

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 28 日現在

機関番号：82404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670660

研究課題名(和文) 脊髄損傷に対する自然免疫賦活化による神経保護に関する研究

研究課題名(英文) The effect of lipopolysaccharide preconditioning in mouse model of spinal cord injury

研究代表者

中村 耕三 (NAKAMURA, Kozo)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・センター・総長

研究者番号：60126133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：LPS投与による自然免疫賦活化により、損傷脊髄における炎症のバランスが変わり神経保護・修復効果が得られる、という仮説を立て、LPS投与をマウス脊髄損傷モデルに対して施行した。LPS投与群で炎症反応は組織修復的な性質に変化する事、損傷部が縮小する事、そして良好な後肢運動機能が得られる事が示された。本研究の結果から、LPS投与による自然免疫賦活化は、中枢神経損傷に対し組織修復を簡便かつ効果的に誘導するストラテジーであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Endotoxin/lipopolysaccharide (LPS) preconditioning (PC) has been shown to attenuate damage induced by stroke and brain trauma in rodent models. The present study preconditioned mice with LPS before inducing contusion SCI to investigate the effect of PC. We found that PC promotes the polarization of M1/M2 macrophages/microglia toward an M2 phenotype in the injured spinal cord on quantitative real-time polymerase chain reaction. Flow cytometric analyses reveal that PC facilitates M2 activation in resident microglia. Augmented M2 activation was accompanied by tissue reorganization and functional recovery. Altogether, our findings demonstrate that LPS preconditioning has a therapeutic effect on SCI through the modulation of M1/M2 polarization of resident microglia. The present study suggests that controlling M1/M2 polarization through endotoxin signal transduction could become a promising therapeutic strategy for various central nervous system diseases.

研究分野：整形外科

キーワード：炎症反応 脊髄損傷 動物実験

### 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷の急性期治療において外傷後に生じる炎症反応による二次損傷の制御は治療介入のターゲットとして認識されていながら、そのメカニズムに基づいた治療法の開発は進んでいない。

### 2. 研究の目的

本研究では外傷後の炎症反応に対し、マクロファージのM1/M2 活性、自然免疫の関与といった近年導入された二つの基礎的知見を応用することを試みる。そして、外傷の実験モデルとしては報告の少ない「事前介入 (preconditioning)」によって炎症システムの機能に修飾を加えることで脊髄損傷発生後の過程に変化をもたらす、組織保護を誘導することを試みる。最終的にはこの事前介入によってもたらさせる治療効果のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

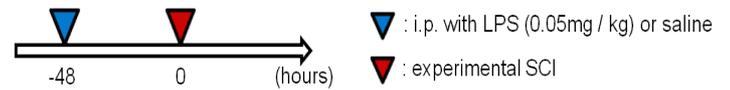
#### 1. 動物

8週齢の C57BL/6J 雌マウスを購入した。全ての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「動物実験の飼養及び保管などに関する基準 (総理府告示)」、「東京大学医学部動物実験指針」および「国立障害者リハビリテーションセンター動物実験指針」に従って行った。

#### 2. LPS による preconditioning

LPS を購入し、PBS にて希釈した。8週齢の C57BL/6J 雌マウスに対し、Preconditioning として脊髄損傷モデル作成に先立って 0.05mg/kg の濃度で 200  $\mu$ l 腹腔内に注射した。Control 群として、PBS のみを 200  $\mu$ l 腹腔内注射した。Preconditioning を行ったグループを PC 群として、control 群との比較解析を行った。

### 3. マウス脊髄圧挫損傷モデルの作成



Preconditioning の 48 時間後に、脊髄損傷モデルの作成を行った (上図)。身体を固定し、専用のデバイス (Infinite Horizons Impactor; Precision Systems and Instrumentation LLC) を用いて 80 kilodynes の力で脊髄に圧挫を加えた。

#### 5. 定量 RT-PCR

#### 6. 酵素免疫測定法 (ELISA)

#### 7. 免疫組織染色

#### 8. フローサイトメトリー

#### 9. Magnetic cell sorting (MACS) による CD11b 陽性細胞の選択採取

#### 10. Luxol Fast Blue (LFB) 染色

#### 11. 行動学的解析

#### 12. Western Blotting

#### 13. Interferon regulatory factor (IRF) -3 binding assay

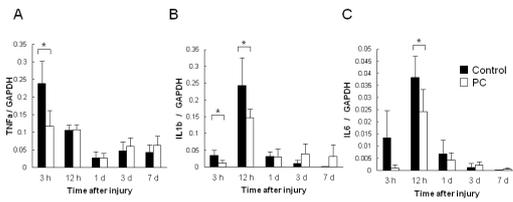
#### 14. 統計学的解析

### 4. 研究成果

#### **結果**

#### **(1) LPS preconditioning によって ET が誘導された**

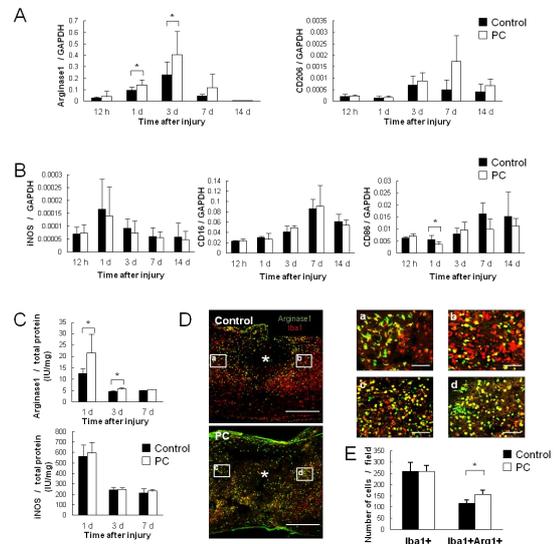
ET が起こると、炎症性サイトカインの発現が抑制されることが知られている。今回の LPS preconditioning モデルで、正しく ET が誘導されているかを確認するために、代表的な炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL1- $\beta$ 、IL-6 の mRNA 発現の評価を行った。その結果、TNF- $\alpha$ 、IL1- $\beta$ 、IL-6 の mRNA 発現はいずれも、脊髄損傷後 12 時間以内の急性期に preconditioning を行った群 (PC 群) で有意に抑制されていた (図 1)。LPS preconditioning によって ET が誘導されたことが示された。



**図1** LPS preconditioning によって ET が誘導された

**(2) LPS preconditioning によって脊髄損傷後に損傷部周囲の M2 活性化が促進された**

LPS preconditioning が脊髄損傷後の macrophage/microglia 活性化型に与える影響を調べるため、脊髄組織における M1 マーカー (iNOS、CD16、CD86) および M2 マーカー (arginase1、CD206) 発現の評価を行ったところ、脊髄損傷 1 日後および 3 日後の損傷脊髄において、M2 マーカーである arginase1 の mRNA 発現促進が、PC 群で有意に認められた (図 2A)。M1 マーカーに関しては、脊髄損傷 1 日後の CD86 の mRNA 発現が PC 群において有意に低い傾向を認められたが、その他は有意差を認めなかった (図 2B)。ELISA による、蛋白濃度の評価においても、脊髄損傷後 1 日後および 3 日後の損傷脊髄において、arginase1 の蛋白濃度が PC 群で有意に高く、iNOS の蛋白濃度には有意差が認められなかった (図 2C)。脊髄損傷 3 日後の免疫組織染色では、抗 Iba1 抗体および抗 arginase1 抗体を用いて観察した (図 2D)。損傷部周囲の Iba1 陽性細胞数、すなわち macrophage/microglia の総数には有意差が認められなかったが、Iba1 および arginase1 の 2 重陽性細胞、すなわち M2 細胞の数は PC 群で有意に多かった (図 2E)。以上の結果より、LPS preconditioning によって、脊髄損傷後 1 週以内の急性期において、損傷部周囲の M2 活性化が促進された事が示された。

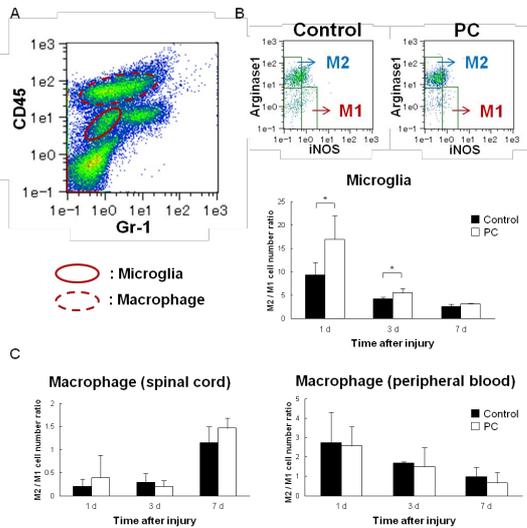


**図2** LPS preconditioning によって脊髄損傷後に損傷部周囲の M2 活性化が促進された

**(3) M2 活性化は主に resident microglia で誘導されていた**

Macrophage と microglia は、マーカーがほぼ共通しており、免疫染色では明確に判別することが困難であるため、フローサイトメトリーによる細胞群の分別を試みた。脊髄組織から得られた細胞を抗 CD45 抗体、抗 Gr-1 抗体、抗 iNOS 抗体および抗 arginase1 抗体でラベリングし、フローサイトメーターにアプライすると、CD45 発現の高低によって resident microglia (CD45<sup>low</sup>) と infiltrating macrophage (CD45<sup>high</sup>) を判別する事が可能であった (図 3A)。さらにこれらの細胞群を同定してゲートをかけ、iNOS および arginase1 の発現の高低によってさらに M1 細胞群と M2 細胞群に分別すると、resident microglia では、脊髄損傷 1 日後および 3 日後において、M2 細胞群の M1 細胞群に対する割合が PC 群で有意に増加していた (図 3B)。一方、脊髄内の infiltrating macrophage と血中の peripheral macrophage においては、control 群と PC 群の間に M2/M1 比の有意差が認められなかった (図 3C)。以上の結果より、preconditioning による脊髄損傷後の M2 活性化は、resident microglia で主に誘導さ

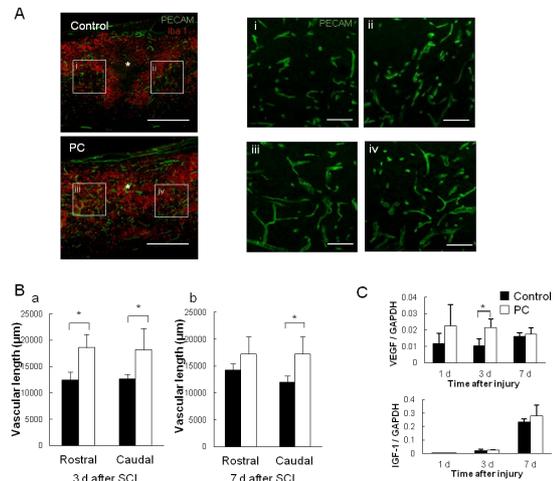
れている事が示された。



**図 3** M2 活性化は主に resident microglia で誘導されていた

**(4) LPS preconditioning によって脊髄損傷後の血管形成が促進された**

M2 細胞が angiogenic factor を産生することが知られているため、脊髄損傷後の血管形成の評価を、血管内皮細胞のマーカである PECAM の抗体を用いた免疫組織染色にて行った。損傷部周囲で染色された血管長を計測したところ、脊髄損傷 3 日後および 7 日後において、PC 群で血管長の合計が有意に大きかった (図 4A,B)。次に、magnetic cell sorting の手法を用いて、脊髄組織から macrophage および microglia のマーカーである CD11b 陽性細胞を選択採取した。Angiogenic factor である VEGF、IGF-1 の mRNA 発現評価を行ったところ、PC 群において脊髄損傷 3 日後において、VEGF の mRNA 発現が有意に上昇していた (図 4C)。以上の結果より、preconditioning によって脊髄損傷後の活性化が誘導された M2 細胞により、損傷部周囲の血管形成が促進された事が示された。

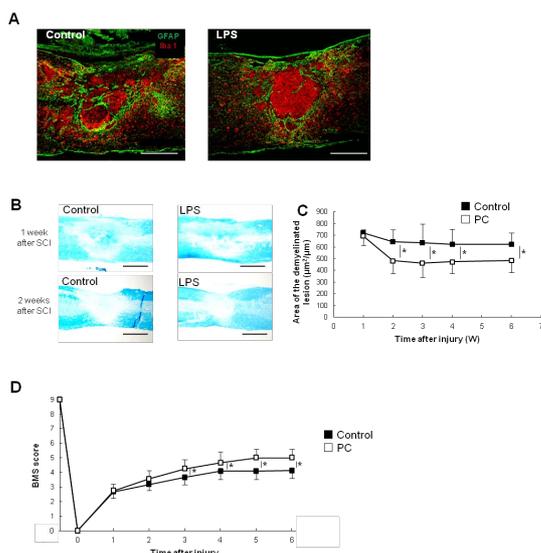


**図 4** LPS preconditioning によって脊髄損傷後の血管形成が促進された

**(5) LPS preconditioning によって脊髄損傷後の組織修復が促進され、良好な運動機能回復を示した**

LPS preconditioning による脊髄損傷後の長期効果を、組織学的および運動機能学的に解析した。反応性アストロサイトのマーカーである GFAP と、macrophage および microglia のマーカーである Iba1 の抗体を用いて損傷部脊髄の免疫組織染色を行ったところ、損傷後 2 週の時点で、PC 群において反応性アストロサイトによるグリア瘢痕が、炎症性細胞をほぼ取り囲んでいるのに対し、control 群では炎症性細胞はグリア瘢痕の外側にも広く散在していた (図 5A)。このことは、グリア瘢痕による炎症細胞群の packing が速やかになされている事を示唆している。また LFB 染色では、PC 群で脊髄損傷後 1 週から 2 週にかけて有意に損傷部の縮小が認められ、損傷後 6 週においても PC 群の損傷面積は control 群と比較して有意に小さい傾向にあった (図 5B,C)。次に、脊髄損傷後のマウス後肢運動機能を、標準的な評価法として世界的に広く用いられている Basso Mouse Scale (BMS) の scoring (9 点満点) を行うことで評価した。脊髄損傷後 3 週以降で、PC 群において有意に良好な後肢運動機能が認

められた (図 5D)。以上の結果より、LPS preconditioning により脊髄損傷後急性期に M2 活性化が促進されたことで、亜急性期以降の長期にわたって組織学的、運動機能学的に良好な改善を認めた事が示された。

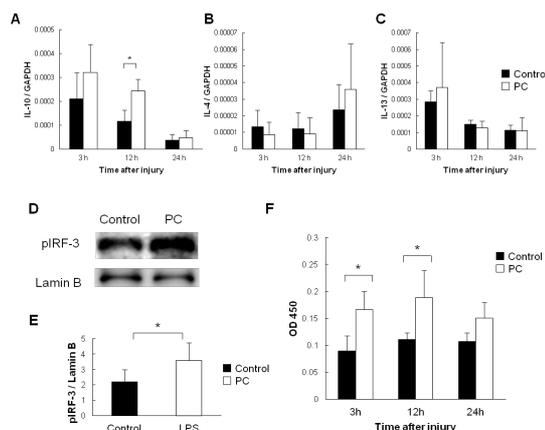


**図 5** LPS preconditioning によって脊髄損傷後の組織修復が促進され、良好な運動機能回復を示した

**(6) LPS preconditioning による脊髄損傷後の M2 活性化に先立って IL-10 の発現増加と IRF-3 の活性化を認めた**

LPS preconditioning による脊髄損傷後の M2 活性化を直接的に誘導した因子を調べるため、M2 活性化の主な誘導因子として知られている IL-4、IL-10、IL-13 の mRNA 発現の評価を行った。すると、IL-4 および IL-13 の mRNA 発現は control 群と PC 群の間に差が無かったのに対し、IL-10 の mRNA 発現が、脊髄損傷 12 時間後の急性期に PC 群で有意に上昇していることが分かった (図 6A-C)。さらに、転写因子として IL-10 発現を直接もしくは間接的に正に調節することが知られている、転写制御因子 IRF-3 の活性を調べた。Western Blotting でリン酸化 IRF-3 (pIRF-3) の蛋白量を、IRF-3 activity ELISA で、オリゴヌクレオチドとの結合能を

持った IRF-3 (活性型 IRF-3) の蛋白量を定量評価した。IL-10 と同じく、脊髄損傷 12 時間後において pIRF-3 の蛋白量および活性型 IRF-3 の蛋白量が、PC 群で有意に上昇している事が認められた (図 6D-F)。



**図 6** LPS preconditioning による脊髄損傷後の M2 活性化に先立って IL-10 の発現増加と IRF-3 の活性化を認めた

**考察**

中枢神経損傷に対する LPS preconditioning は、主にげっ歯類の脳虚血モデルで研究が進められてきたが、2010 年を過ぎてからは脳外傷や脊髄損傷モデルの報告も出てきている。LPS preconditioning が macrophage/microglia の表現型調節を介して神経保護・修復効果を持つことについては過去にも報告があったが、具体的な表現型については明らかにされていない。今回筆者は、LPS preconditioning によってプライミングを受けた内在性 microglia が、脊髄損傷後に M2 活性化を受け、そのことが組織修復と運動機能回復に寄与していることを示した。さらに筆者は、LPS preconditioning による脊髄損傷後の M2 活性化に先立って IL-10 の発現増加と IRF-3 の活性化が促進されていることを示した。LPS preconditioning の機序として M1/M2 活性化に言及したのは本研究が初めてとなる。

本研究の結果から、自然免疫による

preconditioning は、中枢神経損傷に対し、M2 活性化による組織修復を簡便かつ効果的に誘導するストラテジーとして、有望であると考え。臨床応用を考える場合、前投与という性質から外傷性脊髄損傷の治療に実際に preconditioning を用いるのは難しいが、予防投与という形で、合併症としての脊髄損傷のリスクの高い脊椎難手術などに応用が期待できるだろう。理想は preconditioning の効果をもたらす因子をさらに特定し、postconditioning につなげることだが、これには網羅的解析を含めたさらなる研究が必要である。いずれにせよ、エンドトキシンを用いた preconditioning は、脊髄損傷後の神経保護・修復に有望な戦略として期待される。

#### 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 1 件)

Hayakawa K, Okazaki R, Morioka K, Nakamura K, Tanaka S, Ogata T, Lipopolysaccharide preconditioning facilitates M2 activation of resident microglia after spinal cord injury. J Neurosci Res. (査読有) 92(12), 2014,1647-58, doi: 10.1002/jnr.23448.

〔学会発表〕(計 2 件)

早川謙太郎、緒方徹、マウス脊髄損傷モデルにおける自然免疫 preconditioning の効果, 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会, 2014-9, 第一ホテル両国(東京都、墨田区)

Hayakawa K, Ichihara Y, Nagao M, Akai M, Tanaka S, Ogata T, The effect of lipopolysaccharide preconditioning in mouse model of spinal cord injury, Neuroscience 2013, 2013-11, San Diego (USA)

〔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:

出願年月日:

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

中村 耕三 (NAKAMURA Kozo)

国立障害者リハビリテーションセンター・総長

研究者番号: 60126133