

## 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24年 6月14日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22791369

研究課題名（和文） 脊椎損傷における分子生物機構の解明、GAGの役割

研究課題名（英文） Molecular biology of GAG in the central nerve system and spinal cord injury.

研究代表者

若尾 典充 (WAKAO NORIMITSU)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：80528802

研究成果の概要（和文）：本研究で我々はヒアルロン酸オリゴ糖の2～12糖鎖構造体が脊髄損傷におよぼす影響を検討した。HA4が脊髄損傷後の後肢運動機能改善に寄与する結果を示した。HA4は*in vitro*で小脳顆粒細胞に対する細胞保護効果を示したが、軸索伸長に対する効果は見られなかった。組織学的検討においては、HA4投与によるミクログリア、活性化ミクログリアの損傷部への集積抑制がみられ、これは機能回復の説明の一旦と成ると考える。

研究成果の概要（英文）：Hyaluronan is a component of the extracellular matrix of the central nervous system, and forms perineuronal nets around neurons. It has been recently reported that the hyaluronan-degrading enzyme hyaluronidase promotes lateral mobility of AMPA-type glutamate receptors and enhances synaptic plasticity. However, the biological significance of hyaluronan-degrading products (oligosaccharides) has not been studied in depth. Here we investigated the effects of hyaluronan oligosaccharides on motor function recovery after spinal cord injury in rats. The disaccharide HA2 and especially the tetrasaccharide HA4, significantly improved motor function, unlike the case with oligosaccharides composed of 6-12 saccharides. Consistent with this finding, HA4 treatment enhanced axonal regeneration/sprouting, as assessed by corticospinal tract tracer fiber counts. HA4 treatment also significantly suppressed accumulation of Iba-1-positive cells in a lesion two weeks after injury. *In vitro* experiments demonstrated that NMDA-induced neuronal cell death was partly blocked by HA4, but not by other oligosaccharides, whereas proteoglycan-mediated inhibition of neurite outgrowth was not affected by treatment with any oligosaccharide examined. Taken together, the present results revealed that due in part to its neuroprotective activity, HA4 promotes motor function recovery after spinal cord injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000円	600,000円	2,600,000円
2011年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000円	930,000円	4,030,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：(1) 脊髄損傷 (2) ヒアルロン酸オリゴ (3) 軸索伸長効果 (4) PKC, リン酸化 PKC (5) 培養上清 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 活性 (6) 急性期、亜急性期 (7) くも膜下、経口投与 (8) サル脊髄損傷モデル

### 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系における神経周囲の細胞外基質、いわゆる Perineuronal net(以下 PNN)はヒアルロン酸(以下 HA)、プロテオグリカン(以下 PG)、tenacin R より構成される。ここに存在する特徴的な PG は lectican family と総称され、球形の N 末端には HA が結合し、C 末端には tenacin R が結合することで複合体が形成され、あらゆる神経細胞の周囲に見られる構造である。

近年の報告で、HA 分解蛋白であるヒアルロニダーゼ(以下 HA-dase)とコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(以下 CSPG)を分解するコンドロイチナーゼ ABC(以下 C-ABC)により短期間シナプス可塑性が上昇することが示された。CSPG は PNN を構成する代表的な PG であることを考慮すると、HA-dase ならびに C-ABC の効果が PNN の構造そのものに影響を及ぼす可能性がある。さらに C-ABC は感覚系の神経ネットワーク再構築のみならず感情を規定する神経系のネットワークも再構築するとの実験結果が示されたことからこの可能性は支持される。

一方 PNN 構成要素を分解する手法ならびにその効果に関してこれまで研究がなされたきたものの、その分解産物に関してはほとんど研究されていない。今回我々は、HA 分解産物である 2 から 12 糖までの HA オリゴ糖の生物学的活性と、ラット脊髄損傷モデルにおける後肢機能回復効果を検証した。この実験より特に 4 糖構造からなる HA4 に、脊髄損傷後の後肢機能回復効果と神経細胞保護効果を認めためここに報告する。

### 2. 研究の目的

中枢神経系における HA オリゴ糖の生理活性および脊髄損傷に及ぼす影響を網羅的に解析すること。

### 3. 研究の方法

#### 脊髄損傷モデル

成熟雌 SD ラット(200-230g)を用いた。全身麻酔ののち第 9 胸椎椎弓切除し、硬膜を露出。IH impactor により 200dyn の外力により脊髄へ直接損傷を加えた。損傷処置後、シリコンチューブと浸透圧ポンプを接合し皮下へ留置した。この浸透圧ポンプに各種治療介入用の薬剤を 10  $\mu$ g/200  $\mu$ l の濃度で充填した。損傷後は膀胱機能が正常化するまで一日二回、用手的に下腹部圧迫により排尿した。

#### BBB score

後肢機能の回復評価は BBB score を用いた。評価は 2 人の観察者により、盲検法で行った。術翌日に BBB score が 0 点であったもののみを対象とし、術翌日に後肢が動く個体は除外した。

#### ラット小脳顆粒細胞精製

生後 7-8 日、SD ラットの小脳から顆粒細胞を精製、初代培養として使用した。

#### 神経保護活性評価

上記精製したラット小脳顆粒細胞精製後 14 日間の培養の後、グルタミン酸 analogue である NMDA によるストレス下での細胞死を、HA オリゴ糖処理により救済できるかどうかを検討した。NMDA ストレスに先立ち HA2-12 の各オリゴ糖により 10  $\mu$ g/ml の濃度下で 24 時間処理した。細胞死の判定は PI

calcein AM 染色を用いた。また培養上清中の LDH 活性を吸光度分析し、細胞障害度評価も施行した。

#### 神経軸索突起伸張に対する効果

上記ラット小脳顆粒細胞を用い軸索突起伸張効果を検討した。各オリゴ糖  $10 \mu\text{g/ml}$  で coat したスライド上に  $5.0 \times 10^6$  個/ml の濃度で顆粒細胞の培養を 24 時間行った。4%PFA で処理後、ニューロン特異的抗体である Tuj-1 による蛍光染色を行い軸索突起長の測定を行い定量した。

#### 組織学的検討

脊髄損傷後 8 週のラットを 4%PFA 環流処理し、脊髄組織を採取。スクロース処理の後、切片を  $20 \mu\text{m}$  の厚さで作成した。本切片に対し、ミクログリア染色を Iba-1, 活性化ミクログリア染色を ED-1 でそれぞれ染色し、脊髄損傷中心部から頭尾側 10mm の範囲で染色領域を測定し定量化した。HA 投与群、非投与群共に各 5 個体の平均値を算出した。

#### CST(cortico-spinal tract) tracer

下行性の皮質脊髄路の神経再生評価を目的としてトレーサー実験を行った。全身麻酔下で損傷 8 週後ラットの頭部正中より BDA を注入し、その 2 週後に損傷脊髄周囲の切片を評価した。BDA で標識された神経繊維の分布を損傷部より頭側、尾側それぞれ 10mm での横断面において、BDA 陽性繊維を定量し、HA 投与群と非投与群の比較を行うことで再生神経の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### HA4 は脊髄損傷後後肢運動機能改善効果を有する

ラット脊髄圧挫損傷モデルに対する HA オリゴ糖投与後の後肢運動機能を Fig1 に示す。Fig1A,B に示すように治療介入群 HA オリゴ糖 6 種、高分子 HA、非投与の計 8 群間に有意差が見られた (Repeated measure ANOVA,

$p < 0.001$ )。各群間比較では、HA4 投与群と非投与群間に有意差が見られた ( $p = 0.012$ ) もの他の群間に差はなかった。Fig 1C に示すように HA4 投与濃度は、 $1 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  から  $100 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  の濃度範囲においてほぼ同等の後肢機能改善効果を示した。

#### HA4 は脊髄損傷後の軸索再生に寄与する

HA4 投与による後肢運動機能改善効果の組織学的な裏付けを取るために、我々は BDA を用いた皮質脊髄路に対する順行性トレーサー実験を行った。Fig.2A は損傷中心より頭側 10mm の皮質脊髄路に集積した BDA 陽性繊維を示す。HA4 投与群と非投与群間に有意差は見られない (Fig. 2B)。一方損傷中心部より尾側 10mm の横断像では Fig 2C に示すように HA4 投与群で有意に多くの灰白質 BDA 陽性繊維が見られ (Fig 2D)、これらの結果から HA4 投与が軸索再生に寄与した可能性が示唆される。

次に損傷中心の Iba-1, ED-1 による染色結果と定量結果を示す。Iba-1 陽性領域は受傷後 1 週の段階では HA4 投与群、非投与群間に差を認めないものの、受傷後 2 週の段階で HA4 投与群において有意に低下した (Fig 2E)。一方 ED-1 陽性領域は受傷後 1 週、2 週の両時相において共に HA4 投与群が有意に低下していた (Fig 2F)。

#### 軸索突起伸張効果

脊髄損傷後後肢機能改善は部分的には軸索再生で説明が可能であることから、HA オリゴ糖が軸索伸長効果を有するかどうか初代培養小脳顆粒細胞を用いた軸索突起伸張実験で検証した。Fig3A に示すように HA オリゴ糖は軸索突起伸張に影響を与えなかった。

#### 神経細胞保護効果

HA オリゴ糖の神経細胞保護効果を検証した。培養後 14 日目の小脳顆粒細胞に対し、各オリゴ糖 ( $10 \mu\text{g/mL}$ , 24 時間) による前処置に

より NMDA 興奮性毒性細胞死が救済されるかどうかを PI calcein AM 染色で検証した。NMDA (10  $\mu$  g/ml ~ 500  $\mu$  g/ml) 濃度依存性の神経細胞死と HA オリゴ糖前処置による細胞死救済効果を Fig 3B に示す。NMDA (100  $\mu$  g/ml) による細胞死を HA4 のみが有意に救済した。また培養上清中 LDH 濃度も HA4 のみが有意に低値を示した。これらの結果から HA4 は NMDA 依存性興奮性毒性に対する神経細胞保護効果をもつことが示唆される。

#### 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 11 件)

1. *Imagama S, Matsuyama Y, Sakai Y, Ito Z, Wakao N, Deguchi M, Hachiya Y, Osawa Y, Yoshihara H, Kamiya M, Kanemura T, Kato F, Yukawa Y, Yoshida T, Harada A, Kawakami N, Suzuki K, Matsubara Y, Goto M, Sato K, Maruyama K, Yanase M, Ishida Y, Kuno N, Hasegawa T, Ishiguro N An arterial pulse examination is not sufficient for diagnosis of peripheral arterial disease in lumbar spinal canal stenosis: a prospective multicenter study. Spine (Phila Pa 1976) 2011 Jan 6.*
2. *Wakao N, Imagama S, Zhang H, Tauchi R, Muramoto A, Natori T, Takeshita S, Ishiguro N, Matsuyama Y, Kadomatsu K (2011) Hyaluronan oligosaccharides promote functional recovery after spinal cord injury in rats. Neurosci Lett 488:299-304*
3. *Wakao N, Imagama S, Ito Z, Ando K, Hirano K, Tauchi R, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Matsuyama Y, Ishiguro N (2011) Clinical Outcome of Treatment for Spinal Dural Arteriovenous Fistulas: the Results of Multivariate Analysis and Review of the Literatures. SPINE (2011 Jun 23, Epub ahead of print)*
4. *Imagama S, Wakao N, Kitoh H, Matsuyama Y, Ishiguro N (2011) Factors related to surgical outcome after posterior decompression and fusion for craniocervical junction lesions associated with osteogenesis imperfecta. Eur Spine J Jul;20*
5. *Imagama S, Ito Z, Wakao N, Sakai Y, Kato F, Yukawa Y, Sato K, Ando K, Hirano K, Tauchi R, Muramoto A, Hashizume Y, Matsuyama Y, Ishiguro N (2011) Differentiation of localization of spinal hemangioblastomas based on imaging and pathological findings. Eur Spine J. 2011 Apr 29*
6. *Wakao N, Imagama S, Ito Z, Ando K, Hirano K, Tauchi R, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Matsuyama Y, Ishiguro N (2011) Total En Bloc Spondylectomy for L2 Chordoma: A case report (2011) Nagoya J Med Sci (in press)*
7. *Imagama S, Wakao N, Ando K, Hirano K, Tauchi R, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Ukai J, Kobayashi K, Shinjo R, Nakashima H, Maruyama K, Matsuyama Y, Ishiguro N (2011) Treatment for primary spinal atypical*

- teratoid/rhabdoid tumor. J Orthop Sci (in press)*
8. Ando K, Imagama S, Wakao N, Ito Z, Hirano K, Tauchi R, Muramoto A, Matsuyama Y, Ishiguro N. *Examination of the influence of ossified anterior longitudinal ligament on symptom progression and surgical outcome of thoracic ossification of the ligamentum flavum: a multicenter study. Laboratory investigation. J Neurosurg Spine (in press)*
9. Wakao N, Imagama S, Ito Z, Ando K, Hirano K, Tauchi R, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Matsuyama Y, Ishiguro N. *A case of split notochord syndrome: an adult with a spinal endodermal cyst mimicking an intramedullary tumor. Neuropathology. 2011 Dec;31(6):626-31. doi: 10.1111/j.1440-1789.2011.01212.x. Epub 2011 Mar 29.*
10. Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, Yamagata M, Sakamoto K, Tauchi R, Wakao N, Imagama S, Hibi H, Kadomatsu K, Ishiguro N, Ueda M. *Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. J Clin Invest. 2012 Jan 3;122(1):80-90. doi: 10.1172/JCI59251. Epub 2011 Dec 1.*
11. Imagama S, Wakao N, Ando K, Tauchi R, Tsuboi A, Ishiguro N. *Conservative treatment for cervical radiculopathy due to extensive foraminal disc calcification in children: a case report. J Bone Joint Surg Am. 2011 Aug 17;93(16):e93 1-5. No abstract available.*
- [学会発表] (計 8 件)
- ① The management for Osteoporotic Vertebral Fracture in Japan  
Invited Speaker  
Korean society for Osteoporosis 2011.12
- ②新ロコモティブシンドローム基準の検証—  
主題  
日本整形外科学会総会 2011.5
- ③Preoperative paralysis negatively affects life prognosis following operative treatment for osteoporotic vertebral fracture  
一般演題  
日本整形外科学会総会 (English session) 2011,5
- ④新ロコモティブシンドローム基準に腰椎疾患が及ぼす影響—腰痛関連指標、健康関連指標との比較検討—  
主題  
日本脊椎脊髄病学会 2011, 4
- ⑤癌根治術における脊椎外科医の役割  
主題  
Authentic Spinal Surgeon Summit, Tokyo 2011, 2
- ⑥石灰化を伴う頸髄内病変  
主題  
圧迫性脊髄症研究会 2011, 2

⑦ 脊髄動静脈奇形の症状と診断に関する検討

一般演題

日本脊椎脊髄病学会 2010, 4

⑧ 脊髄動静脈奇形の治療成績

主題

日本脊椎脊髄病学会 2010, 4

[図書] (計 1 件)

**【脊椎・脊髄画像診断】 脊髄病変 髄内腫瘍**

**(解説/特集)**

**若尾典充**(名古屋大学 医学部整形外科学教室), 今釜史郎, 安藤圭, 平野健一, 田内亮吏, 村本明生, 松井寛樹, 石黒直樹, 松山幸弘

Orthopaedics(0914-8124)24 巻 11 号

Page159-168(2011.10)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若尾 典充 (WAKAO NORIMITSU)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80528802

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: