

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670644

研究課題名(和文)血小板由来vesicleによる脊髄切断部アストロサイトの機能調節機構

研究課題名(英文)Platelet-derived membrane vesicles and astrocytes at the injury site of the spinal cord

研究代表者

西尾 健資(Nishio, Takeshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70303790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト血小板由来の膜小胞がラットの脊髄アストロサイトに与える影響を検討した。アストロサイト培養系に対して、血小板の上清分画もしくはマイクロパーティクル分画を投与したところ、両分画ともにアストロサイト生存維持あるいは細胞接着分子や細胞外基質分子の発現に対して促進作用を認めなかったが、突起伸展と遊走に対して促進活性を認めた。また、成熟ラット脊髄切断部に血小板由来分画を投与したところ、アストロサイトの活性化や軸索再生誘導作用は認めなかった。しかし、一連の脊髄切断実験の過程で、ある条件下では、脊髄組織を一部除去して端端接合した創部(脊髄短縮術)を越えて軸索再生を誘導できることを発見した。

研究成果の概要(英文)：We studied the biological actions of human platelet-derived membrane vesicles on cultured astrocytes or on the lesion site of the spinal cord in adult rats. Both the supernatant fraction and microparticle fraction of human platelet-derived membrane vesicles did not show a positive effect on astroglial survival under an ischemic condition, while they showed some promotive effect on astroglial process elongation in a scratch injury model and cell migration in a wound healing assay. The both fractions did not enhance the expression of NCAM, L1-CAM, Nr-CAM, N-cadherin and tenascin-C on cultured astrocytes. In in vivo treatment of the both fractions, astroglial cell death was not protected at the lesion site and axon regeneration was not induced across the lesion site.

During the present research, we occasionally found that axons could regenerate across the lesion where spinal cord tissue was partially resected and rostral and caudal stumps were connected.

研究分野：脊髄損傷と神経軸索の再生

キーワード：脊髄損傷 成熟ラット アストロサイト 血小板 軸索再生

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷により白質神経路が切断されると損傷部以下の広範な神経障害が生じる。この障害は永続するため臨床において中枢軸索の再生は大きな課題となっている。中枢軸索の再生が困難な原因としては、Nogo や MAG などのミエリン関連軸索伸長阻害分子や CSPG などのアストロサイト関連細胞外基質分子が想定されているが詳細は不明のままである。これらの背景の中で本研究代表者は成熟ラット脊髄において軸索の再生が切断後 6 時間以内に開始することを示し、神経の細胞体を介さない局所反応であることを提言した (Nishio et al., Neuroscience, 2008)。さらに切断部のアストロサイトを詳細に観察し、未熟なアストロサイトが損傷部に遊走してくること、また成熟アストロサイトが軸索の再生開始前から自身の突起を損傷部方向に伸展することを見出し、脊髄損傷部では従来の考えより遥かに早いアストロサイトの反応が存在することを見出した。一方で幼若ラットでは損傷部へのアストロサイトの遊走に伴い損傷部を超える神経軸索の再生が可能となることを観察しており (Iseda et al., Neuroscience, 2004) これらの知見から脊髄損傷部ではアストロサイトの遊走や分化の制御機構が存在し、それらを適正に誘導することによって成熟ラットでも損傷部を超える軸索再生を誘導し得るのではと考えた。

一方で本研究分担者は月経後の子宮内膜の再生過程で子宮内膜の剥離面に沈着した血小板が活性化され遊走因子や microparticle を放出して内膜上皮の遊走と再上皮化を誘導する可能性を見出した。これらから生殖組織の再構築に血小板が上皮の遊走と分化を制御する重要な因子である可能性を提唱することとなった。

脊髄の切断部位では血管の破綻による出血が必然であり、本研究申請者らは血小板が脊髄損傷部における早期のアストロサイトの遊走および分化を制御する重要な因子と想定して、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

成熟哺乳動物の中枢神経損傷後の損傷部を超える軸索再生は制限されており、神経ネットワークの破壊に伴う機能障害は永続する。従って、中枢神経軸索が損傷部を超えて再生できれば、このような多くの脊髄損傷患者にとって福音になる。そこで本研究では、血小板由来分子が軸索再生に重要な役割を果たすと考えられるアストロサイトの機能を制御できるか否かを検討することを目的とする。

具体的には、成熟アストロサイトの生存維持・突起伸展・細胞膜表面への軸索伸長誘導分子発現などに対する損傷部の血小板由来

分子の役割が明らかにして、その分子機構を解析することにより、現在のところ有効な治療法のない脊髄損傷治療に結びつけることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト血小板の調整

ヒト血小板は京都大学医学部倫理委員会の承認後、ボランティアの末梢血から Walkowiak らの報告した方法で分離し collagen type I を coating した dish 上で RPMI 単独で培養し、培養上清を採取して混入した血小板を除去後、15,000g 遠沈後に分離した上澄みを血小板の分離培養上清分画として、また遠沈を RPMI に浮遊させたものを microparticle 分画とした。

### (2) アストロサイトの培養

以前報告した方法 (Nishio et al., Neuroscience, 2005) に準じて新生ラット大脳から、混合グリアの初代培養を調整する。10%胎仔ウシ血清存在下で 1-2 週間培養してコンフルエントに達した後に、アストロサイト二次培養を得た。アストロサイトの細胞死の評価は fluorescein diacetate/ propidium iodide (FDA/PI) 法により検討した。また、培養アストロサイトに対する形態変化は位相差顕微鏡下に画像解析ソフトを用いて、突起の長さを定量的に評価した。

### (3) 血小板のアストロサイトの細胞死に対する保護作用の検討

新生ラット大脳から採取したアストロサイトを低酸素・低グルコース条件下で培養して apoptosis を誘導し、で調整した血小板上清分画と microparticle 分画を加えて、アストロサイトに対する保護作用の有無を FDA/PI 法により評価した。また microparticle や exosome とアストロサイトの相互作用の確認のため、抗 CD41 や CD9 抗体を用いた免疫染色法および flow cytometry 法でアストロサイトへの各 vesicle の接着を観察した。

### (4) 血小板のアストロサイトの突起伸展に対する誘導作用の検討

培養アストロサイトとで調整した血小板 (上清分画と microparticle 分画) との共培養で、それぞれアストロサイトの突起伸展をコントロール群と比較し、画像解析ソフトを用いて評価した。またアストロサイトが誘引性接触によって軸索伸長を誘導する際には、NCAM, L1CAM, Nr-CAM, N-cadherin などの軸索誘導に関わる細胞接着分子や Laminin, Tenascin-C 等の細胞外マトリクス分子の発現が重要であるので、これらの分子の発現・分泌も RT-PCR 法、Western blot 法および免疫染色法にて検索し、血小板の軸索親和性アストロサイトへの分化誘導の有無を検討した。

### (5) 血小板のアストロサイトの遊走に対する誘導作用の検討

培養アストロサイトと血小板(上清分画と microparticle 分画)との共培養で wound healing assay 法 (Nishio et al., Neuroscience, 2005) を行いアストロサイトの遊走能に対する作用を評価した。またマイクロチャンバーを用いた matrigel invasion assay でも同様の検討を行った。

(6) 血小板の *in vivo* におけるアストロサイトに対する機能誘導作用の検討

ラット脊髄切断モデルを用いて、*in vivo* での血小板のアストロサイト機能誘導作用を観察した。

損傷部の二次的虚血性細胞死を防いだ条件下に GFAP 陽性の成熟アストロサイトの分布を観察し、TUNEL assay でアポトーシスを観察する。この時の損傷部周囲の血小板の分布を CD41 で、またその活性化の有無を CD62p の発現で検討し、アストロサイトとの相互作用について確認する。さらに各血小板分画を切断部に添加し、血小板因子のアポトーシスの抑制効果を評価した。

上記の系で GFAP 陽性の成熟アストロサイトの伸展突起の性状を免疫組織学的に検討する。さらに軸索誘導に関わる NCAM, L1CAM, Nr-CAM, N-cadherin 発現変化を観察し、また再生軸索を蛍光トレーサー microinjection 法にて同定して、誘引性接触による軸索伸長の有無を評価した。

上記と同様の系で GLAST 陽性の未熟なアストロサイトの動きについて観察する。また EGFP transgenic rat からアストロサイトをと同様の方法で分離し、これを切断部から 1mm の部に microinjection にて細胞移植して切断部に遊走するアストロサイトを観察し、添加した血小板分画の遊走誘導作用の評価をする

#### 4. 研究成果

(1) *in vitro* 培養アストロサイトに対する血小板由来分子の作用

アストロサイト生存維持活性は上清分画・microparticle 分画ともに認められなかった。一方、アストロサイトの突起伸展に対しては、上清分画・microparticle 分画ともに、軽度の促進作用を認めた。

また、アストロサイトの遊走に対しても、突起伸展と同様に軽度の促進作用を認めた。

しかし、NCAM, L1CAM, Nr-CAM, N-cadherin などの細胞接着分子や Laminin, Tenascin-C 等の細胞外マトリクス分子の発現に対しては、コントロールと有意な変化は認めなかった。

(2) *in vivo* 成熟ラット脊髄切断モデルの損傷部アストロサイトに対する血小板由来分子の作用

成熟ラット脊髄切断モデルの切断部に、血小板の上清分画または microparticle 分画を投与したが、コントロールに比して GFAP 陽性の

成熟アストロサイトのアポトーシス量に違いを認めなかった。また、*In vitro* 実験で認められたアストロサイトの突起伸展に対する促進作用も、*in vivo* 実験では認められなかった。そして、肝心の損傷部を超える軸索再生も、有意に促進することはなかった。

しかし、これらの *in vivo* 実験の過程で、脊髄単純切断だけでなく、ある条件下で、脊髄を異なる 2 箇所切断して、切断部に挟まれる組織を切除し、吻側断端と尾側断端を端端接合した場合(脊髄短縮術)でも、創部を超える軸索再生を誘導できることを発見した。この知見は、脊髄損傷の根治療法を考える上で、非常に重要な知見であるので、特許取得も視野に入れながら、引き続き検討して行く。

#### 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 0 件)

[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：  
出願年月日：  
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

西尾 健資 (NISHIO, Takeshi)

京都大学・大学院医学研究科 助教

研究者番号：70303790

(2) 研究分担者

藤原 浩 (FUJIWARA, Hiroshi)

金沢大学・大学院医学研究科 教授

研究者番号： 30252456

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：