

Ⅱ－１ 脊髄損傷モデルマウスにおける和漢薬の有効性の検討

富山大学・和漢医薬学総合研究所・神経機能学分野

准教授 東 田 千 尋

【研究目的と背景】

脊髄損傷に対する臨床的対処の現状としては、受傷直後の大量ステロイド剤投与による障害の減弱化が試みられているものの、その効果は疑問視されており (Kronvall et al., 2005)、動物実験での改善効果も明確でない (Pereira et al., 2009)。こういった現状の中、胚性幹細胞 (ES細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を応用した再生医療が次世代の脊髄損傷の治療戦略として有望視され、近年、精力的に基礎研究が進められている (Kumagai et al., (2009); Tsuji et al., 2010)。しかしこれらの戦略で、モデル動物での脊髄損傷改善作用が認められるのは、対照群でもある程度の自然回復が認められる損傷条件下で、急性期 (1-2 日以内) から亜急性期 (10日程度以内) に細胞を移植した場合が主であり、慢性期での有効性は不明である。つまり依然として慢性期に至った脊髄損傷の機能回復は極めて困難であると考えられている。

グリア瘢痕は、慢性期脊髄損傷で神経軸索が伸展を阻害する物理的バリアであると同時に、CSPGなどの軸索抑制因子を放出するため、その負の側面がクローズアップされてきた。しかし astrocyte には、積極的に軸索伸展を促す神経成長因子 (BDNF, NGF, NT3 等) の分泌 (Rolls et al., 2009)、シナプス間隙のグルタミン酸クリアランスによる神経細胞死の保護 (Rothstein et al., 1996) といった正の作用も備わっていることが、次々と示されている。つまり、慢性期脊髄損傷を治療する鍵は、①神経軸索の伸展と、②グリア細胞の正の作用を高めるような制御の両方に働きかけることである (Tohda and Kuboyama, 2011; Teshigawara, Kuboyama et al., 2013)。

そこで本研究では、和漢薬を対象にして、脊髄損傷改善作用の薬理活性を、いくつかの細胞モデルと脊髄損傷動物モデルにおいて多面的に検討し、活性成分の同定と、作用機序の分子的解明を目指す。*In vivo* モデルでの解析 (東田)、*in vitro* モデルでのアッセイとメカニズム解析 (東田, 久保山)、化学的分析研究 (紺野) と役割分担し、相互に連携しながら実施する。

本年度は、主として、CSPG による軸索伸展阻害を乗り越えて軸索を伸展させる活性に着目し、*in vitro* における和漢薬のスクリーニングと、*in vivo* での運動機能改善作用についての評価を行った。

【実験方法】

1) スクリーニングに用いた生薬エキス

和漢医薬学総合研究所内に保有されている、生薬（枋本天海堂より）水エキス110種類を用いた。

2) CSPG 基質上における軸索伸展阻害に対する生薬エキスの改善作用

マウス胎児（胎生14日齢）の脳より大脳皮質神経細胞を初代培養した。培養には、poly-D-lysine コーティングののち、CSPG としての aggrecan を 2 μ g/ml にてさらにコーティングした 8-well カルチャースライドを用いた。細胞は 5 X 10⁴ cells/well の密度で播種した。培養2日目に、溶媒のみあるいは生薬エキスを 1, 10 μ g/ml になるように培地中に加え、その6日後に細胞を固定し免疫蛍光染色を行った。軸索マーカーとしてリン酸化型ニューロフィラメント H (pNF-H) と、神経細胞マーカーとして MAP2 を 2 重染色した。蛍光顕微鏡 (BX61/DP70 システム, オリンパス) にて画像を取得し、軸索の長さを Neurocyte 画像解析ソフトで測定するとともに、Image J 画像解析ソフト上で神経細胞の数を測定し、神経細胞あたりの軸索の長さを算出した。

3) 脊髄損傷マウスの運動機能障害に対する生薬エキスの改善作用

ddY マウス（雌性, 8 週齢）の第11胸椎を切除し、露出させた脊髄に6.5 g の錘を 3 cm の高さから 1 回落下させ圧挫損傷モデルを作製した。損傷 1 時間後に初回, その翌日から 1 日 1 回, 生薬水エキス (300 mg/kg, 経口) の投与を30日間行った。マウスの後肢運動機能の評価は10段階の BMS スコアと, 5 段階の BSS スコアにより行った。その後, マウスを麻酔下に還流固定し脊髄を摘出した。連続矢状断切片を作製し, 免疫組織染色を行った。縫線脊髄路の可視化には, serotonin (5-HT) 抗体を用い, 同時に astrocyte マーカーの GFAP 抗体, コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) マーカーの CS56抗体を用いた三重染色を行った

【実験結果】

マウス大脳皮質神経細胞を用いて, CSPG 基質上の軸索形成に対する生薬水エキスの効果を検討した。実験は 3 回実施し, その平均値によって評価した。通常の poly-D-lysine コーティング上の培養時と比較して, CSPG 基質上で培養した場合, 軸索長は有意に短くなった。6 日間, 110 種類の生薬水エキスを, 1, 10 μ g/ml になるように処置し軸索が有意に伸展するかどうかを検討した結果, 苦参 (10 μ g/ml), 牛膝 (10 μ g/ml), 連翹 (1 μ g/ml) に軸索長促進作用が認められた。

そこで次に, 苦参, 牛膝, 連翹の各エキスを, 脊髄損傷マウスに経口投与し, 30 日間の後肢運動機能を評価した。溶媒投与群と比較して, 苦参エキス投与によって BMS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用: F (18, 576) = 3.143, P < 0.0001) と BSS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用:

F (18, 576) = 4.455, P < 0.0001) が有意に改善した。また、連翹エキス投与によっても、BMS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用 : F (18, 504) = 2.618, P = 0.0003) と BSS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用 : F (18, 504) = 2.212, P = 0.0029) が有意に改善した。一方、牛膝エキス投与では、BMS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用 : F (18, 612) = 1.004, P = 0.4533) と BSS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用 : F (18, 612) = 1.427, P = 0.1122) とともに、溶媒投与群との差が見られなかった。現在、それぞれのマウスから脊髄組織を摘出し、免疫組織染色により軸索形成の程度を検討している。

これらの検討と並行させて、苦参、牛膝、連翹の各水エキスから、分画を作製し (共同研究者・紺野の項)、CSPG 基質上の軸索形成に対する作用を検討中である。

【考察】

昨年度の研究においては、人参 (栃本天海堂)、黄耆 (栃本天海堂)、刺五加 (栃本天海堂)、桂枝朮 (中国江西省) について、初代培養大脳皮質神経細胞での CSPG 濃度勾配上における軸索伸展作用を検討し、桂枝朮水エキスに活性を見出した。しかし、その伸展活性はあまり強くなく、脊髄損傷モデルマウスでの効果を期待することが難しいと考え、あらためて110種類の生薬を対象に、細胞でのスクリーニングを行った。結果として、CSPG 上での軸索伸展阻害を乗り越える活性が、苦参、牛膝、連翹に見出された。さらに苦参と連翹エキスは、脊髄損傷マウスの後肢運動麻痺を改善させる作用を示した。現在、苦参および連翹中の活性成分の特定と、それらの作用機序について検討している。これらの検討により、脊髄損傷治療薬の新たなシーズの提案が可能になるものと考えている。同時に、苦参と連翹を構成生薬とした新たな漢方方剤を作製し、脊髄損傷マウスに投与する実験を実施し、単独の生薬エキスでの作用と比較して、相加・相乗作用が期待できないかも検討する予定である。また今回の研究結果より、CSPG 上での軸索形成の活性が、脊髄損傷後の運動機能改善活性をある程度予測できることも示された。よって、この実験系を、薬物や活性化合物のスクリーニングに有効に利用するとともに、薬物の作用機序の解明にも積極的に利用できると考えている。

【参考文献】

- 1) Kronvall E, Sayer FT, Nilsson OG. Iprednisolone in the treatment of acute spinal cord injury has become more and more questioned. *Lakartidningen*. 2005 ; 102 (24-25) : 18871888,
- 2) Pereira JE, Costa LM, Cabrita AM, Couto PA, Filipe VM, Magalhães LG, Fornaro M, Di Scipio F, Geuna S, Mauricio AC, Varejão AS. Methylprednisolone fails to improve functional and histological outcome following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*. 2009 ; 220 (1) : 71-81.
- 3) Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Nagoshi N, Kitamura K, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Katoh H,

- Okada S, Shibata S, Matsuzaki Y, Toh S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One*. 2009 ; 4 (11) : e7706.
- 4) Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 ; 107 (28) : 12704-12709.
 - 5) Rolls A, Shechter R, Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10 (3) : 235-241.
 - 6) Tohda C, Kuboyama T. Current and future therapeutic strategies for functional repair of spinal cord injury. *Pharmacol Ther*. 2011 ; 132 (1) : 57-71.
 - 7) 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. *Br J Pharmacol*. 2013 ; 168 (4), 903-919.