

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月14日現在

|  |
|--|
| 機関番号：15401   |
| 研究種目：若手研究（B）   |
| 研究期間：2011 ～ 2012   |
| 課題番号：23791646  |
| 研究課題名（和文） 脊髄損傷に対する神経・血管特異的マイクロRNAを用いた新たな治療アプローチの開発   |
| 研究課題名（英文） Neural and vascular specific microRNA as a novel approach for the treatment of injured spinal cord |
| 研究代表者<br>亀井 直輔（KAMEI NAOSUKE）<br>広島大学・病院・病院助教<br>研究者番号：70444685  |

研究成果の概要（和文）：脊髄損傷モデルに対する microRNA-210 の投与は脊髄損傷後の新生血管、グリオシスおよび軸索伸長を促進し、脊髄機能回復を促進した。miR210 の投与によって PTP1B, P-Erk1/2, EFNA3 の発現が抑制され、WNT シグナルが促進された。これらが血管新生を介した脊髄再生メカニズムが働いた可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Administration of microRNA-210 to the spinal cord injury models enhanced angiogenesis, astrogliosis, axon growth and functional recovery following injury. Administration of microRNA-210 downregulated the expression of PTP1B, P-Erk1/2, EFNA3 and promoted Wnt signaling. These might participate in the mechanisms of spinal cord regeneration through the promotion of angiogenesis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：再生医療・再生医学・神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 脊髄再生研究

損傷脊髄の再生を目指して世界中で活発に研究が行われており、幹・前駆細胞移植、軸索伸長阻害因子の抑制、増殖因子の投与など、そのアプローチは多岐にわたっている。特に幹細胞による脊髄組織形成の可能性や Nogo などの軸索伸長阻害因子の存在が明らかになった際には、脊髄再生への期待が高まり、世界各国で臨床研究も行われたが、いまだ十分な成果を挙げるには至っていない。

## (2) 神経・血管ニッチ

近年、神経と血管による微小環境（ニッチ）の重要性が明らかとなってきた。神経幹細胞の維持・増殖や神経発生には血管内皮とのニ

ッチが必須であったり、軸索発生に血管由来のガイダンス分子が関与していたり、中枢神経と血管との間には、胎生期から成体に至るまで、密接な関係があると考えられている。申請者は、神経と血管との相互作用を利用した治療アプローチとして、血管内皮前駆細胞移植による血管再生を介した脊髄再生研究を行い、動物実験レベルでの良好な成績を報告してきた（Kamei N et al. Stem Cells 2010）。しかし、自家細胞移植のようなオーダーメイド治療を行う場合、患者のバックグラウンドによって移植細胞の機能に著しい個人差が出る可能性があることや、治療を行う各医療施設に厳しい施設基準や専門的知識・技術を持った人材および労力が要求されることか

ら、一般に普及させることが非常に難しい。また、培養細胞の場合には樹立にある程度の時間が必要なため、治療効果を得るために必要なタイミングでの移植が困難という問題もある。そこで、新たな脊髄再生治療アプローチとして、マイクロ RNA (miRNA) に着目した。

### (3) マイクロ RNA

miRNA は 18~25 塩基長の小さな一本鎖 RNA で、ノンコーディング RNA と呼ばれるタンパク質をコードしない RNA である。miRNA はタンパク質に翻訳されないが、タンパク質をコードする特定の遺伝子のメッセンジャー RNA (mRNA) の発現や、mRNA からタンパク質への翻訳を制御することで機能している。miRNA は小さいが故に化学合成が容易であり、創薬としての有益性が高い生体分子として注目されている。神経発生や血管新生を制御する miRNA についてはすでに明らかになりつつある。特に miRNA による血管新生の制御を癌治療に応用する研究は盛んに報告されるようになってきているが、再生医療分野における miRNA の治療応用研究の報告はまだ数少なく、あまり進んでいないのが現状である。その中でも、申請者らは運動器における miRNA の研究にいち早く取り組んでおり、脊髄損傷における miRNA 発現変化について報告している (Nakanishi K, Kamei N et al. Spinal Cord 2009)。また、申請者と同じ研究グループで、本研究の研究協力者である中佐智幸は、筋特異的 miRNA 投与が骨格筋損傷後の筋再生を促進することを報告している (Nakasa T et al. J Cell Mol Med 2009)。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経・血管特異的 miRNA が損傷脊髄において、神経再生や血管新生に与える影響や脊髄機能修復に与える効果について明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

マウス T10 椎弓切除後に、IH インパクトで胸髄損傷を作製した。まず予備実験として、損傷 24 時間後に miR-124a、miR-126、miR-210 をそれぞれ損傷部に注入し、経時的な運動機能評価を行い、miR-210 の投与で運動機能が有意に改善することを確かめた。引き続き、miR-210 投与実験へと移行し、対照群には軟骨特異的な miR-140 や無機能 siRNA を投与した。

(1) miR-210 投与後の脊髄損傷部での経時的な miR-210 の発現を real-time PCR で評価した。

(2) 血管新生の評価として、損傷後 3, 7 日目の損傷部組織で、CD31 (血管内皮) による免疫染色を行った。

(3) 損傷部のグリオーシスの評価として、

3 日目の組織で Nestin (未分化細胞)、GFAP (アストロサイト)、7, 14 日目の組織で GFAP, F4/80 (マクロファージ) による免疫染色をそれぞれ行った。

(4) 脊髄機能評価として、Basso Mouse Scale (BMS) による後肢運動機能スコア、経頭蓋電気刺激による後肢からの運動誘発電位を損傷 1~42 日目に測定した。

(5) 軸索再生評価として、損傷後 6 週の脊髄損傷部の尾側組織を用いて、5HT による軸索の染色と Fluoromyelin による髄鞘の染色を行った。

(6) miR-210 のターゲット遺伝子の探索のため、マイクロアレイ解析を行い、候補遺伝子に関して損傷 2, 3, 5 日の損傷部組織で real-time PCR を行った。

(7) miR-210 のターゲット候補のタンパクレベルの発現を損傷後 3 日の組織を用いた Western Blotting で評価した。

## 4. 研究成果

(1) マイクロ RNA 投与翌日から 7 日目まで、miR-210 群における miR-210 の発現が有意に高く、発現ピークは投与 2 日後であった (図 1)。また、in situ hybridization にて脊髄損傷部とその周囲に miR-210 の著明な発現を認めた (図 2)。

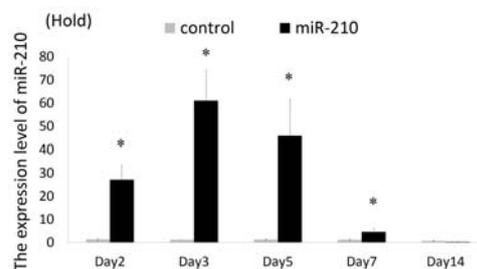


図 1 : 脊髄損傷部 real time PCR

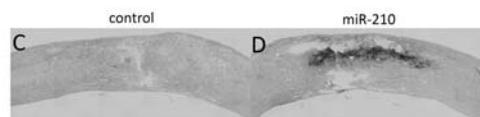


図 2 : 脊髄損傷部 in situ hybridization

(2) miR-210 群では siRNA 群と比較して損傷後 3 日目で脊髄損傷部に CD31 陽性血管を多く認めた (図 3)。

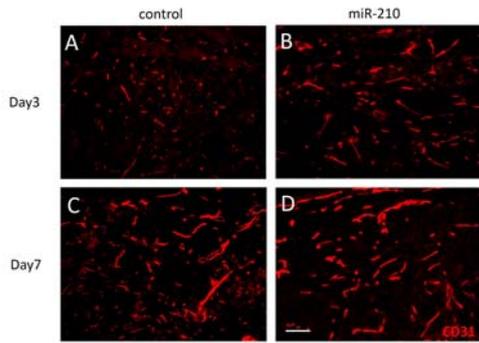


図 3 : 脊髄損傷部の CD31 免疫染色

(3) miR-210 群では損傷 3 日目に Nestin 陽性細胞数が有意に多く (図 4)、7、14 日目に GFAP 陰性かつ F4/80 陽性の領域が有意に小さかった (図 5)。

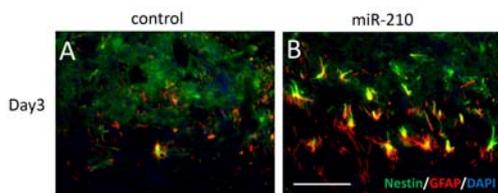


図 4 : 内源性神経幹細胞の発現

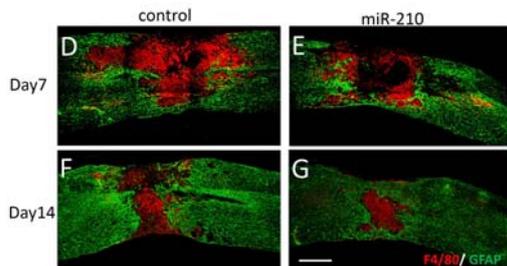


図 5 : 損傷後のアストログリオーシス

(4) miR-210 群では、BMS は損傷 5 日目以降、運動誘発電位は 7 日目以降で siRNA 群より有意な改善を認めた。

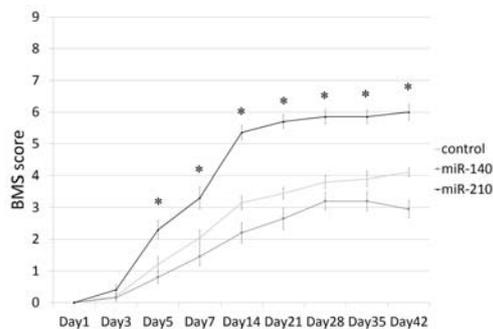


図 6 : BMS による後肢運動機能評価

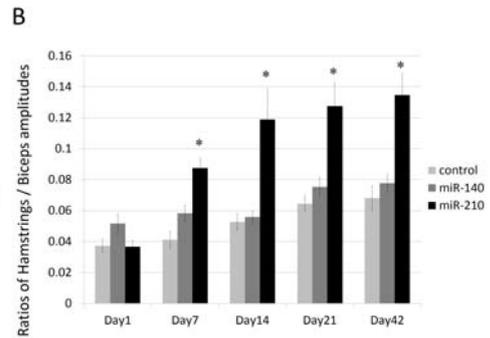


図 7 : 経頭蓋電気刺激-後肢運動誘発電位

(5) miR-210 群では 5HT 陽性軸索の数が有意に多く、Fluoromyelin 陽性の髄鞘面積が有意に大きかった (図 8)

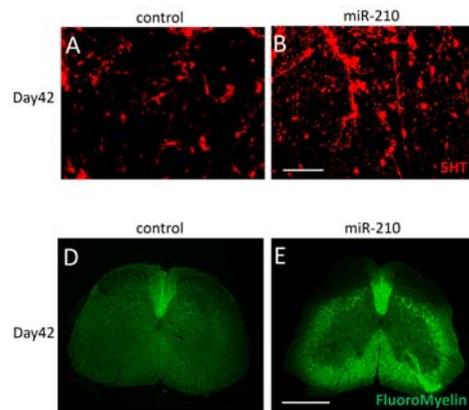


図 8 : 軸索再生の評価

(6) これまで miR-210 のターゲット遺伝子として報告されている遺伝子群の中で、PTP1B の発現に有意差を認めたがその他の遺伝子発現には明らかな有意差を認めなかった (図 9)。WNT シグナル阻害因子である SFRP4 の発現が、miR210 群で有意に抑制されていた。

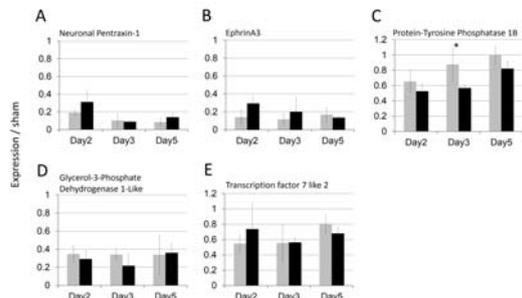


図 9 : ターゲット遺伝子の発現評価

(7) Western Blotting による解析では、miR-210 の投与によって PTP1B, P-Erk1/2, EFNA3 などの発現抑制を認め、これらにターゲット因子の抑制によるメカニズムが推測された。また Beta catenin, Active beta catenin の発現上昇を認め、Wnt シグナルの促進も血管新生促進を介した脊髄再生促進に関与していると考えられた (図 10)。

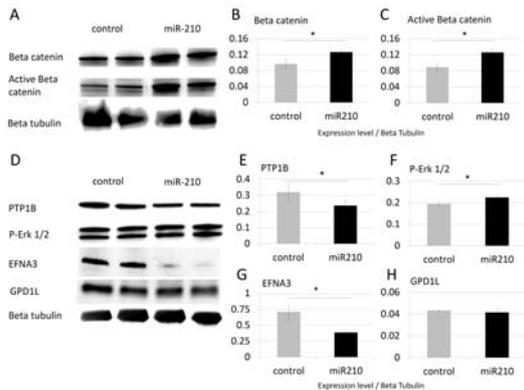


図 10 : タンパク発現の評価

#### まとめ

投与した miR210 は脊髄組織に取り込まれ、新生血管、脊髄組織修復および脊髄機能回復を促進した。miR210 の投与により、PTP1B, P-Erk1/2, EFNA3 の抑制や WNT シグナルの促進を介した血管新生メカニズムが働いた可能性がある。

#### 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 8 件)

1. Naosuke Kamei et al. Ex-vivo expanded human blood-derived CD133+ cells promote repair of injured spinal cord. *Journal of the Neurological Sciences*. 査読有 328, 2013, 41-50
2. Naosuke Kamei et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research* 査読有 90, 2012, 2281-2292
3. Naosuke Kamei et al. Endothelial progenitor cells promote astrogliosis following spinal cord injury through Jagged1-dependent Notch signaling. *Journal of Neurotrauma*. 査読有 29, 2012, 1758-1769
4. Michiko Takeuchi, Naosuke Kamei et al. Human platelet-rich plasma promotes axon growth in brain-spinal cord coculture.

*Neuroreport*. 査読有 23, 2012, 712-716

5. Yuki Fujioka, Naosuke Kamei et al. Magnetic field-based delivery of human CD133+ cells promotes functional recovery after rat spinal cord injury. *Spine*. 査読有 37, 2012, E768-777

6. 亀井直輔. Vascular niche を利用した脊髄再生アプローチ. *日本整形外科学会雑誌*. 査読無 86, 2012, 499-503

7. 亀井直輔. Vascular niche. *整形外科*. 査読無 63, 2012, 458-458

8. Bunichiro Izumi, Naosuke Kamei et al. MicroRNA-223 expression in neutrophils in the early phase of secondary damage after spinal cord injury. *Neuroscience Letters*. 査読有 492, 2011, 114-118

[学会発表] (計 16 件)

1. 宇治郷諭, 亀井直輔. 血管新生マイクロ RNA による脊髄再生. 第 42 回日本脊椎脊髄病学会 2013 年 4 月 25 日 沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)
2. 宇治郷諭, 亀井直輔. マイクロ RNA-210 による脊髄再生. 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013 年 3 月 21 日 パシフィコ横浜(横浜市)
3. Satoshi Ujigo, Naosuke Kamei. Administration of microRNA-210 promotes spinal cord regeneration. 2013 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2013 年 1 月 26 日 San Antonio, TX, USA
4. Naosuke Kamei. Spinal cord regeneration through the vasculogenesis (招待講演). The 18th National Congress of Indonesian Orthopaedic Association. 2012 年 11 月 21 日 Jakarta, Indonesia
5. 亀井直輔. 脊髄損傷に対する新たな血管再生治療 (招待講演). 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012 年 10 月 26 日 名古屋国際会議場(名古屋市)
6. 宇治郷諭, 亀井直輔. microRNA-210 による脊髄再生. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012 年 10 月 26 日 名古屋国際会議場(名古屋市)
7. 亀井直輔. 血管再生治療による脊髄再生. 第 50 回広島脊椎脊髄セミナー. 2012 年 9 月 8 日 大正富山医薬品広島支店 (広島市)
8. 宇治郷諭, 亀井直輔. 血管新生 microRNA による脊髄再生. 第 11 回日本再生医療学会総会. 2012 年 6 月 12 日 パシフィコ横浜(横浜市)
9. 亀井直輔. マイクロ RNA による新たな脊髄再生アプローチ (招待講演). 第 85 回日本整形外科学会学術総会. 2012 年 5 月 17 日 国立京都国際会館 (京都市)
10. Bunichiro Izumi, Naosuke Kamei.

MicroRNA-223 appears in neutrophils following spinal cord injury in mice. 3rd Annual Meeting of Cervical Spine Research Society Asia Pacific Section. 2012年04月21日 Fukuoka, Japan

11. 宇治郷諭, 亀井直輔. 血管新生マイクロRNAによる脊髄再生. 第41回日本脊椎脊髄病学会. 2012年4月19日 石橋文化センター(久留米市)

12. Ujigo Satoshi, Naosuke Kamei. Administration of microRNA-210 promotes spinal cord regeneration. 2012 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2012年2月4日 Moscone West Convention Center, San Francisco, CA, USA

13. 亀井直輔. 脊髄損傷に対する血管再生治療(招待講演). 第46回日本脊髄障害医学会. 2011年11月18日 関西空港会議場(泉佐野市)

14. 亀井直輔. 血管新生を介した脊髄再生治療の開発(招待講演). 第26回日本整形外科学会基礎学術集会. 2011年10月21日 ベイシア文化ホール(前橋市)

15. Hikmat Hadoush, 亀井直輔. MicroRNA-210 as a novel therapy for spinal cord injury. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会. 2011年10月21日 ベイシア文化ホール(前橋市)

16. 亀井直輔. 血管新生マイクロRNAによる脊髄再生. 第30回日本運動器移植・再生医学研究会. 2011年9月25日 福岡国際会議場(福岡市)

[図書] (計2件)

1. 亀井直輔(分担執筆). 先端医療シリーズ44 「臨床医のための最新整形外科」. 寺田国際事務所/先端医療技術研究所 2013 500ページ

2. 亀井直輔(分担執筆). 血管再生治療. 診断と治療社 2012 264ページ

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号: 70444685

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: