

令和 元年 6 月 3 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16457

研究課題名(和文)メカノセンサーCasによるミクログリア活性制御を介する脊髄損傷後の神経可塑性調節

研究課題名(英文)Regulation of neuroplasticity after spinal cord injury via mechanosensor Cas-dependent regulation of microglial activity

研究代表者

市原 克則 (ICHIHARA, Yoshinori)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50710711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミクログリア活性は、リハビリによる神経機能の回復に関与する神経可塑性の制御に重要である。損傷脊髄でのミクログリアの活性にメカニカルストレスが寄与するかを明らかにするために、細胞培養実験と動物実験を行った。その結果、ミクログリアと同系統の細胞であるマクロファージはメカニカルストレスに反応するが、メカニカルストレスの種類により反応が異なることが明らかとなった。さらに、損傷慢性期の脊髄の瘢痕部でのミクログリアは、その周囲とは異なるメカニカルストレスを受けている可能性が示唆された。以上より、メカニカルストレスが損傷脊髄でのミクログリア活性を制御する因子の1つとして機能する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ミクログリアと同系統の細胞であるマクロファージがメカニカルストレスに反応すること、損傷脊髄でミクログリアが部位ごとに多様なメカニカルストレスを受けている可能性が示唆された。これは、損傷脊髄でのメカニカルストレスの役割を解明する一助となるものであり、将来のメカニカルストレス制御を標的としたリハビリテーション法の確立の基盤となることや、リハビリ効果の分子メカニズムの解明につながるものである。

研究成果の概要(英文)：The microglia activity is important for neuronal plasticity, which relates to the recovery of neural function after rehabilitation. The contribution of mechanical stresses to the microglial activity in the injured spinal cord was investigated by in vitro and in vivo experiments. I clarified that macrophages, in which microglia is categorized, have the ability to respond to mechanical stress and differently respond to each kind of mechanical stresses. Moreover, the microglia around the scar area might receive mechanical stress differently to another area. These findings might indicate the contribution of mechanical stress to microglial activity in the injured spinal cord.

研究分野：神経科学

キーワード：ミクログリア マクロファージ メカニカルストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷慢性期での神経可塑性の低下・リハビリ効果に対してミクログリア活性による組織環境調節が関与する可能性

脊髄損傷による神経機能の障害に対し、これまでに失った機能の再獲得を目指して、ニューロリハビリテーションの基本概念である神経可塑性の誘導と、それに伴う神経細胞同士の接続(シナプス)の新生・強化が試みられてきた。基礎的研究でも損傷近位部での側枝形成とシナプス結合が機能回復に影響すると報告されている(Courtin et al, Nat Med, 2008)。臨床でも、神経細胞同士の可塑性誘導を目的として、様々な機器等を利用したリハビリテーションによって神経活動の誘導が行われてきており、一定の効果が得られている。しかし、可塑性の誘導が顕著に認められる期間は限定的であり(亜急性期)、損傷後十分に時間が経過した慢性期では神経可塑性は低下している(Karimi-Abdolrezaee et al, J Neurosci, 2010)。

一方で脊髄組織には神経細胞の周囲にグリア細胞が豊富に存在しており、組織環境を調節することで、神経機能を制御している。グリア細胞の中でもミクログリアはいわゆる炎症反応制御だけでなく、生理的に必要な神経細胞の保護のための増殖因子の分泌等によっても組織環境の調節を担っている。さらに近年、ミクログリア活性がシナプスの結合強化を制御することが報告されている(Schafer et al, Neuron, 2012)。しかし、リハビリテーションによる神経回路再構築や脊髄損傷慢性期に認められる神経可塑性の低下とミクログリア活性の関係は不明である。

損傷組織内の変化「硬化」が、ミクログリア活性を介して神経可塑性に関与する可能性

亜急性期と慢性期の組織環境の変化の一つとして損傷部の瘢痕形成が挙げられる。慢性期の損傷脊髄では組織内に变性部や瘢痕部が形成されて、損傷後の脊髄組織は「硬く」なっており、その部分では神経の可塑性が阻害されている。脊髄と同じ神経組織である脳において、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硬くなっていくことが報告されており(De Vivo L et al., Nat Commun, 2013)、神経組織の硬さと神経可塑性の関連が示唆されている。しかし、硬さ、つまり周囲の物性等の「メカニカルストレス」がどのように神経組織の可塑性変化をもたらすのかは不明である。

異なる物性の培養条件下でミクログリアの機能制御に関わる転写因子 NF- κ B の局在が変化する(図1)。NF- κ B は核内に移行することで機能を発揮することから、損傷脊髄において慢性的に硬化していること自体がミクログリア活性を変化させる可能性が考えられる。また近年、物性を感知する分子、すなわち細胞が周囲から受けるメカニカルストレスを検知する分子として、メカノセンサー-p130Cas (以下、Cas) が報告された(Sawada et al., Cell, 2006)。分子の伸展というメカニカルストレスにより Cas はリン酸化を受ける。しかし、脊髄組織内で実際にミクログリアが物性を検知し、Cas や NF- κ B 等のメカニカルストレス関連分子を介して、その活性を調節しているかは不明である。

on Glass (2-4 GPa) on Gel (6 kPa)



硬いガラス上では核内に、柔らかいゲル上では細胞質内にGFP (p65)が局在する。

図1. GFP-NF- κ B (p65)を発現させた線維芽細胞
実験医学増刊, 33: 1617-1625, 2015.より引用改変

2. 研究の目的

メカニカルストレスがミクログリアの活性を制御し、脊髄損傷後に認める脊髄組織環境変化に寄与しているかを明らかにすることを目的とする。また、リハビリテーションがメカニカルストレスによるミクログリア活性制御に介入しうるかを解明する。

3. 研究の方法

脊髄損傷モデルマウス

8週齢の雄性 C57BL/6J マウスに対し、IH impactor を用いて、脊髄損傷モデルを作成した。なお、損傷部位は T10 で、損傷強度は 60 kdyne で行った。損傷の 8 週間後に 4% PFA を還流し、凍結切片を作成して、免疫染色法によりミクログリアでの Cas のリン酸化を評価した。

免疫染色法

4% PFA 還流後、4% PFA に 1 日浸漬し、脊髄組織を固定した。さらに、20%スクロースおよび 30%スクロースに浸漬したのち、10 μ m の切片を作製した。1 次抗体は Iba1 (abcam, ab5076) およびリン酸化 Cas (Tyr165) を使用した。2 次抗体は Alexa 488, or 568 conjugated anti-mouse, rabbit, or goat antibody (Life technologies) を使用した。なお、検出には蛍光顕微鏡 (BX-9000、キーエンス) を使用した。

初代培養腹腔マクロファージの細胞培養

8-10 週齢の雌性 C57BL/6J マウスに、3% チオグリコレートを腹腔内投与した。3 日後、腹腔に PBS 5mL を腹腔に投与し、腹腔マクロファージを回収した。回収した腹腔マクロファージを

100 xg で 5 分間遠心分離し、10% FBS を混合した RPMI-1640 で培養した。培養翌日に LPS (100 ng/mL) を 24 時間処置した後、シアストレス (平均強度 0.5 Pa、0.5 Hz、30 分) を付加した。6 時間後に mRNA を抽出し、炎症反応を評価した。

培養細胞へのシアストレス負荷

ペリスタポンプを用いて細胞培養液を動かすことで、細胞に対して液流によるシアストレスを付加した (pulsatile fluid shear stress、FSS; Yoshino et al., JBSE, 2013)。なおシアストレスの条件は、平均強度 0.5 Pa、0.5 Hz、30 分とした。

Realtime RT-PCR

ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出し、PrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ) を使用して cDNA に逆転写した。その後、Prism 7500 (Applied Biosystems) を用いて、mRNA 発現量を評価した。なおその際、 $\Delta\Delta Ct$ 法により、GAPDH で補正した遺伝子発現量を算出した。Primer は以下の配列のものを使用した。Gapdh; 5' -TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' (forward) and 5' - GGATGCAGGGATGATGTTCT-3' (reverse), Mcp-1; 5' -GCTCTCTTCTCCACCAC-3' (forward) and 5' -GCTTCTTTGGACACCTGCT-3' (reverse)。

4. 研究成果

損傷脊髄の癒痕近傍部でのミクログリアにおける、メカニカルストレス変化の可能性 -リン酸化 Cas を指標として-

Cas はメカニカルストレスによりリン酸化を受けるメカノセンサーと考えられている。また、脊髄損傷後は、神経可塑性の高い亜急性期と、その後の可塑性の低い慢性期に分類されるが、亜急性期と慢性期の組織環境の変化の一つとして損傷部の癒痕形成が挙げられる。慢性期の損傷脊髄では組織内に癒痕が形成されて、損傷後の脊髄組織は「硬く」なっており、特にその部分では神経の可塑性が阻害されている。これらのことから、可塑性の低い損傷慢性期の癒痕部において、細胞が受けるメカニカルストレスが変化しているという仮説を立てた。そこで、未損傷脊髄と慢性期の損傷脊髄において、Cas のリン酸化が変化するかを、免疫染色法により評価した。

その結果、未損傷脊髄では、Iba1 陽性のミクログリアにおいて Cas のリン酸化が認められた (図 2)。さらに脊髄損傷 8 週後の慢性期において、損傷中心部の Iba1 陽性ミクログリアでも Cas のリン酸化を認めたことに加え、癒痕部近傍の Iba1 陽性ミクログリアにおいて、遠位部の Iba1 陽性ミクログリアに比べてさらに強く Cas のリン酸化を認めた (図 3)。つまり、硬さを含むメカニカルストレスにより起こると示唆される Cas のリン酸化が、脊髄損傷慢性期の損傷中心部近傍の癒痕部近傍でより強く認められた。この結果は、ミクログリアの Cas による組織の物性の感知の可能性、およびメカニカルストレスによる Cas を介したミクログリア活性制御とそれに伴う神経可塑性制御の可能性を示すものである。これらの変化は脊髄損傷慢性期の病態の一端を担うものであると、考えられる。

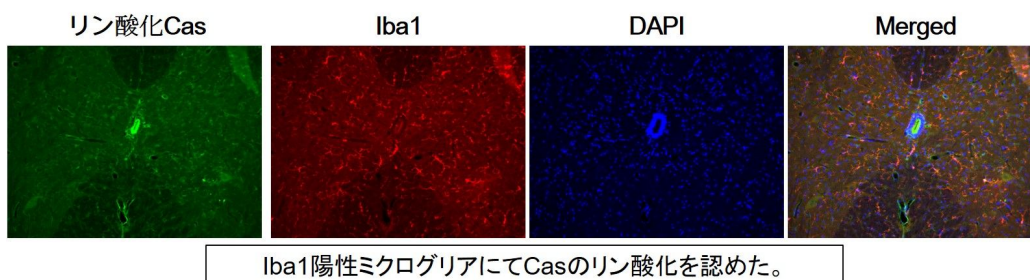


図2. マウスでの未損傷脊髄の組織染色

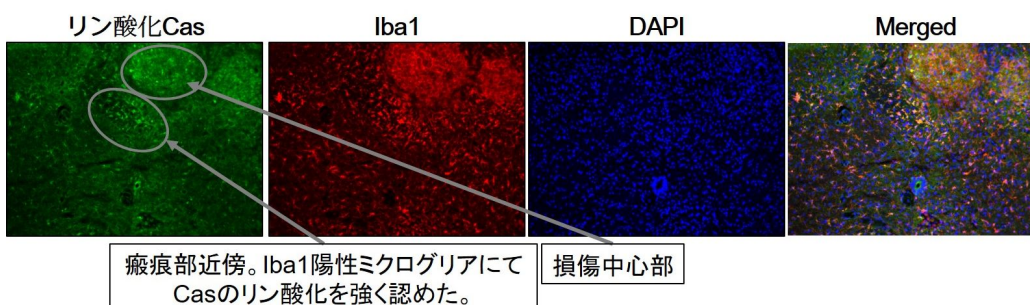


図3. 脊髄損傷8週後のマウス脊髄の組織染色

メカニカルストレスはその mode により、マクロファージの炎症反応を異なって制御する
ミクログリアはマクロファージ系譜細胞である。そのため、簡便にマウスから採取可能な初

代培養マクロファージ細胞として、チオグリコレート誘導性腹腔マクロファージを採取した。培養マクロファージに種々のメカニカルストレスを負荷したところ、MCP1 mRNA 発現量を指標とした LPS 誘導性炎症反応は、その後の静水圧負荷により増加した一方、同程度の強度のシアストレス負荷により低下した (図 4)。この結果は、ミクログリアと同系統の細胞であるマクロファージはメカニカルストレスに反応すること、メカニカルストレスの種類によりその反応に差異が生じることを示す。

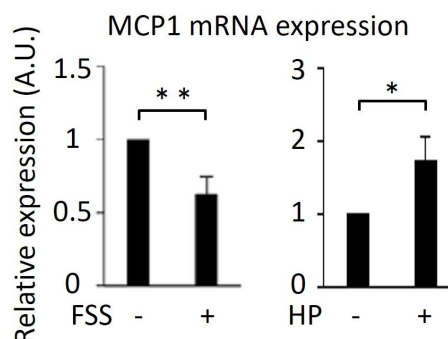


図4. LPS誘導性炎症反応はシアストレス(FSS)負荷により低下するが、静水圧(HP)負荷により増加した。Clinical Science, 132: 2147-2161, 2018. より引用改変

まとめ

以上のことから本研究により、ミクログリアと同系統の細胞であるマクロファージはメカニカルストレスに反応すること、またマクロファージはメカニカルストレスの種類により異なる反応を示すことが明らかとなった。さらに、損傷慢性期の脊髄の瘢痕部でのミクログリアは、メカニカルストレスを受けていることが示唆され、メカニカルストレスが損傷脊髄での組織環境因子の1つとしてミクログリアの機能に影響している可能性が考えられた。本結果は、損傷脊髄でのメカニカルストレスの役割を解明する一助となるものであり、将来のメカニカルストレス制御を標的としたリハビリテーション法の確立の基盤となることや、リハビリ効果の分子メカニズムの解明につながるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

Saitou K, Tokunaga M, Yoshino D, Sakitani N, Maekawa T, Ryu Y, Nagao M, Nakamoto H, Saito T, Kawanishi N, Suzuki K, Ogata T, Makuuchi M, Takashima A, Sawada K, Kawamura S, Nakazato K, Kouzaki K, Harada I, Ichihara Y, Sawada Y. Local Cyclical Compression Modulates Macrophage Function In Situ and Alleviates Immobilization-Induced Muscle Atrophy. Clin Sci (Lond). 132: 2147-2161, 2018. 査読あり

DOI : 10.1042/CS20180432.

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. 232: 986-995, 2017. 査読あり

DOI : 10.1002/jcp.25690.

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. 12: e0171937, 2017. 査読あり

DOI : 10.1371/journal.pone.0171937.

Sawada Y, Ichihara Y, Harada I. Mechanical Regulation and Maintenance of Organismal Homeostasis - Scientific Basis for Health Promotion by Physical Motility and Exercise. Juntendo Medical Journal. 62 (Suppl 1): 50-56, 2016. 査読なし

DOI : 10.14789/jmj.62.s50

〔学会発表〕(計 2件)

市原克則、澤野達哉、笹岡利安、今村武史 SHIP2 が視床下部インスリンシグナルを介した摂食行動に与える影響の解明と、SHIP2 を標的とした新規耐糖能改善薬の開発 日本薬理学会西南支部第 70 回例会 (鹿児島) 2017 年 11 月

若手優秀発表賞受賞

市原克則、笹岡利安、今村武史 5'-リピッドホスファターゼ SHIP2 が摂食行動に与える影響の解明 第 24 回市大フォーラム (大阪) 2017 年 8 月

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.tottori-u.ac.jp/molpharm/>

<https://researchmap.jp/ichihara0416/>

6. 研究組織

- (1) 研究分担者
- (2) 研究協力者

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。