

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19791051
研究課題名（和文） 損傷脊髄に対するグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 β 阻害剤投与による軸索再生誘導
研究課題名（英文） Enhancement of Axonal Regeneration by Administration of GSK3 β -inhibitor Spinal Cord Injured Mice
研究代表者 岩波 明生 (Iwanami Akio)
研究者番号：40327557

研究成果の概要：

研究代表者らは、脊髄損傷マウスに対してグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 β 阻害剤を投与することにより、その損傷部の炎症波及抑制と損傷軸索の再生促進効果があることを本研究により示している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：移植・再生医療、脳・神経、脊髄損傷

1. 研究開始当初の背景

近年の再生医療の進歩に伴い、脊髄損傷の分野においてもES細胞・神経幹細胞などの未分化な細胞を損傷脊髄内に移植すれば軸索の再生や機能回復がもたらされることが報告されている(Ogawa et al, J Neurosci Res 2002)。しかしその一方で、細胞移植のみでは損傷脊髄の再生には限界があることも事実である。神経幹細胞移植後も病理組織で損傷部中心の空洞が残存していることから、移植

の効果を高めるために改善の余地がまだあり、①幹細胞の生存・増殖力の促進や②様々な軸索伸展阻害因子の不活化、③炎症性細胞浸潤のコントロールなど、損傷部微小環境の整備を同時に行うべきと考えられる。申請者は、軸索伸展阻害因子の中でSemaphorin3Aに注目し、Sema3A阻害剤を損傷脊髄内に投与することにより損傷軸索の再生や運動機能回復が有意に得られることを報告した(Kaneko & Iwanami et al, Nat Med 2006)。しかし、

軸索の再生機転だけを促進させても損傷部周囲に存在するグリア瘢痕を貫通するほど有意な神経線維は微量で、やはり実際の臨床応用には大きな隔たりがあると言わざるを得なかった。そこで今回われわれは、以下の3つのポイント①神経幹細胞の生存・増殖力の促進 ②軸索の再生促進および③炎症波及の抑制効果を併せもつ グリコーゲンシンターゼキナーゼ3β 阻害剤 (GSK3β-inhibitor) に注目し、本剤を脊髄損傷後に投与すること、また神経幹細胞移植療法などの細胞移植療法と併用することで更なる損傷軸索の再生や運動機能回復が得られるのではないかと期待している。

2. 研究の目的

脊髄損傷に対して今まで成し得なかった急性期治療(炎症波及の抑制)と慢性期治療(軸索再生の促進)の同時解決を図るため、GSK3β-inhibitor に注目し、本剤を脊髄損傷後に投与すること、また神経幹細胞移植療法などの細胞移植療法と併用することで更なる損傷軸索の再生や運動機能回復が得られるのではないかと期待している。GSK3β-inhibitorを脊髄損傷マウスに投与することにより、その様々な有効性を確認し、脊髄損傷患者への新たな治療薬として応用されることが最終的な目標である。

3. 研究の方法

1) マウス脊髄損傷モデルに対するGSK3β-inhibitor投与と経時的免疫組織学的解析

成体マウス(C57/BL6)の雌に対して、IH i mpactorを用いて重錘落下法により定量的に胸髄圧挫損傷モデルを作製する(Okada et al, Nat Med 2006)。損傷後より5日間、**GSK3β-inhibitor**を1日2回腹腔内投与する群と生食のみを投与する群(対照群)の2群を作る。損傷後1, 2, 6週目のマウスに対して系心

臓的灌流固定を行い、脊髄組織を採取する。凍結切片を作成し、まずはHEやLFB染色で、損傷の経時的な拡がりを確認する。次に、GFAPとCD11bの免疫2重染色を行い、これらを経時的に比較することによって、脊髄損傷後のastrocyteのmigrationの動きと炎症細胞のpackingの関係を考察する。

2) Reactive astrocyteの増殖・遊走に対するGSK3β-inhibitorの影響

上記の考察として、実際に in vitro においてBrdUラベルしたastrocyteを培養後にGSK3β-inhibitorを投与し、astrocyteの増殖能が促進されるかどうかを確認する。幼若マウスの脳組織を採取し、接着培養を行いastrocyteを採取する(Sanai N et al, Nature 2004)。48時間前にBrdUラベルしたastrocyteをpLLコーティングしたcoverslip上に散布し、GSK3β-inhibitorを投与する。増殖したBrdU陽性astrocyteの数を数え比較する。

3) 軸索再生誘導に対するGSK3β-inhibitorの影響

同様に、軸索再生がGSK3β-inhibitorを投与したことで促進されるかどうかをin vitroで確認する。マウス脳錐体神経細胞を培養し、培養液内にGSK3β-inhibitorを投与する群と対照群に分けて軸索伸長の増加、数を比較する

4) 脊髄損傷後マウスの両下肢運動機能評価

脊髄損傷後マウスの経時的な下肢運動機能回復を調べるため、BBB locomotor rating scaleを用いて経時的に評価を行う。

4. 研究成果

1) 経時的な損傷部の組織学的評価

まずわれわれは、損傷後1, 2, 6週目のマウス脊髄のsagittal切片に対してGFAP抗体を用いた免疫組織染色を行い、GFAP陽性astrocyteで囲まれる損傷部の面積を薬剤投与群と対照群で比較した(図1)。同時にGFAP

と炎症細胞を示す Mac1 の免疫 2 重染色を行い、損傷後の炎症細胞の compaction の経時的変化を調べた (図 1)。

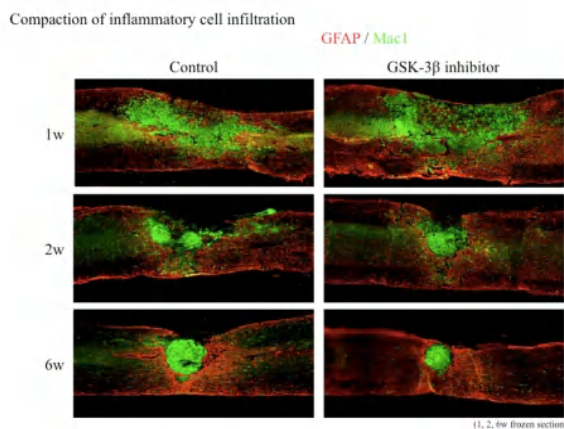
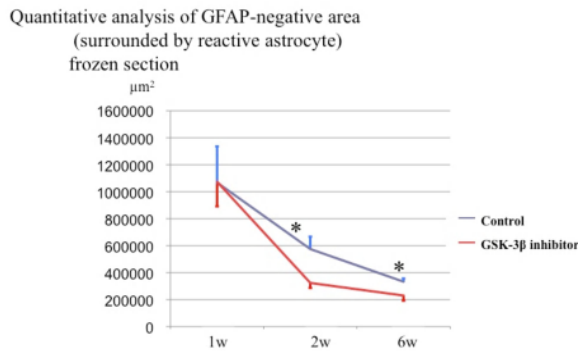


図 1 損傷後経時的な抗 GFAP 染色による損傷部分の面積の比較と炎症細胞の compaction

損傷部分の面積は、損傷後 1 週の時点では、投与群・対照群ともに変わらなかったが、2 週、6 週ともに投与群の方が対照群よりも有意に小さい傾向が認められた (図 1)。

次に、損傷部 6 週後の損傷部における GAP43 陽性の再生軸索を投与群と対照群で比較したところ、投与群において再生軸索の長さおよび損傷部面積あたりの割合ともに有意に対照群に比し増加していることが分かった (図 2)。

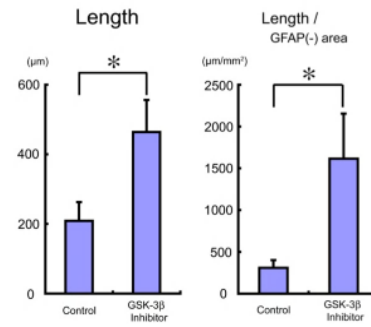


図 2 損傷 6 週後の損傷部における GAP43 陽性再生軸索の比較

さらに、損傷 6 週後の脱髄を調べるため、LFB 染色の結果を比較したところ、投与群において対照群より有意に大きな LFB 陽性面積が認められた (図 3)。

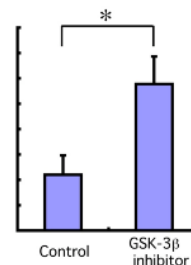


図 3 損傷 6 週後の損傷部周囲 LFB 面積の比較

2) Reactive astrocyte の増殖・遊走に対する GSK 3 β -inhibitor の影響

上記結果に基づき、Reactive astrocyte の増殖に対する本薬剤の影響を調べたところ、薬剤投与濃度の増加とともに、BrdU 陽性 astrocyte の数は有意に増加傾向が認められた (図 4)。

Ro3303544 stimulates astrocyte proliferation
48 h BrdU incorporation

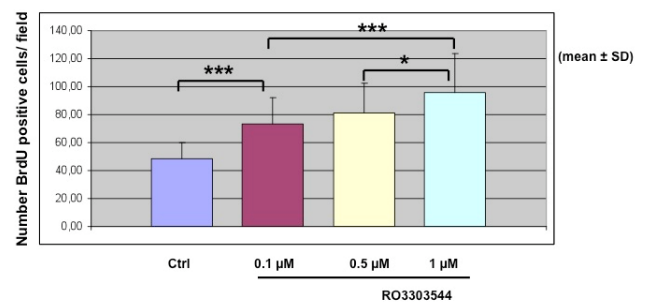


図 4 GSK3 β -inhibitor 投与後の BrdU 陽性 astrocyte の数と投与濃度

3) 軸索再生誘導に対するGSK3β-inhibitorの影響

同様に本薬剤の軸索再生誘導に対する影響を *in vitro* でマウス錐体細胞を用いて行ったところ、本薬剤投与量の増加に従い、錐体細胞が有意に軸索を伸長させることが分かった(図5)。なお、*in vitro* の研究に関しては、慶應義塾大学生理学教室の Dr. Francois Renault-Mihara の協力を得て行った。

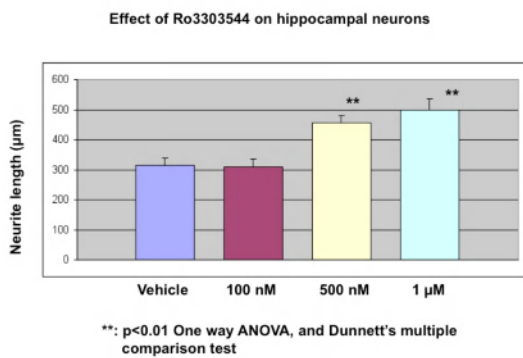


図5 GSK3β-inhibitor 投与後のマウス錐体細胞の軸索伸長の度合いと投与濃度

4) 脊髄損傷後マウスの両下肢運動機能評価

BBB locomotor rating scale による両下肢運動機能評価では、損傷後4週から投与群において対照群よりも有意な両下肢運動機能の回復が認められた(図6)。

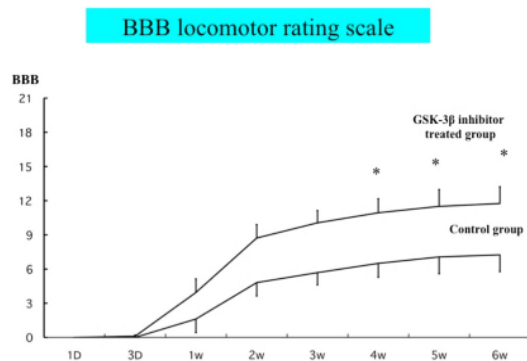


図6 両下肢機能評価の結果

以上より、脊髄損傷マウスに損傷後GSK3β-inhibitor を投与した結果、対照群に比べて有意な下肢運動機能の回復が得られ

た。その機序として、損傷部 astrocyte の増殖促進により、損傷部炎症細胞の浸潤がより限局化され、2次損傷が緩和されたこと、また本薬剤による再生軸索の伸長効果による損傷脊髄の再生機転が強く働いたことの両面が考えられる。今後引き続き *in vitro*/*in vivo* での実験を行い、そのメカニズムを詳細に検討し論文投稿の予定である。

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0件)
特になし

[学会発表] (計0件)
特になし

[その他]
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 ()

研究者番号 :

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者