Normal Conditions. *J Immunol*. 2018 Dec 15;201(12):3492-3496. doi: 10.4049/jimmunol.1800826.
 7. Hara M, Yokota K, Saito T, Kobayakawa K, Kijima K, Yoshizaki S, Okazaki K, Yoshida S, Matsumoto Y, Harimaya K, Nakashima Y, Okada S*. Periostin Promotes Fibroblast Migration and Inhibits Muscle Repair After Skeletal Muscle Injury. *J Bone Joint Surg Am*. 2018 Aug 15;100(16):e108. doi: 10.2106/JBJS.17.01230.
 8. Bekki H, Harimaya K, Matsumoto Y, Kawaguchi K, Hayashida M, Okada S, Doi T, Nakashima Y. Which Side-Bending X-ray Position is Better to Evaluate the Preoperative Curve Flexibility in Adolescent Idiopathic Scoliosis Patients, Supine or Prone? *Asian Spine J*. 2018 Aug;12(4):632-638. doi: 10.31616/asj.2018.12.4.632.
 9. Kawaguchi K, Harimaya K, Matsumoto Y, Hayashida M, Okada S, Iida K, Kato G, Tsuchiya K, Doi T, Oda Y, Iwamoto Y, Nakashima Y. Effect of cartilaginous endplates on extruded disc resorption in lumbar disc herniation. *PLoS One*. 2018 Apr 17;13(4):e0195946. doi: 10.1371/journal.pone.0195946.
 10. Harada A, Maehara K, Ono Y, Taguchi H, Yoshioka K, Kitajima Y, Xie Y, Sato Y, Iwasaki T, Nogami J, Okada S, Komatsu T, Semba Y, Takemoto T, Kimura H, Kurumizaka H, Ohkawa Y. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. *Nat Commun*. 2018 Apr 11;9(1):1400. doi: 10.1038/s41467-018-03845-1.
 11. Yugué I, Okada S, Maeda T, Ueta T, Shiba K. Sensitivity and specificity of the 'knee-up test' for estimation of the American Spinal Injury Association Impairment Scale in patients with acute motor incomplete cervical spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2018 Apr;56(4):347-354. doi: 10.1038/s41393-017-0046-y.
 12. Okada S*, Hara M, Kobayakawa K, Matsumoto Y, Nakashima Y. Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury. *Neurosci Res*. 2018 Jan;126:39-43. doi: 10.1016/j.neures.2017.10.004.
 13. Iida K, Matsumoto Y, Setsu N, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Okada S, Nakashima Y. The neurological outcome of radiotherapy versus surgery in patients with metastatic spinal cord compression presenting with myelopathy. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2018 Jan;138(1):7-12. doi: 10.1007/s00402-017-2817-5.
 14. Saito T, Hara M, Kumamaru H, Kobayakawa K, Yokota K, Kijima K, Yoshizaki S, Harimaya K, Matsumoto Y, Kawaguchi K, Hayashida M, Inagaki Y, Shiba K, Nakashima Y, Okada S*. Macrophage Infiltration Is a Causative Factor for Ligamentum Flavum Hypertrophy through the Activation of Collagen Production in Fibroblasts. *Am J Pathol*. 2017 Dec;187(12):2831-2840. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.020.
 15. Matsumoto Y, Baba S, Endo M, Setsu N, Iida K, Fukushi JI, Kawaguchi K, Okada S, Bekki H, Isoda T, Kitamura Y, Honda H, Nakashima Y. Metabolic Tumor Volume by 18F-FDG PET/CT Can Predict the Clinical Outcome of Primary Malignant Spine/Spinal Tumors. *Biomed Res Int*. 2017;2017:8132676. doi: 10.1155/2017/8132676.
 16. Matsumoto Y, Shinoto M, Endo M, Setsu N, Iida K, Fukushi JI, Kawaguchi K, Okada S, Bekki H, Imai R, Kamada T, Shioyama Y, Nakashima Y. Evaluation of Risk Factors for Vertebral Compression Fracture after Carbon-Ion Radiotherapy for Primary Spinal and Paraspinal Sarcoma. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9467402. doi: 10.1155/2017/9467402.
 17. Renault-Mihara F, Mukaino M, Shinozaki M, Kumamaru H, Kawase S, Baudoux M, Ishibashi T, Kawabata S, Nishiyama Y, Sugai K, Yasutake K, Okada S, Nakamura M, Okano H. Regulation of RhoA by STAT3 coordinates glial scar formation. *J Cell Biol*. 2017 Aug 7;216(8):2533-2550. doi: 10.1083/jcb.201610102.
 18. Hara M, Kobayakawa K, Ohkawa Y, Kumamaru H, Yokota K, Saito T, Kijima K,

- Yoshizaki S, Harimaya K, Nakashima Y, Okada S*. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nat Med*. 2017 Jul;23(7):818-828. doi: 10.1038/nm.4354.
19. Semba Y, Harada A, Maehara K, Oki S, Meno C, Ueda J, Yamagata K, Suzuki A, Onimaru M, Nogami J, Okada S, Akashi K, Ohkawa Y. Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2017 Sep 6;45(15):8758-8772. doi: 10.1093/nar/gkx475.
 20. Yokoyama N, Matsunobu T, Matsumoto Y, Fukushi JI, Endo M, Hatano M, Nabeshima A, Fukushima S, Okada S, Iwamoto Y. Activation of ERK1/2 Causes Pazopanib Resistance via Downregulation of DUSP6 in Synovial Sarcoma Cells. *Sci Rep*. 2017 Mar 28;7:45332. doi: 10.1038/srep45332.
 21. Yokota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Ohkawa Y, Harada A, Okazaki K, Ishihara K, Yoshida S, Kudo A, Iwamoto Y, Okada S*. Periostin Promotes Scar Formation through the Interaction between Pericytes and Infiltrating Monocytes/Macrophages after Spinal Cord Injury. *Am J Pathol*. 2017 Mar;187(3):639-653. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.11.010.
 22. Saito T, Yokota K, Kobayakawa K, Hara M, Kubota K, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Matsumoto Y, Doi T, Shiba K, Nakashima Y, Okada S*. Experimental Mouse Model of Lumbar Ligamentum Flavum Hypertrophy. *PLoS One*. 2017 Jan 6;12(1):e0169717. doi: 10.1371/journal.pone.0169717.
 23. Matsumoto Y, Matsunobu T, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. Bone and soft tissue tumors presenting as sciatic notch dumbbell masses: A critical differential diagnosis of sciatica. *World J Clin Oncol*. 2016 Oct 10;7(5):414-419.
 24. Matsumoto Y, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. Dumbbell Scoring System: A New Method for the Differential Diagnosis of Malignant and Benign Spinal Dumbbell Tumors. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2016 Oct 15;41(20):E1230-E1236.

〔雑誌論文〕(計 24 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 岡田誠司. 反応性アストロサイトと脊髄修復. 第 51 回日本脊髄障害医学会 (2016.11.10-11 千葉).
2. 岡田誠司. グリア瘢痕形成メカニズムの解明と治療への応用. 第 52 回日本脊髄障害医学会. (2017.11.16-17 千葉).
3. 岡田誠司、原正光、小早川和、林田光正、川口謙一、飯田圭一郎、播広谷勝三、中島康晴. 脊髄損傷後のグリア瘢痕形成メカニズムの解明と治療への応用. 第 46 回日本脊椎脊髄病学会(2017.4.13-15 札幌).
4. 岡田誠司、幸博和、松下昌史、林田光正、川口謙一、中島康晴. マウスモデルを用いた黄色靭帯の肥厚メカニズム解析. 第 91 回日本整形外科学会学術総会 (2018.5.24-27, 神戸).
5. 岡田誠司、斉藤武恭、幸博和、松下昌史、林田光正、川口謙一、中島康晴. 黄色靭帯の肥厚メカニズム解明. 第 47 回日本脊椎脊髄病学会(2018.4.12-14 神戸).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/pathophysiology/index.html>

6 . 研究組織

- (1)研究分担者 なし
- (2)研究協力者 なし

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。