

平成23年 5月20日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791398

研究課題名 (和文)

アストログリアの境界膜に特異的なGFPマウスの確立と脊髄損傷の新規治療戦略の探索

研究課題名 (英文)

The function of glia limitans in spinal cord injury

研究代表者

米澤 朋子 (YONEZAWA TOMOKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30304299

研究成果の概要 (和文) : アストログリアは脊髄損傷領域の周囲にグリア境界膜を形成し、組織修復に重要な役割を担うと考えられる。本研究では脊髄損傷モデルにおいて境界膜が炎症細胞浸潤の抑制に関与し、また炎症細胞の浸潤の拡大に血管周囲腔が関与することを明らかにした。また境界膜の成分のひとつ、IV型コラーゲンはアストログリアに対し、トロンボスポンジン-1の発現を増加させることを明らかにし、組織修復に促進的に働く可能性を示した。

研究成果の概要 (英文) : Astroglia form a glia limitans around the injured tissue after spinal cord injury. We used a mouse spinal cord injury model and found that the glia limitans was associated with the suppression of infiltration of inflammatory cells and the perivascular space provides a conduit for inflammatory cells to the expansion from the injury core. In addition, we found that type IV collagen induced expression of thrombospondin-1 in astrocytes. Our results suggest that glia limitans play an important role in the repair process following injured central nervous tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			0
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学，細胞生物学，神経科学，マトリックス生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊椎脊髄病学，脊髄損傷，アストログリア

## 1. 研究開始当初の背景

日本では年間約5千人が脊髄損傷を受傷し、患者総数は10万人とも推定されるが、根本的

治療や二次損傷を防ぐ治療は研究途上にある。近年、脊髄損傷モデルにおいてアストログリアが炎症細胞の浸潤や損傷領域の拡大を防ぐ

働きを有すると報告された。長年、グリア瘢痕を作り出す悪玉細胞として捉えられてきたアストログリアだが、疾患防御因子としても着目されている。アストログリアの一部は血管や軟膜の周囲にグリア境界膜を形成する。グリア境界膜はアストログリアの終足とその細胞外マトリックスで構築される。損傷後には損傷領域の周囲にもグリア境界膜が形成される。我々は、炎症細胞の浸潤や損傷領域の拡大の抑制など、損傷の修復過程でグリア境界膜の働きが重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

脊髄損傷後に早期に修復された、あるいは維持された境界膜が損傷の二次的な炎症反応を軽減して、機能回復に貢献するという仮説に基づき、脊髄損傷後の境界膜と炎症反応の関係や境界膜周囲の反応を明らかにして新しい脊髄損傷の治療の可能性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) C57BL/6マウスを用いて脊髄損傷モデルを作製し、経時的にグリア境界膜の変化と炎症細胞浸潤について免疫組織化学を行う。

(2) 境界膜のアストログリア特異的に発現する遺伝子のプロモーター解析を行い、そのプロモーターの下流でGFPを発現するようにデザインしたトランスジェニックマウスを作製する。さらに、トランスジェニックマウスの脊髄損傷モデルを作製し、GFPを用いて境界膜のアストログリアを単離し、その遺伝子発現などを解析する。

(3) 境界膜での反応を解析する *in vitro*系を確立し、境界膜における反応の解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) グリア境界膜と炎症細胞浸潤の関係

マウス脊髄損傷モデルを作製し、各種マーカーに対する特異抗体による免疫組織化学を行い、炎症細胞の浸潤とグリア境界膜の関係について詳細に解析した。正常な脊髄組織にお

ける血管構造は血管内皮細胞と周皮細胞/平滑筋細胞を囲む一層の基底膜とそれらを取り囲むアストログリアで構築されている。しかし損傷後の組織においては血管周囲に血管周囲腔が出現し、それは血管内皮細胞側とアストログリア側の2重の基底膜構造によって囲まれていることが分かった。さらに損傷後の炎症細胞の分布を調べたところ、一次損傷領域からの浸潤とともに血管周囲腔からの浸潤が見られ、特に亜急性期以降にはむしろ血管周囲腔への炎症細胞の蓄積と浸潤が顕著であった(図1: 脊髄損傷後7日目に凍結切片を作製し、ラミニン(赤:基底膜を検出), CD45(緑:炎症細胞を検出) に対する抗体で免疫染色を行った。またHoechst33258(青)で細胞核を検出した。上図の四角部分の拡大像を下図に示す。複数の血管周囲腔が観察され、基底膜が二重に見える(矢印)。さらに血管周囲腔ではCD45陽性細胞の蓄積と浸潤(二重矢印)がみられた。bar, 500  $\mu$ m(上図), 25  $\mu$ m(下図).)

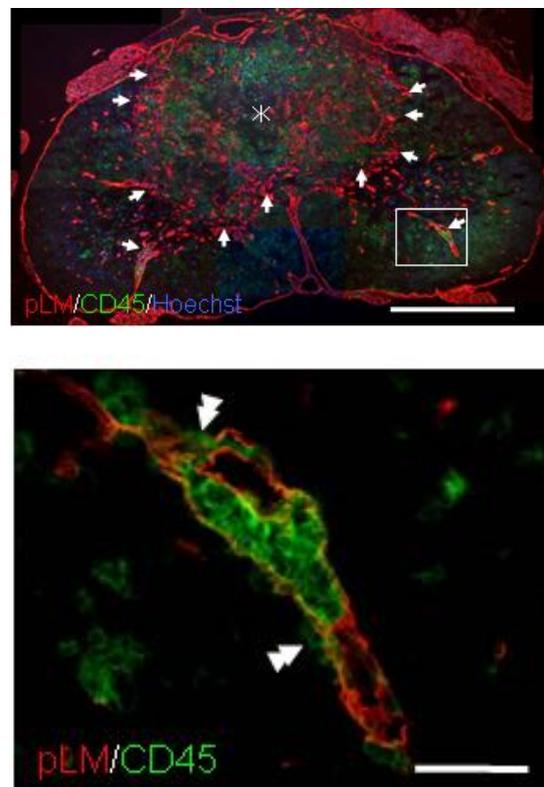


図 1

また炎症細胞の浸潤はアストログリアの終足が破綻している血管周囲腔で起こっており、アストログリアの終足が存在している血管周囲腔には炎症細胞の浸潤は少なく顕著な蓄積が観察された。よってグリア境界膜は炎症細胞浸潤を何らかのメカニズムによって抑制している可能性も示唆された(図2: 脊髄損傷後7日目に凍結切片を作製し、ラミニン(赤: 基底膜を検出)とCD45 (1, 3, 緑: 炎症性細胞を検出)あるいはアクアポリン4 (2, 4, 緑: アストログリアの終足を検出) に対する抗体で免疫染色を行った。またHoechst33258 (青)で細胞核を検出した。1と2, 3と4はそれぞれ連続切片である。1, 2ではアストログリアの終足が血管周囲腔の外側の基底膜に存在せず、多数のCD45陽性細胞が浸潤している。一方, 3, 4ではアストログリアの終足がみられ, CD45陽性細胞の浸潤は比較的少ない。bar, 50  $\mu$ m.)

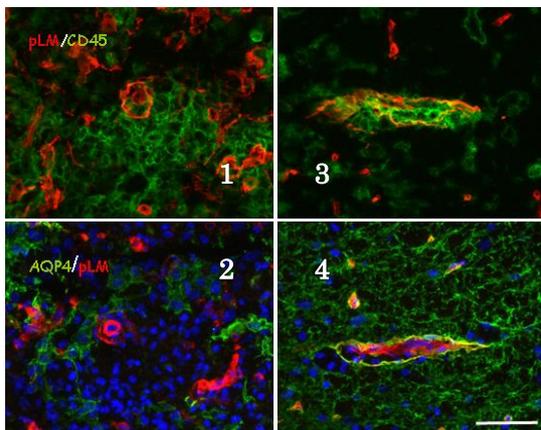


図 2

さらに一次損傷領域から離れた血管周囲腔でも炎症細胞の蓄積や浸潤を確認したので(図1, 上図の四角), 連続切片を用いた免疫組織化学によって検討したところ, 一次損傷領域と血管周囲腔は連続的につながっていた。この結果は損傷脊髄への広範な炎症細胞浸潤は血管周囲腔を介して起こる場合があることを示している。本成果はJournal of Neurotrauma,

27(4), 2010, 739-751に報告した。

## (2) グリア境界膜におけるIV型コラーゲンとアストログリア

(1)の研究から脊髄損傷後のグリア境界膜では基底膜成分とアストログリアの反応が組織修復に何らかの影響を及ぼすと考えられた。そこでアストログリアをマウスから分離培養し, 基底膜成分が与える遺伝子発現の変化を解析したところ, 複数の血管新生関連遺伝子の発現が変化することがわかった。特に, 基底膜成分のひとつであるIV型コラーゲン上で培養したアストログリアは, 他の基底膜成分に比ベトロンボスポンジン(TSP)-1の発現が有意に増加した(図3: アストロサイトをポリLリジン(PLL), フィブロネクチン(FN), ラミニン(LM), IV型コラーゲン(Co1IV)上で12時間培養し, リアルタイムPCRを行った。)

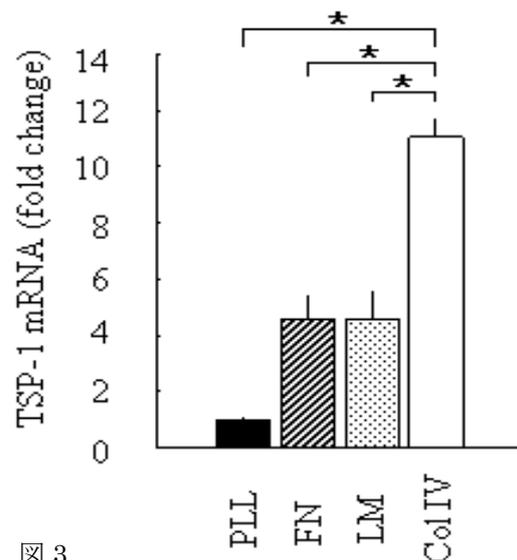


図 3

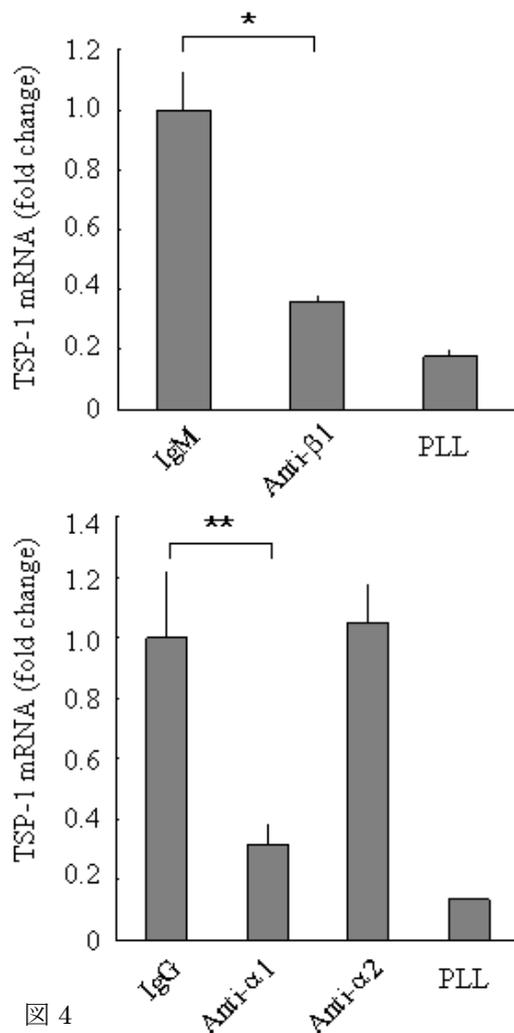


図 4

さらに、TSP-1の発現はIV型コラーゲンの受容体のひとつ、インテグリン $\alpha 1 \beta 1$ を介することが分かった(図4: IV型コラーゲン上でアストログリアを培養した。その際にインテグリン $\beta 1$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ に対する中和抗体を加え、TSP-1の発現に対する影響についてリアルタイムPCRを行い、解析した。中和抗体のコントロールとしてIgMあるいはIgGを用いた。インテグリン $\beta 1$ と $\alpha 1$ の中和抗体はコントロールに比べ、有意にTSP-1の発現を抑制した。)。TSP-1は中枢神経組織の修復において血管新生や神経細胞のシナプス形成などを調節する重要な因子であると知られている。我々はさらに、脳外傷モデルの修復過程においてTSP-1がインテグリン $\alpha 1$ と同様にグリア境界膜に

発現が上昇することを免疫組織化学で明らかにした。したがって、本成果は境界膜における基底膜成分とアストログリアの反応が組織修復に影響を与えることを示唆するものである。本成果はGLIA, 58(7), 2010, 755-767に報告した。境界膜における組織修復反応は二次損傷の拡大を防ぐことに関連している可能性が高いので、今後、脊髄損傷モデルや*in vitro*の詳細な検討によって境界膜で発現する遺伝子の働きやシグナル伝達経路が明らかにできれば新しい治療のターゲットを得る可能性もある。また詳細な検討には境界膜特異的にGFPを発現するトランスジェニックマウスも有効に活用できると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Tomoyuki Takigawa, Tomoko Yonezawa, Teruhito Yoshitaka, Jun Minaguchi, Masae Kurosaki, Masato Tanaka, Yoshikazu Sado, Aiji Ohtsuka, Toshifumi Ozaki, Yoshifumi Ninomiya. Separation of the Perivascular Basement Membrane Provides a Conduit for Inflammatory Cells in a Mouse Spinal Cord Injury Model. *Journal of Neurotrauma*, 査読有, 27(4), 2010, 739-751
- ② Tomoko Yonezawa, Shunji Hattori, Junko Inagaki, Masae Kurosaki, Tomoyuki Takigawa, Satoshi Hirohata, Toru Miyoshi, Yoshifumi Ninomiya. Type IV collagen induces expression of thrombospondin-1 that is mediated by integrin  $\alpha 1 \beta 1$  in astrocytes. *GLIA*, 査読有, 58(7), 2010, 755-767: cover illustration採用
- ③ Omer Fark Hatipoglu, Satoshi Hirohata, Kursat Oguz Yaykasli, Mehmet Zeynel Cilek,

Kadir Demircan, Ryoko Shinohata, Tomoko Yonezawa, Toshitaka Oohashi, Shizo Kusachi, and Yoshifumi Ninomiya. The 3'-untranslated region of ADAMTS 1 regulates its mRNA stability. Acta Med Okayama, 査読有, 63(2), 2009, 79-85

[学会発表] (計 1 件)

① 米澤朋子, 二宮善文

中枢神経組織の創傷治癒過程における細胞外マトリックスとアストロサイト  
第 147 回 日本獣医学会学術集会  
2009 年 4 月 2 日～4 月 4 日, 栃木県総合文化センター

[その他]

ホームページ

<http://mbb2.med.okayama-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米澤 朋子 (YONEZAWA TOMOKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：30304299