

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10931

研究課題名(和文)小胞体ストレスセンサーOASISを介した脊髄損傷後グリオシス機構の解明と制御

研究課題名(英文)Elucidation and control of gliosis mechanism after spinal cord injury via endoplasmic reticulum stress sensor OASIS

研究代表者

亀井 直輔 (Kamei, Naosuke)

広島大学・病院(医)・准教授

研究者番号：70444685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス脊髄損傷モデルに対するOASISのsiRNA投与による一時的なOASISの発現抑制によって、損傷後のグリオシスが抑制され、脊髄機能回復が抑制されることが明らかとなった。また、損傷部周囲に集積したアストロサイトにおいてOASISの発現上昇を認めた。一方、持続的なOASIS欠損の影響を評価するためにOASISノックアウトマウスを用いた。野生型マウスと比べてOASISノックアウトマウスで損傷7日以降の後肢運動機能の改善が有意に高かった。組織学的評価の結果から、OASISを介した小胞体ストレス応答はアストログリオシスには関係しないが、その後のグリア瘢痕形成に強く関係していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

損傷された脊髄が再生しないと言われている最大の原因がグリア瘢痕の形成であると考えられている。そのグリア瘢痕が形成されるメカニズムにOASISを介した小胞体ストレス応答が関与していることが本研究で明らかとなった。本研究における知見を発展させてOASISを介した小胞体ストレス応答のコントロールによってグリア瘢痕を抑制することができれば、脊髄損傷の治療開発におけるブレイクスルーとなり、新たな治療ターゲットとなり得る。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the relationship between endoplasmic reticulum (ER) stress mediated by old astrocyte specifically induced substance (OASIS) and astrogliosis in spinal cord injury (SCI). We used siRNA of OASIS and mice deficient for OASIS in SCI models. In a mouse model of spinal cord contusion injury, a significant increase in OASIS mRNA on day 7 and an increase in protein on days 7 and 14 was observed in injured spinal cords. Furthermore, siRNA injection inhibited astrogliosis and hindlimb motor function recovery. On the other hand, functional recovery was better in the OASIS-deficient mice than in the wild-type mice after SCI. OASIS deletion did not inhibit astrocyte migration but reduced the excessive accumulation of N-cadherin-expressing reactive astrocytes that formed the glial scar around the injury site. In addition, OASIS deletion increased the number of serotonin-positive axons in spinal cord regions caudal to the injury site.

研究分野：整形外科

キーワード：脊髄損傷 小胞体ストレス OASIS グリオシス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

いったん損傷された脊髄の自己修復は困難であり、臨床において脊髄修復を促進する有効な治療法は存在しない。

損傷脊髄の修復にとって最大の障壁は過剰なグリオシスによって形成されるグリア瘢痕である。脊髄損傷後の細胞死によって損傷部のアストロサイトはいったん失われ、その後アストロサイトの新生・遊走によってグリオシスが起る。損傷後早期でのグリオシスは損傷部へと流入してきた炎症細胞を取り囲んで分布拡大を抑制し、機械的損傷（一次損傷）に引き続いて起る炎症などによる二次損傷を抑制する役割を持つ。しかし、損傷部における過剰なグリオシスによってグリア瘢痕が形成され、物理的に神経軸索の伸長が阻害されるとともに、さらにコンドロイチン硫酸などの軸索伸長を阻害する細胞外基質が産生される。これまでに幹細胞移植などの様々方法で脊髄再生治療が試みられ、損傷後急性期から亜急性期では動物実験や臨床研究で一定の治療効果が示されてきているが、慢性期における治療ではグリア瘢痕に阻まれて十分な再生効果が得られない。脊髄再生研究におけるブレークスルーのためには、適切なグリオシスの制御によるグリア瘢痕形成の抑制が重要な鍵となる。

本研究では脊髄損傷後のグリオシスの制御機構として小胞体ストレス応答に着目した。

組織が傷害されると、細胞の小胞体の中に不良タンパクが蓄積して細胞にダメージを与える「小胞体ストレス」が起こる。これに対応するために細胞には「小胞体ストレス応答」と呼ばれる防御システムが備わっており、小胞体ストレス応答のシグナルを核や細胞質に伝える分子が「小胞体ストレスセンサー」である。小胞体ストレスセンサーにはあらゆる細胞にユビキタスに発現するものと、特定の細胞に特異的に発現するものがあり、小胞体ストレスセンサーOASISは中枢神経においてアストロサイト特異的に発現している（文献1）。また、OASISを介した小胞体ストレス応答がアストロサイトの分化を促進することも報告されている（文献2）。さらに脳損傷において、OASISが反応性アストロサイトに発現する軸索伸展阻害因子であるGSPGの発現を促進することも報告された（文献3）Okuda H, Imaizumi K et al. *J Neurochem* 2014）。

これらのことから、OASISを介した小胞体ストレス応答が、脊髄損傷部におけるグリオシスに強く関連している可能性が推測された。

### 2. 研究の目的

アストロサイトに特異的に発現する小胞体ストレスセンサーOASISを介した脊髄損傷後のグリオシスの機構を解明する。

### 3. 研究の方法

実験1. 脊髄損傷後のOASISの発現量の変化と発現分布の評価

#### ① マウス脊髄損傷モデルの作製

C57BL/6マウスに10胸椎椎弓切除を行い、IHインパクトで脊髄の圧挫損傷を作製する。

② 損傷後1, 3, 7, 14日に損傷部脊髄組織からRNAおよびタンパクを抽出し、real-time PCRとウェスタンブロットでOASISの発現を評価し、椎弓切除のみを行ったSham群と比較する。

③ 脊髄損傷後7日に脊髄組織切片を作製し、OASIS, GFAPに対する抗体を用いた免疫染色を行い、OASISの発現分布について評価する。

実験2. OASIS欠損がグリオシスと脊髄機能回復に与える影響

#### ① マウス脊髄損傷モデルの作製

脊髄損傷後5日目に損傷脊髄にOASISのsiRNAを注入して一時的なOASISの発現低下モデルを作製する。また、持続的なOASIS発現欠損モデルとしてOASISノックアウトマウスに対して、上記と同様に脊髄損傷を作製する。

② 脊髄損傷後1, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42日にBasso mouse scale (BMS)を用いたスコアリングによる後肢の運動機能評価を行う。

③ 実験1でOASISの発現上昇が認められる時期にあわせて、損傷部脊髄組織からRNAおよびタンパクを抽出し、real-time PCRとウェスタンブロットでOASISの発現を評価する。

④ 脊髄損傷後7, 14, 42日に脊髄組織切片を作製し、GFAP, F4/80, N-cadherin, cleaved caspase-3, MBP, 5HTに対する抗体を用いた免疫染色を行い、グリオシスの進展、マクロファージの浸潤、グリア瘢痕形成、アポトーシス、軸索再生などについて評価する。

### 4. 研究成果

#### ① 脊髄損傷後のOASISの発現変化

野生型マウスでの脊髄損傷部におけるOASISの発現を損傷後1, 3, 7, 14日に評価したところ、mRNAレベルでは損傷後7日目に有意に発現が上昇し、14日目には発現が低下していた(図1)。タンパクレベルでは損傷後7日目と14日目に有意に発現が上昇していた(図2)。発現上昇のタイミングは脊髄損傷後のグリオシスの経過と一致していると考えられた。

図 1

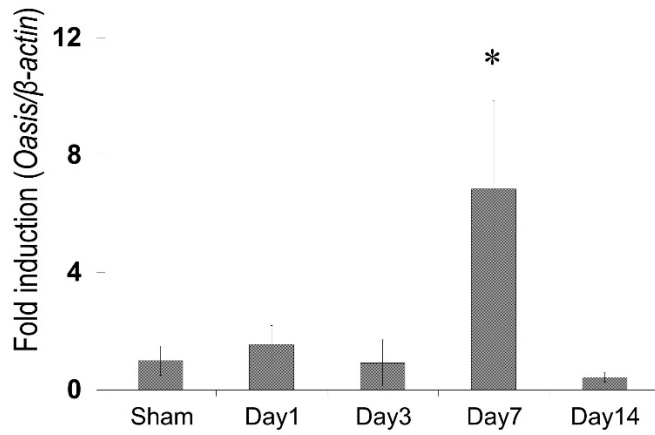
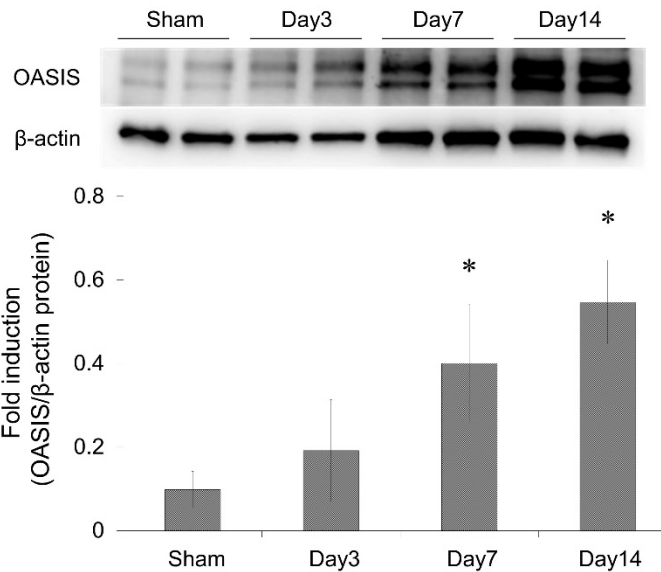
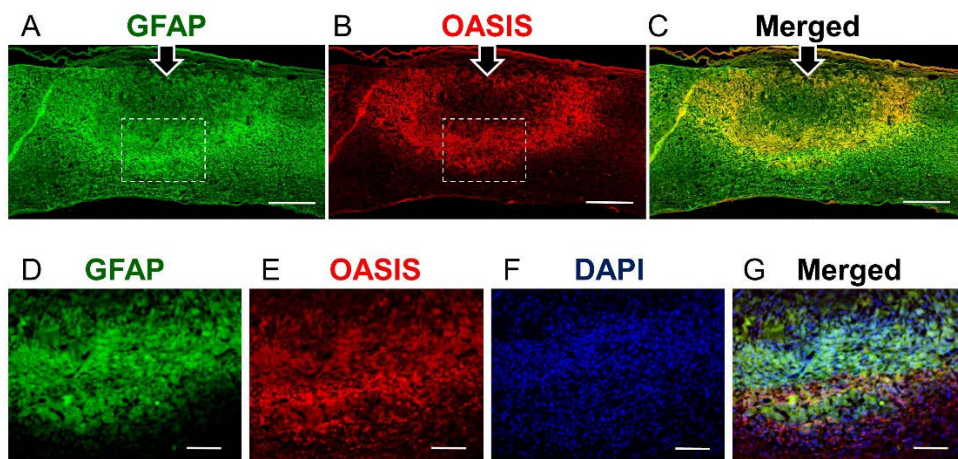


図 2



次に損傷後 7 日目の脊髓損傷部の切片で免疫染色を行ったところ、脊髓損傷部周囲に GFAP 陽性アストロサイトの集積を認め、その領域に一致して、OASIS 陽性細胞の集積も認めた (図 3)。脊髓損傷後のグリオシスに関与しているアストロサイトに OASIS が著明に発現していると考えられ、グリオシスへの OASIS 発現上昇の関与が示唆された。

図 3



② 一時的な OASIS 発現抑制による影響

損傷後 5 日目に損傷脊髓に OASIS の siRNA を注入したモデルを作製した。siRNA の投与によって損傷後 7 日目では OASIS の mRNA の発現が有意に抑制され (図 4)、タンパクレベルでは損傷後 7, 14 日目で OASIS の発現が有意に抑制されていた (図 5)。損傷後 7, 14 日目における GFAP 免疫染色の結果では、siRNA の投与によって脊髓損傷後のグリオシスが明らかに抑制され、損傷部周囲のアストロサイトの修正が減少していた (図 6)。さらに、BMS による運動機能評価では、siRNA の投与によって損傷 7 日目以降の運動機能の回復が低下していた (図 7)。

これらの結果から、マウス脊髓損傷モデルに対する OASIS の siRNA 投与による一時的な OASIS の発現抑制によって、損傷後のグリオシスが抑制され、脊髓機能回復が抑制されるこ

とが明らかとなった。また、OASIS は損傷部周囲に集積したアストロサイトに主に発現上昇が起こっていることが明らかとなった。(文献4)

図 4

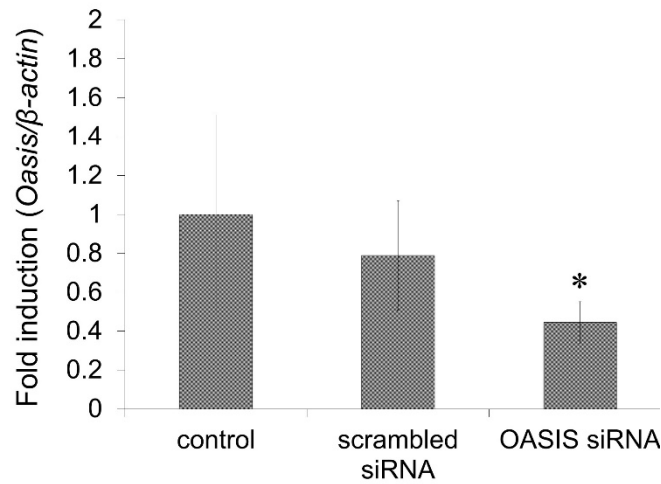


図 5

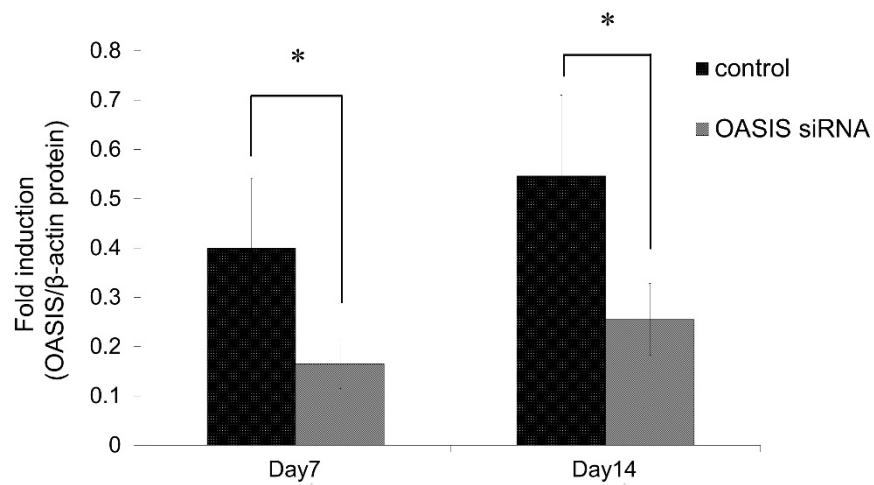


図 6

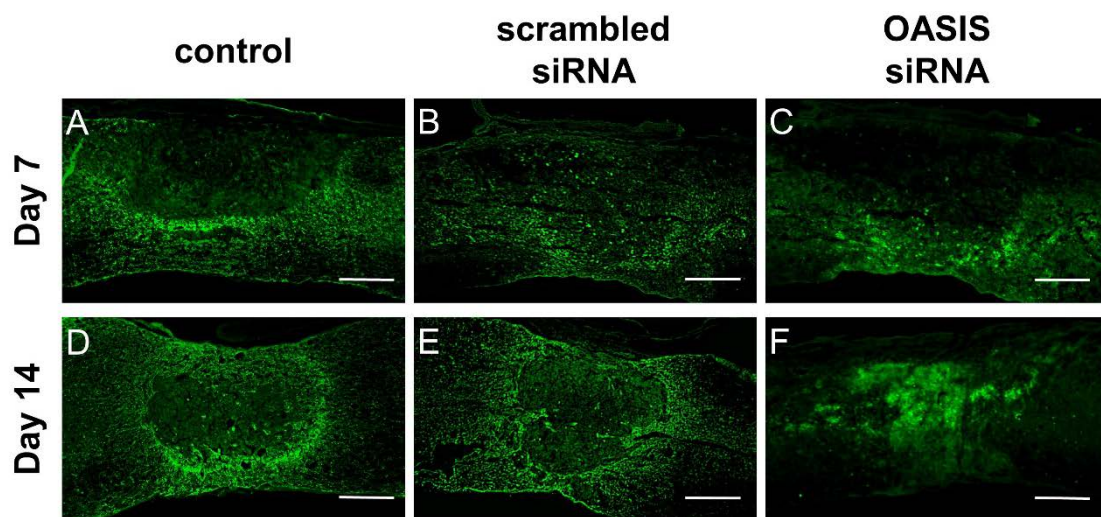
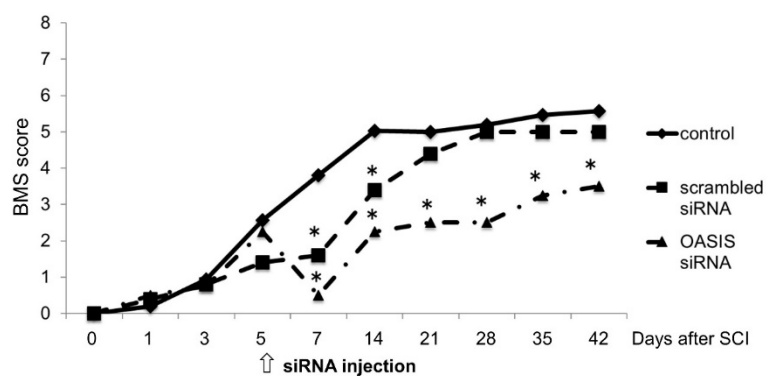


図 7





### ③ 持続的な OASIS 発現欠損による影響

次に OASIS ノックアウトマウスでの脊髄損傷モデルを作製して、持続的な OASIS 欠損が脊髄損傷後のグリオシスにどのような影響を与えるかについて検討した。

まず、BMS による運動機能評価では、siRNA による一時的な発現抑制とは反対に野生型マウスに比べて OASIS ノックアウトマウスの方が損傷後 7 日目以降に有意に運動機能の回復が上昇していた。

脊髄損傷後の免疫染色では、損傷後 7 日における GFAP および Nestin による未成熟アストロサイトの免疫染色での評価で、OASIS ノックアウトによるアストロサイト発生への影響は認められなかった。さらに損傷後 14 日での GFAP による免疫染色で損傷部周囲へのアストロサイトの遊走や F4/80 陽性マイクロファージの集積においても OASIS ノックアウトの影響は認められなかった。ただし、損傷部周囲に集積した GFAP 陽性アストロサイトの集積濃度が OASIS ノックアウトマウスにおいて低いという特徴が認められた (図 8)。そこで、損傷後 42 日において GFAP および N-cadherin による免疫染色を行い、グリア瘢痕形成に関連する N-cadherin 陽性のアストロサイトの面積が OASIS ノックアウトマウスにおいて有意に小さかった (図 9)。これらのことから OASIS を介した小胞体ストレス応答はグリア瘢痕形成への最も強く寄与していることが示唆された。(文献 5)

図 8

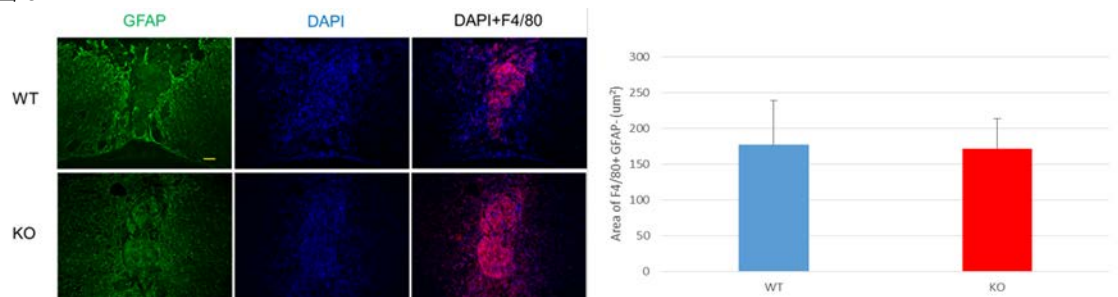
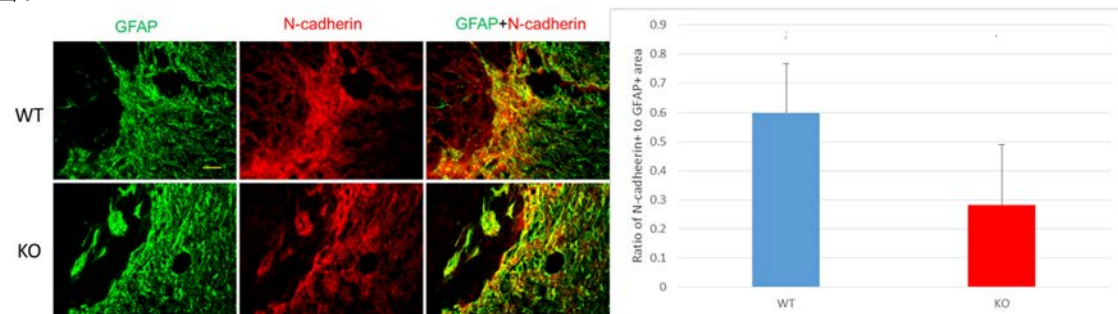


図 9



#### <引用文献>

1. Kondo S, Imaizumi K et al., OASIS a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes, *Nat Cell Biol.* 2005; 7(2):186-194
2. Saito A, Imaizumi K et al., Unfolded protein response, activated by OASIS family transcription factors, promotes astrocyte differentiation, *Nat Commun.* 2012; 3:967
3. Okuda H, Imaizumi K et al., OASIS regulates chondroitin 6-O-sulfotransferase 1 gene transcription in the injured adult mouse cerebral cortex, *J Neurochem.* 2014; 130(5):612-625
4. Takazawa A, Kamei N et al., Endoplasmic reticulum stress transducer old astrocyte specifically induced substance contributes to astrogliosis after spinal cord injury, *Neural Regen Res.* 2018;13(3):536-540
5. Sumida Y, Kamei N et al., The endoplasmic reticulum stress transducer old astrocyte specifically induced substance positively regulates glial scar formation in spinal cord injury, *Neuroreport.* 2018; 29(17):1443-1448

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

|                                                                                                                                                                     |                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sumida Y, Kamei N, Suga N, Ochi M, Adachi N                                                                                                               | 4. 巻<br>29              |
| 2. 論文標題<br>The endoplasmic reticulum stress transducer old astrocyte specifically induced substance positively regulates glial scar formation in spinal cord injury | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Neuroreport                                                                                                                                               | 6. 最初と最後の頁<br>1443-1448 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1097/WNR.0000000000001128                                                                                                             | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                                                                                                                              | 国際共著<br>-               |

|                                                                                                                                                      |                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takazawa A, Kamei N, Adachi N, Ochi M                                                                                                      | 4. 巻<br>13            |
| 2. 論文標題<br>Endoplasmic reticulum stress transducer old astrocyte specifically induced substance contributes to astrogliosis after spinal cord injury | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Neural Regeneration Research                                                                                                               | 6. 最初と最後の頁<br>536-540 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.4103/1673-5374.228759                                                                                                  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）                                                                                                                | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

|                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Naosuke Kamei, Yoshikazu Sumida, Nobuo Adachi                                                   |
| 2. 発表標題<br>Relationship between endoplasmic reticulum stress and astrogliosis following spinal cord injury |
| 3. 学会等名<br>The 28th Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium（国際学会）                                   |
| 4. 発表年<br>2018年                                                                                            |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>亀井直輔                  |
| 2. 発表標題<br>脊髄損傷の治療研究へのマイクロRNAの応用 |
| 3. 学会等名<br>第18回運動器科学研究会          |
| 4. 発表年<br>2017年                  |

|                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Naosuke Kamei, Yoshikazu Sumida, Kazuyoshi Nakanishi, Nobuo Adachi                                               |
| 2. 発表標題<br>Deletion of endoplasmic reticulum stress sensor OASIS inhibits the glial scar formation after spinal cord injury |
| 3. 学会等名<br>第48回日本脊椎脊髄病学会学術集会                                                                                                |
| 4. 発表年<br>2019年                                                                                                             |

|                             |
|-----------------------------|
| 1. 発表者名<br>亀井直輔             |
| 2. 発表標題<br>脊髄損傷の診断と治療       |
| 3. 学会等名<br>広島臨床骨関節研究会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2019年             |

|                                        |
|----------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>亀井直輔                        |
| 2. 発表標題<br>夢から現実となりはじめた再生医療            |
| 3. 学会等名<br>第251回広島県臨床整形外科医会研修講演会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2020年                        |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 味八木 茂<br><br>(Miyaki Shigeru)<br><br>(10392490) | 広島大学・病院(医)・講師<br><br><br><br>(15401) |    |

## 6. 研究組織（つづき）

|           | 氏名<br>(研究者番号)                                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                      | 備考 |
|-----------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 安達 伸生<br><br>(Adachi Nobuo)<br><br>(30294383)      | 広島大学・医系科学研究科(医)・教授<br><br><br>(15401)      |    |
| 研究<br>分担者 | 石川 正和<br><br>(Ishikawa Masakazu)<br><br>(60372158) | 広島大学・医系科学研究科(医)・寄附講座准教授<br><br><br>(15401) |    |