

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462307

研究課題名(和文)線溶活性の修飾による新規脊髄損傷治療の開発

研究課題名(英文)Role of fibrinolytic process in the functional recovery after contusion spinal cord injury

研究代表者

木村 敦 (Kimura, Atsushi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20364507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：プラスミノゲンK0マウスは脊髄損傷後3日から7日の急性期に有意に良好な機能回復を示したが、その後は野生型との差が縮まり、有意差がなくなった。プラスミノゲンの阻害剤であるトラネキサム酸(TXA)を損傷直後1回静注(グループ1)、損傷直後1回静注+3日間飲料水で経口投与(グループ2)、損傷直後1回静注+28日間経口投与(グループ3)の3種の方法で投与し、損傷直後生食1回静注の対照群と比較した。その結果、グループ2だけが対照群に比較して有意に良好な機能回復を示した。本研究の結果から、脊髄損傷後の急性期にTXAを投与することが脊髄損傷の新しい治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plasminogen (Plg) K0 mice showed significantly better motor function after contusion spinal cord injury (SCI) compared with that in WT mice between 3 days post injury (dpi) and 7 dpi; however, the significant difference was diminished by 14dpi. We examined whether tranexamic acid, an inhibitor of Plg, enhances functional recovery after SCI. The administration protocol of TXA was as follows: group 1, bolus intravenous (iv) administration (100mg/kg) immediately after injury; group 2, bolus iv, followed by peroral TXA (20mg/ml TXA in drinking water) for 3 days; group 3, bolus iv, followed by peroral TXA for 28 days; group 4 (control group); saline iv immediately after injury. Mice in group 2 showed significantly better functional recovery than that in control group. These results suggest that plg inhibitor has dual effect on ameliorating SCI, depending on the time after SCI. Treatment with TXA optimized for timing may enhance functional recovery after contusion SCI.

研究分野：整形外科

キーワード：脊髄損傷 線溶系 プラスミノゲン

1. 研究開始当初の背景

交通外傷等による脊髄損傷は、恒久的な運動麻痺・感覚障害をきたす難治性の疾患である。一度、麻痺が生じると根本的な治療はなく、新たな神経損傷・修復機序に基づいた新規治療法の開発が望まれる。本研究では、新たな脊髄損傷修復機序として線溶反応に着目した。線溶は、フィブリン血栓を溶解するだけでなく、組織線溶を介して様々な細胞機能に参与する(図1)。また、中枢神経には組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)が豊富に存在し、神経の可塑性やシナプス伝達に参与することが知られている。線溶を構成する因子のノックアウト(KO)マウスを利用することで、脊髄損傷の病態生理への線溶の関与を明らかとし、最終的には薬理学的な線溶活性の修飾が、脊髄損傷の新規治療法となりうるかを検討する。

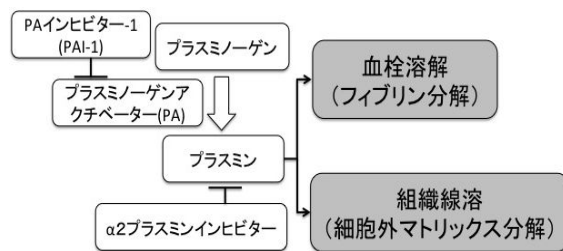


図1. 線溶系の概要

2. 研究の目的

線溶は血栓溶解だけでなく、組織線溶を介して細胞遊走、接着などの様々な細胞機能にも関与する。本研究では、線溶に関わる因子のKOマウスを用いて、脊髄損傷後の運動機能、神経創傷治癒過程への線溶反応の関与と、その機序を明らかにする。さらに、薬理学的な線溶活性調節の治療効果を検討し、難治性疾患である脊髄損傷の新規治療法を開発・提案する。

3. 研究の方法

・実験動物

野生型(Black6/J)とBlack6/JをバックグラウンドとしたプラスミノゲンKOマウスを使用した。

・脊髄損傷モデル

吸入麻酔下にマウス第10胸椎に椎弓切除を行い、Infinite Horizon Spinal cord impactorを用いて脊髄に定量的な圧挫損傷(60kdyn)を加えて脊髄損傷モデルを作成した。

・運動機能評価

脊髄損傷後の運動機能の改善をBasso Mouse Scale(BMS)[1]を用いて受傷後4週まで評価した。また定量的な運動機能の指標として、回転するロータロッドから落下するまでの時間を計測した。

・出血量の評価

脊髄内への出血量を評価するために、損傷後24時間の脊髄を採取し、これをホモジェナイズして遠心し、上清中のヘモグロビン濃度を

吸光度を指標として定量化した。

・血管透過性の評価

Hanら[2]の方法に従って、損傷後24時間の動物にルシフェラーゼ溶液(0.5µg/mlを80µl)を頸動脈より静注し、30分後に損傷脊髄を採取した。脊髄をホモジェナイズし、遠心後の上清に含まれるルシフェラーゼ濃度を血管透過性の指標とした。

・組織学的検討

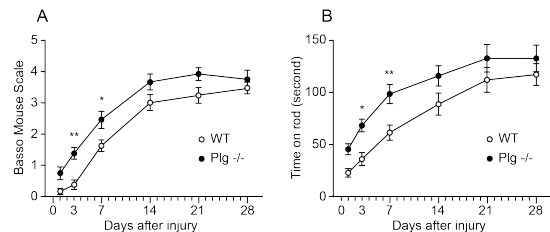
損傷後4週目の動物より損傷脊髄を採取し、矢状断方向で厚さ20µmの連続切片を作成した。損傷組織の中央に位置する炎症性痕をフィブロネクチンに対する免疫染色を指標として同定した[3]。連続切片上病巣が最大となったスライス上で、その断面積をコンピューターソフト(BZ-X analyzer, Keyence)を用いて定量化した。

・マイクロアレイによる解析

脊髄損傷後24時間の脊髄よりRNAを抽出し、96種類の炎症に関連する遺伝子の発現をTaqMan® Gene Expression Assaysを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 線溶系ノックアウトマウスの機能回復  
線溶系ノックアウトマウスの脊髄損傷後の機能回復を、BMSスケールとロータロッドテストで比較した。プラスミノゲンKOマウ



スの機能回復は、野生型マウスと比較して損傷後3日と7日は有意に良好であったが、その後は野生型との差が縮まり、2週目以降には有意差がなくなった(図2)。

図2

(2) 出血量と血管透過性の変化

脊髄損傷から24時間後動物において、脊髄内の出血量と血管透過性を比較した。プラスミノゲンノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、出血量、血管透過性のいずれにおいても有意に抑制されていた(図3)。

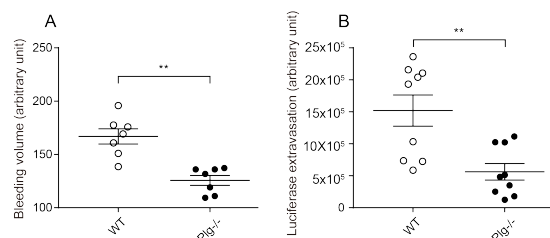


図3

### (3) 組織学的検討

損傷後 28 日目の動物において、炎症性癒痕組織のサイズをフィブロネクチンに対する免疫染色を指標として評価した。炎症性癒痕の面積はプラスミノージェン KO の方が小さい傾向にあったが、有意差はなかった (図 4)。

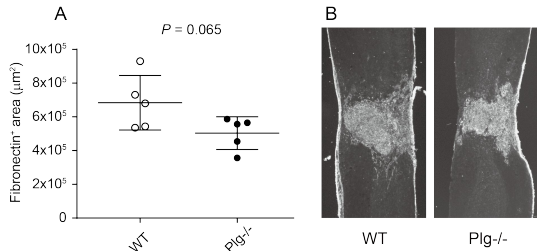


図 4

### (4) 炎症性サイトカインの発現

脊髄損傷後 24 時間の動物において損傷脊髄の RNA を採取し、炎症に関連する 96 遺伝子の RNA 発現を比較した (図 5)。右上の区画に示された赤の点が Plg-KO 有意に発現が増加していた遺伝子であり、Tnfrsf18、Cd8、Cd4、Icos、Cd3、FasI、Gzmb、Tfrc の 8 遺伝子であった。逆に発現が有意に減少していた遺伝子は CCl19 であった。

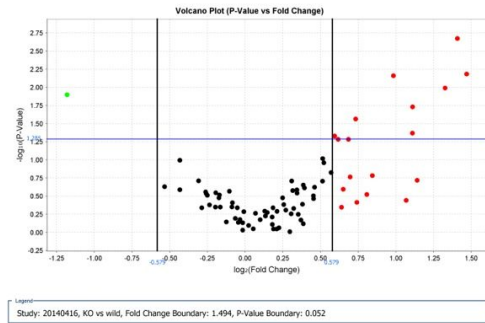


図 5

### (5) トラネキサム酸によるプラスミノージェン活性の調節が機能回復に与える影響

ノックアウトマウスを用いた検討により、損傷後急性期にはプラスミノージェン活性を抑制することが脊髄内への出血と血管透過性亢進を抑制し、機能回復を促進する可能性が示唆された。一方で、プラスミノージェン KO と野生型の機能回復が損傷後 2 週以降に有意差を失ったことから、亜急性期以降はプラスミノージェン活性が機能回復に促進的に働く可能性が示唆された。こうした結果から、プラスミノージェンの阻害剤であるトラネキサム酸 (TXA) を次の 3 つの方法で投与した。グループ 1: 損傷直後に TXA1 回静注 (100mg/kg)、グループ 2: 損傷直後 TXA1 回静注 (100mg/kg) + 3 日間内服 (飲料水に TXA20mg/ml 添加)、グループ 3: 損傷直後 1 回静注 + 28 日間内服。損傷直後に生食を 1 回静注したマウスをコントロールとして各群と機能回復を比較すると、グループ 2 の損傷

直後 1 回静注 + 3 日間内服だけが有意に良好な機能回復を示した (図 6)。

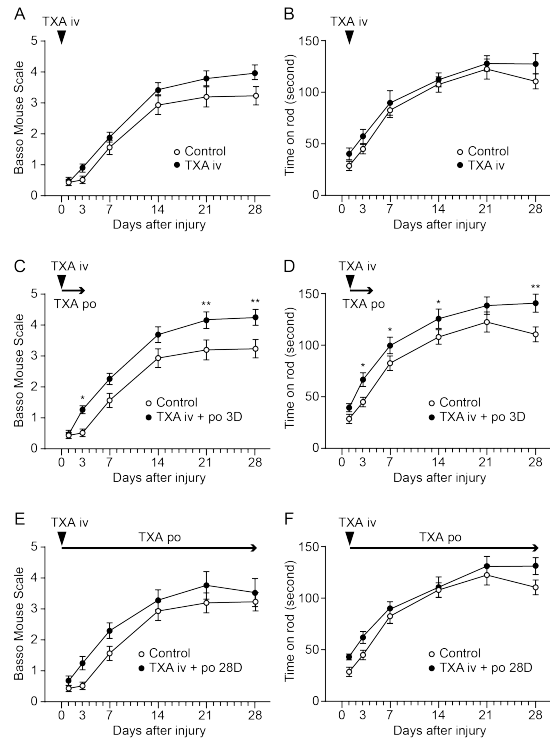


図 6

### (6) TXA 投与と動物の組織学的検討

TXA 投与による治療効果を組織学的に確認した。フィブロネクチン陽性の炎症性癒痕のサイズは TXA 静注 + 3 日間内服のグループ 2 だけがコントロール群に比較して有意に小さかった (図 7)。

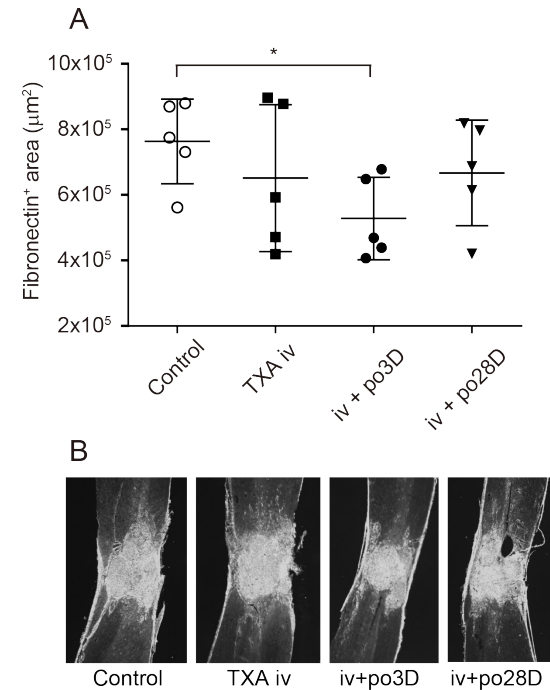


図 7

(6)TXA 投与による出血と血管透過性の変化  
 脊髄損傷後 24 時間の動物において、トラネキサム酸投与が脊髄損傷部の出血と血管透過性亢進に与える影響を検討した。損傷直後に TXA 静注を行い、その後飲料水によって経口投与を行った動物では、コントロールとして生食を静注した動物と比較して出血量、血管透過性ともに有意に減少していた(図 8)。

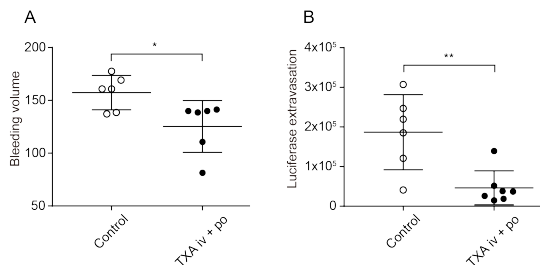


図 8

### 考察

TXA は古くから止血剤として用いられているが、脊椎手術を含む外科治療に用いた場合、安全に出血量を減少されることができるとして、近年見直されている薬剤である[4]。さらに出血を伴う外傷患者に TXA を投与するランダム化試験において、発症後 3 時間以内に投与すると死亡率を有意に減少させることでも注目されている[5]。

本研究では、プラスミノゲン KO マウスの脊髄損傷後の機能解析から、プラスミノゲンを抑制することは、発症後数日間は脊髄内出血の出血減少、血管透過性の抑制などによって保護的に作用するが、それ以降は抑制的に作用することが示唆された。実際に損傷直後に TXA1 回急速静注とその後 3 日間内服を行った群だけが、有意に良好な機能回復を示した。

プラスミノゲンから生成されるプラスミンは、pro-matrix metalloproteinase (Pro-MMP) を活性化型の MMP へと変換することで、組織修復に重要な役割を果たす。また、脊髄再生を阻害する因子の中で最も重要視されている、chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) の分解にも線溶系が関与することが指摘されている[6]。プラスミノゲン KO マウスや TXA を長期投与した群で、対照群との間に機能予後の差がなくなったことは、プラスミンによる組織修復が阻害された結果と考えられる。

### 引用文献

1. Basso, D.M., et al., *Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains*. J Neurotrauma, 2006. **23**(5): p. 635-59.
2. Han, S., et al., *Rescuing vasculature*

*with intravenous angiopoietin-1 and alpha v beta 3 integrin peptide is protective after spinal cord injury*. Brain, 2010. **133**(Pt 4): p. 1026-42.

3. Luchetti, S., et al., *Comparison of immunopathology and locomotor recovery in C57BL/6, BUB/BnJ, and NOD-SCID mice after contusion spinal cord injury*. J Neurotrauma, 2010. **27**(2): p. 411-21.
4. Yang, B., et al., *Systematic review and meta-analysis of perioperative intravenous tranexamic acid use in spinal surgery*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55436.
5. collaborators, C.-., et al., *The importance of early treatment with tranexamic acid in bleeding trauma patients: an exploratory analysis of the CRASH-2 randomised controlled trial*. Lancet, 2011. **377**(9771): p. 1096-101, 1101 e1-2.
6. Soleman, S., et al., *Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders*. Neuroscience, 2013. **253**: p. 194-213.

### 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 1 件)  
 脊髄損傷部におけるアストロサイトの機能  
 雑誌『整形外科』67 巻 7 月増刊号「脊椎・脊髄外傷に対する診療の最前線」  
 . 脊髄再生・損傷の基礎研究 5. 脊髄損傷部におけるアストロサイトの機能

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
 出願状況(計 0 件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

自治医科大学医学部、准教授  
木村 敦 ( KIMURA, Atsushi )  
研究者番号：20364507

(2)研究分担者

自治医科大学医学部、准教授  
大森 司 ( OHMORI, Tsukasa )  
研究者番号：70382843

(3)連携研究者

( )

研究者番号：