

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591607

研究課題名（和文） 脊髄損傷後神経再生における FABP と制御因子の解明

研究課題名（英文） Roles of FABP and its regulating factors on neurogenesis after spinal cord injury

研究代表者

内田 幹人 (UCHIDA MIKITO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：30313795

研究成果の概要（和文）：

脂肪酸結合蛋白 (FABP) ノックアウトマウス (FABPKO マウス) を用い、野性型マウス (WT マウス) を対照として、クリップ閉鎖脊髄損傷モデルにおける FABP の役割を検討した。その結果、FABP は脊髄損傷後に増殖したアストロサイトで発現亢進を認め、FABPKO マウスでは損傷後 28 日での前角神経細胞は有意に減少し、下肢の運動機能も不良であった。本研究モデルでは、いずれのマウスでも神経新生はほとんど観察されなかった。以上より、FABP は脊髄損傷に対する神経保護作用を有し、これには増殖したアストロサイトの関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined expression change of fatty acid binding protein (FABP) and evaluated the effects of FABP gene knockout on neuronal injury, neurogenesis and functional recovery after spinal cord injury (SCI). FABP is upregulated and mainly expressed in proliferative astrocytes after SCI. sparing of ventral neurons and motor function recovery were significantly worse in the knockout mice. Neurogenesis was hardly observed in this spinal compression model. These data indicate that FABP could have a neuroprotective role and might be associated with proliferation of astrocytes after SCI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：脊髄損傷，脂肪酸結合蛋白，神経新生，神経細胞保護

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷の病態には、外力による一次損傷に加え、それに続く損傷周囲の炎症や浮腫等による周囲の神経細胞壊死、空胞形成及びグリア瘢痕などの二次損傷が大きく関与している。

脊髄損傷後、アストロサイトは反応性に増殖しグリア瘢痕を形成するが、これが軸索伸長を阻害し、機能回復を妨げる原因とされている。一方、増殖したアストロサイトが血液脳関門を修復し、炎症細胞浸潤を抑制し、神経細胞やオリゴデンドロサイトに保護的に作用するとの報告もあり (J Neurosci, 2004; Nat Med, 2006), 反応性アストロサイトの脊髄損傷における役割については、未だ一定の見解が得られていない。

脳と同様に、成体脊髄においても中心管周囲脳室上衣層から幹細胞が分離されている (Neuroscience, 2009)。これらは脊髄損傷後に増殖し、その多くがアストロサイトに分化すると報告されているが (Cell, 1999), 神経細胞への分化も起きているとする報告も近年散見される (Eur. J. Neurosci, 2007, Developmental Biology, 2009)。脊髄損傷後に神経新生が誘導される組織環境や、誘導された神経新生細胞が機能回復にどのように関与するかは、十分解明されていないのが現状である。

脂肪酸結合蛋白 (free fatty acid binding protein: FABP) は、約 130 個のアミノ酸からなり、14-15kD の低分子量の可溶性細胞内蛋白である。FABP は脂肪酸の細胞内輸送や貯蔵、細胞増殖や分化等の多様な細胞内シグナル伝達の調節に関与していると考えられている。哺乳類では、12 種類の分子種が同定されているが、各サブタイプの特異的機能については十分解明されていない。

中枢神経組織に発現している脳型

FABP(FABP7)および上皮型 FABP(FABP5) は、ともに神経幹細胞に強く発現し、胎生期の神経新生に深く関与していると考えられている。また、最近の報告では脳虚血後の神経細胞の保護や新生に FABP が関与することが解明されている。しかし、成体の脊髄損傷後の神経細胞障害や幹細胞増殖における FABP の機能については、全く解明されていない。

2. 研究の目的

本研究においては、FABP7 および FABP5 の遺伝子をそれぞれ欠損させた 2 種類のマウスと野生型マウス (WT マウス) を用い、クリップ閉鎖による脊髄圧迫損傷モデルでの神経細胞障害における FABP の役割を検討した。また、脊髄損傷後の新生細胞の増殖や分化における FABP の役割について検討した。

3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷モデルの作成

生後 9-11 齢 (18-22g) の雌性 C57BL/6WT マウスと、これと背景を同一とする雌性 FABP7 欠損マウス (FABP7KO マウス) および雌性 FABP5 欠損マウス (FABP5KO マウス) を用いた。吸入麻酔下にて、第 10-12 胸椎の椎弓を切除し、微小血管クリップ (閉鎖圧 20g) を用いて脊髄を前後方向から 30 秒閉鎖し、脊髄損傷を作成した。Sham 群では、同環境下で椎弓切除のみを行った。

(2) 新生細胞の同定

新生細胞は、bromodeoxyuridine (BrdU) により標識した。まず、上記 (1) のモデルで脊髄損傷後 1, 3, 7 日目に BrdU を 50 mg/kg, 1 日 3 回 2 時間おきに腹腔内投与し、同日マウスを灌流固定後、脊髄を摘出し、ビブラトームにて 20 μ m 厚の脊髄水平断切片を作成した。切片を、塩酸処置した後、BrdU

免疫染色を行い、BrdU 陽性細胞をカウントし、脊髄損傷後新生細胞増殖のピーク時期を検討した。この結果から、新たに脊髄損傷マウスモデルを作成し、脊髄損傷後、ピーク時をはさんだ3日間 BrdU を 50 mg/kg, 1日4回2時間おきに腹腔内投与し、脊髄損傷後4, 7, 14, 21, 28日目のマウスから同様にして脊髄切片を作成した。

(3) FABP 発現の Western blot 解析

脊髄損傷後3, 7, 10, 14, 28日に脊髄を摘出し、蛋白質サンプルを抽出した。30 μ g のサンプルを 10% NuPAGE Bis-Tris gel を用いて電気泳動し、polyvinylidene difluoride 膜へ転写した。膜はブロッキング後、一次抗体（ウサギ抗 FABP7 抗体および FABP5 抗体）および二次抗体と反応させ、結合抗体を chemiluminescence 法で発光した。Fuji LAS 4000 Lumino Image Analyzer (Fuji Film 社) で検出した。

(4) FABP 発現細胞の同定

WT マウスにて、FABP7 及び FABP5 と各種細胞マーカー {NeuN (成熟神経細胞), GFAP (アストロサイト)} の多重免疫染色を行い、共焦点顕微鏡 (FV1000; Olympus 社) を使用し、各種マーカーの共局在を観察した。

(5) 新生神経細胞の分化の同定

上記(2)のサンプルを使用し、BrdU と各種細胞マーカー {Double cortin (DCX) (遊走能を持つ幼弱神経細胞), NeuN} の多重蛍光免疫染色を行った。共焦点顕微鏡を使用し、BrdU 陽性細胞と各種マーカーとの共局在を観察し、神経新生の有無を検討した。

(6) 残存神経細胞数の比較

上記(2)のサンプルの脊髄損傷28日目の切片を用いて、残存神経細胞数を3系統のマウス群間 (WT, FABP7KO 及び FABP5KO) で比較した。

(7) 脊髄損傷後機能回復の評価

脊髄損傷後1, 4, 7, 14, 21, 28日目に、下肢運動機能を Basso Mouse Locomotor Scaling (BMS) にて評価し、3系統のマウス群間 (WT, FABP7KO 及び FABP5KO) で比較した。

(8) 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。二群間の検定には Student の t 検定を行った。多群間の検定は、ANOVA 解析を行った後、Dunnett, Scheffe の多重比較検定を行った。P<0.05 を統計学的有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 脊髄損傷後の FABP の発現

WT マウスでは、脊髄損傷後に FABP 発現が誘導され、FABP7 は14日目、FABP5 は10日目において、sham 群に比較し有意に発現していた (n=4, P<0.05) (図1)。

図1A

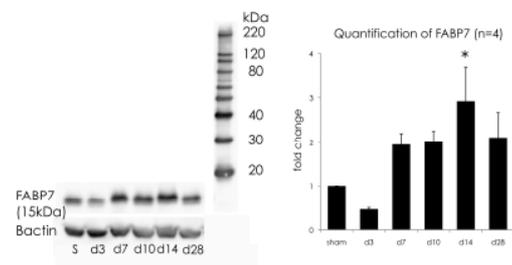


図1B

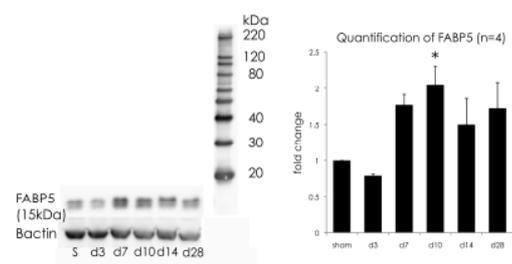


図1: 脊髄損傷後の FABP の発現 (A: FABP7, B: FABP5)

(2) FABP の発現細胞

Sham 群において, FABP7 は主にアストロサイトに発現していたが, FABP5 はアストロサイトとニューロンに発現していた. 上記 western blot 解析から両 FABP の発現がピークを迎えた脊髄損傷後 14 日目の時点では, 殆どの FABP7 及び FABP5 は, 増殖したアストロサイトに強く発現していた.

図2A

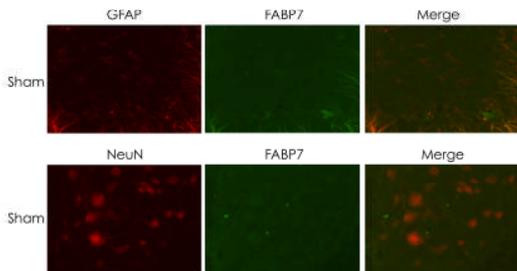


図2B

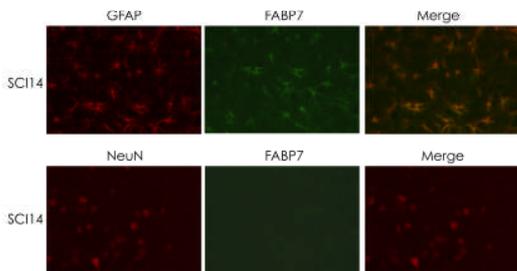


図2C

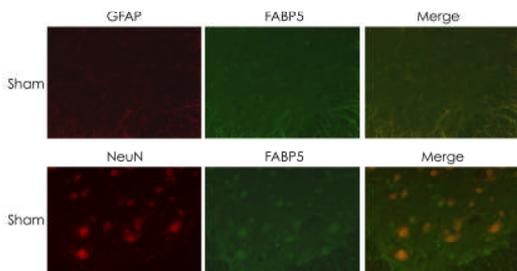


図2D

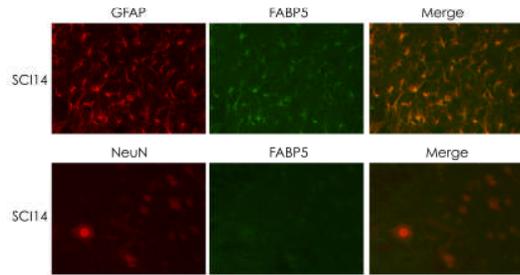


図 2 : WT マウスの Sham と脊髄損傷後 14 日目の FABP と GFAP, NeuN の多重免疫染色 (A : sham の FABP7, B : 脊髄損傷後 14 日目の FABP7, C : sham の FABP5, D : 脊髄損傷後 14 日目の FABP5)

(3) 脊髄損傷後新生細胞増殖の検討

プレリミナリー実験として, 脊髄損傷後新生細胞の増殖ピークを WT マウスで検討した. 脊髄損傷後 3 日目に BrdU の取り込みはピークを迎え, sham に比較して有意に亢進していた (n=5, P<0.05) (図 3). この結果より, 脊髄損傷後 4, 7, 14, 21, 28 日目のマウスから脊髄切片を作成する際には, BrdU を脊髄損傷後 2-4 日目に投与することとした.

図3

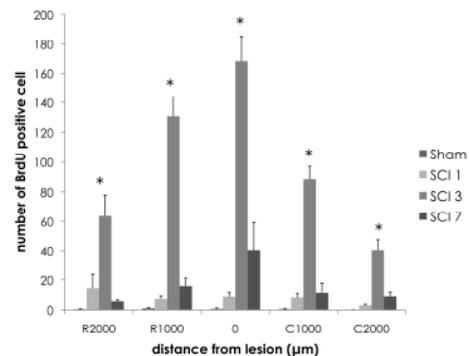


図 3 : 脊髄損傷後の BrdU 陽性細胞数

(4) 新生細胞の分化

BrdU 陽性細胞と DCX, NeuN との多重染色を施行したが, 共陽性を示す細胞は殆ど認められず, 3 系統のマウス群間 (WT, FABP7KO 及び FABP5KO) に差を認めなか

った。

図4

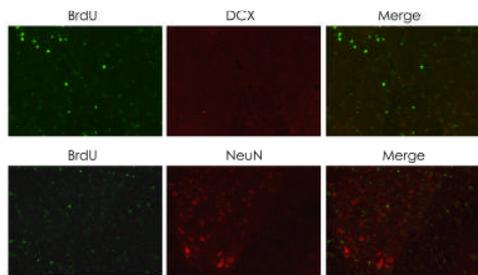


図4 : BrdU と DCX, NeuN の多重免疫染色 (DCX は脊髄損傷後 14 日目, NeuN は脊髄損傷後 28 日目の染色)

(5) 脊髄損傷後の生存神経細胞数

脊髄損傷後 28 日目の前角における残存神経細胞数をカウントし, 3 系統マウス群間 (WT, FABP7KO 及び FABP5KO) で比較した結果, FABP7 及び FABP5KO マウスでは, WT マウスと比較し, 有意に細胞数が少なかった ($n=4$, $P<0.05$) (図 5).

図5A

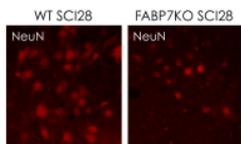


図5B

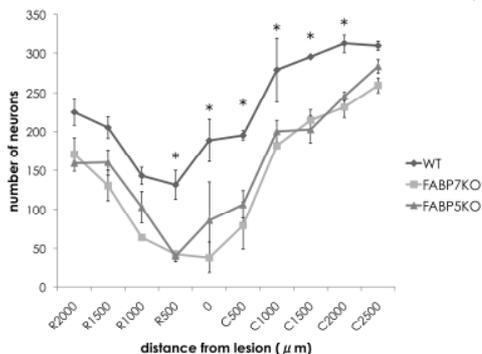


図 5 : 脊髄損傷後神経細胞傷害 (A : NeuN の蛍光免疫染色, 5B : 残存神経細胞数)

(6) 下肢運動機能回復

FABP7 及び FABP5KO マウスでは, WT マウスと比較し, 有意に運動機能の回復が不良であった ($n=10$, $P<0.05$).

図6

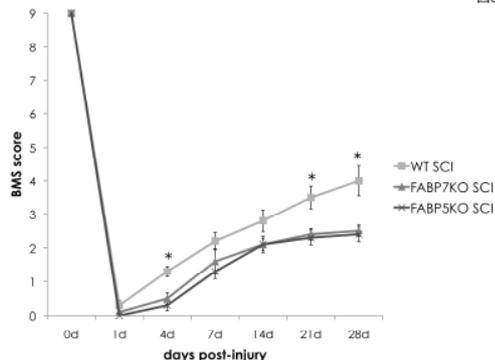


図 6 : 脊髄損傷後の下肢運動機能評価

考察

(1) 脊髄損傷後の神経細胞傷害における FABP の役割について

本研究において, FABP7 及び FABP5KO マウスは, WT マウスと比較し, 脊髄損傷後の運動機能回復が有意に不良で, 神経細胞傷害は両 FABP KO マウス群で重度であった.

FABP は遊離脂肪酸と結合することによって, 脂肪酸の細胞内輸送や貯蔵等に関与していると考えられている. n-3 系多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (docosahexanoic acid: DHA) などは, 脊髄損傷後の神経細胞保護作用を有することが報告され (Brain, 2007), FABP7 及び FABP5 は DHA と高い親和性を有するとされており (J Neurochem, 2008), 本実験結果はこの関連が示唆される.

また, 脊髄損傷後に FABP7 及び FABP5 の発現が有意に亢進していることが明らかとなった. 脊髄損傷 28 日目では, WT マウス群と比較し, 両 FABPKO マウス群におい

て有意に神経細胞残存数が少なかったことから、脊髄損傷後にアストロサイトで発現が亢進した FABP が神経保護的に作用した可能性が考えられる。

FABP7 と FABP5 の局在には差異が認められた。アストロサイトには両 FABP は発現していたが、神経細胞には FABP5 のみ発現していた。今後、FABP7 と FABP5 の局在について、他のグリア系細胞についても詳細に検討し、FABP 同士の相補作用も含め、機能回復における FABP の役割についても検討する必要がある。

(2) 脊髄損傷後の神経新生における FABP の役割について

本研究では、微小血管クリップにて脊髄を前後方向から閉鎖圧迫する脊髄損傷モデルを用いた。脊髄損傷後に FABP7 及び FABP5 の発現は有意に亢進することが明らかとなったものの、3 系統マウスとも BrdU と共陽性を示す神経細胞マーカー陽性細胞が殆ど見られず、神経新生における FABP の役割は明らかではなかった。

本研究では、臨床の脊髄損傷の受傷機転に近い状態で検討するために本モデルを用いたが、脊髄への傷害が強いと神経新生が起きないとの報告もある (Eur. J. Neurosci, 2007)。脊髄における幹細胞は、損傷後に増殖し、神経細胞ではなくアストロサイトに分化すると報告されているが (Cell, 1999)、本研究モデルは、脊髄傷害が強かったために神経新生が起きず、神経新生における FABP の関与について解明できなかった可能性がある。今後は、軽微な脊髄損傷モデルを用いて、脊髄損傷後の神経新生における FABP の役割を再検討する予定である。

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)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 幹人 (UCHIDA MIKITO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員
研究者番号：30313795

(2) 研究分担者

堀越 徹 (HORIKOSHI TORU)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：50209300

(3) 連携研究者

なし