

令和元年5月20日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10839

研究課題名(和文) 損傷脊髄における小胞体ストレスとインフラマソームの関連およびその傷害作用

研究課題名(英文) The relationship between inflammasomes and the endoplasmic reticulum stress response in the injured spinal cord

研究代表者

渡辺 雅彦 (WATANABE, Masahiko)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：40220925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：外傷性脊髄損傷における障害は二次障害により拡大するが、その主体をなすのがアポトーシスであり、中枢神経では小胞体ストレスが重要な経路である。アポトーシスはオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の生存分化も障害し、再髄鞘形成を阻害する。小胞体ストレス応答に関わるインフラマソームの解析を行ったところ、損傷により有意に高値を示し、特にOPCで発現が高くOPCの小胞体ストレスに対する脆弱性はインフラマソームからも示された。また、小胞体ストレス応答能を増強する糖尿病薬GLP-1受動体作動薬の効果を検討したところ、下肢機能の改善とOPCの有意な生存分化をみとめ、今後の臨床応用に希望がもてる結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷性脊髄損傷における障害は二次障害により拡大するが、その主体をなすのがアポトーシスであり、中枢神経では小胞体ストレスが重要な経路である。アポトーシスは損傷の拡大に加えて、再生のために誘導・増殖されたオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の生存分化も障害し、再髄鞘形成を阻害する。すなわち損傷脊髄内でのグリア細胞のアポトーシス抑制が可能であれば、二次障害による損傷範囲拡大の軽減、再髄鞘形成による脊髄損傷後の麻痺の軽減へとつながる可能性がある。われわれは二次障害の主因である小胞体ストレス応答に着目し研究し良好な結果を得ており、今後の臨床応用を目指している。

研究成果の概要(英文)：Apoptosis is a key factor in the secondary injury process after spinal cord injury that aggravates the damage to the injured spinal cord, and endoplasmic reticulum stress is one of the main apoptosis pathways in the central nervous system. Apoptosis hinders the survival and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) that proliferate after spinal cord injury, impeding remyelination and functional recovery. We investigated the role of inflammasomes in the injured spinal cord, which is involved in the ER stress pathway, and showed significantly higher expression of inflammasomes after spinal cord injury, especially in OPCs. We also investigated the effect of a GLP-1 receptor agonist, which also enhances the ER stress response. GLP-1 receptor agonist administration enhanced OPC survival and differentiation and brought about improved motor function, showing great potential for the treatment of SCI.

研究分野：整形外科 脊椎・脊髄外科

キーワード：脊髄損傷 オリゴデンドロサイト オリゴデンドロサイト前駆細胞 小胞体ストレス応答 インフラマソーム

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

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷患者数は、全世界で 250 万人とされ、多くの患者が障害を抱え不自由な生活と苦難を強いられている。脊髄損傷遺残麻痺の軽減に向けて基礎的研究の進歩は目覚ましいが、損傷時の脊髄細胞障害と再生阻害の詳細なメカニズムについては未だ解明されていない点も多い。外傷性脊髄損傷において、一旦死滅した脊髄細胞を再び取り戻すには、損傷した部分への細胞移植が最も効果的と考えられる。しかし、細胞移植療法に関しては多くの基礎的実験結果は報告されているものの、臨床応用には未だ多くの課題が残されている。

外傷性脊髄損傷における障害は、外力による物理的破壊のみならず、これに引き続いて生じる二次障害で形成されることが知られている。実験的脊髄損傷モデルでは、直接的外力(一次障害)によって生じる脊髄組織の挫滅による物理的細胞破壊や出血性壊死とそれに引き続いて生じる生化学的、病理学的変化(二次障害)により損傷が拡大する現象が認められている(Watanabe et al., J Neurotrauma 1998)。二次障害の主体をなすのがアポトーシスである。さらにアポトーシスは再生のために誘導・増殖された細胞も障害する。われわれがこれまで行ってきた外傷性脊髄損傷における脱髄とオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化・誘導の検討では、脱髄部周囲でオリゴデンドロサイト前駆細胞は一時的に増殖するが、その後再髄鞘形成が得られない。(Watanabe et al., J Neurosci Res 2002, Watanabe et al., Glia 2004, Suyama et al., J Neurotrauma 2007) この要因の一つとして、増殖したオリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスが考えられる。これらアポトーシスを抑制することは、二次障害による損傷の拡大を軽減することのみならず、再生(再髄鞘形成)の意味においても大変重要となる。

中枢神経系におけるアポトーシスの経路として小胞体内におけるタンパク修飾異常が挙げられている。外傷のストレスにより小胞体内でのタンパク修飾異常が起こり、異常タンパクが集積しアポトーシスへ至る。この異常タンパクに対する自己防御機能として unfolded protein response(UPR)がある。UPR は小胞体シャペロン GRP78 が主体となるが、小胞体シャペロンの異常がアルツハイマー病や、パーキンソン病に大きく関与していることが報告されている。われわれは、グルタミン酸やツシカマイシンによるストレス下にグリア細胞の培養を行い、GRP78 の発現増強を確認した。その結果は、ストレスが軽度のうちは GRP78 により異常タンパクが分解されるが、ストレスが過度になるとその処理能力を超えてアポトーシスに至るという Larner らの報告と矛盾しない結果であった。また、遺伝子導入により GRP78 を強発現することによりアポトーシスを抑制することも報告した。(Suyama et al., Neuroscience Letters, 2011, PloS one, 2014) in vivo においても、損傷により脊髄細胞内に GRP78 が強発現し、その発現程度は細胞種により異なり、オリゴデンドロサイト前駆細胞では他の細胞種に比して有意に発現が低いことを証明した。(Matsuyama et al., Spinal Cord, 2014) また小胞体ストレス応答能を増強するとされる FDA で認可された利尿剤アミロライドの効果も報告した。アミロライドは培養オリゴデンドロサイト前駆細胞の小胞体ストレス応答能を高め、また in vivo でも GRP78 の発現を高め、オリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスを軽減した。(Kuroiwa et al., Eur J Neurosci, 2014) アミロライド投与で生存したオリゴデンドロサイトが、再髄鞘形成や後肢感覚機能障害の軽減にも影響していることを長期的観察にて証明し報告した。(Imai et al., Clinical Medicine, 2018)

また近年、細胞死を誘導する新たな経路としてインフラマソームを介した細胞死が注目されている。インフラマソームは、パターン認識受容体(NLRPs)、Caspase、ASC などから構成され、IL-1、IL-18 前駆体を切断・活性化し、細胞死(pyroptosis)を引き起こす。他分野では小胞体(ER)ストレスによるインフラマソームの活性化も報告されているが、損傷脊髄における

関連は未だ不明である。われわれはこれまでに、OPCがERストレスに対して脆弱であることを報告した。しかしながらOPCがなぜERストレスに対して脆弱であるのかという点については依然不明である。この解明を目的として、脊髄損傷モデルラットを用いて、細胞種ごとのインフラマソーム構成タンパクの発現を、免疫組織化学的に評価し検討した。

また近年、糖尿病薬として普及しているGLP-1受容体作動薬であるエキセナチドは、インスリン分泌能の改善に加え、アポトーシス抑制作用が報告されており、その要因としてERストレス応答能の改善がある。そのため、脊髄損傷後に対するGLP-1受容体作動薬の有効性とERストレスへの影響を調査した。

またGLP-1受容体作動薬の細胞保護作用は小胞体ストレス応答の増強だけでなく、マクロファージの分化、誘導に関わると、他分野で報告されている。そこで、損傷脊髄におけるGLP-1受容体作動薬のマクロファージ分化、誘導に対する作用機序に関しても調査した。

2. 研究の目的

(1) 損傷脊髄内における細胞種ごとのインフラマソーム発現の検討

(2) 脊髄損傷に対するGLP-1受容体作動薬の有効性とERストレスへの影響の検討

(3) 脊髄損傷に対するGLP-1受容体作動薬のマクロファージ極性への作用の検討

3. 研究の方法

(1) 損傷脊髄内における細胞種ごとのインフラマソーム発現の検討：

10週齢雌SDラットを用いて、IH-impacterを使用し、損傷強度を100kdyn(Low-degree injury group:LI)と200kdyn(High-degree injury group:HI)に分けて脊髄圧挫損傷モデルを作成した。損傷後1,3,7,14日に脊髄を摘出し凍結切片を作成した。インフラマソーム構成タンパクのマーカーとして、抗NLRP3, ASC, Caspase-2抗体を用い、各種細胞マーカー抗体(抗NG2, GFAP, NeuN抗体)を用いて蛍光二重免疫染色を施行し、損傷強度と、細胞種ごとのインフラマソーム構成タンパクの発現を比較検討した。

(2) 脊髄損傷に対するGLP-1受容体作動薬の有効性とERストレスへの影響の検討

10週齢雌SDラットでIH-Impactorを用いて200kdyn胸髄圧挫損傷モデルを作成し、脊髄損傷のみのコントロール群、損傷直後と7日後にエキセナチド10 μ gを皮下注射したエキセナチド群、そして椎弓切除のみのSham群を比較検討した。脊髄損傷前後と隔日での血糖値を測定し、後肢機能評価をBBBスコアで行った。損傷後3,7,14日に脊髄を摘出し、Western blot, 免疫染色で小胞体ストレス関連蛋白の発現を比較し、OPCの細胞数を調査した。

(3) 脊髄損傷に対するGLP-1受容体作動薬のマクロファージ極性への作用の検討。

10週齢雌SDラットでIH impactorを用いて胸髄圧挫損傷モデルを作成し、損傷直後にExenatide 10 μ gを皮下注射したエキセナチド群、脊髄損傷直後にPBS 1mlを皮下注射したコントロール群とし、両群ともに損傷後7日に2回目のExenatide/PBSの皮下注射を行った。損傷後に隔日でBBB scoreを測定し、後肢機能を評価した。損傷後1,3,7,14日に脊髄を摘出し、M1 phenotype(iNOS)・M2 phenotype(Arginase1)を用いた二重染色を行った。

4. 研究成果

(1) 損傷脊髄内における細胞種ごとのインフラマソーム発現の検討

損傷群におけるインフラマソーム構成蛋白の発現は、非損傷群に比べて、損傷後1,3,7日において有意に高値を示した($P<0.01$)。しかし損傷強度別の比較においては、両者に有意な差は認めなかった。損傷後1,3,7日のOPCにおけるNLRP3, ASC, Caspase-2の発現率は、損傷群が非損傷群と比較し有意に高かった($P<0.01$)。また損傷後1日におけるOPCでのNLRP3, ASC, Caspase-2の発現率は、アストロサイトと比較して有意に高値を示した($P<0.01$)。TXNIPの発現は、損傷後1日目と3日目において、LI群HI群の両群において、sham群と比較し有意に高

値を示した。LI 群と HI 群の間には有意な差はなかった。

(2) 脊髄損傷に対する GLP-1 受動体作動薬の有効性と ER ストレスへの影響の検討

エキセナチド投与群は損傷後 7 日以降、コントロール群と比較し有意に BBB スコアの改善を認めた ($p < 0.01$)。低血糖は発生せず、3 群間で血糖値に有意差はなかった。Western blot では損傷後 3 日で GRP78 発現量が有意に増加し、14 日で CHOP 発現量が有意に減少し、免疫染色で同様の結果が得られた ($p < 0.01$)。OPC 細胞数は 14 日においてエキセナチド投与群で有意に高かった。

(3) 脊髄損傷に対する GLP-1 受容体作動薬のマクロファージ極性への作用の検討。

BBB score による後肢機能はエキセナチド投与群において 7 日以降に有意な改善を認めた ($p < 0.01$)。iNOS 陽性細胞は両群とも 14 日にかけて経時的に増加していく傾向にあった。両群間に有意差はないものの、エキセナチド投与群でやや増加が小さかった。Arginase1 陽性細胞はエキセナチド投与群で 3, 7 日に有意に増加しており ($p < 0.05$)、14 日では減少傾向にあったが、コントロール群と比較すると細胞数はやや多い結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

著者名: Sho Yanagisawa, Hiroyuki Katoh, Takeshi Imai, Satoshi Nomura, Masahiko Watanabe

表題名: The relationship between inflammasomes and the endoplasmic reticulum stress response in the injured spinal cord.

雑誌: Neuroscience Letters

発表年月日: 2019 年 4 月 15 日

著者名: Takeshi Imai, Hiroyuki Katoh, Kaori Suyama, Masahiro Kuroiwa, Sho Yanagisawa, Masahiko Watanabe

表題名: Amiloride Promotes Oligodendrocyte Survival and Remyelination after Spinal Cord Injury in Rats

雑誌: Journal of Clinical Medicine

発表年月日: 2018 年 3 月 5 日

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) 発表者名: Satoshi Nomura, Hiroyuki Katoh, Takeshi Imai, Toshihiro Noguchi, Masahiko Watanabe

発表課題: The effect of the GLP-1 receptor agonist on spinal cord injury - by enhancing the ER stress response

学会等名: Orthopaedic Research Society 2019

発表年月日: 2019 年 2 月 2 日

発表場所: Austin Convention Center

(2) 発表者名: 野村慧、加藤裕幸、野口俊洋、今井洸、黒岩真弘、渡辺雅彦

発表課題: 脊髄損傷における GLP-1 受容体作動薬の作用-小胞体ストレス応答能の増強-

学会等名: 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会

発表年月日: 2018 年 10 月 11 日

発表場所: 奈良春日野国際フォーラム

(3) 発表者名: Masahiko Watanabe, Satoshi Nomura, Hiroyuki Katoh

発表課題: Administration of the GLP-1 receptor agonist exenatide enhances the ER stress response and improves functional recovery after spinal cord injury

学会等名 : 57th ISCOS

発表年月日 : 2018 年 9 月 14 日

発表場所 : ICC Sydney

(4) 発表者名 : Satoshi Nomura, Hiroyuki Katoh, Takeshi Imai, Toshihiro Noguchi, Masahiko Watanabe

発表課題 : The effect of the GLP-1 receptor agonist on spinal cord injury - by enhancing the ER stress response

学会等名 : Orthopaedic Research Society 2018

発表年月日 : 2018 年 03 月 12 日

発表場所 : Hyatt Regency New Orleans

(5) 発表者名 : 加藤裕幸、野村慧、柳澤聖、今井洸、渡辺雅彦

発表課題 : 脊髄損傷に対する GLP-1 受容体作動薬の治療効果

学会等名 : 第 52 回日本脊髄障害医学会

発表年月日 : 2017 年 11 月 17 日

発表場所 : 三井ガーデンホテル千葉

(6) 発表者名 : Satoshi Nomura, Hiroyuki Katoh, Takeshi Imai, Sho Yanagisawa, Masahiko Watanabe

発表課題 : The effect of the GLP-1 receptor agonist on spinal cord injury - by enhancing the ER stress response

学会等名 : Neuroscience 2017

発表年月日 : 2017 年 11 月 14 日

発表場所 : Washington Convention Center

(7) 発表者名 : 野村慧、加藤裕幸、柳澤聖、今井洸、黒岩真弘、渡辺雅彦

発表課題 : 脊髄損傷における GLP-1 受容体作動薬の効果と小胞体ストレス応答による作用の解明

学会等名 : 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会

発表年月日 : 2017 年 10 月 27 日

発表場所 : 沖縄コンベンションセンター

(8) 発表者名 : Sho Yanagisawa, Hiroyuki Katoh, Takeshi Imai, Satoshi Nomura, Masahiko Watanabe

発表課題 : Activation of NLRP3 inflammasomes in a rat spinal cord injury model.

学会等名 : ORS 2017

発表年月日 : 2017 年 3 月 20 日

発表場所 : San Diego Convention Center

(9) 発表者名 : Sho Yanagisawa, Hiroyuki Katoh, Takeshi Imai, Masahiko Watanabe

発表課題 : Activation of NLRP3 inflammasomes in a rat spinal cord injury model.

学会等名 : neuroscience2016

発表年月日 : 2016 年 11 月 14 日

発表場所 : San Diego Convention Center

(10) 発表者名 : 柳澤聖、加藤裕幸、今井洸、黒岩真弘、渡辺雅彦

発表課題 : 損傷脊髄におけるインフラマソーム構成タンパクの発現-細胞種による違い-

学会等名 : 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会

発表年月日：2016年10月13日

発表場所：福岡国際会議場

(11)発表者名：柳澤聖、加藤裕幸、今井洸、隅山香織、黒岩真弘、渡辺雅彦

発表課題：損傷脊髄におけるインフラマソーム構成タンパクの発現

学会等名：第35回日本運動器移植再生医学研究会

発表年月日：2016年9月24日

発表場所：広島県医師会館

〔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

6.研究組織

(2)研究分担者

研究分担者氏名：加藤 裕幸

ローマ字氏名：KATOH, Hiroyuki

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：40348678

研究分担者

研究分担者氏名：隅山 香織

ローマ字氏名：SUYAMA, Kaori

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20433914

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。