

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592192

研究課題名(和文) 脊髄損傷における病態の解明と治療

研究課題名(英文) Pathology & treatment of spinal cord injury

研究代表者

松山 幸弘 (Matsuyama, Yukihiro)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20312316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、正常および損傷脊髄における脂質の変化を、質量分析顕微鏡法で解析し、損傷後の損傷部におけるフォスファチジルコリン分子種の分布を可視化することに成功した。ドコサヘキサエン酸含有フォスファチジルコリンは、脊髄損傷後1日より脊髄損傷の中心部より減少し、その後不可逆的に減少した。IL-6受容体抗体を損傷後マウスに投与することで、ドコサヘキサエン酸含有フォスファチジルコリンが、損傷周辺部で対照群よりも増加することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Imaging mass spectrometry was used to visualize twelve molecular species of phosphatidylcholine (PC) on thin slices of spinal cord with spinal cord injury (SCI). Unique distribution patterns were observed for phospholipids with different fatty acid compositions, and distinct dynamic changes were seen in both their amounts and their distributions in tissue as tissue damage resulting from SCI progressed. In particular, PCs containing docosahexaenoic acid localized to the large nucleus in the anterior horn region at one day post-SCI and rapidly decreased thereafter. PC imaging revealed that the anti-IL-6 receptor antibody MR16-1 that has been shown to suppress inflammation after SCI was able to prevent the reduction of docosahexaenoic acid-containing PC in comparison with the control group at the injury site as early as 7 days post-SCI.

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：脊髄損傷 質量分析顕微鏡法 MALDI プロスタグランジン LC-MS/MS IL-6受容体抗体 ドコサヘキサエン酸

1. 研究開始当初の背景

急性脊髄損傷は人体が被る外傷のうち最も悲惨なものの一つである。急性脊髄損傷の発生率は若い世代で高いが、最近では高齢化社会に伴って高齢者においても転倒によって脊髄損傷を受傷する率が上昇している。この脊髄損傷が、個人と社会に与える肉体的、精神的、経済的な負担は極めて大きく社会問題にもなっている。分子生物学的研究の進歩と同時に、脊髄損傷における病態解明は進んできたが、まだ未知な部分も多く、治療に関しては確立されていない。脊髄損傷後の病態に関して、電子顕微鏡、免疫染色での形態的評価、観察と、質量分析法による種々の生化学的因子の変化に関する検討がなされている。しかし、通常の質量分析法は、検体を分離・精製して試料とするため、目的物質の組織細胞内分布や局在といった位置情報が失われてしまう。我々の使用する質量顕微鏡法は、MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization, MALDI) による質量分析で、原子、分子、クラスターなどの粒子を気体状にイオン化し、それらを質量電荷比に応じて分離検出する手法で、単一または少数の標的因子のみの局在分布が同定できるのではなく、すべての脂質の分布を質量比によりそのままの状態で見ることができ、目的物質の二次元分布を知ることができる。脳疾患や癌などにおいて、質量顕微鏡での評価の有用性が報告されているが、脊髄損傷後の報告は少ない。また、治療は、幹細胞移植等による脊髄再生についての研究が近年なされてきているものの、臨床での導入は未知数であり、薬物での治療方法も望まれているが、今のところ有効な薬物治療は存在しない。

2. 研究の目的

脊髄損傷後の脂質の経時的変化を可視化できる質量顕微鏡法を用いて観察し、脊髄損傷後の病態に関与する脂質(リン脂質、リゾリン脂質)を同定することで、脊髄損傷の新しい評価方法としての有用性を検討すること、また、脊髄損傷後に炎症を抑制する IL-6 受容体抗体(MR16-1)を投与することによってリン脂質の発現にどのように影響を及ぼすかを調査すること。

3. 研究の方法

(1) Sprague-Dawley 雌ラット、9 週齢を用い、T10 レベルで IH impactor によって 200 kdyn で一定の損傷を脊髄に加えた。損傷後 12 時間、1 日、1 週、2 週、8 週の各時点で、それぞれ 3 個体から脊髄を摘出した。脊髄は、損傷部、損傷部より 5 mm 末梢、損傷部より 10 mm 中枢、5 mm 中枢の 4 面で薄切し、スライドガラス上の組織標本とした。残った脊髄より LC-ESI-MS/MS によって PG の定量を行った。また、正常脊髄においても実験を行った。IMS のマトリックスとして、リン脂質のうち phosphatidylcholine(PC)を検出するため、

dihydroxy benzoic acid(DHB) を用い、スライドガラスにスプレーコートした。IMS 装置は time of flight (TOF) /TOF 型を用いた。

(2) マウスの処理は同大学での内規に従い、動物愛護の観点から苦痛軽減に十分配慮して麻酔下に行った。8 週齢 C57BL/6J JmsSlc マウスの T10 高位に脊髄圧控装置を用いて 60 kdyn の脊髄圧控損傷モデルマウスを作成した。損傷直後に MR16-1 を 100 μ g/g、腹腔内に単回投与した群 (MR16-1 群、n=19) と、同量の PBS を投与した対照群 (C 群、n=21) を比較した。行動解析としては、運動機能評価 (BMS スコア) と残尿測定を行った。組織解析としては損傷後 7 日と 28 日の損傷部での免疫組織学的検討 (Iba-1、Glial fibrillary acidic protein: GFAP) と、損傷後 7 日に MALDI-IMS を用いたリン脂質の 1 種であるフォスファチジルコリン(PC)分布の解析を行った。マトリックスには 2,5-dihydroxy benzoic acid を用いた。MALDI-IMS 装置は time of flight (TOF) /TOF 型を用いた。

4. 研究成果

(1) 正常脊髄における IMS で、質量電荷比 (m/z) 700~900 において約 150 もの分子イオンピークが検出された。このうち 14 のピークについて、過去に報告したデータに基づき PC 分子種として同定した。イメージングの結果、同じ PC 分子種であっても、含有する脂肪酸の違いで各々特異な組織内分布を示した。最も多量に存在する PC 分子種 (diacyl-16:0/18:1) は脊髄の灰白質領域全体に様に分布していた。それ以外のオレイン酸 (18:1) 含有 PC は白質領域で検出された。一方、docosahexaenoic acid (DHA) (22:6) 含有 PC は、灰白質領域に限局して存在し、特に PC (diacyl-16:0/22:6) は前角細胞の分布に一致した為、この細胞の膜構成に関与することが示された。DHA 含有 PC は、SCI 後は 1 日より減少して 8 週まで減少したままで、脊髄神経の不可逆的損傷変化を表していることが示唆された。これとは異なり、arachidonic acid (AA) (20:4) 含有 PC は SCI 後 1 週でのみ著明に増加していた。これらは HE 染色との対比で、免疫細胞の浸潤部と局在と一致し、時期的に破綻した血液脊髄関門を透過して浸潤した免疫細胞に由来する可能性があることを示唆した。そのような免疫細胞が AA に由来する PG を含む生理活性脂質を産生するとして報告があり、また IMS で同時に観察された LPC (18:0) の同部位での増加は PG の産生を間接的に示唆すると考えられた。そこで PG 定量を行ったが、5 つの PG はそれぞれ特異的な変化を示した。しかし、特に PGE2 は SCI 後 1 日~1 週で上昇し、2 週以降は減少したことから、浸潤免疫細胞が PGE2 を産生した可能性がある。しかし、我々は直接的に PGE2 がどこで産生されているかについて識別することはできず、より高度な空間的分解能で PG の画像化を可能にする IMS 法

の改良が、この仮説の検証に必要であると考
えられた。一方、SCI 後、時期特異的变化を
示すこれらのPG種の定量は、SCI後の炎症(急
性か慢性か)の段階、病態を評価するのに有
用である可能性がある。

(2) MR16-1 群は損傷後 21、28 日の時点で BMS
スコアが有意に高値で、対照群よりも運動機
能の有意な改善を示した。残尿量に、両群で
有意差はみられなかった。損傷後 7 日目、28
日目の組織学的検討において MR16-1 治療は
Iba-1 陽性細胞(マイクログリア/マクローファ
ージ)の浸潤を抑制していた。また、損傷後
28 日の時点で Luxol fast blue 染色による
髄鞘の評価では、MR16-1 群で多くの領域が温
存されていた。

損傷後 7 日目の脊髄における MALDI-IMS 陽イ
オンモードの解析では両群ともに、質量電荷
比(m/z) 700~880 において多数のピークが検
出された。このうち 11 のピークについて、
過去の報告データに基づき PC 分子種と同定
した。可視化された PC は含有する脂肪酸の
違いに基づき各々特徴的な組織内分布を示
した。PC に含有される脂肪酸は、例えば 16:0
と 18:1 であれば PC(diacyl-16:0/18:1)と表
記する。

MR16-1 群では、損傷部において
PC(diacyl-16:0/18:1)

PC(diacyl-16:0/22:6)

PC(diacyl-16:0/20:4)の減少が抑制されて
いた。正常灰白質に豊富に存在する
PC(diacyl-16:0/22:6)は、MR16-1 群と対照群
の損傷中心部で減少していた。しかし、
MR16-1 群の損傷周辺部では、対照群と比較し
て PC(diacyl-16:0/22:6)が多く分布してい
た。

免疫染色によって GFAP 陽性細胞が損傷部位
の周辺に多く分布していることが明らかにな
り、MR16-1 群では PC(diacyl-16:0/22:6)
の局在と一致していることが明らかになっ
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 5 件)

Hanada M., Sugiura Y., Shinjo R., Masaki
N., Imagama S., Ishiguro N., Matsuyama Y.,
Setou M.: Spatiotemporal alteration of
phospholipids and prostaglandins in a rat
model of spinal cord injury. Anal Bioanal
Chem 403(7): 1873-1884, 2012.

Arima H., Hanada M., Hayasaka T., Masaki
N., Omura T., Xu D., Hasegawa T., Togawa
D., Yamato Y., Kobayashi S., Yasuda T.,
Matsuyama Y., Setou M.: Blockade of IL-6
signaling by MR16-1 inhibits reduction of
docosahexaenoic acid-containing
phosphatidylcholine levels in a mouse
model of spine cord injury. Neuroscience

269: 1-10, 2014.

Hanada M., Tsutsumi K., Arima H., Shinjo
R., Sugiura Y., Imagama S., Ishiguro N.,
Matsuyama Y.: Evaluation of the effect of
tranilast on rats with spinal cord injury.
J Neurol Sci 346(1-2): 209-15, 2014.

Hanada M., Shinjo R., Miyagi M., Yasuda T.,
Tsutsumi K., Sugiura Y., Imagama S.,
Ishiguro N., Matsuyama Y.: Arundic acid
(ON0-2506) inhibits secondary injury and
improves motor function in rats with
spinal cord injury. J Neurol Sci 337
(1-2): 186-192, 2014.

Arima H, Omura T, Hayasaka T, Masaki N,
Hanada M., Xu D, Banno T, Kobayashi K,
Takeuchi H, Kadomatsu K, Matsuyama Y.,
Setou M. Reductions of docosahexaenoic
acid-containing phosphatidylcholine
levels in the anterior horn of an ALS mouse
model. Neuroscience 2015;297:127-36.

[学会発表] (計 6 件)

花田 充, 杉浦悠毅, 新城龍一, 堤 弘次,
石黒直樹, 瀬藤光利, 松山幸弘, 脊髄損傷ラ
ットにおける prostaglandin の経時的変化の
検討と質量顕微鏡によるアラキドン酸含有
リン脂質の評価との比較, 第 27 回日本整形
外科学会基礎学術集会 (2012. 10. 26~10. 27)
名古屋市

花田 充, 新城龍一, 宮城道人, 安田達也,
有馬秀幸, 堤 弘次, 杉浦悠毅, 今釜史郎,
石黒直樹, 瀬藤光利, 松山幸弘 ON0-2506 は
脊髄損傷に対する治療薬となりえる, 第 27
回日本整形外科学会基礎学術集会
(2012. 10. 26~10. 27)名古屋市

Arima H., Hanada M., Hayasaka T., Masaki
N., Hasegawa T., Togawa D., Yamato Y.,
Kobayashi S., Seto M., Matsuyama Y. MR16-1
allows recovery from spinal cord injury :
an evaluation-based study using imaging
mass spectrometry, 8th combined meeting of
orthopaedic research societies
(2013. 10. 13-16) Venice, Italy

Hanada M., Arima H., Shinjo R., Sugiura Y.,
Tsutsumi K., Imagama S., Ishiguro N.,
Matsuyama Y. Evaluation of effect of
tranilast on the spinal cord injury in rat,
8th combined meeting of orthopaedic
research societies (2013. 10. 13-16) Venice,
Italy

有馬秀幸, 大村威夫, 早坂孝宏, 正木紀隆,
花田 充, 坂野友啓, Xu Dongmin, 長谷川
智彦, 戸川大輔, 大和 雄, 小林 祥, 小
林和克, 竹内英之, 門松健治, 瀬藤光利,
松山幸弘, 筋委縮性側索硬化症モデルマウ
ス脊髄における脂質変化, 第 29 回日本整形
外科学会基礎学術集会 (2014. 10. 09-10) 鹿
児島市

Xu Dongmin, Arima H., Banno T., Omura T.,
Setou M., Matsuyama Y. Spinal cord lipid
alteration after sciatic nerve injury, 第
29 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2014. 10. 09-10) 鹿児島市

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 幸弘 (Yukihiro Matsuyama)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 20312316

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

花田 充 (Mitsuru Hanada)

浜松医科大学・医学部・医局員

研究者番号 : 番号なし