

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07735

研究課題名(和文)糖鎖結合分子による損傷神経の治療

研究課題名(英文)Therapy of injured nerves with glycan-binding molecules

研究代表者

尾崎 智也(Ozaki, Tomoya)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：40710588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、臨床薬であるプロタミンが脊髄損傷に対する治療薬になる可能性を吟味した。まず、損傷した軸索末端にできる病態であるdystrophic endballを誘導できる培養モデルを使い、プロタミンがdystrophic endballをキャンセルすることが分かった。動物実験では、尾静脈から投与されたプロタミンは、脊髄損傷による運動不全を改善し、脊髄内のセロトニン作動性神経線維の伸長を促進することが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の治療実験では、脊髄損傷1週間後から治療を開始した。これは、実際の脊髄損傷患者に対する亜急性期以降の治療に光を指すものである。なぜなら、亜急性期以降の治療の大半はリハビリテーションであり、神経軸索の伸長を促す薬剤治療は行われない。本研究の結果は、亜急性期以降の脊髄損傷患者に対し薬剤で治療できる可能性を示した意義あるものである。脳における軸索損傷にもプロタミンが治療効果を示すのかについては、興味を持たれるところであり、我々の今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：In our study, we examined the potential of protamine, a clinical drug, as a therapeutic agent for spinal cord injury. First, using a culture model that can induce dystrophic endballs, a pathology that forms at the ends of injured axons, we found that protamine cancels dystrophic endballs. In animal studies, protamine administered through the tail vein improved motor dysfunction caused by spinal cord injury and promoted the growth of serotonergic nerve fibers in the injured spinal cord.

研究分野：神経科学、糖鎖科学、再生医療研究

キーワード：神経軸索損傷 コンドロイチン硫酸 ドラッグリポジショニング 脊髄損傷治療薬 プロタミン

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷とは神経が司る運動・感覚機能の病態であり、人類が早急に解決すべき課題である。しかし、強力な阻害因子が未解決のためその効果的な治療法はない。脊髄組織の損傷部には、グリア性瘢痕が形成され、そこにはコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (Chondroitin sulfate proteoglycan: CSPG) が蓄積する (Davies et al., *J Neurosci.* 1999)。その CSPG 上の糖鎖、コンドロイチン硫酸 (CS) は、神経軸索の再伸長を強く阻害する。CS が責任分子となり **dystrophic endball** と呼ばれる損傷軸索の病態も形成される。近年、**dystrophic endball** について情報は集まりつつあるが、治療薬の確立には至っていない。CS という責任分子は分かっているものの、その効果を打ち消す薬剤の探索、調査、吟味が不十分であった。

2. 研究の目的

本研究では、未だ有効な治療法のない脊髄損傷に対して、糖鎖結合分子が治療薬となり得るか評価するものである。本研究で評価した物質は、すでに臨床薬としてヒトに使われているプロタミンである。我々は、**dystrophic endball** を解析する中で、プロタミンの **dystrophic endball** をキャンセルする活性を見出していた。

3. 研究の方法

1. プロタミンの **dystrophic endball** キャンセル効果

以前より使用している、ガラスに CS の濃度勾配をコートし、そこに神経細胞を培養することで、**dystrophic endball** を誘導できる培養モデルでのプロタミンの効果を確認した。0.01-3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のプロタミンを培養液に混ぜ **dystrophic endball** に処理する。CS コートを横切り伸長した軸索の割合を計測し、評価した。

2. プロタミンの **dystrophic endball** 表現型への作用

我々は、2019 年に、CS によって形成される **dystrophic endball** 内部にはオートファゴソームが蓄積していることを明らかにしている。この表現型は、**dystrophic endball** の外見である軸索末端腫大と密接に関連すると考えており、プロタミンが、オートファゴソームの蓄積を解消するか否か検証した。

3. プロタミン投与によるマウス脊髄損傷の治療実験

In vitro でのプロタミンの活性が観察されたので、動物を使った治療実験に進む。プロタミンがマウスにける脊髄損傷による後肢運動不全を改善するかどうか評価した。具体的には、第 10-11 胸椎において圧挫損傷 ($85\text{Kdyn} = 0.85\text{N}$) した脊髄損傷マウスモデルを作製した。実際の脊髄損傷患者への治療は亜急性期以降が長く、その期間に治療できることが望ましい。そこで、受傷して 1 週間の亜急性期からプロタミンをマウス尾静脈から投与した。濃度は $1\text{mg}/\text{kg}$ とした。投与したプロタミンが後肢の運動機能を改善させるかどうか、受傷後 8 週間 **Basso Mouse Scale (BMS)** テストを行い評価した。

受傷して 9-10 週間後、組織学的解析のため、マウスを固定し脊髄組織を摘出した。凍結切片を作製し、後肢運動機能の調節に寄与するセロトニン作動性神経線維について免疫染色を行い、プロタミンが脊髄内の神経軸索の伸長を促したかどうか検証した。損傷部位よりも尾側部において、コントロールである生理食塩水投与マウスと比較するこ

とで評価した。

4. 研究成果

本研究では、糖鎖であるコンドロイチン硫酸 (Chondroitin sulfate: CS) に結合するペプチドが損傷軸索の治療薬となるか吟味した。CS は中枢神経系、例えば脊髄が損傷した時、損傷部位に豊富に存在し、神経軸索の伸長を阻害することが知られる。CS に結合する分子を使えば、その阻害をキャンセルできるのではないかと予想した。CS に結合するペプチドとは、実は、臨床薬プロタミンである。申請者は、医療現場でヘパリンの中和剤としてヒトに使われる薬剤の可能性を見出した。申請者は、これまでに **dystrophic endball** と呼ばれ損傷軸索の病態として考えられている軸索末端の情報を集めてきた。その中で使用していた **dystrophic endball** を培養系で誘導できるモデルは、薬剤のスクリーニングにも利用できた。申請者は、様々な分子を **dystrophic endball** に処理し、それぞれのキャンセル効果を評価してきた。その結果、プロタミンは軸索が、その伸長に対する阻害分子である CS 上での伸長を促進することが認められた (図 1、未発表データ)。この結果から、プロタミンが **dystrophic endball** をキャンセルすることが示唆された。

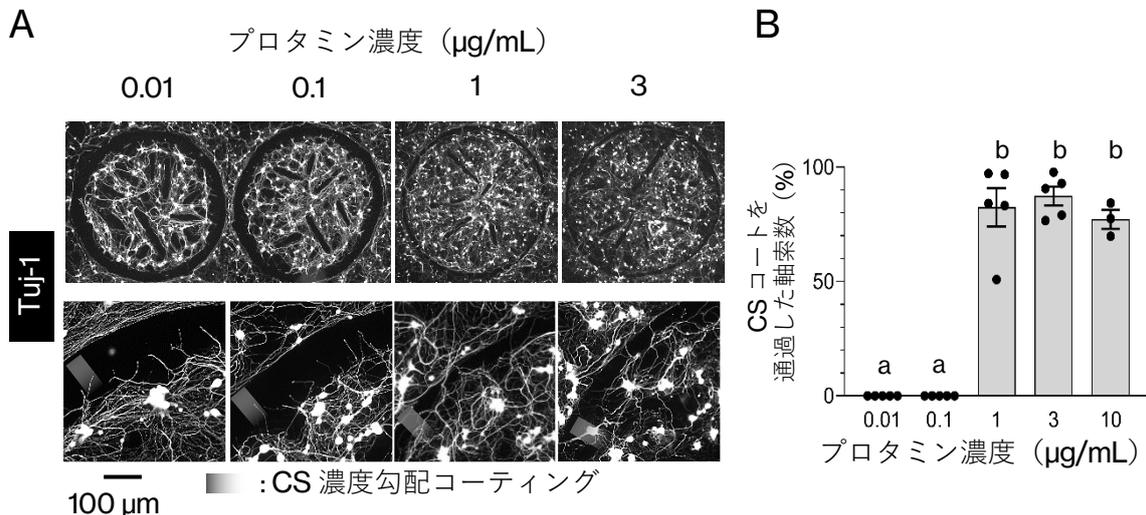


図 1：プロタミンは **dystrophic endball** をキャンセルする。異なるアルファベットは有意差を示す。

次にプロタミンが本当に **dystrophic endball** をキャンセルするか、プロタミンの **dystrophic endball** 表現型への作用を観察した。申請者らは、**dystrophic endball** 内部にオートファゴソームが高密度に存在する表現型を報告している (Sakamoto* Ozaki* et al, Nat. Chem. Biol. 2019 *equal contribution)。Dystrophic endball にプロタミンを処理し、オートファゴソーム特異的マーカーである LC3 に対して蛍光免疫染色を行い可視化し、解析した。その結果、プロタミン処理により、**dystrophic endball** 内部のオートファゴソーム密度は減少し、形態も成長円錐様に戻ることが観察された (図 2、未発表データ)。プロタミンが **dystrophic endball** をキャンセルすることを確認できた。

次に、プロタミンがマウスにおいて、脊髄損傷により生じた運動不全を改善するかどうか検証した。胸髄(T10-11)を挫滅損傷したマウスには、後肢に運動不全が表れる。実際の脊髄損傷に対する治療では、亜急性期に効果的な治療ができることが望ましい。そこで、本研究では、亜急性期での治療実験を行った。脊髄が損傷して 1 週間後から 1 日置

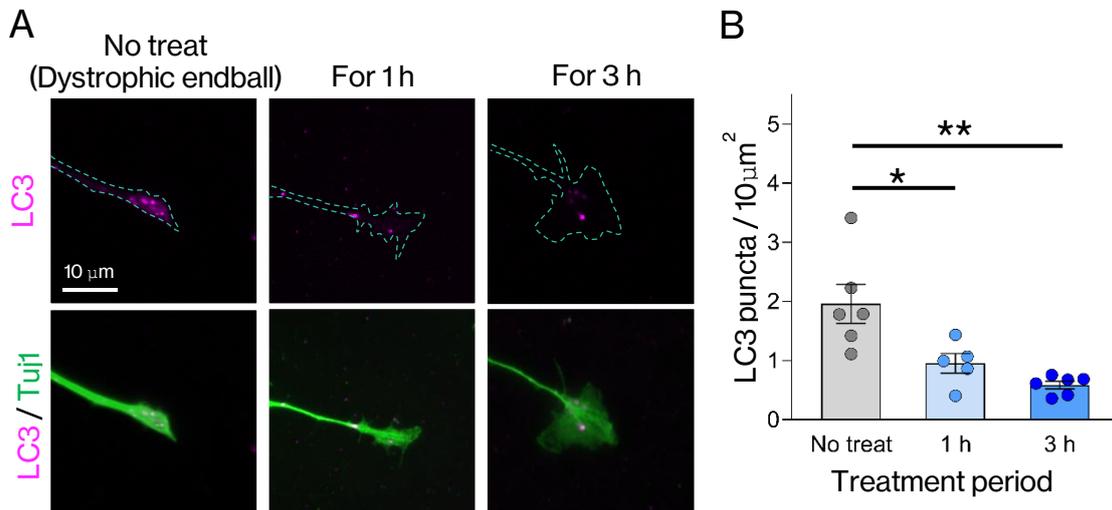


図2：プロタミンは dystrophic endball の表現型を解消する。

きに、プロタミン (1mg/kg) をマウス尾静脈から投与した。脊髄損傷後8週間、行動テストを行い、後肢の運動機能の改善を評価した。その結果、プロタミンが脊髄損傷による運動不全を改善させることが分かった(図3、未発表データ)。未治療のコントロールマウスは、後肢の動きが鈍く、足の裏を地に着けられず歩行が困難であった。一方で、プロタミン投与マウスは、足の裏を地に着けステップを踏み、スムーズな歩行活動が見られた。また、プロタミン投与マウスのほぼ全てが実験期間の8週間生存し、プロタミン投与による副作用、例えば体重には変化は見られなかった (図示せず)。

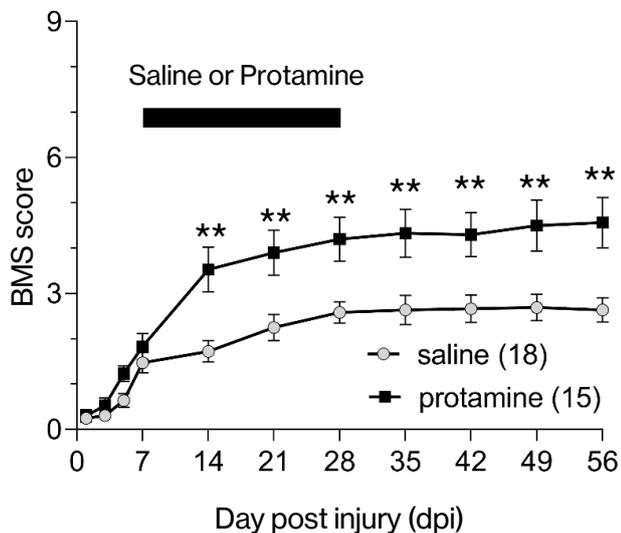


図3：プロタミンは脊髄損傷後の運動不全を改善する。

次に、脊髄損傷マウスに投与されたプロタミンが、脊髄内において軸索伸長を促進するか否か検証した。マウスにおいて、セロトニン作動性神経線維が後肢運動機能に重要であることが古くより分かっており、この神経線維はセロトニントランスポーター (Serotonin transporter: SERT) を発現している。げっ歯類を用いた脊髄損傷治療実験における組織学解析では、SERT が良く解析される。本研究でも、この分子について蛍光免疫染色を行い検証した。脊髄組織を、損傷中心を挟み、吻側 (脳側) および尾側の3領域に分け、SERT 陽性面積を定量した。その結果、プロタミン投与マウスでは生理食塩水投与マウスに比べて、損傷中心および尾側において SERT の陽性面積が増加した (図4)。これは、脊髄損傷マウスの脊髄においてプロタミンがセロトニン作動性神経線維の伸長を促したことが伺える。

プロタミンはカチオン性アルギニンリッチペプチド (Cationic arginine rich peptide: CARP) であり、神経保護作用を有すると考えられる。脳における軸索損傷にもプロタ

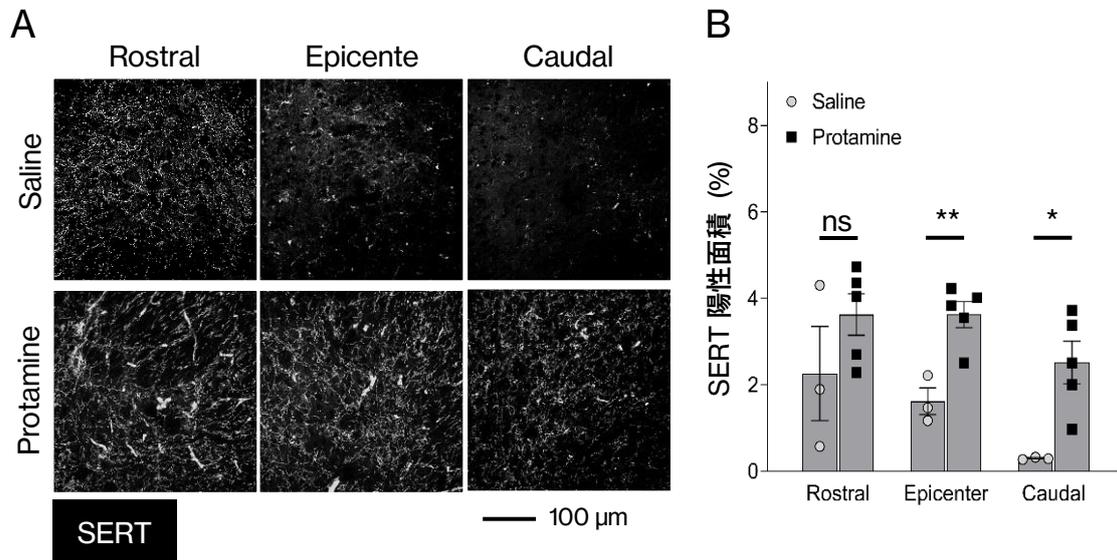


図4：脊髄損傷マウスへのプロタミン投与は脊髄内においてセロトニン作動性神経線維の伸長を促す。

ミンが治療効果を示すか興味を持たれるところであり、今後の課題である。また、プロタミン以外にも、**dystrophic endball** をキャンセルする分子を見出すことができた（図5、未発表データ）。今後は、その分子の活性について詳細に検証し、動物実験へと進める予定である。また、図5ではアルギニン分子が4つ連なったものでは、**dystrophic endball** をキャンセルしていないことが分かる。**CARP** の神経保護作用についての先行研究と一致するように、4連のアルギニンでは不十分だと考える。従って今後は、**dystrophic endball** をキャンセルする **pharmacophore** についても調査していきたい。そして、損傷軸索に対する有効な治療薬の創製へとつなげる。

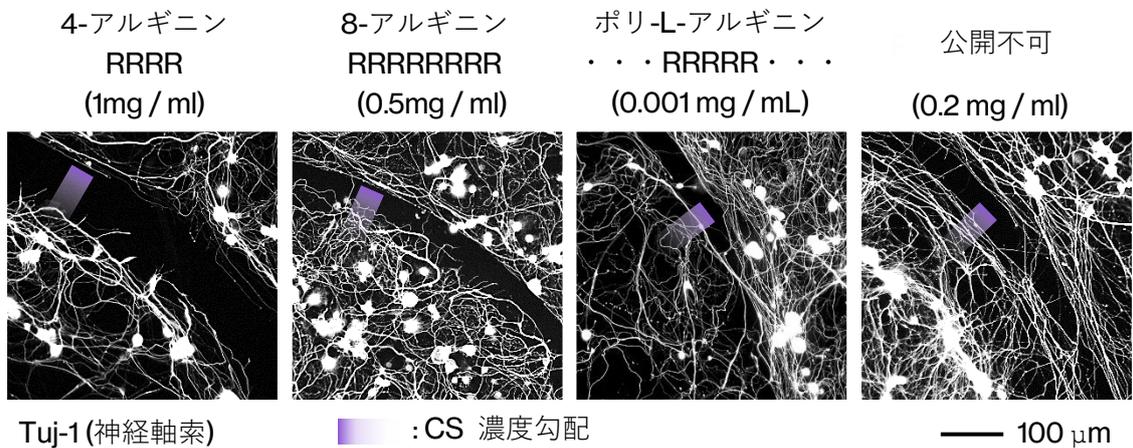


図5：一部のカチオン性アルギニンリッチペプチドは **dystrophic endball** をキャンセルする。

以上が、本研究で得られた成果の一部である。現在、成果をまとめて論文執筆中である。最後に、科研費を受けることにより学術的にも臨床的にも重要な結果が得られた。ここに、深く感謝の意を表す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尾崎智也、坂元一真、Yuanhao Gong、門松健治
2. 発表標題 The role of neuronal axon outgrowth arrest and morphological change induced by glycan
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾崎智也、坂元一真、Yuanhao Gong、門松健治
2. 発表標題 A glycan stops autophagic flux and axon regrowth via PTPRsigma-cortactin axis.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾崎 智也、坂元 一真、鈴木 佑治、門松 健治
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸結合ペプチドはdystrophic endballを解消し脊髄損傷に伴う運動障害を改善する
3. 学会等名 NEURO2022（第45回日本神経科学大会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾崎 智也、坂元 一真、鈴木 佑治、門松 健治、酒々井真澄
2. 発表標題 糖鎖が引き起こす損傷軸索の病態
3. 学会等名 第39回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾崎 智也
2. 発表標題 Protamine promotes axon regrowth and improves motor dysfunction after spinal cord injury in mice
3. 学会等名 2023 Hallym University-Nagoya City University international Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------