

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591694
 研究課題名 (和文) VHLペプチドを用いた脊髄変性疾患に対する脊髄神経再生の研究
 研究課題名 (英文) Spinal neurogenesis for degenerative spinal cord disease using VHL peptide
 研究代表者
 村田 英俊 (MURATA HIDETOSHI)
 横浜市立大学・医学部・助教
 研究者番号：40398524

研究成果の概要：

細胞膜透過性VHLペプチド(VHL-TATペプチド)を開発し、慢性脊髄圧迫モデルで検討した。しかし、脊髄変性変化および運動機能変化に有意な差をもたらさなかった。そこで、非骨傷性脊髄損傷モデルを作成し、再度その損傷状態、変化、神経再生を検討することとした。一方、非骨傷性損傷モデル自体が新規の独自モデルとして注目されることになり、多くの成果を発表した。このモデルにおいて、VHLペプチド導入し、研究継続中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 脳神経外科学

キーワード：脊髄・脊椎疾患学

1. 研究開始当初の背景

von Hippel-Lindau (VHL)病は母斑症と呼ばれる疾患群のひとつであり、小脳血管芽腫、網膜血管腫、腎細胞癌、褐色細胞腫などを生ずる常染色体優性遺伝性疾患である。その原因遺伝子は長く不明であったが、1993年にポジショナルクローニングにより、VHLが原因遺伝子として同定された(Latif.Science,1993)。その後

の解析で研究グループで研究分担者の菅野らは散発性の小脳血管芽腫や腎細胞癌にもVHLの欠損、変異、発現抑制があることを見いだした

(Kanno,et.al,Cancer Res,1996)。VHL遺伝子産物pVHLは213アミノ酸からなり腫瘍が生じる臓器のみならず、多くの臓器で普遍的に発現されている。その中でとりわけ、中枢神経系においてはニュー

ロン特異的に VHL の発現が見られる。しかし、ニューロンにおいて VHL がどのような役割を果たしているかについては不明であった。2000 年、私たちはラット神経幹細胞を用いて VHL 遺伝子が神経分化に関与している可能性を示唆した (Kanno, Cancer Res, 2000)。2002 年、本申請者、村田はヒト神経芽細胞腫細胞に VHL を発現させることにより、形態的、生化学的のみならず、機能的にもニューロンに近似した神経系細胞を樹立することに成功した (Murata, Cancer Res, 2002)。また機能的神経細胞の形質を獲得していく過程を明らかにした (Murata, Cancer Res, 2002)。この細胞を利用し、ラット急性脊髄損傷モデルへの同細胞移植実験により、運動機能が改善するデータが得られていた (第 60 回日本脳神経外科学会、第 2 回日本分子脳神経外科学会発表, 2001)。しかし、急性損傷モデルは脊髄への人為的 direct 損傷が大きく影響しており、実際、臨床上日常的に遭遇する変形性頸椎症にともなう頸髄症や、脊髄損傷の 6 割とされる脱臼や骨折を伴わない脊髄損傷 (非骨傷性頸髄損傷) の病態とは大きくかけ離れており、生理的脊髄変性を示す病態モデル (脊髄症モデル) の確立が求められていた。

その頃、申請者前任施設の研究分担者である、金ら (獨協医科大学脳神経外科) は頸椎症などによって生じる頸椎症性脊髄症のラットモデルを確立しつつあった (Kim, Ann Neurol, 2004)。同モデルは吸水性ウレタンによる慢性脊髄圧迫により脊髄症を誘導したもので、遅発性脊髄症のモデルとして初めて確立したものである (Kim, Ann Neurol, 2004)。これは、臨床上日常的に遭遇する頸部脊柱管狭窄症、頸椎椎間板ヘルニア、後縦靭帯骨化症などといった頸椎変性疾患としての脊髄症の病態を良く反映している。運動行動学的な脊髄症発症の経過とともに、病理学的な遅発性脊髄変性の過程も明らかにされ、実際の神経再生・回復の過程を把握し、実用的臨床的発展をなすうるふさわしいモデルであった。

そこで 2004 年より、申請者らが開発した VHL 発現神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) (ニューロン近似細胞) (Murata Cancer Res, 2002) を用いて、脊髄症モデルへの移植実験を行ってきた (平成 17 年度, 18 年度文部科学省科学研究費若手研究 B 取得村田)。同細胞の脊髄実質への生着は良好

で、神経系マーカー発現 (neuropeptide Y, Neurofilament-H) が維持された。脊髄神経伝導速度ではコントロールに比べ有意差が生じ、行動学的機能回復はコントロールに比べ若干の改善がみられた。しかし、一方で、一部生着後脱分化し腫瘍性増殖を示したものが存在したものがあったこと、病理学的には神経ネットワークの再構築は明らかでなかった。また、脊髄は、神経索路や神経細胞が密集し、機能的に silent area が少ないため、移植そのものによる障害も決して無視できなかった。VHL による脊髄機能再生は確認できたものの、臨床応用へ進展させるためにはこれらの未だ多くの問題点が存在した。そのため、移植処置が必要なく、無侵襲で、かつ不活化した自己の脊髄ニューロンそのものを再生させる手段、すなわち VHL を無侵襲で、脊髄内に自己内在する細胞に導入する方法を模索していた。

そこで、私たちは Frankel らによって発見された HIV-1 の TAT 蛋白由来のペプチド "TAT ペプチド" と呼ばれる 12 アミノ酸からなる膜透過性ペプチド

(Frankel, Cell, 1988) に着目した。この TAT ペプチドは細胞膜脂質 2 重膜に化学的に融合し、TAT のついた基質蛋白が細胞内に能動的に取り込まれる特性をもつ

(micropinocytosis)。その導入高率はほぼ 100% と非常に高い上に、取り込みは細胞膜にて能動的であるため、細胞膜障害や細胞質内障害を引き起こさない。従って基質となる蛋白やペプチドが細胞障害を及ぼさなければ、導入方法としては非常に有効な方法である。そこで、私たちはラット脊髄症モデル (慢性脊髄圧迫モデル) において、細胞移植など脊髄そのものに対する侵襲的操作を一切せず、この TAT-VHL ペプチドを静脈内投与、あるいは脊髄外表からの直接投与を行い、変性した脊髄ニューロンの再生、回復についての機序、過程、治療効果を検討することを発案した。

2. 研究の目的

細胞膜透過性 VHL ペプチドを作成し、独自に開発したラット慢性脊髄圧迫モデル (Kim et al, Ann Neurol, 2004) の脊髄障害部に導入し、脊髄ニューロンの再生、新生を促す。病理学的、運動行動学的、電気生理学的観点から、その神経再生の

有無、治療しての有用性、発展性へと導く。

3. 研究の方法

VHLペプチド作成

このVHLペプチドは、VHLタンパクのうちVHL活性化部位であるelongin B-C結合部位をモチーフとしている。私たちはこのドメインのエピトープ（作用点）を構造解析から同定し、15アミノ酸に絞り込んでペプチドを作成した。エピトープの解析から数種類のVHLペプチドを作成したが、このVHL157-171ペプチド(TLKERCLQVVRSLVK)は、皮膚神経幹細胞の導入により、最も神経分化活性を有することがすでに証明されている（。これに細胞膜透過ドメインであるHIV-TAT :YGRKKRRQRRRDあるいはAnntenapedia :KGRQVKVWFQNRKM KWKKを接合し、TAT-VHL(157-171)を作成する。アミノ酸接合は固相法とよばれる接合法で、ペプチド合成機433A(Applied Biosystems, Foster, CA)を用いる。このペプチドを蛍光標識できるようにするため、FLAG (YKDDDDK) (赤色蛍光) もしくはFITC (緑色蛍光) でラベルする。

慢性脊髄圧迫ラット (頸髄症ラット) の作成

生理的脊髄変性経過を持つモデルとして、研究分担者、金彪ら (獨協医科大学教授) が開発したラット脊髄症モデルを用いる (Kim et al, Ann Neurol, 2004)。すなわち、Wister rat (体重 250-300g) を用い、全身麻酔の下、第 5,6 頸椎椎弓下に 0.7mm 厚の吸水膨張性ポリマー (アクアプレン) を挿入して局所脊髄圧迫を作成する。このポリマーは徐々に体内の水分を吸収し約 96 時間で最大膨張率 2.5 倍の体積に増加する。挿入操作による急性脊髄損傷のないのを確認後、時間経過とともに脊髄の慢性圧迫により、脊髄変性、運動細胞 (前角細胞) の脱落を生じてくる (Kim et al, Ann Neurol, 2004)。約 25 週で下肢痙性が生じ、脊髄症モデルが完成する。
細胞膜透過性 TAT-VHL(157-171)ペプチド

運動行動学的計測

行動負荷テストとして回転式運動量測定ケージ、傾斜姿勢維持測定板を用いる。また下垂式重量測定器を使い、前脚、後脚の筋力を測定する。

病理学的評価

3 週、6 週、9 週、24 週の各時点で脊髄を露出し、ポリマー圧迫部位(移植部位)を 8 μ m のスライス幅で連続切片を作成する。HE 染色、KB 染色にて脊髄の変性状態の変化 (改善度)、前角細胞の個数変化、軸索の伸長の程度を評価する。脊髄損傷部をイメージアナライザー (Image J) にスキャンし、その分布と面積を算出し、障害範囲の変化をみる。エポン包埋標本を同時に作成し、電子顕微鏡で観察し、再生細胞とのシナプス形成の有無と分泌顆粒の局在を観察する。

運動行動学的計測

行動負荷テストとして回転式運動量測定ケージ、傾斜姿勢維持測定板を用いる。また下垂式重量測定器を使い、前脚、後脚の筋力を測定する。病理学的評価 : 3 週、6 週、9 週、24 週の各時点で脊髄を露出し、ポリマー圧迫部位(移植部位)を 8 μ m のスライス幅で連続切片を作成する。HE 染色、KB 染色にて脊髄の変性状態の変化 (改善度)、前角細胞の個数変化、軸索の伸長の程度を評価する。脊髄損傷部をイメージアナライザー (Image J) にスキャンし、その分布と面積を算出し、損傷範囲の変化をみる。エポン包埋標本を同時に作成し、電子顕微鏡で観察し、再生細胞とのシナプス形成の有無と分泌顆粒の局在を観察する。

電気生理学的評価

運動行動学実験、病理学的評価をもとに、電気生理学的検討を行う。すなわち 3 週、6 週、9 週、24 週の各時点で脊髄を露出し、圧迫部位を境にして、神経伝導速度と後脚大腿における運動誘発電位を記録する。行動実験での改善結果をより客観的に裏付ける

4. 研究成果

平成 19 年度の初期検討において、ペプチド投与群とコントロール群とでは生理学的脊髄変性変化および運動機能変化に有意な差をもたらさないことが判明した。病理学的変化も有意な変化をもたらさな

かった。これは、神経再生の誘因として再生・修復機能が活性化されるべき損傷部位を必要とするためと考えられた。私たちの以前の研究、ラット急性脊髄損傷モデルに対するヒト神経芽細胞腫細胞のVHL発現細胞の移植実験では若干の運動機能の向上がみられた(第60回日本脳神経外科学会、第2回日本分子脳神経外科学会発表, 2001)ことから再度脊髄損傷モデルでのVHLペプチド導入における検討が望ましいと考えた。しかし、急性損傷モデルは脊髄への人為的 direct 損傷によるバイアスが無視できないため、非間接的な脊髄損傷モデルでの研究を模索した。すなわち、直接脊髄を露出せずに脊髄損傷を誘発することを思案していた。そこで、慢性脊髄圧迫モデルに脱臼や骨傷を起こさないよう瞬間的頸部後屈負荷を試みた。すると上肢優位に運動障害を示すラットが出現した。これは私たちが臨床で経験する「中心性脊髄損傷」とよばれる病態とよく似た症状であり、非骨傷性脊髄損傷の代表的症状の一つである。そのため、この損傷モデルの作成について至適検討を行うと、臨床でみられる非骨傷性脊髄損傷と同様の病態が誘導できることが判明した。このモデルを用いて、その損傷状態、変化、神経再生を検討することとした。一方で、この非骨傷性脊髄損傷モデルは過去に類似の報告はなく、そのモデル自体が新規の独自モデルとして大きく評価されることとなった。脊髄露出に伴う人為的操作もなく、直接的な外傷を伴わない。内在する脊髄変性疾患の病態にも流用でき、神経再生モデルとしても活用できる。結果として平成20年度はこのモデルの確立に時間を費やしたが、一定の成果を上げることができ、多くの発表をおこなった(下記)。現在、このラットに対し、当初のVHLペプチド投与群、PBS投与群(コントロール)、非投与群にわけ、研究進行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

村田英俊、黒川 龍、川原信隆 金 彪
非骨傷性脊髄損傷の病態解明
日本脊髄障害医学会雑誌 22(1) 30-31, 2009

村田英俊、黒川 龍、金 彪
非骨傷性脊髄損傷の病態解明
脊髄外科 22(2), 128-130, 2008

黒川 龍 金 彪 村田英俊 川本俊樹
荻野雅弘 新郷哲郎 糸岐一茂
慢性脊髄圧迫ラットにおける脊髄局所血流
脊髄外科 22(2), 126-127, 2008

村田英俊, 黒川龍, 菅野洋, 山本勇夫, 金 彪
非骨傷性脊髄損傷—中心性脊髄損傷の病態解明
日本脊髄障害医学会雑誌 21 (1), 176-177, 2008

村田英俊 黒川 龍 金 彪
非骨傷性頸髄損傷の症候の発生メカニズム: 実験データから
脊髄脊椎 21(5): 583-590, 2008

[学会発表] (計 7 件)
村田英俊 黒川 龍 川原信隆 金 彪
非骨傷性頸髄損傷の病態解明
第43回日本脊髄障害医学会 2008/11/7 札幌

村田英俊 黒川 龍 川原信隆 金 彪
非骨傷性頸髄損傷の病態解明
第67回日本脳神経外科学会総会 2008/10/2 盛岡

村田英俊 黒川 龍 川原信隆 金 彪
非骨傷性頸髄損傷の病態解明
第23回日本脊髄外科学会 2008/06/12 宮城松島

村田英俊 黒川 龍 菅野 洋 山本勇夫 金 彪
非骨傷性脊髄損傷モデル: 中心性脊髄損傷の病態解明
第42回日本脊髄障害医学会 大宮 2007/11/04

村田英俊 黒川 龍 山本勇夫 金 彪
非骨傷性脊髄損傷モデル: 中心性脊髄損傷の病態解明
第66回日本脳神経外科学会総会 東京 2007/10/04

村田英俊 黒川 龍 菅野 洋 山本勇夫 金 彪
非骨傷性脊髄損傷モデル—中心性脊損の真の病態は何か—
第11回 Waterfront Neurosurgical

Conference 横浜（三溪園）2007/07/01

村田英俊 黒川 龍 金 彪
非骨傷性頸髄損傷：中心性脊髄損傷の病態
解明-動物モデルから-
第 22 回日本脊髄外科学会 大宮
2007/06/14

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田英俊
横浜市立大学 医学部 脳神経外科 助教
研究者番号：40398524

(2) 研究分担者

菅野 洋
横浜市立大学 医学部 脳神経外科 准教授
研究者番号：40244496

金 彪 獨協医科大学 医学部 脳神経外科 教授
研究者番号：90231290

(3) 連携研究者

なし