

令和元年6月24日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15660

研究課題名（和文）ブタ肝臓分解物由来生理活性物質による脊髄損傷治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of the therapeutic drug for the spinal cord injury with the bioactive substance derived from porcine liver decomposition

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） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は「ヒトでの記憶学習機能改善効果が見られたPLDが脊髄損傷に有効であるかの検証とその有効成分を特定」であり、ラット脊髄損傷モデルを用いた動物実験でPLDの脊椎損傷に対する有効性が一定量以上の投与量である事が確認できた。このPLDの有効性は新たな神経の再生と考えるより、切断されずに残った神経の回復の促進である可能性が神経の切断状態の違いによる回復差から導かれており、そのメカニズム解明の一助となる結果が得られている。さらに細胞を用いた実験から、これらの効果は単一のリン脂質成分によるものではなく、複数のリン脂質の複合的効果と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラット脊髄損傷モデルを用いた動物実験でPLDの脊椎損傷に対する有効性が一定量以上の投与量である事が示されたことで、今後、リン脂質をベースとした新たな脊椎損傷のための治療薬開発が可能であると考えている。更に、神経細胞に対してリン脂質にまだ明らかになっていない未知の機能があるとも考えられ、今後の展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is inspection of the effectiveness in the spinal cord injury treatment by porcine liver decomposition (PLD), and identification of the active ingredients. We showed that PLD beyond certain quantity is effective for spinal cord injury by the animal experiment using the rat spinal cord injury model. We think the validity of this PLD doesn't depend on new nervous revival, and is promotion of the recovery of left nerves without being cut. Moreover, it was revealed that these effects were complex action of plural phospholipids included in PLD in in vitro experiments.

研究分野：毒性学

キーワード：脊髄損傷 生理活性物質 リン脂質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本学は今年度から図1に示した大学プロジェクトとして体内埋め込み型の「歩行アシストサイボーグプロジェクト」を立ち上げ、運動機能障害を患う患者のQOLの改善を目指している(図1)。我々はこのアシストサイボーグによって再び歩くことが可能になる患者が一人でも多くなることを目的として、脊髄損傷の患者をターゲットにした治療法の開発に着手することにした。そのシードは我々が今年、特許申請したブタ肝臓分解物(PLD:特願2015-5948)である。PLDはヒトの経口摂取で長谷川式簡易認知評価スケール(HDS-R)を用いた評価方法でスコアの改善が見られた(図2)。このPLDには多くのリン脂質が含まれており、主要成分であるPCの分解産物であるコリンでの学習効果もラットを用いた実験で確認されている。そしてこのPLDには今注目されている脂質メディエーターと呼ばれているリゾリン脂質(LPL)も含め、脊髄損傷患者に有効な新規の生理活性物質を見つけ、新たな治療薬の開発を目指す。



図1. 体内埋め込み型歩行アシストサイボーグの開発

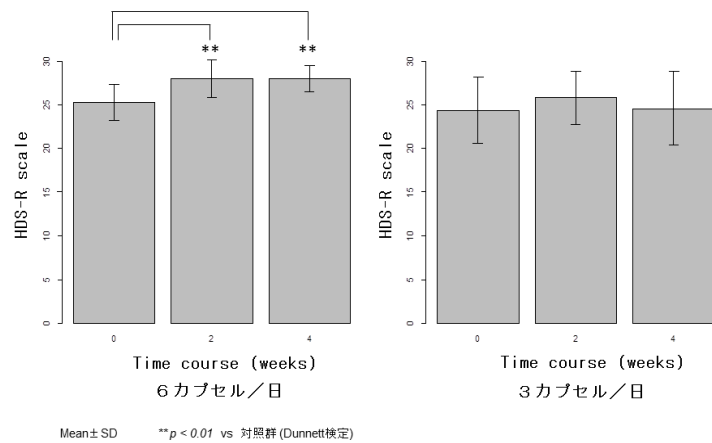


図2. PLDによるヒトの学習記憶改善効果

2. 研究の目的

- PLDによる脊髄損傷モデル動物での有効性の確認
- PLDに含まれる脂質メディエーターの分離・同定
- PLDの有効性のメカニズムの解明

3. 研究の方法

3 - 1. PLD エキスの調製

シュガーポークから採取した肝臓原料(冷凍)750gをホモジナイザー、あるいはミンチカッターでペースト状になるまで粉碎し、イオン交換水8Lを加えたものを反応液とした。反応槽に得られた反応液とタンパク質分解酵素(ニュートラーゼ(ノボサイムス))3.75gを添加し、50、300rpmの条件で15時間程度攪拌し、酵素反応を行った。反応終了後、90で1時間加熱処理を行い、酵素を失活させた。次いで、反応液を濾過して未分解物を除去し、実施例に係わるPLDエキスを得た。

3 - 2. リン脂質成分の分析

PLDに含まれる成分は松田らと医学と薬学に発表した(2016)。この結果から、PLDに含まれるリン脂質とPLD投与マウスによる脳、および血漿中リン脂質変化をAkita Lipid Technologies 合同会社に分析依頼した。各サンプルは脂質抽出後、リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルグリセロール(PG)とそれらのリゾ体(LPC、LPS、LPI、LPA、LPE、LPG)をLC-MS/MSを用いたリポミクス定量解析を行った。

3 - 3. 動物実験

3 - 3 - 1. Basso-Beattie-Bresnahan (BBB)試験

動物実験は信州大学動物実験等実施規程に則って実施した(承認番号:280010)。11週齢のWistar雄性ラットを使ってGrunerらの方法を参考に全身麻酔下で脊椎損傷モデルラットを作製した。作製当日からPLD(PLD)エキス(全量群:5ml/kg、半量群:2.5ml/kg)を2週間連続で経口投与した。この間の0,1,3,5,7,10,14日目に22段階評価のBBB評価(スコア0(完全麻痺)~スコア21(正常な後肢運動))の22段階で評価、A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma 12:1-21, 1995)を行った。

3 - 3 - 2. リン脂質成分の動態解析

動物実験は日本薬科大学動物実験等実施規程に則って実施した(承認番号:201709)。6週齢のSPF-ddY雄性マウスを用い、1週間の予備飼育の後、PLD又は精製水を0.1mL/kgの用量で1

週間連続経口投与を行った。動物は PLD および精製水投与群でそれぞれ 3 匹ずつ試験を行なった。1 週間後に、イソフルラン麻酔下で心臓採血を行って血漿サンプルを得、同時に全脳を摘出して脳サンプルを得た。それぞれのサンプルについてリポミクス分析を行った。

3 - 4 . 細胞実験

3 - 4 - 1 . 細胞培養

PC-12 ラット褐色腫由来細胞、RCR-1 ラットアストロサイト、MG-6 マウスミクログリア細胞、OLP6 ラット視交叉上核由来細胞は全て理化学研究所から購入した。BV-2 マウスミクログリア細胞は長崎大学から提供してもらった。各細胞は表 1 の培地を用い、5% CO₂ インキュベーターで培養した。

表 1 . 細胞と培養培地

細胞名	培地
PC-12	DMEM (low glucose) + 10% Fetal bovine Serum(FBS) + 10% Horse serum
RCR-1	DMEM (low glucose) + 10% FBS
MG-6	DMEM (high glucose) + 10% FBS + 10 μg/ml Insulin + 0.1mM 2-Mercaptoethanol
BV-2	DMEM (high glucose) + 10% FBS
OLP6	Neurobasal medium + 0.5 mM L-glutamine + 2% B27 + 5% FBS + 20 ng/ml EGF + 20 ng/ml basic FGF

3 - 4 - 2 . PLD、およびリン脂質暴露試験

各細胞を 2~4×10⁵/well でプレートに播種し、PLD、またはリン脂質を 24 時間、または 72 時間暴露した。用いたリン脂質は Olbracht Serdary Research Laboratories 社の Phospholipid Kit (LPC、PC、LPE、PE、PI、PA、PS、Cardiolipin、sphingomyelin、Cerebroside)、および Avanti 社の 18:0 LPC、18:1 LPC、16:0 LPC、18:0 LPS、18:0 LPE、18:0 LPI、18:0 LPA、18:0 LPG を用いた。PureLink RNA Mini Kit を用いてトータル RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover で cDNA 合成を行った。BDNF、ITGAM、IL-6、IL-1、CCL-2、CCL-5、TNF の発現をリアルタイム PCR 装置で THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて測定した。

4 . 研究成果

4 - 1 . PLD 中のグリセロリン脂質分析

PLD に含まれるグリセロリン脂質についての分析結果を図 3 に示した。PC とリゾ PC (LPC) では PC の方が若干多く含まれていたが、それ以外のリン脂質ではリゾ体の方が多いという結果であった。また、各脂質の脂肪酸についても測定したが必ずしも規則性はなく、PC では 34:1 の 1 価の不飽和脂肪酸が最も多かったのに対し、PS や PI、PA では 38:4 の多価脂肪酸が最も多く、その中でも PI はこの 38:4 型が極端に多いのに対し、PS や PA は 36:1 の 1 価の不飽和脂肪酸もかなり多い結果であった。一方、リゾ体ではどれも飽和型の 18:0 が最も多いという共通性が見られたが、LPC だけは 16:0 の飽和型も同程度に高い値であった。

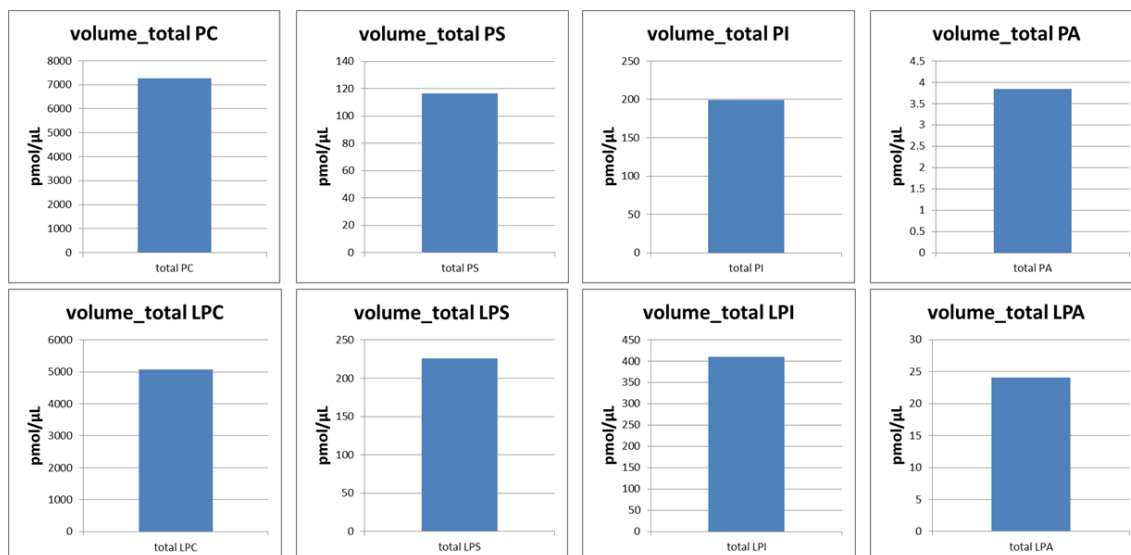
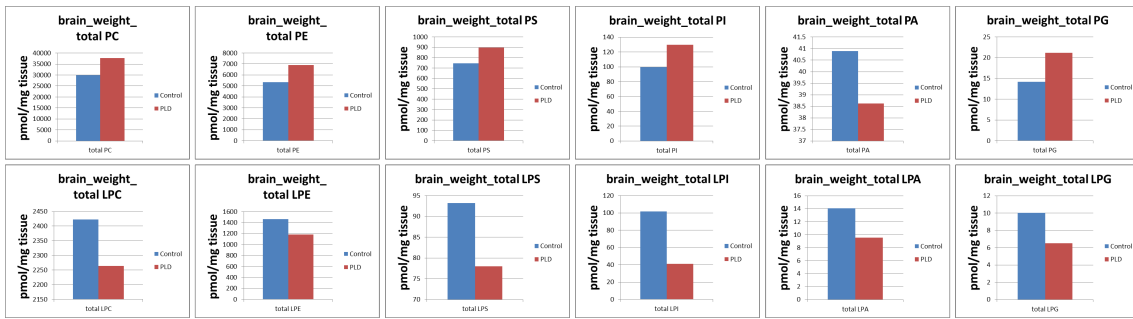


図 3 . PLD 中のグリセロリン脂質の定量分析

4 - 2 . PLD 投与後の脳内及び血漿中のリン脂質濃度

PLD を 1 週間、経口投与したマウスの各リン脂質量は投与しなかったコントロールマウスと比較して脳においては PA 以外、増加していたが、リゾ体は全て減少していた (図 4a)。これに対し、血漿中のリン脂質はリゾ体も含め、PG 以外はコントロールと比較して減少していたが、PG だけはリゾ体も含めて増加していた (図 4b)。

(a)



(b)

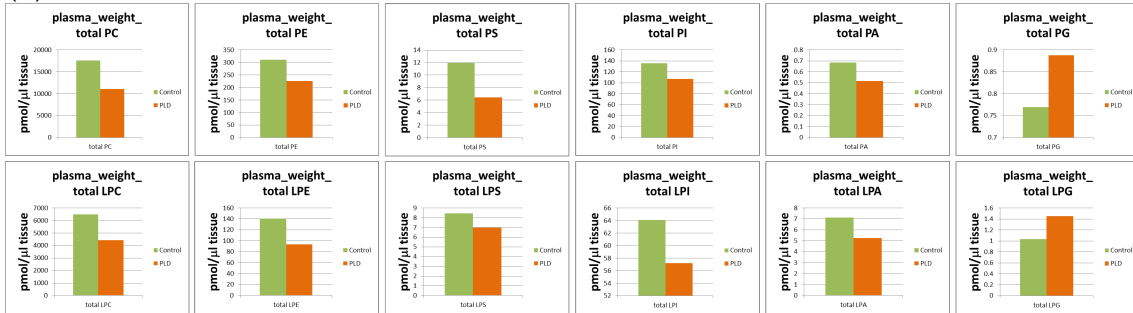


図4. PLD投与1週間後のマウスのリン脂質の定量分析。(a)脳中、(b)血漿中。

4 - 3 . ラット脊髄損傷モデルにおける PLDP の効果

脊髄損傷モデルラットの各群の生存率を図5a、体重変化を図5bに示す。術後、2週間までにPLD投与群で各1匹、コントロール群で2匹が死亡した。この死亡したラットを除いた体重変化は1週間まで体重は減少したが、2週間目には回復した。そして、BBB評価では半量PLD群はコントロール群とほとんど同じ変化であったが、全量PLD群ではスコアが21になった1匹がいる一方で、コントロールと同様に3までしか回復しないラットもいた(図5c)。これらの違いは脊髄損傷モデル作製時の切断状態に依存していると考えられ、完全切断ラットでは回復がほとんど見られないものの、部分切断ラットでは十分な回復が見られるものと考えられる。

4 - 4 . PLD による神経関連細胞への影響

各種神経関連細胞とリン脂質成分による遺伝子発現変化については今後、特許申請を検討しており、公表は差し控える。すでに申請済みの結果を図6に示す。

アストログリア細胞であるRCR-1細胞にPLDを暴露したところ、24時間でBDNFが濃度依存的に上昇した。しかし、3日目ではコントロールより低値となり、一過性の発現の増加と考えられた。BV-2ミクログリアではPLD暴露によってIL-6、IL-1、CCL-2のmRNA発現の全てが優位に抑制されたが、濃度依存性は見られなかった。PLDに含まれるリゾリン脂質のLPCとLPAを同様に暴露したところ、PLDの発現パターンとは異なり、LPCのみ、IL-1の抑制が見られた。

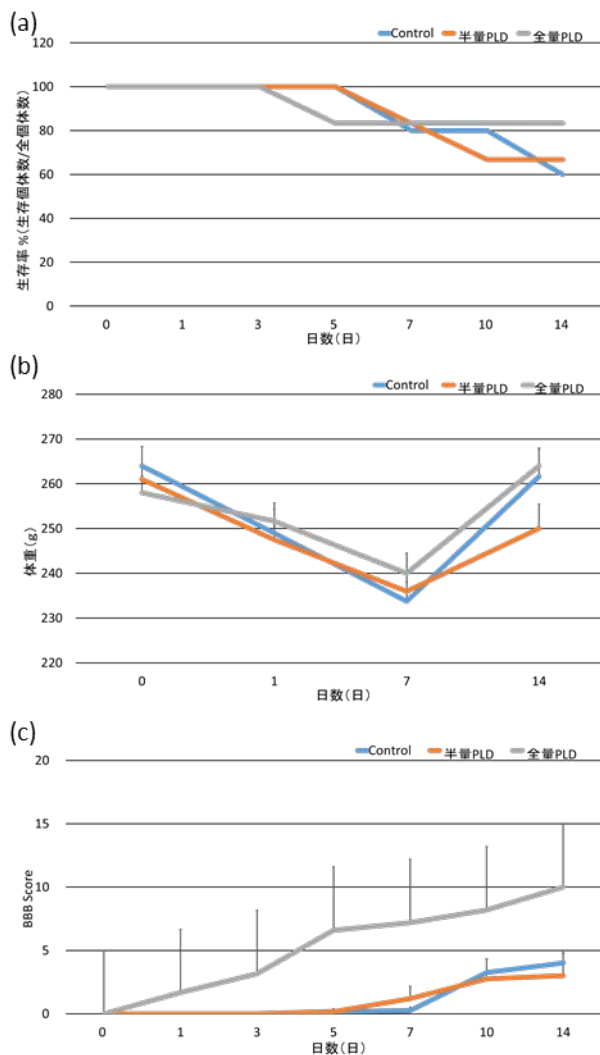


図5. 脊髄損傷モデルラットを用いたPLDの有効性評価。(a)生存率、(b)体重変化、(c)BBBスコア。

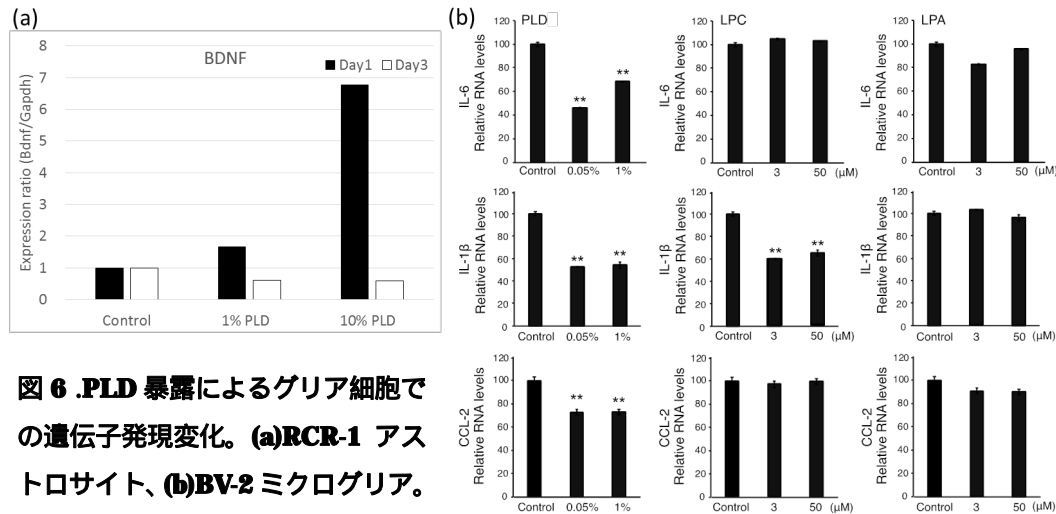


図 6 .PLD 暴露によるグリア細胞での遺伝子発現変化。(a)RCR-1 アストロサイト、(b)BV-2 ミクログリア。

本研究の目的は「ヒトでの記憶学習機能改善効果が見られた PLD が脊髄損傷に有効であるかの検証とその有効成分を特定」であった。そして、ラット脊髄損傷モデルを用いた動物実験で PLD の脊髄損傷に対する有効性が一定量以上の投与量である事が確認できたことから新たな脊髄損傷のための治療薬開発に結びつく可能性が示された。この PLD の有効性は新たな神経の再生と考えるより、切断されずに残った神経の回復の促進である可能性が神経の切断状態の違いによる回復差から導かれており、そのメカニズム解明の一助となる結果が得られている。また、その有効成分についての検討ではまず、PLD に含まれるリン脂質成分の分析、および、代謝の影響を確認するために PLD を 1 週間投与したマウスの血中、および脳組織中のリン脂質成分の分析を LC-MS による MRM/ SRM 法を用いて詳細に定量分析してその対象脂質成分の絞り込みが行えた。1 週間投与で体内のリン脂質が増加する事を予想していたが、脳中のジアシルリン脂質は増加したものの、それ以外である脳中のリゾリン脂質、および血漿中のリン脂質は全て減少しており、リン脂質の代謝が亢進している事を示している。この結果からは直接的な PLD の有効性の考察は難しいが、リン脂質の代謝物まで検討対象を広げる必要性を示唆している。

PLD 自体での細胞実験では神経細胞に対しては明確な作用は確認できなかったが、ミクログリアの増殖を促進する効果やサイトカインの発現の抑制効果、アストロサイトの BDNF 発現亢進効果が見られた。しかし、このリン脂質成分での検討では必ずしも PLD と一致するものではなく、各リン脂質の総合的な効果として脊髄損傷の治癒促進効果が表れたものと考えられる。実際、サイトカイン発現に対する効果もリン脂質の種類によって促進性を示すものと抑制性を示すものがあつた。さらに、これらの反応は細胞によっても異なつた。

今後、我々は PLD の脊髄損傷治癒効果のより具体的なメカニズムを明らかにするとともに、その生理作用を示すリン脂質だけの組み合わせによる効果の極大化を検討していきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. [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. 査読有
DOI: 10.3390/ijms18122730
2. [Tsukahara T](#), [Matsuda Y](#), [Haniu H](#). Lysophospholipid-related diseases and PPAR signaling pathway. *Int J Mol Sci*. 2017;18:2730. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.07.082
3. [松田佳和](#), [羽二生久夫](#), [塚原完](#), [井上俊夫](#), [佐古兼一](#), [杉田和夫](#), [馬淵知子](#), [江水保](#), [佐藤和三郎](#). 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. 査読有
http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ad6igyga/2016/007308/016&name=1057-1066j&UserID=160.252.69.9&base=jamas_pdf
4. [井上俊夫](#), [松田佳和](#), [佐藤卓美](#), [櫻田誓](#), [羽二生久夫](#), [塚原完](#), [杉田和夫](#), [馬淵知子](#), [江水保](#), [佐藤和三郎](#). ラットの空間認知記憶に及ぼすコリン塩化物長期摂取の影響. *医学と薬学*. 2016; 73, 1009-1016. 査読有
http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ad6igyga/2016/007308/010&name=1009-1016j&UserID=160.252.69.9&base=jamas_pdf

〔学会発表〕(計 2件)

1. 石田季子, 寺方彩夏, 吉川庸平, 齋藤和馬, 佐久田舜, 瀬下詩音, 成川友貴, 山崎萌, 羽二生久夫, 塚原完, 植村健, 佐藤和三角, 佐古兼一, 井上俊夫, 松田佳和. ブタ肝臓分解物による認知機能改善効果の可能性. 第28回神経行動薬理若手研究者の集い, 2019
2. 上田勝也, 鎌仲貴之, 滝沢崇, 黒田千佳, 石田悠, 塚本圭祐, 佐藤和三角, 塚原完, 松田佳和, 齋藤直人, 羽二生久夫. 脊髄損傷モデルラットにおけるブタ肝臓分解物の治癒効果の検討. 日本薬学会第138年会, 2018

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 神経機能再生促進剤

発明者: 井上俊夫、植村健、塚原完、羽二生久夫、松田佳和、佐藤和三角

権利者: 佐藤和三角

種類: 特許

番号: 特願 2019-7552 号

出願年: 2019

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 松田 佳和

ローマ字氏名: (**MATSUDA , Yoshikazu**)

所属研究機関名: 日本薬科大学

部局名: 臨床薬学教育センター

職名: 教授

研究者番号 (**8桁**): 2 0 3 7 7 6 3 3

研究分担者氏名: 塚原 完

ローマ字氏名: (**TSUKAHARA , Tamotsu**)

所属研究機関名: 長崎大学

部局名: 医歯薬学総合研究科(薬学系)

職名: 准教授

研究者番号 (**8桁**): 0 0 5 2 9 9 4 3

研究分担者氏名: 高橋 淳

ローマ字氏名: (**Takahashi , Jun**)

所属研究機関名: 信州大学

部局名: 学術研究院医学系

職名: 准教授

研究者番号 (**8桁**): 6 0 3 4 5 7 4 1

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 滝沢 崇

ローマ字氏名: (**TAKIZAWA , Takashi**)

研究協力者氏名: 鎌仲 貴之

ローマ字氏名: (**KAMANAKA , Takayuki**)

研究協力者氏名: 上田 勝也

ローマ字氏名: (**KATSUYA , Ueda**)