

分担研究報告書

(脳科学研究事業「中枢神経損傷後の機能回復機構の解明、治療法の開発」)

中枢神経損傷後の細胞応答反応とその修飾の研究

分担研究者 吉峰俊樹

大阪大学大学院 医学系研究科 神経機能制御外科学講座 教授

研究要旨: 中枢神経損傷後、十分な機能回復を得るためには、一次損傷に引き続いておこる二次損傷の軽減が必要であり、本研究では主に中枢神経の外傷性並びに虚血性損傷モデルにおける損傷後の細胞応答反応の解明を進めている。今年度の研究では、特に脊髄損傷モデルにおいて Src kinase inhibitor である PP1 投与による損傷後の浮腫、炎症抑制作用を明らかにし、それによりもたらされる損傷範囲や神経機能改善効果を明らかにした。さらに損傷された神経細胞、軸索の再生治療の試みとして、神経幹細胞の供給源として adult ラットの骨髄間質細胞を培養、分離した。現在、ラット凍結脳損傷モデルを用い、損傷後に動脈内より神経細胞に分化した骨髄間質細胞を注入し、生着状態の評価を行っている。移植細胞に対する生体の細胞応答反応の影響等についてはほとんど知られておらず、今後、移植医療に伴う神経機能回復過程、機序についてさらに詳細な検討を進める予定である。

A. 研究目的

救急医療の進歩によって重症中枢神経損傷後の治療成績は向上してきたが、重篤な障害を残す例も多く、神経機能回復に向けさらなる取り組みがもとめられている。中枢神経損傷には一次損傷とそれに引き続いておこる二次損傷があるが、これまで損傷を受けた中枢神経は再生しないとされており、治療の主体は二次損傷をいかに抑制するかにかかっていた。一方、神経幹細胞に関する知見が近年多く明らかになり、損傷した中枢神経を再生させることも夢物語ではなくなってきた。本研究においても従来からの二次損傷を抑制し神経損傷を最小限に

とどめる研究と共に、神経幹細胞を使用し神経再生をはかる研究を行った。二次損傷を抑制する研究として、特に脊髄損傷モデルをもちいて、Src family kinase inhibitor である PP1 の投与により VEGF によって生じる浮腫抑制作用に関する研究を行った。神経再生の研究としては、骨髄間質細胞から神経細胞に分化する細胞を培養、分離し、損傷後脳への移植を試みた。

B. 研究の方法と結果

1. 脊髄外傷モデルを用いた Src family kinase inhibitor PP1 投与による外傷性脊髄損傷抑制効果の検討

脊髄損傷後に生じる損傷部周囲の浮腫形成は二次的な損傷拡大につながる。損傷部や損傷部周辺領域で VEGF の発現が亢進しており、VEGF による血管透過性の亢進が浮腫を形成する要因であることが知られている。Src kinase inhibitor である PP1 は VEGF の下流に作用し浮腫形成を抑制する薬剤であるが、実験的脊髄損傷後においても、損傷範囲や浮腫の範囲を抑制することを昨年度報告した。本年度はさらに、PP1 投与により機能改善をはかることを目的とした。ビーマークリップを用いて、第10胸椎レベルで脊髄圧挫傷モデルを作成し、損傷直後に PP1 および、溶解液を腹腔内投与し、経時的に下肢機能の評価と組織学的検討、組織中の炎症関連因子の mRNA 定量を行った。その結果、PP1 投与群では、浮腫範囲が縮小し、マクロファージの浸潤が抑制され、脊髄損傷範囲は有意に縮小した。また、PP1 投与群では、組織中の $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF}\alpha$ 、 ICAM-1 、 COX-2 の mRNA 発現量の低下を認めた。神経機能に関して、PP1 投与群では、溶解液投与群に比し、下肢機能は有意に良好な改善を認めた。こうしたことから、PP1 投与は浮腫抑制のみならず、炎症を抑えることにより、組織の二次的損傷を抑え、機能の改善につながったと考えられた。

2. 骨髄細胞の動脈内投与による脳損傷部位の神経再生の検討

骨髄細胞を培養、分化させ、動脈内よ

り投与することにより脳損傷部位での神経細胞を検討した。まず、adult ラット骨髄間質細胞をとりだし、培養する系の確立に成功した。培養細胞は、一部が神経細胞に分化したことを確認した。現在、セルソーターを用い、分化した細胞の分離を行っている。また、脳損傷モデルとしてはラット凍結損傷モデルを用い、損傷後に動脈内より骨髄間質細胞を注入し、生着の部位、数量を検討中である。

C. 考察

脊髄損傷モデルでは、PP1 投与後神経機能の改善が得られた。Src kinase inhibitor は、脳虚血時の保護効果が注目されているが、脊髄損傷においても組織学的、機能的保護効果を認めた。その機序としては、従来から知られている VEGF を介した血管透過性の亢進による浮腫の抑制だけではなく、炎症反応を抑制することによる可能性が示唆された。Src の下流には PI3 kinase があり、PI3 kinase が活性化されると $\text{NF-}\kappa\text{B}$ が活性化され、 IL-1 、 TNF 、 COX-2 、 ICAM-1 などの炎症に関連する因子が活性化される。PP1 投与は、こうした経路を抑制することによって炎症反応を抑え、浮腫抑制効果とあいまって神経保護効果を発揮したと考えられた。

神経再生の研究として、adult ラットの骨髄より骨髄間質細胞を取り出し、培養することに成功した。骨髄間質細胞に関しては、一部は、神経細胞に分化したことから、神経幹細胞あるいは、その前駆細胞が含まれていると考えられた。神経幹細胞を得る手段としては、ES 細胞、成

人脳内の幹細胞などがあるが、ES 細胞の使用には倫理的な問題があり、脳内からの採取には手技の煩雑さ、危険性が存在する。骨髄細胞中にも神経に分化しうる幹細胞が存在していることが知られており、これらの問題点を解決しうる幹細胞取得法として期待されている。これらの細胞を損傷部位に移植するに当たっては、まず移植ルートを検討が必要である。また効率を考慮すれば、ある程度分化させた状態の神経前駆細胞を抽出して移植するのが望ましいと考えられるが、どの程度まで分化させるのが有効かについては今後の検討が必要である。

本研究により、二次損傷の広がり薬剤により最小限に抑え、損傷の残った部位には神経幹細胞移植による神経再生を促すことにより、神経機能の改善を図った。今後さらに細胞移植による神経再生治療は臨床応用に向け検討されるものと考えられる。細胞移植療法を行うにあたっては、昨年までの研究により解析を行った ApoE 蛋白の神経細胞保護作用や NF- κ B デコイ治療をはじめとする種々の細胞応答反応との関連は非常に重要であり、今後さらに検討を行う予定である。

D. 結論

PP1 投与により脊髄損傷後の二次損傷の進展を抑え、組織学的、機能的予後を改善した。また、骨髄間質細胞より神経幹細胞をとりだし、脳損傷部位に移植するための基礎実験を行った。

E. 研究発表

論文発表

1. Masami Nishio, Eiji Kohmura, Takamichi Yuguchi, Yoshikazu Nakajima, Toshiyuki Fujinaka, Chihiro Akiyama, Akira Iwata, Toshiki Yoshimine: Neuronal apolipoprotein E is not synthesized in neuron after focal ischemia in rat brain. Neurological Research (in press)
2. Toshiyuki Fujinaka, Eiji Kohmura, Takamichi Yuguchi and Toshiki Yoshimine: The Morphological and Neurochemical Effects of Diffuse Brain Injury on Rat Central Noradrenergic System. Neurological Research (in press)

学会発表

1. Masami Nishio, Takamichi Yuguchi, Chihiro Akiyama, Toshiyuki Fujinaka, Yoshikazu Nakajima, Masaaki Taniguchi, Eiji Kohmura, Toshiki Yoshimine: Nuclear Factor kappa-B decoy oligodeoxynucleotides can reduce the ischemic spinal cord injury of rat. The 6th International Neurotrauma Symposium (Tampa, Florida, USA, October, 2002)
2. Chihiro Akiyama, Takamichi Yuguchi, Masami Nishio, Takahiro Tomishima, Toshiyuki Fujinaka, Masaaki Taniguchi, Yoshikazu Nakajima, Eiji Kohmura* and Toshiki Yoshimine : Src family kinase inhibitor PP1 improves motor

- function after spinal cord contusion in rats. The 6th International Neurotrauma Symposium (Tampa, Florida, USA, October, 2002)
3. Masami Nishio, Takamichi Yuguchi, Chihiro Akiyama, Yoshikazu Nakajima, Masaaki Taniguchi, Toshiyuki Fujinaka, Toshiki Yoshimine: Nuclear Factor kappa-B decoy protect the spinal cord injury following ischemia/ reperfusion in rats. International Symposium on Molecular Mechanism and Epochal Therapeutics for Ischemic Stroke Dementia (Okayama, Japan, November, 2002)
 4. Chihiro Akiyama, Takamichi Yuguchi, Masami Nishio, Takahiro Tomishima, Toshiyuki Fujinaka, Masaaki Taniguchi, Yoshikazu Nakajima and Toshiki Yoshimine : Src family kinase inhibitor PP1 improves motor function by reducing edema after spinal cord contusion in rats. Brain Edema 2002 (Hakone, Kanagawa, Japan, November, 2002)
 5. 西尾雅実、甲村英二、湯口貴導、秋山智洋、藤中俊之、山中一功、中島義和、吉峰俊樹: 頭蓋内顔面神経損傷時の顔面神経細胞変性に関する検討:Reg-2 発現を指標として. 第25回日本神経外傷学会 (平成 14 年 3 月、東京)
 6. 秋山智洋、湯口貴導、西尾雅実、藤中俊之、山中一功、中島義和、甲村英二、吉峰俊樹: Src family kinase PP1 による脊髄損傷後の細胞浸潤及び浮腫抑制効果の検討. 第25回日本神経外傷学会 (平成 14 年 3 月、東京)
 7. 西尾雅実、甲村英二、湯口貴導、中島義和、山中一功、谷口理章、藤中俊之、秋山智洋、安田恵多良、吉峰俊樹 : Nuclear Factor-kappa B decoy によるラット脊髄虚血治療. 第27回日本脳卒中学会 (平成 14 年 4 月、仙台)
 8. 秋山智洋、湯口貴導、西尾雅実、藤中俊之、谷口理章、山中一功、中島義和、吉峰俊樹: Src family kinase inhibitor PP1 による脊髄損傷後の機能改善効果. 第17回日本脊髄外科学会 (平成 14 年 6 月、静岡)
 9. 秋山智洋、湯口貴導、西尾雅実、藤中俊之、谷口理章、中島義和、吉峰俊樹: Src family kinase inhibitor PP1 による脊髄損傷後の機能改善効果の検討. 第61回日本脳神経外科学会総会 (平成 14 年 10 月、松本)
 10. 西尾雅実、湯口貴導、秋山智洋、藤中俊之、谷口理章、中島義和、吉峰俊樹: 頭蓋内顔面神経損傷時の顔面神経細胞変性に関する検討. 第14回神経損傷の基礎シンポジウム (平成 14 年 12 月、東京)
- G. 知的所有権の取得状況
- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案特許 | なし |
| 3. その他 | なし |

分担研究報告書

(脳科学研究事業「中枢神経損傷後の機能回復機構の解明、治療法の開発」)

「二次的脳損傷におけるミクログリアの役割に関する研究」

分担研究者 種子田 護 近畿大学医学部脳神経外科学 教授
研究協力者 片岡 和夫 近畿大学医学部脳神経外科学 助教授

研究要旨:脳損傷病態下で protease は細胞外腔で proteolysis を生じ病態を悪化させる可能性が考えられる。一方, protease は受容体を介してさまざまな生理機能を担っている。正常グリア細胞、グリア系腫瘍細胞において protease 受容体が発現する可能性が明らかとなった。脳損傷病態下においても、protease は細胞外腔で proteolysis によって病態を悪化させているだけではなく、濃度によっては protease 受容体を介した反応によって脳保護に働きうる可能性もあることが示唆された。

A. 研究目的

Proteaseは細胞外腔でproteolysisを生じ様々な病態に関与する一方、広範囲な生理機能を担っている。こうした中でもProtease受容体(PAR: Protease Activated Receptor)を介した細胞反応が明らかとなってきた。PARはthrombin, trypsinなどのserine proteaseにより活性化しさまざまな細胞反応を生じさせる。脳損傷病態下ではproteolysisはより病態を悪化させていると考えられているが、PARを経由した細胞反応はbrain protectionに働きうる可能性も考えられるようになってきた。またproteaseが高濃度で存在する場合は過剰なproteolysisが問題となり、低濃度では細胞反応のみを生じる可能性も考えられる。これまで脳損傷病態下でのPARを介した細胞反応の役割についてはまったく明らかとなっていない。

B. 研究方法

マウス由来のmicroglia細胞、astroglia細胞を分離しそれぞれの培養系を確立した。ヒト由来のグリア系腫瘍細胞(U-251 MG; GI-1; GB-1; YH-13; T98G)の培養系を確立した。これらの培養細胞にcytokine刺激($TNF\alpha$, $INF\gamma$, $IL-1\beta$), chemokine(LPS)刺激を行い培養液中のprotease(thrombin, prothrombin, trypsinなど)についてZymography, immunoblottingにて検討した。また培養細胞よりRNAを抽出しさまざまなprotease, PAR-1, -2, -3, -4のmRNA発現について高感度定量的PCR装置を用いたquantitative RT PCR法にて検討した。

C. 研究結果

Microglia培養細胞ではPARの発現はとぼしく、cytokine刺激にてもPARの発現上昇をほとんど認められなかった。しかし、Astroglia細胞培養、グリア系腫瘍細胞群ではPARを発現し、cytokine刺激にてもPARの発現上昇を認める可能性が明らかとなっ

た。

D. 考察

Proteaseは細胞外腔でproteolysisを生じて様々な病態に関与すると考えられている。すなわち血管の基底膜を構成するマトリックス蛋白がproteolysisにより破綻すると脳浮腫発生に関与すると考えられる。また、直接神経細胞傷害を生じると考えられる。一方、proteaseは受容体を介し細胞反応を生じることも明らかになっている。特に、PARは最近その存在が明らかになり、4タイプのPARがクローニングされている。PARはthrombin, trypsinなどのserine proteaseにより活性化しさまざまな細胞反応を生じさせる。そのmechanismは、PARのN末端のpeptideの特定部分をserine proteaseのproteolysisにより切断すると特定のpeptide部分が露出され、このpeptide部分がPAR自身の別の部位に結合し、PARを活性化させ細胞反応を生じると考えられている。今回の研究では、Astroglia・グリア系腫瘍細胞ではPARを発現する可能性が示唆された。PARを介した細胞反応が脳損傷病態にどう影響を与えるかはまったく明らかでなく今後の研究課題であると考えられる。

E. 結論

脳損傷病態下で、proteaseは細胞外腔でproteolysisを生じ病態を悪化させる可能

性が考えられる。一方、protease受容体を介した細胞反応を生じ脳損傷病態に影響を与えていると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawabata A, Kawao N, Itoh H, Shimada C, Takebe K, Kuroda R, Masuko T, Kataoka K, Ogawa S: Role of N-methyl-D-aspartate receptors and the nitric oxide pathway in nociception/hyperalgesia elicited by protease-activated receptor-2 activation in mice and rats. *Neurosci Lett* 329:349-353,2002

2. 学会発表

片岡和夫, 種子田護, 朝井俊治, 山田恭史, 中村英剛, 寺本佳史: 破裂脳動脈瘤形成のプロセス. 第61回日本脳神経外科学会 2002年10月 松本

渡邊啓, 寺本佳史, 片岡和夫, 朝井俊治, 種子田護: 脳浮腫とAquaporin-4の発現の関連性について(in vitro). 第61回日本脳神経外科学会 2002年10月 松本

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案特許 | なし |
| 3. その他 | なし |

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Oda J, et al.	Mild hypothermia alters the O ₂ consumption/delivery ratio by decreasing the slope of the supply-dependent line.	Crit Care Med	30	1535 - 1540	2002
Yamashita T, et al.	The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho.	J. Cell Biol.	157	565 - 570	2002
Kubo T, et al.	A novel FERM domain including guanine nucleotide exchange factor is involved in Rac signaling and regulates neurite remodeling.	J. Neurosci.	22	8504 - 8513	2002
Tanaka H, et al.	Cytoplasmic p21 ^{Cip1/WAF1} regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity.	J. Cell Biol.	158	321 - 329	2002
Che Y H, et al.	Changes in mRNA for choline transporter-like protein following facial nerve transection.	J. Chem. Neuroanat.	24	147 - 152	2002
Kubo T, et al.	Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays.	J. Neurochem.	82	1129 - 1136	2002
Hirata M, et al.	Frequency-dependent spatial distribution of human somatosensory evoked neuromagnetic fields.	Neurosci Lett.	318	73 - 76	2002
Toyota S, et al.	Malignant infarction in cats after prolonged middle cerebral artery occlusion: glutamate elevation related to decrease of cerebral perfusion pressure.	Stroke.	33	1383 - 1391	2002
Kitamura Y T, et al.	Motor-evoked potentials following transcranial magnetic stimulation during recovery after a stroke.	Recent Advances in Human Brain Mapping	1232 C	907 - 914	2002

20020916

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.66の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。