

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592164

研究課題名(和文) 損傷脊髄の修復における境界膜の分子シグナル解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism in glia limitans during the repair of spinal cord injury

研究代表者

米澤 朋子 (Yonezawa, Tomoko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：30304299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷では最初の損傷によって誘導される二次的な損傷領域の拡大が、損傷後の麻痺の程度に悪影響を及ぼすとされている。脳損傷後に $\alpha 1$ インテグリンが一過性の発現上昇を示すことなどから、脊髄損傷後において何らかの役割を担うと仮定した。本研究によって得られた結果から、脊髄損傷後の二次損傷における炎症反応に深く関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Primary mechanical spinal cord injury causes the secondary injury, which expands the size of initial injury and affects paralysis and motor function loss. We reported that the expression of $\alpha 1$ integrin transiently increased after brain injury. In this study, we hypothesized $\alpha 1$ integrin would play a role in spinal cord injury. The results suggested that the role of $\alpha 1$ integrin associated with inflammation of secondary spinal cord injury.

研究分野：医歯薬学

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：脊髄損傷 インテグリン

1. 研究開始当初の背景

日本においては、毎年 5000 人が脊髄を損傷し、患者総数は 10 万人とも推測される。根本治療や二次的な損傷を防ぐ治療は研究途上にあるが、社会的な期待は大きい、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と報告された。

一方、グリア境界膜は脊髄や脳の血管及び軟膜の周囲にあるアストログリアの終足とそれが直接的に接する細胞外マトリックスの基底膜を指す。我々は脳損傷後の 4-7 日後に $\alpha 1$ インテグリンが境界膜に一過性に存在することなど、中枢神経系の外傷時におけるグリア境界膜の破綻と再形成が損傷組織の修復に影響を及ぼしうることを報告してきた。本研究課題では、脊髄損傷におけるグリア境界膜の重要性、およびグリア境界膜でのインテグリンに依存したシグナルに着目した。

2. 研究の目的

損傷脊髄におけるグリア境界膜の役割、及びグリア境界膜におけるインテグリンの機能とシグナルについて解析する。さらに、それらのシグナルの制御が及ぼす幹細胞移植への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス脊髄損傷モデルの作製

$\alpha 1$ インテグリン $\alpha 1$ ノックアウトマウスおよび野生型マウスの 8 週齢、オスを用いた。麻酔下で胸髄 T9 レベルを露出し、マウスを固定し、NYU 型の脊髄損傷作製器械を用いて、3 グラムの重りを 2 cm の高さから落下させ、挫滅損傷を作製した。

(2) 下肢の運動機能評価

Basso Mouse Scale (BMS) (Basso DM et al., J Neurotrauma, 23(5), 635-659, 2006) を用いて評価した。

(3) 免疫組織染色

マウスの脊髄を採取し、OCT コンパウンドに包埋し、凍結切片を作製した。常法に従い、切片を固定し、ブロッキング処理後に抗体反応を行った。一次抗体は、抗 $\alpha 1$ インテグリン抗体、また、白血球マーカーとして CD45、アストログリアのマーカーとして GFAP、線維性癆痕マーカーとしてフィブロネクチン、基底膜マーカーとして IV 型コラーゲンに対する抗体を用いた。

(4) アストログリアの培養

新生仔マウス的大脑を採取し、軟膜を剥離後、トリプシンで細胞を分散させ、メッシュで血管などの結合組織性固形物を取り除き、培養皿に播種した。3 日後に激しい振盪により弱い接着性を有する細胞等を取り除いた。抗 GFAP 抗体を用いた細胞免疫染色で純度を

確認した。

(5) 培養アストログリアに対するインターロイキン (IL) - 1 刺激と mRNA 発現解析

培養アストログリアを培養皿に播種し、1 日後に IL-1 を加え、常法に従い、継時的に細胞を回収し、RNA を抽出した。常法に従い、逆転写酵素で cDNA を作製し、定量的 PCR 法を行った。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスおよび $\alpha 1$ インテグリン ノックアウトマウスに対し、脊髄損傷を施し、下肢の運動機能の回復について BMS を用いて評価したところ、両方で運動機能の回復に明らかな差があることが分かった。

(2) 損傷脊髄における $\alpha 1$ インテグリンの発現細胞の同定を試みた。複数の細胞種のそれぞれに対するマーカー抗体を用いた。損傷後の組織では、様々な細胞が入り乱れており、確実な同定には別の手法で追加実験を行う必要がある。

(3) 発現細胞として可能性の高かったアストログリアを用いて、脊髄損傷における $\alpha 1$ インテグリンの働きについて分子レベルでの検討を行った。 $\alpha 1$ インテグリンは IV 型コラーゲンの主要な受容体であり、一方、IV 型コラーゲンはグリア境界膜の主要な成分である。 $\alpha 1$ インテグリンを活性化させる IV 型コラーゲンをコートした培養皿とコートしていない培養皿にアストログリアを播種し、IL-1 刺激後の炎症性サイトカインの発現を比較した。その結果、 $\alpha 1$ インテグリンは炎症性サイトカインの発現制御に関与することが示唆された。

(4) 以上の結果は脊髄損傷後の二次損傷における炎症反応に $\alpha 1$ インテグリンが関与することを示唆するものであり、本成果はその分子メカニズムの理解に貢献するものであると考えられる。

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 13 件)

Demircan K, Yonezawa T, Takigawa T, Topcu V, Erdogan S, Ucar F, Armutcu F, Yigitoglu MR, Ninomiya Y, Hirohata S. ADAMTS1, ADAMTS5, ADAMTS9 and aggrecanase-generated proteoglycan fragments are induced following spinal cord injury in mouse. Neurosci Lett, 査読有, 544, 2013, 25-30. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.02.064.

Maehara A, Nishida K, Furutani M, Matsumoto E, Ohtsuka A, Ninomiya Y, Oohashi T. Light and electron microscopic detection of inflammation-targeting

liposomes encapsulating high-density colloidal gold in arthritic mice. *Inflamm Res*, 査読有, 63(2),2014, 139-47. DOI: 10.1007/s00011-013-0682-4.

Momota R, Narasaki M, Komiyama T, Naito I, Ninomiya Y, Ohtsuka A. Drosophila type XV/XVIII collagen mutants manifest integrin mediated mitochondrial dysfunction, which is improved by cyclosporin A and losartan. *Int J Biochem Cell Biol*. 査読有, 45(5), 2013, 1003-11. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.02.001.

Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Hatzirodos N, Bonner W, Sabatier L, Reinhardt DP, Sado Y, Ninomiya Y, Wilhelm D, Rodgers RJ. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PLoS One*. 査読有, 8(2), 2013,e55578. DOI: 10.1371/journal.pone.0055578.

Hirashima K, Iyama K, Baba Y, Honda Y, Sado Y, Ninomiya Y, Watanabe M, Takamori H, Beppu T, Baba H. Differential expression of basement membrane type IV collagen $\alpha 2$ and $\alpha 6$ chains as a prognostic factor in patients with extrahepatic bile duct carcinoma. *J Surg Oncol*. 査読有, 107(4), 2013,402-7. DOI: 10.1002/jso.23225.

Bekku Y, Saito M, Moser M, Fuchigami M, Maehara A, Nakayama M, Kusachi S, Ninomiya Y, Oohashi T. Bral2 is indispensable for the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brainstem and cerebellum. *J Comp Neurol*. 査読有, 520(8), 2012,1721-36. DOI: 10.1002/cne.23009.

Momota R, Naito I, Ninomiya Y, Ohtsuka A. Drosophila type XV/XVIII collagen, Mp, is involved in Wingless distribution. *Matrix Biol*, 査読有, 30,2011, 258-266. DOI:

10.1016/j.matbio.2011.03.008.

Oohashi T, Naito I, Ueki Y, Yamatsuji T, Permpoon R, Tanaka N, Naomoto Y, Ninomiya Y. Clonal overgrowth of esophageal smooth muscle cells in diffuse leiomyomatosis-Alport syndrome caused by partial deletion in COL4A5 and COL4A6 genes. *Matrix Biol*. 査読有,30(1),2011, 3-8. DOI: 10.1016/j.matbio.2010.09.003.

Saito K, Yonezawa T, Minaguchi J, Kurosaki M, Suetsugu S, Nakajima A, Nomoto H, Morizane Y, Sado Y, Sugimoto M, Kusachi S, Ninomiya Y. Distribution of (IV) collagen chains in the ocular anterior segments of adult mice. *Connect Tissue Res*. 査読有, 52(2),2011,147-56. DOI: 10.3109/03008207.2010.492062.

Kinnunen AI, Sormunen R, Elamaa H, Seppinen L, Miller RT, Ninomiya Y, Janmey PA, Pihlajaniemi T. Lack of collagen XVIII long isoforms affects kidney podocytes, whereas the short form is needed in the proximal tubular basement membrane. *J Biol Chem*. 査読有,286(10), 2011,7755-64. DOI: 10.1074/jbc.M110.166132.

〔学会発表〕(計 36 件)

米澤朋子ら、脊髄損傷における I V 型コラーゲン鎖の発現と分布の継時的変化、日本結合組織学会・マトリックス研究会、2013 年 6 月 28 日～29 日、和歌山県立医科大学

堀田輝ら、アストロサイトのサイトカイン産生における I V 型コラーゲンの役割、日本結合組織学会・マトリックス研究会、2012 年 6 月 7 日～8 日、日本青年館ホテル

米澤朋子ら、The expression of interleukin-6 is attenuated by type IV collagen in cultured astrocytes, 日本神経科学会、2012 年 9 月 18 日～21 日、名古屋国際会議場

三好亨ら、The inhibitory role of an angiotensin II converting enzyme inhibitor on gelatinase activity in experimental abdominal aortic aneurysm, 日本血管生物医学学会、2012 年 12 月 5 日～7

日、あわぎんホール

齋藤健司ら、マウス眼におけるI V型コラーゲン鎖の分布、日本結合組織学会・マトリックス研究会、2011年6月10日～11日、別府ビーコンプラザ

〔図書〕(計 2 件)

米澤朋子、二宮善文、日本臨床、先天代謝異常症候群、2012、4

二宮善文、他、朝倉書店、血管生物医学事典、2011、2

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mbb-okayama.com/>

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

(2)研究分担者

二宮 善文 (NINOMIYA YOSHIFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70126241

(3) 研究協力者

堀田 輝 (HOTTA AKIRA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学

院生

井本 紗央里 (INOMOTO SAORI)

岡山大学・医学部保健学科・4年生