

主論文の要約

Blockade of Gap Junction Hemichannel Protects Secondary Spinal Cord Injury from Activated Microglia-Mediated Glutamate Excitotoxicity

（ギャップ結合ヘミチャネルの阻害は活性化ミクログリアを介した
グルタミン酸興奮性神経毒性から脊髄の二次損傷を防止する）

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
脳神経病態制御学講座 脳神経外科学分野

（指導：若林 俊彦 教授）

梅林 大督

【緒言】

脊髄損傷は2つの連続した機序によって引き起こされる。一次損傷は機械的・直接的に最初の組織障害を引き起こすとともに、虚血・炎症・神経毒性を惹起して、引き続く二次損傷を誘導する。一次損傷に加え、二次損傷の被害も大きい。ミクログリアは脊髄損傷部に多く認められ、損傷後に活性化する主要な細胞の1つと考えられる。近年、異常に活性化したミクログリアから放出されるグルタミン酸が神経細胞を傷害すること（興奮性神経細胞死）が明らかにされてきている。活性化ミクログリアからのグルタミン酸放出の阻害は、脊髄損傷の二次損傷の抑制となり、脊髄損傷の治療戦略になり得る。しかしながら、活性化ミクログリアは神経保護的な働きも有しており、神経毒性のみに特異的な阻害が必要とされる。

近年、我々は活性化ミクログリアが、過剰のグルタミン酸をギャップ結合ヘミチャネルであるconnexin 32を介して放出することを報告した。我々はギャップ結合ヘミチャネル阻害薬であるINI-0602を用いて、ミクログリアの活性化に伴い発現増加するギャップ結合ヘミチャネルを阻害することでグルタミン酸の放出を抑制し、筋萎縮性側索硬化症(ALS)およびアルツハイマー病や脳梗塞モデルにおいて、それぞれ神経細胞死を抑制することに成功している。また、活性化ミクログリアは脳損傷よりも脊髄損傷の際に多く認められ、脊髄損傷においても活性化ミクログリアのコントロールは重要であると考えられる。本研究において、我々はギャップ結合ヘミチャネル阻害薬により、同様にグルタミン酸を阻害することで脊髄二次損傷の抑制に与える影響を検討した。

【対象及び方法】

本研究において、ギャップ結合ヘミチャネル阻害薬としてINI-0602を使用した。実験には、C57BL6マウス(16-21 g、7-9 週齢、雌)を用いた。T9-T10レベルにて脊髄の後方半分を1 mmの深さにて切開した。モデル作成直後に無作為に2群に分け、一方にINI-0602、100 mg/kg、他方にコントロール群として同量のPBSを腹腔内投与し、その後隔日投与を4週間続けた。組織学的な検討のために、病変部の脊髄組織はHE染色とGFAP、ニューロフィラメント(NF)、CD68の抗体を用いた免疫染色を、損傷2週後の組織標本にて評価した。また、脊髄損傷部の微小環境内での影響を評価するため、炎症関連の遺伝子発現をqRT-PCRを用いて測定した。神経行動学的評価は、後肢の運動機能評価であるBasso Mouse Scale(BMS)とInclined plane testにて4週間評価した。さらに、電気生理学的検査として経頭蓋MEPにて運動神経伝導速度を評価した。

【結果】

免疫組織標本の結果として、コントロール群ではHE染色にて深刻な組織損傷を認めた(Fig. 1A)。加えて、GFAPにて標識されるグリア瘢痕を形成する反応性アストロサイトの増生も認め(Fig. 1B)、軸索は損傷部位から脊髄側索まで破壊されてNFは減少した(Fig. 1C)。さらに、活性化ミクログリアのマーカーであるCD68の集積を損傷

部位にて認めた (Fig. 1D)。INI-0602 投与群ではコントロール群に比べて GFAP 陽性アストロサイトは有意に減少し、NF は有意に保存され、活性化ミクログリアのマーカーである CD68 も有意に減少していて、損傷が軽減された ($p < 0.05$)。これらの結果は INI-0602 投与群で神経組織の変性・破壊の・反応性グリアの減少、さらにはミクログリアの集積の減少を示し、引き続く軸索の破壊を防止したと考えられる。

qRT-PCR による遺伝子発現の結果では、INI-0602 投与群で $\text{TNF-}\alpha$ や炎症性サイトカインの IL-1 は減少した ($p < 0.05$)。神経栄養因子である BDNF の発現量は有意に増加しており ($p < 0.05$)、神経保護的に働いていると考えられた。

神経行動学的評価の結果は、BMS、inclined plane test とともに薬剤投与群において有意な改善を認めた ($p < 0.05$) (Fig. 2)。電気生理学的な検討では MEP は脊髓損傷後に著名な活動電位の振幅の減少と潜時の延長を示した ($p < 0.05$)。一方、INI-0602 投与群では脊髓損傷 2 週後、4 週後ともに有意な改善を示した ($p < 0.05$)。

【考察】

本研究において、我々は脊髓損傷に対するギャップ結合ヘミチャネル阻害薬 INI-0602 の効果を初めて報告した。INI-0602 は血液脳関門を通過できるため、他のギャップ結合ヘミチャネル阻害薬と異なり実際の中枢神経の治療に応用でき得るという利点がある。INI-0602 はグルタミン酸の放出を阻害することによって、グリア瘢痕の形成抑制と成長因子の発現を増加することによって微小環境を改善すると考えられた。結果として、INI-0602 はまた脊髓損傷後の運動機能の改善を促進すると考えられた。

我々の以前の報告では、グルタミン酸は connexin 32 を経てミクログリアから放出される。一方で、connexin 43 など他のヘミチャネルの阻害が潜在的な治療標的になるという報告もある。INI-0602 もまた、ヘミチャネルを非特異的に阻害する。それ故、我々のデータは脊髓損傷後の局所でのヘミチャネルの重要な役割を明らかにしたが、いずれのヘミチャネルがより重要であるかについてはさらなる課題を残している。

ニューロンもまたグルタミン酸を放出するが、ミクログリアはより多量の興奮性アミノ酸を放出する。活性化ミクログリアのヘミチャネルはおそらく細胞外間隙により多く露出しており、非活性化ミクログリアや他の中枢神経細胞に比較して薬剤の標的として特異的な表面形態となっている。このように、INI-0602 は神経細胞やアストロサイトのギャップジャンクションにも影響するが、ミクログリアからのグルタミン酸の放出を優先的に抑制するため、治療薬として有用であり得ると考えられる。

以前に ALS モデルに用いた INI-0602 の量は 20 mg/kg だった。本研究において我々は 100 mg/kg の量を用いた。投与量を増加した理由の一つは、脊髓損傷後の神経組織損傷は変性疾患である ALS に比較してより急速であり重篤であるからである。また、脊髓損傷後のミクログリアの増生は 48 から 72 時間後にピークを迎える。それ故、INI-0602 は脊髓損傷後即座に投与された。

ミクログリアの活性化によるグルタミン酸の放出は神経損傷の悪循環の一つである。本研究では INI-0602 はミクログリアの活性化自体を変化させることなく、神経損

傷とグリアの活性化の両方を抑制した。INI-0602はミクログリアからのグルタミン酸放出を阻害することで、ミクログリア自体の活性化を直接阻害することなく、好ましくない神経・グリア相互関係を抑制して、二次損傷を亜急性または慢性期に抑制したと考えられた。このことは神経運動機能の改善に貢献していると考えられた。

【結論】

脊髄損傷においても、ギャップ結合ヘミチャネル阻害薬によりグルタミン酸毒性が減少し二次損傷が抑制されることにより、神経再生に有益な効果が得られることが示唆された。