

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462237

研究課題名(和文) ケラタン硫酸分解による脊髄損傷治療-臨床に直結した新規治療法の開発-

研究課題名(英文) The enzyme of Keratan sulfate degradation contributes the functional recovery after thoracic spinal cord injury

研究代表者

今釜 史郎 (Imagama, Shiro)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40467288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で安定したケラタン硫酸(KS)分解酵素の安全性確認後、ラット胸髄圧挫損傷モデルを作成して酵素投与を行い、下肢運動機能の回復や感覚機能回復、組織学的回復を、神経保護作用とともに確認した。脊髄損傷による下肢麻痺回復後にアロデニアを認めなかった。骨髄幹細胞移植やリハビリテーションとの併用効果は、損傷後2週からの亜急性期以降に効果がみられたが、下肢関節拘縮の個体ではリハビリテーションの効果がなかった。KS分解酵素は脊髄再生においてアロデニアを生じない運動機能回復効果とともに、神経保護や痕抑制効果により、細胞移植やリハビリテーションに適した環境が整えられると考えられ、今後の臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the efficacy of the enzyme of Keratan Sulfate degradation (KSase) with rehabilitation for rat thoracic spinal cord injury model. The histological analysis including tracer analysis, neurophysiological examination, and sensory examination were performed. From the result of the number of fibers strained for GAP-43, 5-HT, and tracer with Dil, KSase significantly promoted axonal regrowth after SCI. The sensory function was also recovered by KSase treatment without allodynia. There was no adverse effect after KSase treatment. To the subacute phase, the impact of rehabilitation for spinal cord injury was also observed, but limited in chronic phase after spinal cord injury. KSase may promote not only axonal regrowth but also neural plasticity related to motor and sensory function. The KSase may contribute a satisfactory treatment for spinal cord injury.

研究分野：整形外科

キーワード：ケラタン硫酸 ケラタン硫酸分解酵素 脊髄損傷 軸索伸長 神経保護 感覚障害 リハビリテーション

### 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷に関して Nogo、セマフォリン、CS などの神経再生抑制因子による病態解明が進み臨床応用が期待されているが、脊髄機能の回復効果は十分ではない。また最近注目の iPS 細胞移植による再生治療も大いに期待されるが、その母床である脊髄のグリア瘢痕を制御することも極めて重要である。そこで我々はグリア瘢痕を形成するプロテオグリカンの 1 種である KS に着目している。

我々はコンドロイチン硫酸 (CS) と同系統のケラタン硫酸 (KS) に注目し研究しており、KS 分解は CS 分解をしのぐ脊髄損傷後運動機能回復を示した<sup>1)</sup>。また当教室では骨髄間質細胞に Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) を発現させ脊髄損傷治療効果を検討してきた。

### 2. 研究の目的

本研究ではこれまでの脊髄損傷に対する KS 分解の効果をもとに、生体内でも安定した安全な KS 分解酵素の開発と投与、運動・感覚機能の回復、リハビリ併用効果、GDNF と KS 分解酵素の併用効果を検証し、臨床応用の段階まで進めることを目的とする。

### 3. 研究の方法

S.Dラット (雌、9週齢) を用い、エーテルとケタミン麻酔下に、一定した脊髄損傷モデル作成が可能な IH-0400 impactor (Neuroscience. idea, Co., Ltd) を用い圧挫損傷を作製する。損傷直後浸透圧ポンプ付きマイクロチューブをクモ膜下に挿入し、薬剤投与モデルとした。

酵素を投与したラットの血液、体内を検証し、安全性に問題がないか検証した。KS ノックアウトマウスに関しては生体に異常がないことは確認済みである。KS 分解酵素がラット

脊髄で機能しているかどうか組織染色、Western blotなどで確認した。

脊髄損傷後の運動機能改善の評価として BBBスコア (open fieldにて観察)、Grid test (%Grip)(20mm格子状の金網を下肢を落とさず把持できた割合を観察する)、Foot print analysis (ラットの歩容を stride width、stride lengthで評価する) を評価した。評価方法は定時刻、double blindにて複数人の検者にて10週間観察し下位運動機能の回復程度を評価した。

感覚機能の検査として、Von Frey filament を用いた測定の圧感覚試験、Tail immersion test (55 の熱水に tail をつけ、揺らすまでの時間を測定) を定時刻、double blindで複数人の検者にて10週間観察、各検査は15分間隔で3回行い平均をとった。

電気生理学的検査 (運動・知覚機能) としては、MEP、spSCEP の Latency, Duration, Amplitude の差を測定し解析を行った。電気生理学的にも客観的に運動機能、知覚機能回復を示す。

組織学的検査として、凍結切片で「KS, CS, LFB, CD11b, GFAP (reactive astrocyte), 2B6, Gap43, CGRP, Collagen4 (fibrous tissue), 5HT, neurofilament を免疫染色し、蛍光画像解析システム MetaMorph Imaging System (Molecular Devices Corporation) にて、新生軸索数や scar 面積などを解析した。治療群での軸索伸長促進の有無など、組織学的評価を行った。

トレーサーを用いた KS 分解酵素による軸索再生促進の評価として脊髄損傷後8週間で、麻酔下に脳へ10%BDA (Invitrogen社) を左右3.5  $\mu$ l ずつ注入した。その2週間後 sacrifice し、前述の蛍光画像解析システムにて新生軸索の

Fiber countや軸索再生、sproutingの形態などを解析する。Countは、損傷部位から頭側10mmのBDA陽性線維数に対する、損傷部位から尾側10mmのBDA陽性線維数の比で評価した。

骨髄間質細胞移植とKS分解酵素の併用として、骨髄由来幹細胞の抽出培養と遺伝子導入法のヌクレオフェクション法、そして遺伝子移入した骨髄幹細胞の細胞標識も技術は確立されている。細胞移植の時期は損傷亜急性期を予定した。併用療法を行った動物と行わなかった動物（治療単独群、vehicle群）について、運動機能評価、知覚機能評価、組織学的評価、電気生理学的検査、トレーサー試験を行い、評価した。

リハビリテーションとKS分解酵素の併用効果を検討するため、KS分解酵素投与群、非投与群でリハビリテーション（トレッドミル運動）有無による下肢運動機能評価を行った。さらに、KS分解酵素投与の至適時期とリハビリテーションの指摘開始時期も検討した。

#### 4. 研究成果

ラット脊髄圧挫損傷モデルを作成し、ケラタン硫酸分解酵素を投与した。IHインパクトー使用と200kdynの圧挫設定により、圧挫後は完全麻痺の脊髄損傷を惹起し安定した脊髄損傷モデルを作成できることが確認された。酵素を投与した治療群と、生理食塩水を投与したcontrol群で、脊髄損傷後の生存に差はなく、治療群で明らかな副作用、有害事象を認めず、この分解酵素の安全性が確認された。

治療群とcontrol群の脊髄損傷後下肢運動機能回復をBBBスコアを用いて測定すると、治療群ではcontrol群に対し有意に良好な回復を示した（治療群のBBBスコア平均8.5、

control群は平均4.5）、Grid testやfoot print testも同様の結果であった。Von frey filamentを用いた知覚試験と圧感覚、熱感覚試験では治療群でアロデニア症状を認めないことが確認され、知覚の回復も良好であった。

電気生理学的検査では、経頭蓋刺激で下肢腓腹筋のモニタリングを行った（MEP）。MEPにおける振幅の評価では、治療群で有意に振幅の回復を得ており、前述の脊髄損傷後下肢運動機能回復を裏付ける結果であった。SpSCEPは感覚系神経回復を確認可能な脊髄モニタリング検査であるが、SpSCEPでも治療群で有意な潜時の回復を得た。

免疫組織染色では神経系染色として、Gap43、5-HT染色にて、治療群で有意に多いpositive fiberを認めた。またCollagen IVで染色した脊髄損傷部の瘢痕面積は、治療群で有意に小さかった。LFBでは治療群で有意に多い髄鞘がみられ、神経保護作用が確認された。以上より、治療群では軸索再生を抑制する瘢痕形成が有意に小さく、神経fiberが有意に多く、脊髄損傷後の運動機能、知覚ともcontrolに比べ有意に良好な回復を示すことが確認された。

上記効果をMRI画像で確認すべく、脊髄損傷後8週間で脊髄のMRI検査を実施した。有意差を認めるに至らなかったが、損傷範囲の平均値は治療群で少ない傾向であった。

ラット脊髄損傷モデルにトレーサーを用いたKS分解酵素による軸索再生促進の評価を行った。脊髄損傷後8週間で、麻酔下に脳へ10%BDA（Invitrogen社）を左右3.5μlずつ注入し、その2週間後sacrificeし、蛍光画像解析システムにて新生軸索のFiber countや軸索再生、sproutingの形態などを

解析したところ、損傷部位から頭側 10mm の BDA 陽性線維数に対する、損傷部位から尾側 10mm の BDA 陽性線維数の比が、治療群では有意に高かった。

また、骨髄間質細胞移植と KS 分解酵素の併用を行った。骨髄由来幹細胞の抽出培養と遺伝子導入法のヌクレオフェクション法、そして遺伝子移入した骨髄幹細胞を損傷亜急性期に細胞移植した。KS 分解酵素は損傷直後からくも膜下腔に 2 週間連続投与した。併用療法を行った動物と行わなかった動物では併用療法群で多い軸索を認めたが有意差は認めなかった。

リハビリテーションとの併用効果は、損傷後 2 週からの亜急性期以降に効果がみられたが、慢性期でのリハビリテーションの効果は傾向を認めたものの有意な差を認めなかった。特に慢性期では下肢関節拘縮の個体がみられリハビリテーションの効果がなかった。

KS 分解酵素は脊髄再生においてアロデニアを生じない運動機能回復効果に寄与することが示されたが、幹細胞移植や慢性期リハビリテーションの効果は限定的であった。特に脊髄損傷慢性期にはより多くの介入を要し、リハビリテーションは早期から長期間継続の必要性も示唆された。脊髄損傷に対する多方面からの介入に際し、本研究で示された KS 分解酵素は神経保護や軸索伸長効果、瘢痕抑制効果により、細胞移植やリハビリテーションに適した環境が整えられると考えられ、今後の臨床応用が期待できる。

#### <引用文献>

1) Imagama S, Sakamoto K, Tauchi R, Shinjo R, Ohgomori T, Ito Z, Zhang H, Nishida Y, Asami N, Takeshita S, Sugiura N, Watanabe H, Yamashita T, Ishiguro N, Matsuyama Y,

Kadomatsu K. Keratan sulfate restricts neural plasticity after spinal cord injury. *J Neurosci*. Nov 23;31(47) 2011, 17091-102.

#### 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)

Kenyu Ito, Bisei Ohkawara, Hideki Yagi, Hiroaki Nakashima, Mikito Tsushima, Kyotaro Ota, Shiro Imagama, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno Lack of Fgf18 causes abnormal clustering of motor nerve terminals at the neuromuscular junction with reduced acetylcholine receptor clusters *Scientific Reports*, Jan; 11; 8(1), 2018, 434, 1-12. 査読あり

Kei Ando, Shiro Imagama, Zenya Ito, Kazuyoshi Kobayashi, Tetsuro Hida, Kenyu Ito, Mikito Tsushima, Yoshimoto Ishikawa, Akiyuki Matsumoto, Yoshihiro Nishida, Naoki Ishiguro. A self-assembling peptide reduces glial scarring, attenuates post-traumatic inflammation and promotes neurite outgrowth of spinal motor neurons. *Spine* Oct 15;41(20), 2016, E1201-E1207. 査読あり

[学会発表](計 5 件)

Mikito Tsushima, Shiro Imagama, Bisei Ohkawara, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno Drug X can inhibit apoptotic cell death

induced by oxidative stress in vitro and improve locomotor function of lower limbs in spinal cord injury model mice in vivo. Eurospine 2017

Satoshi Tanaka, Takuji Ito, Akinobu Ota, Takefumi Sone, Daisuke Shimojo, Shiro Imagama, Yoshitaka Hosokawa, Manabu Doyu, Hideyuki Okano, Yohei Okada Pathophysiological analysis of skeletal muscles in spinal bulbar muscular atrophy by genome editing of CAG repeats Society for Neuroscience 2017

今釜史郎、安藤圭、小林和克、飛田哲朗、伊藤研悠、都島幹人、松本明之、両角正義、田中智史、村山宜人、新名芳有、荻野涼子、上野新也、井上照好、森田泰博、西田佳弘、石黒直樹 bFGF 様新規化合物の経静脈投与による脊髄損傷治療 - 基礎研究と臨床治験(第2相)第31回日本整形外科学会基礎学術集会 2016

Kenyu Ito, Bisei Ohkawara, Hideki Yagi, Hiroyuki Konishi, Shiro Imagama, Zenya Ito, Kei Ando, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno Role of Fgf18 gene derived from anterior horn of spinal cord for neuron ORS(Orthopedic Research Society 2015 小林 和克, 今釜 史郎, 伊藤 全哉, 安藤 圭, 八木 秀樹, 新城 龍一, 飛田 哲朗, 伊藤 研悠, 石川 喜資, 大籠 友博, 門松 健治, 西田 佳弘, 石黒 直樹 神経変性疾患におけるミクログリアをターゲットとした理想的治療薬とは 第29回日本整形外科学会基礎学術集会 2014

〔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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今釜 史郎 (IMAGAMA, Shiro)

名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 (40467288)

(2) 研究分担者

安藤 圭 (ANDO, Kei)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 ( 40566973 )

伊藤 全哉 ( ITO, Zenya )

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 ( 50447819 )

小林 和克 ( KOBAYASHI, Kazuyoshi )

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号 ( 00706294 )

都島 幹人 ( TSUSHIMA, Mikito )

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 ( 60755338 )

伊藤 研悠 ( ITO, Kenyu )

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 ( 10732638 )

石川 喜資 ( ISHIKAWA, Yoshimoto )

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 ( 30732656 )

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし