

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791665

研究課題名(和文) 脊髄損傷後の炎症モニタリングおよび骨髄間葉系幹細胞を用いた救済戦略の構築

研究課題名(英文) Monitoring of neuroinflammation and creation of new strategy after spinal cord injury.

研究代表者

佐藤 敦 (Sato, Atsushi)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：10445596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：マウス脊髄損傷モデルを用い脊髄の損傷状態と炎症状態のモニターをマイクログリア(MG)/マクロファージ(MF)の活性化を指標に行った。また、インターロイキン1(IL-1)によるMG/MFの修飾作用をIL-1KOマウスを用いて明らかにした。さらに、初代MGの培養では古典的活性化、代替経路型活性化ともIL-1が関与した。in vivoの実験からIL-1は炎症反応の減少を介して脊髄損傷を抑制し、またin vitroの実験と合わせIL-1はMGの古典的活性化、代替経路型活性化の両方に関与する事が示唆された。さらに、脊髄損傷動物に対しhMSCsを移植し、脊髄損傷や神経再生の改善が認められる事を確認した。

研究成果の概要(英文)：Microglia and macrophages (MG/MF) have a diverse range of functions depending on unique cytokine stimuli, and contribute to neural cell death, repair, and remodeling during central nervous system diseases. While IL-1 has been shown to exacerbate inflammation, it has also been recognized to enhance neurodegeneration. We determined the activating phenotype of MG/MF and the impact of IL-1 in an in vivo spinal cord injury (SCI) model of IL-1 knock-out (KO) mice. Moreover, we demonstrated the contribution of IL-1 to both the classical and alternative activation of MG in vitro using an adult MG primary culture. We demonstrate here in in vivo experiments that IL-1 suppressed SCI in a process mediated by the reduction of inflammatory responses. Moreover, we suggest that IL-1 participates in both the classical and alternative activation of MG in in vivo and in vitro systems. hMSCs Implanted to injured spinal cord have been recognized to improve motor function, neuroinflammation and regeneration.

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：脊髄損傷 神経炎症 マイクログリア マクロファージ インターロイキン1 骨髄間葉系幹細胞 代替経路型活性化型 古典的活性化型

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷患者は年間5千人から6千人発症し、その総患者数は10万から15万人といわれている。急性期の死亡率は低下したが依然として重度の後遺障害が残ることが多い。また、薬物的治療法はメチルプレドニゾロンの大量投与が唯一である。このように、脊髄損傷患者の activity of daily life (ADL) の確保のための予後診断法の確立や新規医療法の開発は急務である。

2. 研究の目的

当該研究は脊髄損傷後の新規診断方法の開発および新たな治療戦略の発展につながる基礎研究を行うことを目的とする。新規診断方法の開発は、マウス脊髄損傷モデルを用い脊髄の損傷状態と炎症状態の変化を比較することにより損傷から再生治癒にいたる損傷状態のモニターをマイクログリア/マクロファージの活性化を指標にして明らかにする。さらに、骨髄間葉系幹細胞の移植による脊髄の損傷抑制および再生促進作用とマイクログリア/マクロファージの活性化がどのように関連するか調べる。

3. 研究の方法

野生型、IL-1 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて第9、10胸椎間の脊髄を切断して脊髄損傷モデルを作成し、脊髄損傷後の脊髄の状態(運動機能、脊髄損傷)を経時的に観察しマイクログリア/マクロファージの活性化型(ELISA、immunoblotting)と比較する。MG/MFの活性化型のマーカーとして TNF- $\alpha$  と YM1 を測定した。次に、成人マウスから MG の初代細胞培養を作成し、IL-1 の存在、非存在下に IFN  $\gamma$  あるいは IL-4 を暴露する。さらに、IL-1 の存在、非存在下に IL-4 と IL-13 を暴露する。

4. 研究成果

野生型、IL-1KO マウスともに脊髄損傷後徐々

に下肢運動機能が改善した。IL-1 KO マウスでは野生型と比べ、損傷後3日から下肢機能を表す BMS スコアが有意に高値であった。また、GFAP で囲まれる脊髄損傷面積は有意に減少した(図1)。

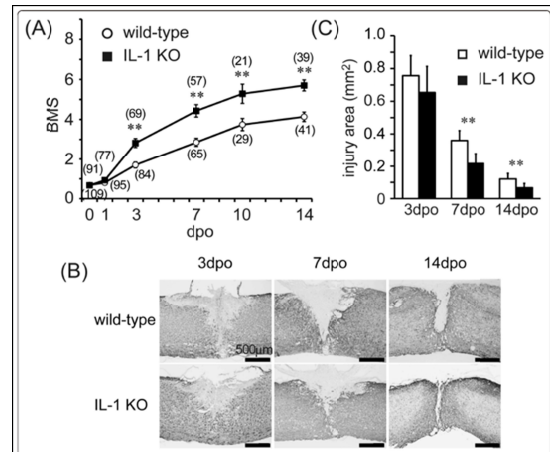


図1. 脊髄損傷後の下肢運動機能、損傷面積

野生型では脊髄損傷後 IL-1 が増大し、TNF は上昇後高値を持続したが、IL-1KO マウスでは IL-1 は検出されず、TNF は有意に低値であった。IL-1 はマイクログリア/マクロファージのマーカーである Iba1 陽性細胞内に検出された(図2)。

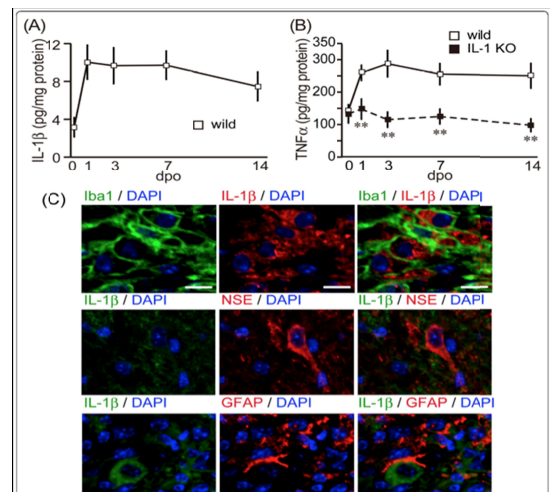


図2. 脊髄損傷後の前炎症性サイトカイン、IL-1 の細胞局在  
野生型では代替活性化型マーカーである Ym1 が損傷後7、14日に増加したが、IL-1KO マウスでは増加せず有意に低値であった。Ym1 は損傷中心部の辺縁に観察され、MG/MF マーカーである F4/80 と二重染色陽性であった。さら

に、IGF-1 との三重染色も陽性であった（図 3）。

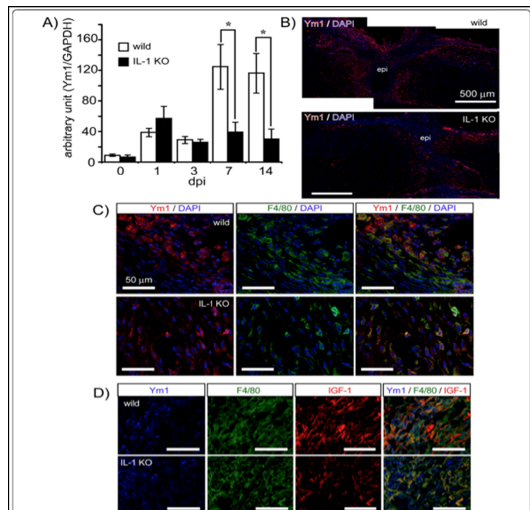


図 3. 脊髄損傷後の代替活性化マーカーYm1の推移と細胞局在  
マウス脊髄損傷モデルを用いた *in vivo* の実験から IL-1 は炎症反応の減少を介して運動機能を改善させ脊髄損傷を抑制した。細胞培養の結果、NOx は IL-1 の暴露で増加し、IFN の共暴露で相乗的に増加した。TNF は IFN の暴露で増加し、IL-1 の共暴露でさらに増加した。IL-4 と IL-1 の共暴露で最大値を示した。Arg-1 活性は IL-4 の暴露で増加し、IL-1 との共暴露でさらに増加した。IGF-1 は IFN の暴露で減少し、IL-4 の暴露で増加した（図 4）。

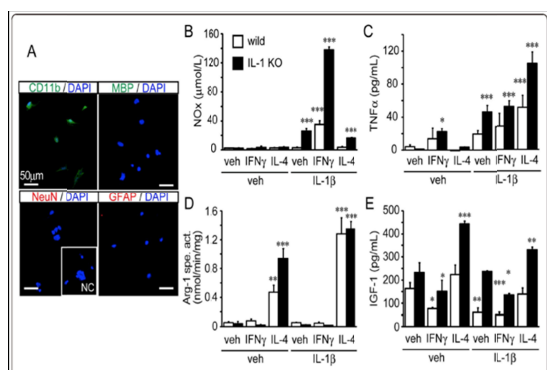


図 4. 野生型、IL-1KO マウスでの初代培養マイクログリアの活性化型  
STAT1 は IFN の暴露で増加し、IL-4 の暴露では変化を認めず、IL-1 の影響も認めなかった。COX2 は IL-1 の暴露で増加したが、IFN 、IL-4 単独投与では増加しなかった。

IL-1 と IL-4 の共暴露では相乗的に増加する傾向にあった。iNOS は IFN 、IL-4 単独投与では増加しなかったが、IFN と IL-1 の共暴露で増大した。Ym1、Arg-1 は IL-4 の暴露で増加し、IL-1 との共暴露で増大した（図 5）。

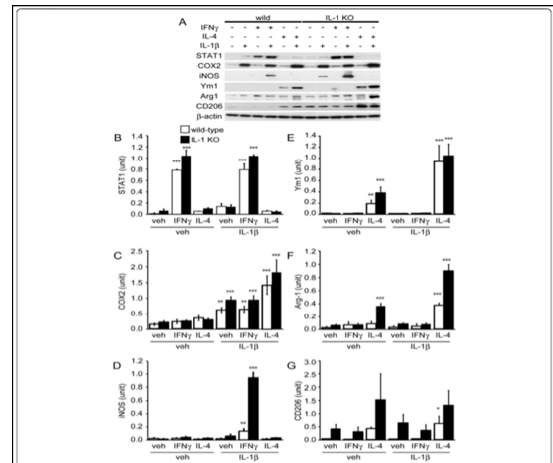


図 5. IL-1 存在 / 非存在下での培養マイクログリア活性化  
COX2 は IL-1 の暴露で増加したが、IL-4、IL-13 単独投与では増加しなかった。Ym1 は IL-4 単独、IL4/13 同時投与ともに増加し、IL-1 の共暴露で相乗的に増加した。しかし、IL-13 単独投与では増加せず、IL-4 単独投与と比較し有意に減少した。Arg-1 は IL-4、IL-4/13 投与で同様に増加し、IL-1 の共暴露で相乗的に増加したが、IL-13 単独投与では増加しなかった（図 6）。

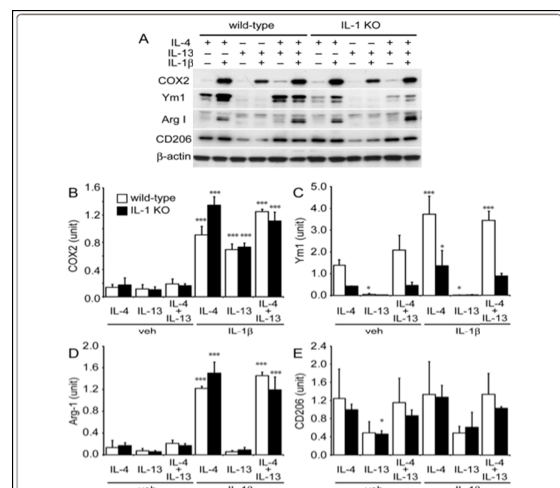


図 6. IL-4、IL-13 によるマイクログリア活性化型

野生型、IL-1KO マウスから作成した初代 MG の細胞培養を用いた in vitro の実験からは IL-1 は MG の古典的活性化、代替経路型活性化の両方に関与する事が示唆された。

#### 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2件)

Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Ohara K, Asano M, Iwakura Y, Takashi Atsumi T, Shioda S. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. J Neuroinflammation. 2012 Apr 7;9:65.  
DOI: 10.1186/1742-2094-9-65. 査読有

Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Sato A, Ohara K, Miyamoto K, Nakano H, Kiriyama K, Dohi K, Hiraizumi Y, Matsunaga M, Shioda S. Establishment and characterization of primary adult microglial culture in mice. Acta Neurochir Suppl. 2013;118:49-54.  
DOI: 10.1007/978-3-7091-1434-6\_8. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

佐藤敦, 大滝博和, 小原賢司, 圓谷智海, 平泉裕, 渥美敬, 塩田清二. 脊髄損傷マウスにおけるマイクログリア/マクロファージ活性化へのインターロイキン1の関与. 第86回日本整形外科学会学術総会. 2013/5/23-2013/5/26 2013 広島グリーンアリーナ(広島・広島)

Hirokazu Ohtaki, Atsushi Sato, Tomomi Tsumuraya, Dandan Song, Kazuyuki Miyamoto, Kenji Ohara, Masahide Asano, Yoichiro Iwakura, Takashi Atsumi, Seiji Shioda. Interleukin-1 (IL-1) may contribute to develop classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal

cord injury. 11th International Society of Neuroimmunology Congress. 2012/11/4 -2012/11/8 2012. The Westin Copley Place Boston (Boston, MA)

Dandan Song, Hirokazu Ohtaki, Tomomi Tsumuraya, Atsushi Sato, Yutaka Hiraizumi, Tomio Inoue, Seiji Shioda. Stem cell characteristics and anti-inflammation properties of hMSCs in different passages. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013/3/28-2013/3/30 2013 サポート高松・かがわ国際会議場(高松・香川)

Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Sato A, Xu Z, Miyamoto K, Hiraizumi Y, Nakamachi T, Hashimoto H, Shintani N, Shioda S. Human stem/progenitor cells from bone marrow improve spinal cord injury via communicating with PACAP. The 11th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides 2013/8/27 - 2013/8/31 2013 Hungary University of Pecs Szentagothai Research Centre (Pecs, Hungary)

〔図書〕(計0件)

〔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

佐藤 敦 ( SATO ATSUSHI )

昭和大学・助教

研究者番号：10445596

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 研究協力者

大滝 博和 ( OHTAKI HIROKAZU )

昭和大学・助教

研究者番号：20349062

塩田 清二 ( SHIODA SEIJI )

昭和大学・教授

研究者番号：80102375