

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19969

研究課題名(和文)カベオリン1発現調節による固縮軽減の試み - ラット脊髄虚血モデルにおける検討 -

研究課題名(英文) Spasticity reduction trial by caveolin 1 over-expression therapy; Rat ischemic paraplegia model

研究代表者

神里 興太 (Kamizato, Kota)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10554454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット下肢麻痺モデルを作成し神経を成長させる因子であるカベオリンを脊髄神経で多く産生させることで麻痺の改善が得られるか検討を行った。
手術は我々が開発した「軟膜下投与方法」を実施することで脊髄を傷つけることなく治療を完遂することができた。手術手技を改良し、新たな注入用の機材(新しい針)を開発し報告した。神経細胞上でカベオリンは多く産生され、神経は成長していたが運動は改善しなかった。

研究成果の概要(英文)：Rat motor dysfunction model (hind-limb paraplegia model) were chosen in our study. Neuro growth factor (caveolin 1) were provided to remaining neurons by intracellular caveolin production. Subpial injection was used for virus delivery. It is new and efficient method for gene delivery.
Axonal grow from remained neurons were confirmed. We can not show motor recovery with caveolin over expression in rat paraplegia model.

研究分野：神経科学

キーワード：対麻痺 カベオリン

1. 研究開始当初の背景

胸部下行大動脈遮断による脊髄虚血は、胸腹部大動脈手術後の最も悲惨な合併症である。対麻痺を来しそれは患者および家族の生活に多大な損害を与える。血管外科手術で最も困難な領域であるため、現在でもその予防ならびに治療に関して世界中で様々な研究が行われている。しかし、血管外科医および麻酔科医はこの合併症の予防および治療について様々な手段を講じているが、その発生率はいまだ約 5-30%と報告されており、いまだ解決できない領域となっている。

一方、最近従来行われてきた開胸術を伴う直達手術を必要としない大動脈ステント内挿術の普及によって、これまでは経過観察されてきたハイリスクな患者への血管内治療が急増している。ステント内挿術においても対麻痺は重要な術後合併症である (Ann Thorac Surg 2005;80:1280-9) ことが報告されている。そのため、今後対麻痺に対する介入の重要性はますます高まると思われる。

2. 研究の目的

<ラット脊髄虚血モデルと固縮>

我々は、以前よりラット脊髄一過性虚血モデルを用いた研究を進めており、痙性対麻痺を呈するラットモデル作成法を確立している。我々のモデルでは分水嶺に存在する介在型抑制性神経細胞の脱落が起こることで興奮性と抑制性のバランスの破綻が生じ、固縮を呈する。そのため我々は脊髄における「抑制性神経伝達の増強」と「興奮性神経伝達の抑制」に関して治療法を検討、報告してきた。また、移植細胞を抑制性神経に分化させることで運動異常を軽減させることにも成功した。

一方、一過性脊髄虚血モデルにおける免疫組織学的検討では、分水嶺に存在する介在型抑制性神経細胞は減少するものの完全に脱落するわけではない。そのため、新たなネットワークの構築は運動機能を改善させうると考えられる。

<下行性運動神経に対する遺伝子導入>

我々は、脊髄における下行性運動神経（皮質脊髄路、赤核脊髄路、網様体脊髄路など）に対しアデノ随伴ウイルスセロタイプ 9 (AAV9) をベクターとして用いる高効率遺伝子導入法（軟膜下遺伝子導入法）を開発した。この方法を用いることで、一度の遺伝子導入手術により AAV9 による感染を腰髄ほぼ全ての神経細胞・軸索で成立させることが可能である。具体的には下部頸髄を椎弓切除により露出し硬膜切開後に軟膜下にウイルスベクターを注入、閉創することで運動機能に影響を与えることなく遺伝子の導入が可能となった。

<カベオリンと軸索の伸長>

マウス初代神経培養を用いた研究では、カベオリン 1 タンパクを過剰発現させることで神経細胞からの軸索伸長を促進させる。また、野生型マウス海馬にカベオリン 1 遺伝子を過剰発現させることで軸索の総量を増加させることにも成功し、電気生理学的にも細胞間のネットワークも増大していた（ともに未発表データ）。カベオリン 1 過剰発現マウスでは脳損傷後の障害領域が小さくなることも判明した (Egawa J, FASEB J. 2017 Aug;31(8):3403-3411. doi:10.1096/fj.201601288RRR.)。

しかしながらこれまで脊髄においてカベオリン 1 タンパク発現を制御することで機能回復を試みた検討はほとんど見られない。

3. 研究の方法

1) 一過性脊髄虚血後痙性麻痺モデルラットに対するカベオリン 1 (Cav1) 過剰発現による鎮痙効果

アデノ随伴ウイルス (AAV9) を用いた遺伝子導入による Cav1 の過剰発現による固縮の改善を電気生理学的に検討する。

2) 痙性対麻痺モデルの作成：

雄性 SD ラットを空気 + イソフルランによる麻酔後、2F Fogarty カテーテルを左大腿動脈から挿入する（約 11cm で胸部下行大動脈へ到達）。左内頸動脈から 20G テフロン針を挿入する。Fogarty カテーテルの先端バルーンを膨らませ大動脈を遮断し、同時に左内頸動脈から脱血し低血圧（40mmHg）にすることで 10 分間の脊髄虚血を行う。（Taira, Stroke 27:1850-8, 1996）虚血後麻酔から覚醒させ、数日間観察し、痙性対麻痺を呈したラットを使用する。

3) CAV1 過剰発現のためのウイルス注入とそれによる鎮痙効果の評価：

痙性麻痺をきたしたラットを空気 + イソフルランによる麻酔後、椎弓固定器により固定する。固定後に第 10 および 11 胸椎の椎弓を顕微鏡下に歯科用ドリルで切除する（Th10-11 椎弓切除術）。椎弓切除後に硬膜切開を加え、その後軟膜を切開する。軟膜切開部位よりポリエチレン性細径カテーテル（PE-5）を 1.0cm 尾側に挿入する。経カテーテル的にアデノ随伴ウイルス（AAV9-Syn-CAV1）を注入し Cav1 遺伝子を導入する（対照群として AAV9-Syn-RFP/GFP を用いる）。ウイルス注入後はカテーテルを抜去し、閉創する。

4) 痙性対麻痺の評価：(8w まで週 1 回計測)

運動機能評価法である BBB score を用いて評価した後、SpasticityMeter、運動誘発電位 (MEP) や Hoffman 反射を用いて痙性の強さと脊髄における電気生理学的状態を評価する。

痙性が改善した場合、改善の持続がどの程度になるのか継続的に評価する。

2) 痙性対麻痺ラット脊髄における Cav1 の過剰発現による痙性の改善に関する分子生物学的・組織学的研究

) AAV9-Syn-CAV1 による遺伝子導入による Cav1 過剰発現に関する分子生物学的検討

痙性対麻痺ラット脊髄を用い検討する。脊髄虚血後 1 日 (n=6) 遺伝子導入後 7 日 (n=6)、遺伝子導入後 42 日 (n=6) で検討を行う。ラットはペントバルビタールで犠殺後、経心臓的に冷生理食塩水(ヘパリン加)で全身灌流後、新鮮脊髄組織(腰髄膨大部)を採取する。

採取した新鮮脊髄組織から membrane lipid raft 上の Cav1 の量を計測するため、蔗糖密度勾配遠心法で fraction4 及び 5 の分画の Cav1 の量を定量する。

) AAV9-Syn-CAV1 による組織中での Cav1 組織学的変化についての検討

痙性対麻痺ラット脊髄を用い検討する。脊髄虚血後前(n=6)、虚血後 1 日(n=6)、遺伝子導入後 7 日(n=6)、遺伝子導入後 21 日(n=6)、遺伝子導入後 42 日(n=6)で検討を行う。ラットはペントバルビタールで犠殺後、経心臓的に冷生理食塩水(ヘパリン加)で全身灌流後、4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定する。固定後に脊髄を摘出し、30%スクロース溶液による処理を行った後に凍結切片を作成する。

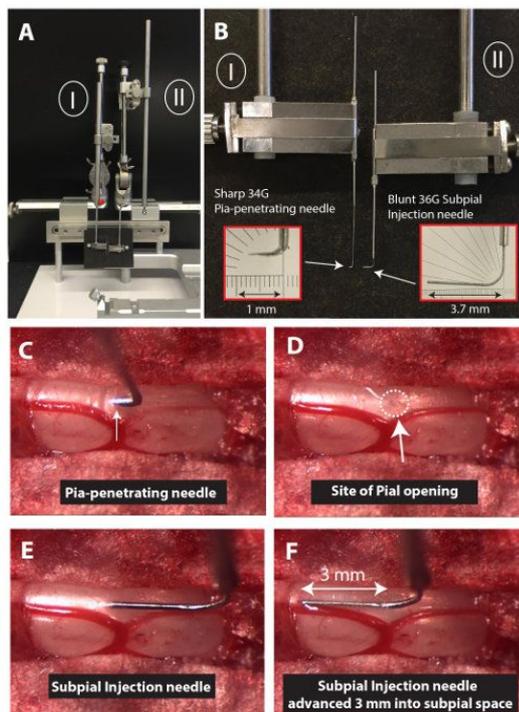
凍結切片を用い,Cav1,Synaptophysin,MAP2 各種抗体や NeuN,GFAP,Iba1 を用いて免疫組織染色を施行する。それぞれの酵素の経時変化、局在性を顕微鏡下(蛍光およびレーザー共焦点顕微鏡下)に観察する。

4. 研究成果

一過性脊髄虚血後痙性麻痺モデルラットに対するカベオリン1過剰発現による鎮痙効果アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入による Cav1 の過剰発現による固縮の改善を電気生理学的に検討した。痙性対麻痺モデルの作成:雄性 SD ラットを空気+イソフルランによる麻酔後、2F Fogarty カテーテルを左大腿動脈から挿入した(約 11 cm で胸部下行大動脈へ到達)。左内頸動脈から 20G テフロン針を挿入した。Fogarty カテーテルの先端バルーンを膨らませ大動脈を遮断し、同時に左内頸動脈から脱血し低血圧にすることで 10 分間の脊髄虚血を行った。虚血後麻酔から覚醒させ、数日間観察し、痙性対麻痺を呈したラットを使用した。CAV1 過剰発現のためのウイルス注入と鎮痙効果の評価:痙性麻痺をきたしたラットを空気+イソフルランによる麻酔後、顕微鏡下に Th 10-11 椎弓切除術を施行した。椎弓切除後に硬膜及び軟膜を切開した。軟膜切開部位よりポリエチレン性細径カテ

ーテル(PE-5)を 1.0cm 尾側に向けて挿入した。経カテーテル的に AAV9-Syn-CAV1 を注入した(対照群として AAV9-Syn-RFP/GFP を用いる)。ウイルス注入後はカテーテルを抜去し、閉創した。

29 年度中に手術法(ウイルス注入方法)に関して以下の通り改良した。手術法の改良:手術に際し、注入用カテーテルで神経障害をきたした経験はなかったものの、より低侵襲な遺伝子導入を目指しポリエチレン PE-5 カテーテルよりもさらに細い 35G 注入針を開発、論文として発表した。



痙性対麻痺の評価:運動機能評価法である BBB score を用いて評価した後、運動誘発電位を用いて痙性の強さと脊髄における電気生理学的状態を評価した。その結果 BBB スコアが改善する傾向を示した。一方で運動誘発電位は有意差がなく、さらなる検討が必要な状況である。

CAV1 過剰発現のためのウイルス注入と鎮痙効果の評価:痙性麻痺をきたしたラットを空気+イソフルランによる麻酔後、顕微鏡下に Th10-11 椎弓切除術を施行した。椎弓切除後に硬膜及び軟膜を切開した。軟膜切開部位より 35G 注入針を 0.5cm 尾側に向けて挿入した。経カテーテル的に AAV9-Syn-CAV1 を注入した(対照群として AAV9-Syn-RFP/GFP を用いた)。ウイルス注入後は抜去し、閉創した。

痙性対麻痺の評価:運動機能評価法である BBB スコアが改善する傾向を示した。一方で運動誘発電位は有意差がなく、さらなる検討が必要な状況である。

分子生物学的・組織学的検討:

AAV9-Syn-CAV1によるCav1組織学的変化についての検討を行なった。痙性対麻痺ラット脊髄を用い検討した。脊髄虚血後前, 虚血後1日, 遺伝子導入後7日, 遺伝子導入後21日, 遺伝子導入後42日で検討した。

脊髄凍結切片を用い, Cav1, Synaptophysinを用いて免疫組織染色を施行した。(DAPI/NeuNも実施)ウイルス投与群において早期から脊髄全体でのCav1シグナルの増加が認められた。経時的にSynaptophysinの密度増加も合わせて確認することができた。

組織学的にCAV1の増加と軸索の伸長が認められたにもかかわらず電気生理学的に確認できなかった。興奮性神経と抑制性神経双方にCAV1が作用した可能性があり, このような結果が得られたと考えられる。

現在興奮性神経伝達物質と抑制性神経伝達物質のバランスを評価するべく, 脳脊髄液サンプルからグルタミン酸とアミノ酪酸の濃度測定を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- 1) Tadokoro T, Miyanohara A, Navarro M, Kamizato K, Juhas S, Juhasova J, Marsala S, Platoshyn O, Curtis E, Gabel B, Ciacci J, Lukacova N, Bimbova K, Marsala M. Subpial Adeno-associated Virus 9 (AAV9) Vector Delivery in Adult Mice. *J Vis Exp*. 2017 Jul 13;(125). doi: 10.3791/55770.(査読あり)
- 2) Miyanohara A, Kamizato K, Juhas S, Juhasova J, Navarro M, Marsala S, Lukacova N, Hruska-Plochan M, Curtis E, Gabel B, Ciacci J, Ahrens ET, Kaspar BK, Cleveland D, Marsala M. Potent spinal parenchymal AAV9-mediated gene delivery by subpial injection in adult rats and pigs. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016 Jul 13;3:16046. doi: 10.1038/mtm.2016.46. eCollection 2016. (査読あり)

〔学会発表〕(計2件)

- 1) Yoshizumi T, Kamizato K, Platoshyn O, Navarro MR, Marsala S, Ciacci JD, Marsala M. Potent & long-lasting suppression of muscle spasticity by spinal subpial AAV9-mediated VGAT and GAD65 gene delivery in a rat thoracic 9 transection model of chronic spasticity. *Neuroscience2016*, 2016
- 2) Bravo Hernandez M, Yoshizumi T, Navarro

MR, Kamizato K, Tadokoro T, Platoshyn O, Marsala S, Ciacci JD, Mazur C, Marsala M. A potent anti-spastic effect after intrathecal NK1 antisense oligonucleotide or subpial AAV9-NK1-ShRNA delivery in rats with chronic spinal transection-induced muscle spasticity. *Neuroscience2016*, 2016

〔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

- (1) 研究代表者
神里 興太 (KOTA KAMIZATO)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 10554454
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
なし