

氏 名	しぎょう みちこ 執行 美智子
学 位 の 種 類	博士（薬科学）
学 位 記 番 号	富医薬博甲第 199 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
教 育 部 名	富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程 薬科学専攻
学 位 論 文 題 目	Denosomin の軸索伸展作用メカニズム解明に基づく新規脊髄損傷治療戦略の研究 (Study of a novel therapeutic strategy of spinal cord injury based on the mechanism of Denosomin-induced axonal facilitation)
論文審査委員	
(主査)	准教授 田 淵 明子
(副査)	教 授 新 田 淳美
(副査)	教 授 東 田 千尋（指導教員）

論文内容の要旨

【背景】

脊髄損傷 (SCI; Spinal Cord Injury) では、交通事故、転落事故、スポーツ事故に伴う脊椎脱臼骨折などの外傷によって、脊髄の神経軸索が断裂し、損傷部位より下位の脊髄神経支配領域において感覚麻痺、運動機能障害、自律神経障害が永続的に引き起こされる。現在の脊髄損傷の治療では、損傷により生じた脊髄の圧迫除去や、脱臼によって不安定になった椎骨を元の位置に戻して安定化させる手術療法、損傷直後に限定の抗炎症薬メチルプレドニゾロンの大量投与療法が用いられている。しかしこれらは対症療法であり、脊髄の組織および機能を正常化する積極的な治療法の確立が切望されている。

脊髄損傷後の脊髄組織では、時間的、空間的に様々な分子、細胞が複雑に変動し、免疫細胞の浸潤ならびにサイトカイン放出による炎症反応や、軸索損傷による伝導遮断、神経突起伸展阻害因子の発現が引き起こされる。特に損傷領域に集積する活性化アストロサイトはグリア性瘢痕を形成することで軸索再生の物理的障壁となるだけでなく、軸索伸展阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン損傷部位に放出することで、神経回路の再形成に阻害的に働く化学的障壁ともなり、機能回復をさらに困難なものにしている。

我々は、脊髄の機能的な回復を図るには、損傷部位において軸索の伸展を誘発し、破綻した神経回路網が再構築されることが特に重要であると考えてきた。脊髄損傷後の損傷部位では、様々な軸索伸展阻害因子が増加し、そのことが機能不全永続の大きな要因ともなっているため、そういった環境下でも軸索伸展を促進する薬物を見出すことができれば、脊髄損傷の根本的克服につながる可能性がある。また、そのような薬物の作用機序を解明することで、脊髄損傷改善に至る新規の分子メカニズム発見につながり得る。

当研究室ではこれまでに、軸索伸展活性を有する薬物として新規化合物 Denosomin に着目し SCI に対する作用を検討してきた。Denosomin は、インドのアーユルヴェーダ医学で強壮薬・向知性薬として用いられている Ashwagandha (*Withania somnifera* Dural の根)の単離成分の 1 つ withanoside IV に着目し活性研究・合成研究を行う過程で得られた化合物である。

第一章では、Denosomin を投与した SCI マウスにおいて顕著に運動機能改善作用が示され、その損傷部位で中間径フィラメントタンパク質である vimentin を発現・分泌するアストロサイトが、特異的に増加することで損傷部の軸索伸展に関与することを明らかにした。第二章では、軸索伸展作用を示す細胞外 vimentin のメカニズムの解明を検討した。第三章では、細胞外 vimentin による軸索伸展作用および脊髄損傷改善作用について SCI モデルマウスを用いた *in vivo* の検討を行った。また、第四章では、脊髄損傷モデルマウスの従来の運動機能評価法の不足点を改良した新たなスコアリングを開発した。

【第一章 Denosomin によるアストロサイトを介した脊髄損傷改善作用メカニズムの解明】¹⁾

当研究室ではこれまでに、軸索伸展活性を有する新規化合物 Denosomin を見出していた。本研究では、Denosomin を SCI モデルマウスに連日経口投与したところ、顕著に運動機能が改善し、その損傷部位では、NF-H 陽性軸索、運動機能を制御する縫線脊髄路に分布する 5-HT 陽性軸索、皮質脊髄路について有意に伸展が促進された。さらに軸索伸展阻害に関与すると考えられているアストロサイトが Denosomin 投与により増加することを見出した。そこで Denosomin による運動機能改善にはアストロサイトが何らかの正の役割を担っている可能性を考え、SCI 改善のメカニズムをアス

トロサイトに着目して検討した。

単離初代培養アストロサイトに対する Denosomin の作用 脊髄由来培養アストロサイト(SD rats, 胎生 17 日齢)に Denosomin (1 μ M)を処置したところ、細胞増殖が促進された。さらに Denosomin (1 μ M)を前処置した培養アストロサイトの培養上清を初代培養脊髄神経細胞(SD rats, 胎生 17 日齢)に処置したところ、有意に軸索の伸長が促進された。

Denosomin 処置によりアストロサイトから分泌される軸索伸展因子の同定 Denosomin (1 μ M)あるいは溶媒を処置したアストロサイトから抽出した全タンパク質溶液をそれぞれ 2D-PAGE および LC-MS/MS により解析した結果、Denosomin 処置で増加する因子として中間径フィラメントタンパク質の vimentin が示された。さらに、Denosomin 処置したアストロサイトの培養上清を ELISA 解析した結果、Denosomin 処置で vimentin の細胞外への分泌が増加することが確認された。CSPG 基質上(0.5 μ g/ml)で初代培養大脳皮質神経細胞(ddY mice, 胎生 14 日齢)を培養すると軸索伸長が阻害されるが、vimentin (10 ng/ml)を共処置すると CSPG 存在下でも有意に軸索伸長が促進された。

Denosomin 投与 SCI マウスにおける vimentin の発現 SCI マウス(雄性, ddY mice, 7 週齢, L1 レベルの圧挫損傷)に対して、Denosomin (20 μ mol/kg/day)または溶媒を損傷 1 時間後、翌日以降は 1 日 1 回、7 日間連続経口投与した後、脊髄切片の蛍光免疫染色を行った。Denosomin 投与群の損傷部位で、vimentin の密度、5-HT 陽性軸索(縫線脊髄路)の密度が増加し、vimentin に沿って伸展する 5-HT 陽性軸索の割合が増加した。さらに vimentin と共局在するアストロサイトの割合は増加する一方、CSPG と共局在するアストロサイトは増加しなかった。Denosomin 投与した SCI マウスで増加した vimentin は細胞外マトリックスタンパク質 laminin と共局在し、 β -actin(細胞質および細胞膜に分布)とは重ならなかった。

これらの結果により、Denosomin 投与した SCI マウスの損傷部位では vimentin を発現・分泌するアストロサイトが特異的に増加し、それに沿って伸展する軸索が増加することが示された。

【第二章 細胞外 vimentin による軸索伸展作用メカニズムの解明】²⁾

第一章より、Denosomin 投与により運動機能が改善した SCI マウスの損傷部位では、アストロサイトから分泌された vimentin が損傷部位の軸索伸展促進作用に関与していることが示された。Vimentin は中間径フィラメントタンパク質の一つであり、これまで細胞内タンパク質として細胞接着や細胞移動に関与することが知られている。一方、分泌された細胞外タンパク質としての神経細胞に対する作用は全く報告されていない。そこで、本章では、細胞外 vimentin のターゲットタンパク質を明らかにすることで、vimentin の新たな知見となり得る軸索伸展作用メカニズムの解明を目指した。

細胞外 vimentin のターゲットタンパク質候補の検出 Vimentin (100 ng/ml)あるいは溶媒を 10 分間処置したラット大脳皮質神経細胞から抽出した全タンパク質溶液を用いて、網羅的リン酸化抗体アレイを行ったところ、リン酸化割合が増加する受容体タンパク質として Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)が示された。

細胞外 vimentin による IGF1R シグナル経路への関与 マウス大脳皮質神経細胞に 2 種類の IGF1R 阻害剤(IGF1-analog; 20 ng/ml または anti-IGF1R antibody; 2 μ g/ml)をそれぞれ前処置し、vimentin (100 ng/ml)による軸索伸展作用を検討した。いずれの阻害剤を用いた場合にも vimentin による軸索伸展作用が阻害され、IGF1R が vimentin による軸索伸展に関与することが示された。また、マウス大脳皮質神経細胞(培養 4 日目)に vimentin (100 ng/ml)を 5, 10, 30, 60 分間処置し、vimentin によって起こる IGF1R のリン酸化タイムコースを、蛍光免疫染色および western blot により検出したところ、vimentin による IGF1R のリン酸化は処置後 30 分間でピークに達した。このとき培養上清中に含まれる IGF1R の生理的リガンド(IGF1, IGF2, Insulin)は、vimentin 処置で増加しないことが ELISA により示された。

Vimentin と IGF1R の直接結合 DARTS 法と western blot による解析、および免疫沈降法による検討から、vimentin と IGF1R が直接結合することを明らかにした。

結合シミュレーション解析 Vimentin の C 末端領域(aa: 330-407)が IGF1R の細胞外ドメインに結合する領域であることが示された。

これらの結果より、細胞外 vimentin が神経細胞上にある IGF1R に直接結合し活性化することで、軸索伸展作用を促進することを明らかにした。

【第三章 細胞外 vimentin による SCI マウスの脊髄損傷改善作用および軸索伸展作用の検討】

第一章、第二章より、Denosomin によってアストロサイトから分泌される軸索伸展促進因子として vimentin が同定され、Denosomin 投与した SCI マウスの損傷部位では vimentin を発現・分泌するアストロサイトが増加することによって軸索伸展が促進されることを示唆する結果を得た。そこで本章では、損傷部位における細胞外 vimentin の増加が本当に軸索の伸展を促進し、それが脊髄損傷の機能を改善させるかを検討した。

細胞外 vimentin による SCI マウスの運動機能改善作用 SCI マウス(雌性, ddY mice, 6-8 週齢)の側脳室内に vimentin (0.528 pmol/day)または溶媒(ACSF; artificial cerebrospinal fluid)を持続注入し (21 日間)、スコアリングにより運動機能を評価したところ、後肢運動機能は vimentin 投与群で有意に改善した。また、脊髄矢状断切片の蛍光免疫組織染色解析より、損傷部における 5-HT (縫線脊髄路軸索マーカー) および NF-H (神経軸索マーカー) 陽性の軸索密度が vimentin 処置により有意に増加した。

【第四章 脊髄損傷モデルマウスにおける新規運動機能評価方法 TMS の開発】³⁾

SCI 後の機能回復において、関節の動きと体重支持の有無が重要な判断要素である。SCI マウスの後肢運動機能評価で一般的に用いられる BMS score は、特に関節の動きを詳細に検出する評価法であるが、損傷後時間経過に伴って次第に回復する体重支持の程度は十分に反映されない。重度の損傷条件や慢性期において、時間経過に伴う回復程度を正確に反映するスコアリングは、機能不全に対する候補薬物の効果を検討する際に非常に重要であると考えた。そこで以前当研究室で開発した体重支持に着目した評価法 BBB score と、広く普及している BMS score を組み合わせて改良を加え、新たな評価法 TMS (Toyama Mouse Score) を開発した。BMS と TMS を比較検討したところ、一人の観察者が複数のマウスを評価したときの変動係数、および複数の観察者が 1 匹のマウスを評価したときの変動係数は、BMS より TMS の方が低くなった。この結果から TMS がより精確な運動機能評価法であることが示された。

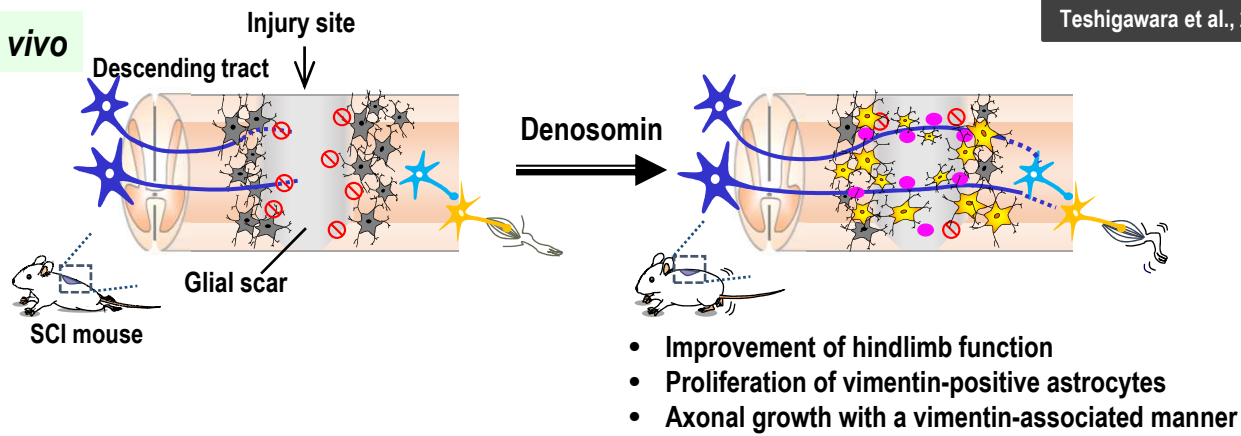
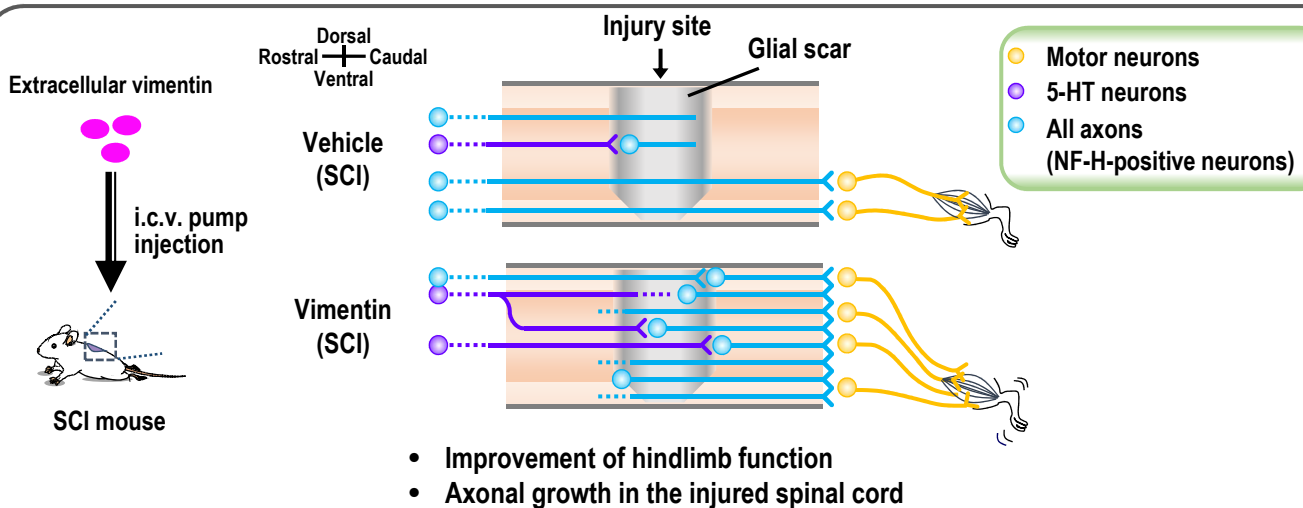
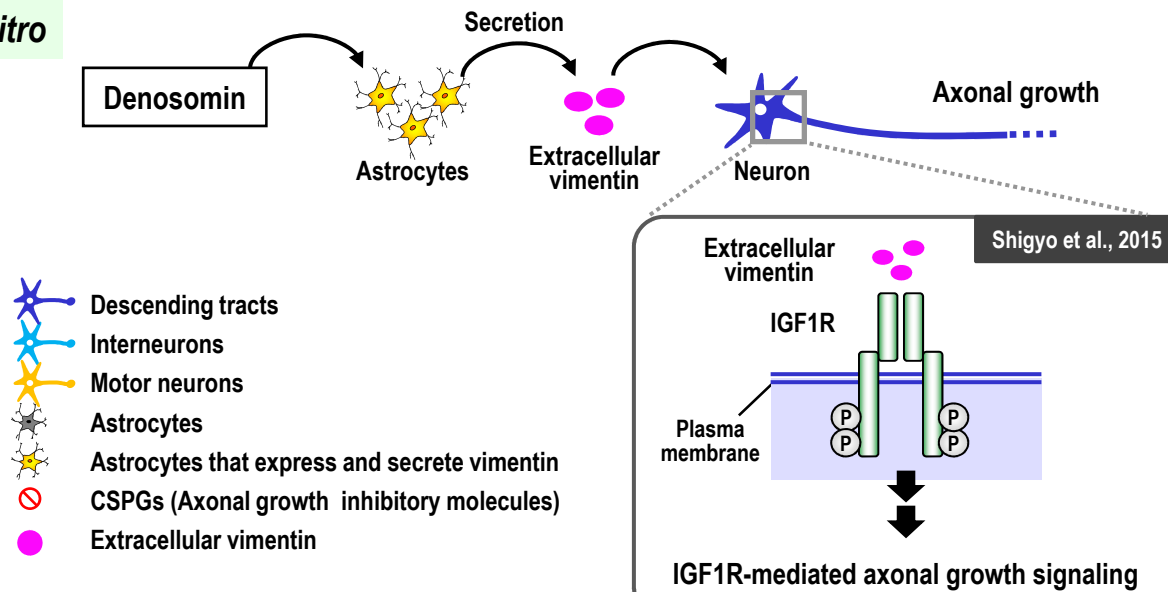
【結論】

本研究では、Denosomin を投与した SCI マウスの損傷部位において vimentin を発現・分泌するアストロサイトが特異的に増加することで軸索の伸展が促進され、運動機能改善に寄与することを明らかにした。さらに、細胞外 vimentin の増加が SCI マウスの後肢運動機能改善、軸索伸展を直接導くことを本研究で初めて明らかにした。また、これまで神経細胞における vimentin は、細胞内タンパク質としての機能しか知られていなかったが、細胞外タンパク質 vimentin が IGF1R に結合して軸索伸展作用を示す、という新しい現象が明らかとなった。

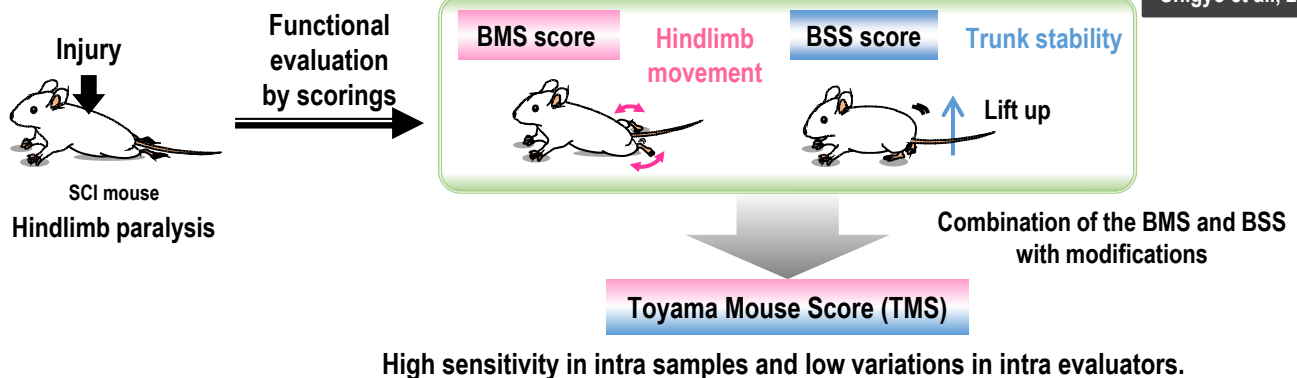
本来損傷部位で軸索伸展を阻害する反応性アストロサイトであっても、vimentin を分泌するようになることで軸索再生を賦活化し、運動麻痺の改善を導く、という現象を Denosomin が制御し得ることが示された。これは脊髄損傷改善の新たな機序であり、Denosomin が新規脊髄損傷治療薬として有効な創薬シーズとなり得ることが期待される。

【参考文献】

1. Teshigawara K, Kuboyama T, **Shigyo M**, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C. *British Journal of Pharmacology*. (2013) 168, 903-919.
2. **Shigyo M**, Kuboyama T, Sawai Y, Tada-Umezaki M, Tohda C. *Scientific Reports*. (2015) 5, 12055.
3. **Shigyo M**, Tanabe N, Kuboyama T, Choi SH, Tohda C. *BMC Research Notes*. (2014) 7, 332.

In vivo**In vitro**

Shigyo et al., 2014



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

【背景】

脊髄損傷 (SCI; Spinal Cord Injury) 後の損傷部位では、様々な軸索伸展阻害因子が増加し、機能不全永続の大きな要因となっている。そういった環境下でも軸索伸展を促進する薬物を見出すことができれば、脊髄損傷の根本的克服につながる可能性があり、その作用機序を解明することは、脊髄損傷改善の新しい分子メカニズム発見につながり得る。

当研究室ではこれまでに、軸索伸展活性を有する薬物として新規化合物 Denosomin に着目し SCI に対する作用を検討してきた。Denosomin は、インドのアーユルヴェーダ医学で強壮薬・向知性薬として用いられている Ashwagandha (*Withania somnifera* Dunal の根)の単離成分の 1 つ withanoside IV に着目し活性研究・合成研究を行う過程で得られた化合物である。

本研究では、Denosomin 投与による SCI マウスの運動機能改善作用を明らかにし、その作用機序の解明を行った。またその過程で、脊髄損傷モデルマウスの従来の運動機能評価法の不足点を改良した新たなスコアリングを開発した。

【第一章 Denosomin によるアストロサイトを介した脊髄損傷改善作用メカニズムの解明】¹⁾

Denosomin を SCI モデルマウスに 14 日間経口投与したところ、顕著に運動機能が改善し、損傷部位では、NF-H 陽性軸索 (軸索全般)、5-HT 陽性軸索 (縫線脊髄路)、皮質脊髄路が有意に伸展した。さらに、損傷中心部のアストロサイトが Denosomin 投与により増加した。そこで Denosomin による運動機能改善にアストロサイトが何らかの正の役割を担っている可能性を考え、以下の検討を行った。

脊髄由来初代培養アストロサイトに Denosomin を処置したところ細胞増殖が促進された。さらに Denosomin を前処置した培養アストロサイトの培養上清を初代培養脊髄神経細胞に処置したところ、有意に軸索の伸展が促進された。Denosomin あるいは溶媒を処置したアストロサイト中で増加するタンパク質を 2D-PAGE および LC-MS/MS により解析した結果、中間径フィラメントタンパク質の vimentin が示された。Denosomin 処置したアストロサイトから vimentin の分泌が増加することを ELISA で確認した。CSPG をコートして軸索伸展を阻害した培養皿上でも、vimentin を処置により大脳皮質神経細胞の軸索が有意に伸展した。SCI マウスに対して Denosomin を 7 日間連続経口投与すると、溶媒投与群と比較して、損傷部位での vimentin の密度、5-HT 陽性軸索の密度が増加し、vimentin に沿って伸展する 5-HT 陽性軸索の割合も増加した。Vimentin と共局在するアストロサイトの割合は増加する一方、CSPG と共局在するアストロサイトは増加しなかった。Denosomin 投与により増加した

vimentin は細胞外マトリックスタンパク質 laminin と共局在し、 β -actin (細胞質・細胞膜に分布)とは重ならなかった。

【第二章 細胞外 vimentin による軸索伸展作用メカニズムの解明】²⁾

細胞外に分泌される vimentin の神経細胞に対する作用は我々の報告以外にない。よってその機序も不明であった。そこで、細胞外 vimentin の結合タンパク質を明らかにすることを目指した。

Vimentin を 10 分間処置したラット大脳皮質神経細胞の網羅的リン酸化抗体アレイを行ったところ、リン酸化割合が増加する受容体タンパク質として Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)が示された。マウス大脳皮質神経細胞に 2 種類の IGF1R 阻害剤をそれぞれ前処置すると、vimentin による軸索伸展作用が阻害された。また、マウス大脳皮質神経細胞に vimentin を処置したところ、IGF1R のリン酸化が認められた。培養上清中に含まれる IGF1R の生理的リガンド(IGF1, IGF2, Insulin)は、vimentin 処置で増加しないことを ELISA により確かめた。DARTS 法と western blot による解析、および免疫沈降法による検討から、vimentin と IGF1R が直接結合することを明らかにした。さらに、*in silico* 結合シミュレーション解析により vimentin の C 末端領域(aa: 330-407)が IGF1R の細胞外ドメインに結合する領域であることが示された。

【第三章 細胞外 vimentin による SCI マウスの脊髄損傷改善作用および軸索伸展作用の検討】⁴⁾

細胞外 vimentin による SCI マウスの運動機能改善作用を検討するために、SCI マウスの側脳室内に vimentin または溶媒(artificial cerebrospinal fluid)を持続注入したところ (21 日間)、後肢運動機能は vimentin 投与群で有意に改善した。また、損傷部における 5-HT (縫線脊髄路軸索マーカー) および NF-H (神経軸索マーカー) 陽性の軸索密度が vimentin 処置により有意に増加した。

【第四章 脊髄損傷モデルマウスにおける新規運動機能評価方法 TMS の開発】³⁾

SCI マウスの後肢運動機能評価のスタンダードである BMS score は、関節の動きに主眼がある評価法であるが、肢機能の重要な観点である体重支持の程度が適切に反映されない点や、機能改善を細やかに検出しにくい点、点数付けに迷いやすい点において、改善の余地があると強く感じてきた。そこで、迷わず精確にスコアリングできる評価法の確立を目指して、

BMS score を改良した新たな加算式評価法 TMS (Toyama Mouse Score) を開発した。BMS ではスコアの差として表せない肢動作の改善を TMS は検出できること、TMS では BMS よりばらつきの小さい検出ができることが示された。この結果から TMS がより精確な運動機能評価法であることが示された。

【結論】

本研究では、Densosomin を投与した SCI マウスの損傷部位において vimentin を発現・分泌するアストロサイトが増加することで軸索の伸展が促進され、運動機能改善に寄与することを明らかにした。さらに、細胞外 vimentin の増加が SCI マウスの後肢運動機能改善、軸索伸展を直接導くことを初めて明らかにした。これまで神経細胞における vimentin は、細胞内タンパク質としての機能しか知られていなかったが、細胞外タンパク質 vimentin が IGF1R に結合して軸索伸展作用を示す、という新しい現象も明らかとなった。

本来損傷部位で軸索伸展を阻害する反応性アストロサイトであっても、vimentin を分泌するようになることで軸索再生を賦活化し、運動麻痺の改善を導く、という現象を Densosomin が制御し得ることが示された。これは脊髄損傷改善の新たな機序であり、Densosomin が新規脊髄損傷治療薬として有効な創薬シーズとなり得ることが期待される。

主査及び副査は、申請者 執行美智子氏に面接試験を行うとともに論文内容を綿密に審査し、本論文が博士学位(薬科学)を受けるに十分に値すると判断した。

1. Teshigawara K, Kuboyama T, **Shigyo M**, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C. “A novel compound, denosomin, ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin” *British Journal of Pharmacology*, 168, 903-919, (2013).
2. **Shigyo M**, Kuboyama T, Sawai Y, Tada-Umezaki M, Tohda C. “Extracellular vimentin interacts with insulin-like growth factor 1 receptor to promote axonal growth” *Scientific Reports*, 5, 12055, (2015).
3. **Shigyo M**, Tanabe N, Kuboyama T, Choi SH, Tohda C. “New reliable scoring system, Toyama mouse score, to evaluate locomotor function following spinal cord injury in mice” *BMC Research Notes*, 7, 332, (2014).
4. **Shigyo M**, Tohda C. “Extracellular vimentin is a novel axonal growth facilitator for functional recovery in spinal cord-injured mice” *Scientific Reports*, in press (2016).