

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462244

研究課題名(和文) レプチン抵抗性が脊髄損傷の治療に悪影響を与えるメカニズムの解明とその克服法

研究課題名(英文) The mechanism to rescue the inflammation of injured spinal cord tissue especially for the influence of leptin.

研究代表者

佐久間 英輔 (SAKUMA, Eisuke)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90295585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：急性脊髄損傷で中枢神経内の再生阻害因子を克服して良好な機能的再生をさせるためには(1)軸索の再生能力の修飾(2)ミエリン内の阻害因子のブロック(3)グリア瘢痕の形成抑制(4)神経幹細胞などの移植による神経細胞あるいはグリアの補充再生などを組み合わせていく必要がある。我々は、グリア瘢痕の形成抑制が神経幹細胞などの移植による神経細胞あるいはグリアの補充再生と同時に必須であり、そのためには、ミクログリアの活性化の抑制が重要である事に注目して、脳内のミクログリアの老化に伴う活性化の抑制、ミクログリア由来細胞株BV-2細胞に、炎症を引き起こすリポ多糖の作用の抑制について研究をしてきた。

研究成果の概要(英文)：In the acute spinal injury, we must try to minimize the inflammation of the spinal cord tissue. We try to rescue this inflammation and investigate the mechanism to suppress the microglia for minimizing the inflammation. The ghrelin system activated by Rikkunshito significantly reduced the number of pathologically activated microglia with amoeboid morphology in the brains of klotho-deficient, SAMP8 and aged ICR mice. We also report that SGK1 and SGK3 are expressed in multiple microglial cell lines. An SGK inhibitor, gsk650394, inhibits cell viability. In addition, lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory regulators iNOS and TNF α was enhanced by gsk650394. These findings suggest that SGKs may play an important role in regulating microglial viability and inflammatory responses. These two investigations include the important findings to rescue this inflammation of the spinal cord tissue.

研究分野：組織学

キーワード：再生医療 ミクログリア 下垂体前葉 脊髄損傷

1. 研究開始当初の背景

成体の種々の組織には幹細胞が存在し、一定の寿命で死滅していく細胞の補充をしている。この成体の組織中に存在している幹細胞を総称して“体性幹細胞”と総称されている。下垂体前葉内において体性幹細胞の一種と考えられているのは下垂体濾胞星細胞と呼ばれている細胞種である。一方、中枢神経系は再生能力が低く、一度損傷すると再生は困難である。脊髄損傷に対する移植による脊髄再生には“夢の治療”として、大きい期待が寄せられている。

2. 研究の目的

我々は急性脊髄損傷に対する初期段階での脊髄再生治療に、下垂体濾胞星細胞を応用し、非開頭法を用いて採取した下垂体組織を腎被膜下移植しこれに毛様体神経栄養因子(CNTF)を皮下のリザーバーから持続投与し、数日後にこの下垂体組織を脊損部に移植する緊急手術に応用可能な治療方法を開発する基礎研究を行ってきた。また、我々はレプチン受容体遺伝子異常症を呈する遺伝性肥満ラット Zucker (fa/fa) が Wistar ラットに比べて治療成績の不良を呈する事を発見した。今回の研究の目的は、神経組織の炎症等が脊髄損傷の治療に与える悪影響を克服する方法を開発する事である。

3. 研究の方法

急性脊髄損傷は、軸索の断裂、神経細胞及びグリア細胞の壊死により脊髄神経組織が破壊される。その機序としては直達外力による一次損傷とその後続く二次損傷によるものがあり、最終的に生じる反応性アストロサイトによるグリア瘢痕が大きな問題となる。そこで中枢神経内の再生阻害因子を克服して良好な機能的再生をさせるためには(1)軸索の再生能力の修飾 (2) ミエリン内の阻害因子のブロック (3) グリア瘢痕の形成抑制 (4) 神経幹細胞などの移植による神経細胞あるいはグリアの補充再生など様々な方法を組み合わせる必要がある。我々は、グリア瘢痕の形成抑制が神経幹細胞などの移植による神経細胞あるいはグリアの補充再生と同時に必須であり、そのためには、ミクログリアの活性化の抑制が重要である事に注目して、脳内のミクログリアの老化に伴う活性化の抑制、ミクログリア(MG)由来細胞株 BV-2 細胞に、炎症を引き起こすリポ多糖(LPS)の作用の抑制について研究をしてきた。

4. 研究成果

(1)カロリー制限は、老化を遅らせ、幾つかの疾患の発生や機能低下を抑えることが証明されている。カロリー制限に回答して胃からグレリンが分泌されエネルギー代謝を調整する事が知られている。今回、我々は、2種の遺伝的老化促進マウス(Klotho欠損マウスとSAMP8マウス:いずれもオス)と正常老化のモデルとして加齢ICRマウスの合計3系統のモデルマウスを用いてグレリンシグナリングの影響を検討した。その結果、六君子湯およびアトラクチロジンの処置が内因性グレリンを増加させ、全ての3つの老化モデル(各群9-11匹)において寿命を延長させることを明らかにした。

六君子湯の投与実験では、各々18-20匹の2種の遺伝的老化促進マウス(Klotho欠損マウス&SAMP8マウス:いずれもオス)において、病理所見によると、視床下部活性化ミクログリアを抑制し、心筋線維の萎縮を改善しており、記憶の固定を改善していた。

また、それに加えて、SAMP8マウスでは、食欲不振低下、自発運動低下、白血球の発症の低下、胃粘膜萎縮、下腿の腓腹筋の筋萎縮(サルコペニアの症状)をそれぞれ改善していた。

一方、正常老化のモデルとしての加齢ICRマウスでも心筋線維の萎縮の改善のほか、記憶学習を改善する所見が見られており、老化促進マウスと正常老化のモデルマウスのいずれに対しても六君子湯の投与が老化の抑制と予防に対して有効であることが判明した。

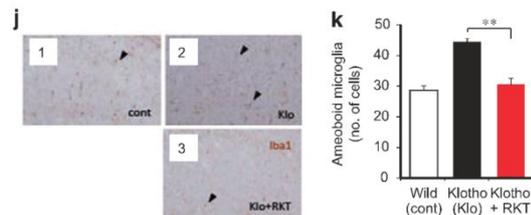
これらの一連の結果によって、我々は、六君子湯の投与によるグレリン増加は老化関連疾患(例えば心疾患や脳疾患など)に対して保護する役割を持ち、健康寿命の延長につながる可能性があることを解明した。

脳内のミクログリア活性:

また、寿命の延長の原因として考えられる中枢神経内の炎症反応の抑制効果については、我々の神経幹細胞移植治療の開発というテーマに、直接関与する事項であり、特に中枢神経内での炎症の有無に注意して研究した。

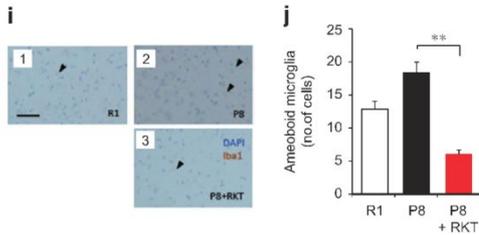
すなわち、脳内における、炎症反応の指標として、活性型のミクログリアの密度の変化に着目して、主に海馬の領域にて、指標物質としてIBA1を用いた免疫染色で確認する事とした。

グラフ1



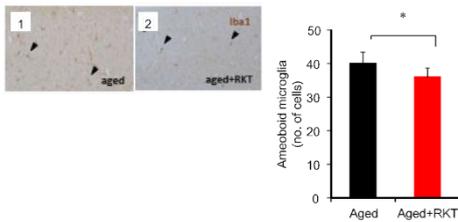
老化促進モデルマウス Klotho に六君子湯 (RKT) を 1000mg / kg 投与すると 活性型ミクログリアが減少する。

グラフ 2



老化促進モデルマウス SAMP8 に六君子湯 (RKT) を 1000mg / kg 投与すると 活性型ミクログリアが減少する。

グラフ 3



老化マウス ICR に六君子湯(RKT)を 0.5%, 1%含有する試料を与えると 活性型ミクログリアが減少する。

結果と考察：

特に中枢神経組織の代表である脳内において六君子湯の投与 胃の組織からのグレリンの分泌 長寿遺伝子の代表である SIRT1 の発現の強化 活性型ミクログリアの密度の減少という効果が解明された。この発見は、加齢変化に対する効果を中心にして研究しているが、中枢神経内の炎症反応の抑制という点では、神経幹細胞移植時のグリア瘢痕の抑制の検討という点で重要な要素を含んでいる。

(Molecular Psychiatry, 2016)

(2) 中枢神経内で炎症反応を起こすミクログリアについて、培養細胞を用いて、ミクログリアの活性調節における SGK1 を含む SGK のはたらきを検討した。

SGK :

Serum- and Glucocorticoid-inducible Kinase 1(SGK1)は血清などにより発現誘導されるリン酸化酵素で、腎臓での Na⁺再吸収の促進を含め種々の組織で多くの役割を持っていることが報告されている。さらに、近年 SGK の免疫系細胞における重要性が次々に明らかになってきている。

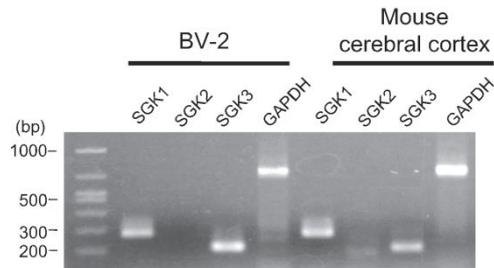
血清や糖質コルチコイドなどにより誘導されるリン酸化酵素として SGK1 が同定された (Webster et al 1993) のち、ファミリー分子として SGK2、SGK3 が発見された (Kobayashi et al 1999)。SGK2/3 は血清などには誘導されない。いずれも脳に発現することが報告されているが脳・神経における役割はいまだ不明な点が多い。基質としては GSK3 や

Nedd4-2 等が知られている。gsk650394 は SGK 特異的な阻害剤として報告され (Sherk et al 2008)、SGK1、SGK2 に対する IC50 はそれぞれ 62 nM、103 nM である。

ミクログリア：

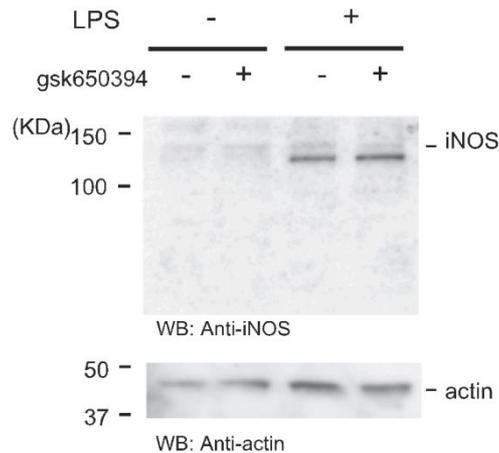
中枢神経系のグリア細胞の一種であるミクログリアは骨髄由来の細胞で、主に脳内の免疫機能を担っているとされる。ミクログリアは細菌感染時や脳梗塞後の炎症に非常に重要な役割を持つばかりでなく、最近ではうつ病等の精神疾患においてもその関与が指摘されてきている。そのため、ミクログリアの活性調節機構を明らかにすることは種々の精神神経疾患の発症メカニズムの解明やその治療にとって有益となる。

グラフ 4



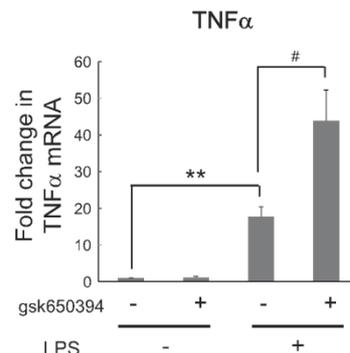
ミクログリア由来細胞株 BV-2 細胞に SGK1 と SGK3 が発現しているのを PCR で確認。

グラフ 5



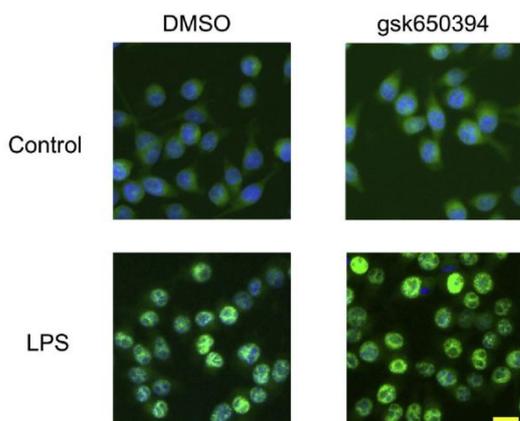
gsk650394 投与で、iNOS 蛋白が増加

グラフ 6



gsk650394 投与で TNF の発現レベル上昇

グラフ7



SGK 阻害で NF- κ B の核への移行が促進

結果と考察:

ミクログリア由来細胞株 BV-2 細胞を LPS 投与によりミクログリアを活性化したところ、刺激誘導型の一酸化窒素(NO)合成酵素 iNOS や炎症反応を惹起するサイトカイン TNF の mRNA が増加した。炎症を引き起こすリポ多糖 (LPS) と共に SGK 阻害剤である gsk650394 を投与したところ、iNOS と TNF の発現レベルはさらに上昇した。SGK 阻害剤による iNOS 蛋白の増加はウェスタンブロット法によっても確認され、また、NO の産生も SGK 阻害剤の投与により増強した。さらに、SGK の阻害により炎症に関与する転写因子 NF- κ B の核への移行が促進された。これらのことから、SGK の活性は炎症刺激に対するミクログリアの活性を抑制する可能性が示唆される。

なお現在、組織の阻血による酸性化の影響を検討するため、Asic1a ノックアウトマウスを購入、系統維持し、研究している。

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 2 件)

1: Increased ghrelin signaling prolongs survival in mouse models of human aging through activation of sirtuin1.

Fujitsuka N, Asakawa A, Morinaga A, Amitani MS, Amitani H, Katsuura G, Sawada Y, Sudo Y, Uezono Y, Mochiki E, Sakata I, Sakai T, Hanazaki K, Yada T, Yakabi K, Sakuma E, Ueki T, Nijima A, Nakagawa K, Okubo N, Takeda H, Asaka M, Inui A.

Mol Psychiatry. 査読あり

2016 21(11):1613-1623.

doi: 10.1038/mp.2015.220

2: Serum- and glucocorticoid-inducible kinases in microglia.

Inoue K, Sakuma E, Morimoto H, Asai H, Koide Y, Leng T, Wada I, Xiong ZG, Ueki T

Biochem Biophys Res Commun. 査読あり

2016 478(1):p.53-9

doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.094.

[学会発表](計 3 件)

1: 2016 年 10 月 14 日

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会
福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

ASIC1a ノックアウトマウスの育児障害
若林健二郎, 佐久間英輔, 植木孝俊, 井上浩一,
大塚隆信, 和田郁雄, 水谷潤, 植木美乃,
村上里奈, 青山公紀, 井上浩一, 河命守,
白井康裕, 森本浩之, 小出益徳, 浅井友詞

2: 2016 年 3 月 28 日

第 121 回 日本解剖学会全国学術集会
ビッグパレット福島 (福島県・郡山市)
リン酸化酵素 SGK によるミクログリア活性の
調節

井上浩一, 佐久間英輔, 森本浩之, 和田郁雄,
植木孝俊

3: 2015 年 3 月 22 日

第 120 回日本解剖学会全国学術集会・第 92
回生理学学会大会・合同大会 神戸国際会議場
(兵庫県・神戸市)

Postnatal Changes of Distribution of S-100
Protein Positive Cells, Connexin 43 and
LH-RH Positive Sites in the Pars Tuberalis
of the Rat Pituitary Gland

佐久間英輔、和田郁雄、白澤信行、若林
健二郎、大塚隆信、植木孝俊

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/w3med/la
bo/rehabilitation.dir/index.html](http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/w3med/la
bo/rehabilitation.dir/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 英輔 (SAKUMA, Eisuke)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・
講師

研究者番号: 90295585

(2) 研究分担者

和田 郁雄 (WADA, Ikuo)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・
教授

研究者番号: 70182970

若林 健二郎 (WAKABAYASHI, Kenjiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・
助教

研究者番号: 20418867

伊藤 錦哉 (ITOH, Kinya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・
助教

研究者番号: 50597820

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし