

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09476

研究課題名(和文) 脊髄損傷性運動麻痺の機能回復におけるリゾリン脂質の役割とそのメカニズム

研究課題名(英文) Role and mechanism of lysophospholipids in functional recovery of spinal cord-injured motor paralysis

研究代表者

羽二生 久夫 (Haniu, Hisao)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：30252050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はリゾリン脂質(LPLs)にインパクト法による脊髄損傷(SCI)モデルマウスの運動機能麻痺の治癒促進効果があるかを明らかにする事である。中程度から重度と言われるインパクト法によるSCIモデルマウスでもブタ肝臓分解物での経口投与で損傷治癒促進効果が確認できた。そこでin vitro実験で炎症抑制効果や神経伸長促進効果が見られたLPLsの一種であるリゾフォスファチジルエタノールアミンの投与を行ったところ、損傷処理後の損傷部への連日の直接投与でのみ有意に治癒促進効果が示された。損傷部の組織標本では投与群でGFAP陽性領域とアポトーシス細胞の減少が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究成果は生物由来であるブタ肝臓分解物やその中に含まれるリゾリン脂質の一部に神経修復作用がある事を示している。この成果は外部からの投与のみならず、体内での代謝による運動機能の改善を目指せる可能性をも示している。この研究を発展させることによってリゾリン脂質による神経の保護から修復までの予防薬や治療薬の開発に展開させていきたい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify whether lysophospholipid (LPLs) have effects on promoting the healing of motor function paralysis in a mouse model of spinal cord injury (SCI) by the impactor method. Oral administration of porcine liver degradation products has been shown to accelerate the healing of SCI in mice with moderate to severe SCI. In vitro experiments using lysophosphatidylethanolamine, which has been shown to suppress inflammation and promote nerve growth, showed a significant healing-promoting effect only when administered directly to the injured area after injury treatment on a daily basis. Tissue specimens from the injured area showed a decrease in GFAP-positive areas and apoptotic cells in the treated group.

研究分野：整形外科学

キーワード：リゾリン脂質 脊髄損傷 ニューロン グリア細胞 脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 今年の参議院選挙でれいわ新撰組の2名の当選者がいずれも障害者であった事から障害者に対して注目が集まっている。障害者にとって生活し易い社会を作る事は非常に重要な事であり、このような注目がなくても障害者になってしまった方達のために進めなければいけない社会福祉である。その障害の大きな原因の一つが整形分野における脊髄損傷 (SCI) であり、長野県はウィンタースポーツの盛んな事もあり、若くして障害者になるケースも多い。そして、全国では10万人以上の患者と年5千人以上の新たな患者がSCIによる運動麻痺に苦しんでいるが、障害者にとっての本当の願いは社会の受容よりも医療による障害からの解放であろう。

(2) 研究代表者は受託共同研究としてブタ肝臓プロテアーゼ分解物 (PLDP) の認知機能評価の研究に参加していた【1】。これはブタの肝臓にホスファチジルコリン (PC) が多く含まれている事が知られていたため、コリン仮説に基づく認知症への効果を期待したものであり、長谷川式簡易認知評価スケールで評価したところ、日常の食生活よりも低いPC量相当で認知機能の改善効果が見られた。この結果はPLDPに含まれるPC以外の成分が認知機能に関連する神経、及びその関連細胞への作用を示している事からSCIでの有効性も評価する価値があると判断し、萌芽研究として応募して採択された。SPIモデルラットにおいて運動機能評価であるBasso-Beattie-Bresnahan (BBB) スコアでその有効性が確認でき、特許申請を行った【2】。そしてPLDPの詳細なリン脂質の成分分析を定量したところ、リン脂質の中でもリゾリン脂質が豊富である事が明らかとなった。

PLDPに豊富に含まれていたリゾリン脂質は生理活性リン脂質、あるいは脂質メディエーターとも呼ばれており、近年、様々な生体内での生理機能が明らかになりつつある。我々もこのPLDP研究から既にリゾリン脂質の一つであるリゾホスファチジン酸 (LPA) のニューロンにおける生理作用について報告しており【3】、これを加速させたい。

2. 研究の目的

本申請ではPLDP中に含まれていたリゾリン脂質であるLPA、リゾホスファチジルコリン (LPC)、リゾホスファチジルイノシトール (LPI)、リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)、リゾホスファチジルセリン (LPS) や他のリン脂質が脊髄損傷時の運動麻痺の改善に有効であるかを in vivo と in vitro 実験で明らかにする事である。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

インパクトを用いたSCIモデルマウスの作製

マウス (8週齢、オス) を麻酔下で体重を測定後、中央部縦方向に約1.5cm切開し、胸椎の10~12番目に当たる部分に上下5mm程度の切れ目をメスで入れた。椎弓をハサミで切除して硬膜を露出し、インパクト (室町機械: IH-400) にセットした。強度70 kdyn で衝撃負荷をかけた。麻酔から覚醒後、下肢が麻痺していることを確認した (day0)。実験終了はDay28、またはDay56とし、CO₂ で安楽死させた。

本研究は信州大学動物実験等実施規程に則り、承認 (No.020021) を得て行った。

PLDP、LPEの投与

PLDPは麻酔から覚醒後、経口から28日間の連続投与を行った。LPEの投与はインパクト処理直後、翌日から2日間の損傷組織患部への直接投与、そして腹腔投与の3パターンで行った。

評価項目

Day1, 3, 5, 7, 14, 21 に体重と動画撮影を行い、撮影動画から歩行パフォーマンスと運動能力を9段階で評価するBassoMouseScale (BMS) スコア化して評価した。また、終了時に組織標本作製用に手術部位を採取、ホルマリン固定を行い、HE染色、GFAP及びCD11bの免疫組織染色を行った。また、TUNEL法によるアポトーシス細胞の評価も行った。

(2) 細胞実験

ミクログリアに与える影響

2種類のミクログリア細胞 (BV2 & SIM-A9) にPLDPおよびLPLsを暴露し、増殖性、形態変化、活性化反応を評価した。さらに、リポ多糖で誘発する炎症応答に対する抗炎症能についても評価を行った。

神経細胞に与える影響

培養大脳皮質ニューロンを用いてLPLsの形態に対する影響やグルタミン酸誘発性興奮毒性の評価を行った。また、神経芽細胞 (SK-N-SH) を用いてLPLsの細胞毒性評価を行った。

4. 研究成果

(1) 動物実験

PLDP 投与マウスではコントロール群と比較し、投与期間中の体重変化に違いはなかった。足関節の状態と BMS スコアを図 1 に示した。SCI 処理後 1 日目ではどちらの群も運動機能が消失しているが、28 日では PLDP 群に自発的に歩行が可能となる個体があった (図 1a)。BMS スコアは 14 日目まで有意差が示され、その後 28 日目まで継続した (図 1b)。

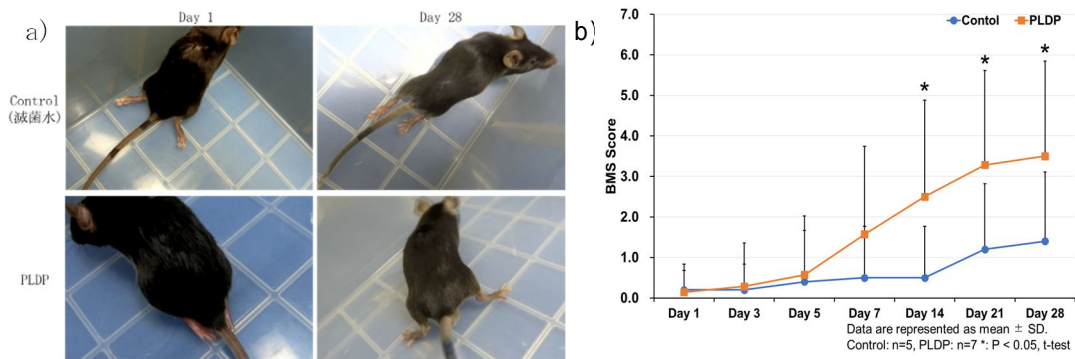


図 1. 脊髄損傷マウスへの PLDP 投与による運動機能への影響。a) SCI 処理後 1 日目と 28 日目の各群のマウスの様子。b) BassoMouseScale スコアの変化。

LPE 投与群とコントロール群の比較では投与方法によって結果が異なった。SCI 処置直後の損傷部直接 1 回投与、および腹腔内投与では有効性が確認できなかった。しかし、処置翌日からの二日間にわたる患部への直接投与によって有意に BMS スコアが高くなった。また、免疫組織学的評価では LPE 投与群で GFAP 陽性領域の減少と TUNEL 法でのアポトーシス陽性細胞の減少が確認できた。

(2) 細胞実験

ミクログリアに与える影響

BV2 と SIM-A9 に対する PLDP、および LPLs の形態変化 (ミクログリアプロセス) 増殖性、活性化反応を調べたところ、図 2 のような結果が示された【4】。SIM-A9 における PLDP、および LPLs の形態変化は PLDP と LPE、LPC で顕著に増加した (図 2A)。BV2 でも PLDP は有意な形態変化を誘発した。細胞増殖への影響は SIM-A9 では 0.1% PLDP、および 3 μM LPC18:1 と LPS、10 μM LPA18:1 で有意な増殖上昇が確認された (図 2B)。BV2 では PLDP、LPC18:1、LPA18:1 の複数の濃度で増殖上昇が観察された。SIM-A9 にリポ多糖で刺激した時の炎症応答を PLDP は抑制し、LPC にも同様の作用がある事が明らかとなった (図 2C)。この LPC の作用は NADPH oxidase 2 レベルを抑制する事による活性酸素産生の減少による事が明らかとなった【5】。

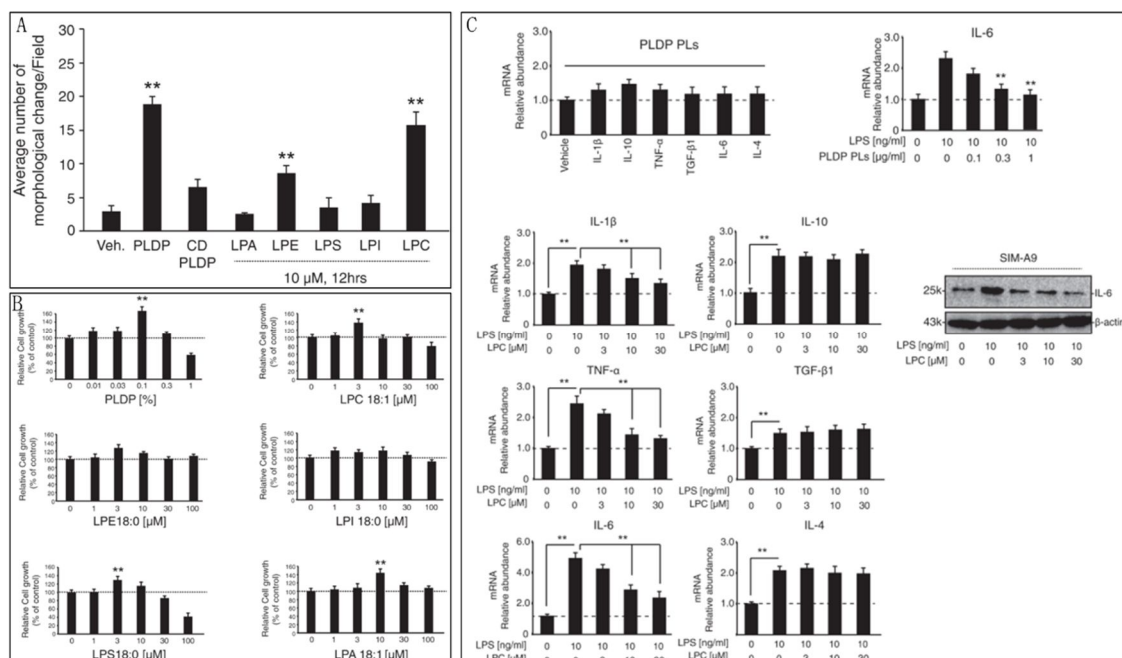


図 2. ミクログリアに与える PLDP および LPLs の影響。A) 形態変化への影響。B) 細胞増殖性への影響。C) 炎症応答に対する影響。

神経細胞に与える影響

培養大脳皮質ニューロンを用いて PLs と LPLs の軸索および樹状突起面積に対する影響を調べ

たところ図3のような結果が得られた【6】。微小管関連タンパク質2 (MAP2) 陽性の樹状突起と微小管関連タンパク質タウ (tau) 陽性の軸索がディッシュー面に広がっていた (図3A)。LPEでのみ Tau と MAP2 のシグナル面積がコントロール培養のもの比べて有意に増加した (図3A-C)。一方、神経核抗原 (NeuN) 陽性ニューロンの数は、牛心臓 CL で処理した場合を除き、対照とリン脂質で処理した培養物の間に実質的な差はなかった (図3A,D)。さらに異なる LPE の分子種 LPE16:0 と 18:0 の神経突起伸長に対する影響を調べたところ、どちらも容量依存的に促進効果を示した。しかし、それぞれの促進作用のカスケードは異なる事も明らかになった。また、LPE18:1でも同様に神経突起伸長や促進されるとともにグルタミン毒性に対して保護作用がある事も明らかにした【7】。

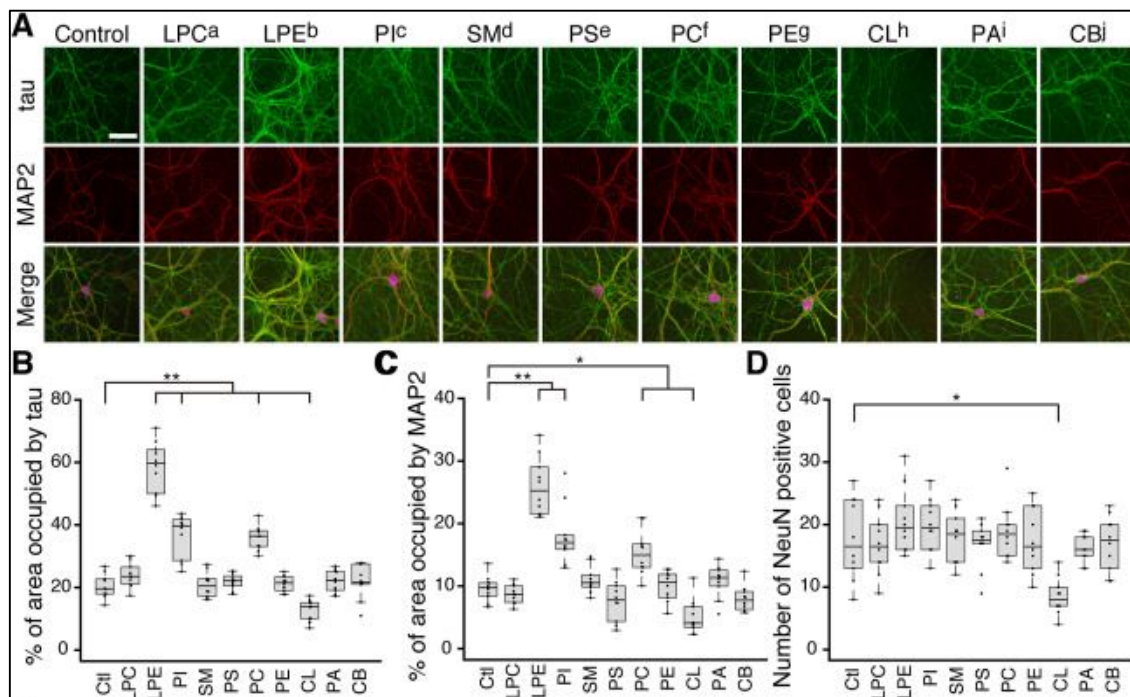


図3. 大脳皮質ニューロンに与える LPLs の影響。A) MAP2 および Tau 染色像。B) Tau シグナル領域の定量化。C) MAP2 シグナル領域の定量化。D) NeuN 陽性神経細胞数の定量化。

また、図4に示すように *in vitro* での生理作用が確認できた LPLs の SK-N-SH に対する細胞毒性評価では分子種の中でも違いがあり、LPC では LPC16:0 や 18:0 では毒性が見られるものの 18:1 では見られず、LPE でも同様に 16:0 や 18:0 では毒性が見られるものの 18:1 では示されなかった【8】。LPL は親水性のリン酸ヘッドグループと疎水性の脂肪酸テールに由来する両親媒性を有し、洗剤のように振る舞うため細胞毒性を誘発すると考えられるが【9】、脂肪酸の違いによる細胞毒性の違いは製薬化する際の重要な情報と考えている。

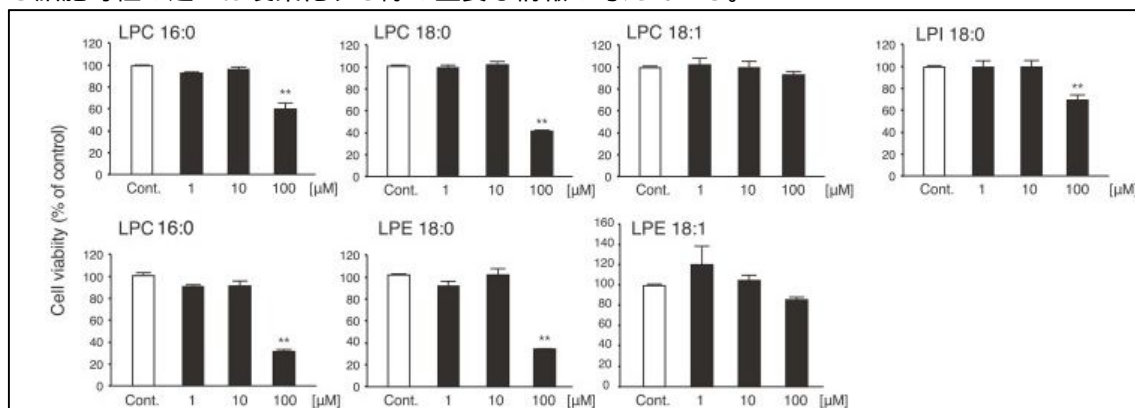


図4. SK-N-SH 神経芽細胞に与える LPLs の細胞毒性としての影響。

< 引用文献 >

1. 松田佳和, 羽二生久夫, 塚原完, . プタ肝臓分解物のヒト認知機能改善効果. 医学と薬学. 2016; 73, 1057-1066.
2. 特願 2019-7552、神経機能再生促進剤
3. Tsukahara T, Yamagishi S, Matsuda Y, Haniu H. Lysophosphatidic acid signaling regulates the KLF9-PPAR axis in human induced pluripotent stem cell-derived

- neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;491:223-7.
4. Tsukahara T, Haniu H, Uemura T, Matsuda Y. Porcine liver decomposition product-derived lysophospholipids promote microglial activation in vitro. *Sci Rep.* 2020;10:3748.
 5. Tsukahara T, Hara H, Haniu H, Matsuda Y. The Combined Effects of Lysophospholipids against Lipopolysaccharide-induced Inflammation and Oxidative Stress in Microglial Cells. *J Oleo Sci.* 2021;70:947-954.
 6. Hisano K, Kawase S, Mimura T, Yoshida H, Yamada H, Haniu H, Tsukahara T, Kurihara T, Matsuda Y, Saito N, Uemura T. Structurally different lysophosphatidylethanolamine species stimulate neurite outgrowth in cultured cortical neurons via distinct G-protein-coupled receptors and signaling cascades. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;534:179-185.
 7. Hisano K, Yoshida H, Kawase S, Mimura T, Haniu H, Tsukahara T, Kurihara T, Matsuda Y, Saito N, Uemura T. Abundant oleoyl-lysophosphatidylethanolamine in brain stimulates neurite outgrowth and protects against glutamate toxicity in cultured cortical neurons. *J Biochem.* 2021;170:327-36.
 8. Karaki T, Haniu H, Matsuda Y, Tsukahara T. Lysophospholipids-potent candidates for brain food, protects neuronal cells against α -Synuclein aggregation. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2022;156:113891.
 9. Takagi Y, Nishikado S, Omi J, Aoki J. The many roles of lysophospholipid mediators and Japanese contributions to this field. *Biol. Pharm. Bull.* 2022;45:1008-21

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hisano Kazutoshi, Yoshida Hironori, Kawase Shiori, Mimura Tetsuhiko, Haniu Hisao, Tsukahara Tamotsu, Kurihara Taiga, Matsuda Yoshikazu, Saito Naoto, Uemura Takeshi	4. 巻 170
2. 論文標題 Abundant oleoyl-lysophosphatidylethanolamine in brain stimulates neurite outgrowth and protects against glutamate toxicity in cultured cortical neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 327 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 塚原完, 唐木達哉, 羽二生久夫, 上芝洸貴, 松田佳和.	4. 巻 48
2. 論文標題 リゾリン脂質経口摂取による神経変性疾患の新規創薬基盤開発.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 47-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsukahara Tamotsu, Haniu Hisao, Uemura Takeshi, Matsuda Yoshikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Porcine liver decomposition product-derived lysophospholipids promote microglial activation in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-60781-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsukahara Tamotsu, Haniu Hisao, Uemura Takeshi, Matsuda Yoshikazu	4. 巻 8
2. 論文標題 Therapeutic Potential of Porcine Liver Decomposition Product: New Insights and Perspectives for Microglia-Mediated Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 446 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8110446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hisano Kazutoshi, Kawase Shiori, Mimura Tetsuhiko, Yoshida Hironori, Yamada Hiroki, Haniu Hisao, Tsukahara Tamotsu, Kurihara Taiga, Matsuda Yoshikazu, Saito Naoto, Uemura Takeshi	4. 巻 534
2. 論文標題 Structurally different lysophosphatidylethanolamine species stimulate neurite outgrowth in cultured cortical neurons via distinct G-protein-coupled receptors and signaling cascades	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 179 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsukahara Tamotsu, Hara Hiroto, Haniu Hisao, Matsuda Yoshikazu	4. 巻 70
2. 論文標題 The Combined Effects of Lysophospholipids against Lipopolysaccharide-induced Inflammation and Oxidative Stress in Microglial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 947 ~ 954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess21069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuya Karaki, Hisao Haniu, Yoshikazu Matsuda, Tamotsu Tsukahara	4. 巻 156
2. 論文標題 Lysophospholipids-potent candidates for brain food, protects neuronal cells against - Synuclein aggregation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomed Pharmacother	6. 最初と最後の頁 113891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2022.113891	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuya Karaki, Hisao Haniu, Yoshikazu Matsuda, Tamotsu Tsukahara	4. 巻 10
2. 論文標題 Lysophospholipids: A Potential Drug Candidates for Neurodegenerative Disorders.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 3126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10123126.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植村 健 (Uemura Takeshi) (00372368)	信州大学・学術研究院総合人間科学系・准教授 (13601)	
研究分担者	塚原 完 (Tsukahara Tamotsu) (00529943)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	松田 佳和 (Matsuda Yoshikazu) (20377633)	日本薬科大学・薬学部・教授 (32425)	
研究分担者	高橋 淳 (Takahashi Jun) (60345741)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------