

平成30年6月8日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462243

研究課題名(和文) 脊髄損傷における境界膜の作用機序の解明および治療応用への基礎研究

研究課題名(英文) Analysis of the role and impact of glia limitans in 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷後、グリア境界膜は破壊されるが、その後、損傷組織の周囲にグリア境界膜が再形成される。本研究では、マウス脊髄損傷モデルを用いて、グリア境界膜の再形成過程におけるIV型コラーゲンの発現変化や二次損傷との関連性を解析した。IV型コラーゲンは損傷後に発現が誘導され、さらに、分子種によって異なる発現変化を示すことが分かった。損傷脊髄の組織修復において、細胞外マトリックスと細胞との相互作用が何らかの役割を果たすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：After spinal cord injury, glia limitans are destroyed. And then new glia limitans surround the injured tissue. We examined the temporal change of type IV collagen expression and the association between the type IV collagen expression and the secondary injury cascade using spinal cord injury mouse model. We found that the type IV collagen expression increased in injured cord and the temporal expression pattern was different depending on the alpha(IV) chain. The result suggested that the interaction between the extracellular matrix and cell play a role in injured spinal cord.

研究分野：分子生物学

キーワード：脊髄損傷 細胞外マトリックス アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

日本国内において、毎年 5000 人ほどが脊髄を損傷し、脊髄損傷の患者総数は 10 万人を超えるとされている。損傷脊髄の再生治療や二次損傷を抑制する治療は研究の途上である。脊髄損傷における二次損傷とは、損傷によって誘導される炎症などを発端に二次的に損傷の領域が拡大してしまう現象を指す。したがって、二次損傷の抑制はその後の四肢の運動や感覚に生ずる麻痺を軽減する可能性があると考えられている。近年、二次損傷に関与する分子の同定が進められており、興味深い発見がなされてきた。しかし、有効な治療法を確立するためには、損傷脊髄で生ずる様々な反応についてさらに分子レベルでの詳細な研究とその理解を深めることが必要であると考えられる。

グリア境界膜とは、脊髄や脳の血管および軟膜の細胞外マトリックス(基底膜)に沿って、アストログリアの終足が隙間なく並ぶことによって形成される膜様の構造のことである。我々は脳や脊髄の損傷モデルマウスを用いて、血液脳関門の修復、炎症細胞の浸潤の抑制、血管新生の調節因子の発現にグリア境界膜が関与することを示してきた。したがって、グリア境界膜における細胞外マトリックスと細胞との相互作用は二次損傷に大きな影響を及ぼすと考えられる。

脊髄損傷では、グリア境界膜は破壊され、細胞外マトリックスも分解を受ける。その後、グリア境界膜や細胞外マトリックスは元のとおり修復すると期待されるが、損傷の大きさなどの条件に依存し、その修復の度合いは異なると考えられる。例えば、損傷前の状態とは異なり、損傷組織ではグリア瘢痕や線維性瘢痕を生じ、細胞外マトリックスの量や成分は変化すると考えられている。損傷脊髄では、細胞外マトリックスと細胞との相互作用とその相互作用の結果は刻々と変化すると考えられる。したがって、その変化やその変化の分子メカニズムを知ることは損傷脊髄の修復や再生にとって重要であると考えられる。

IV 型コラーゲンは基底膜を構成する主要な成分の一つである。IV 型コラーゲンは異なる 6 種類の遺伝子 (COL4A1~COL4A6) から発現されるタンパク質、1(IV)~6(IV)鎖が 3 本らせん構造をとり、分子を形成する。生体内では、112(IV)と 345(IV)と 556(IV)という分子が知られ、さらに、それらの分子は高次構造をとり、ヘキサマーとなってメッシュ構造を形成して機能することが分かっている。これらの IV 型コラーゲンは基底膜構造の保持だけでなく、受容体を介した細胞の増殖や移動なども制御する多機能な分子であると知られている。また、遊離の C 末端側の分解産物、NC1 ドメインには血管新生を抑制する作用が報告されている。112(IV)が生体内のすべての基底膜に存在する一方で、345(IV)や 556(IV)は限

られた組織に存在する。基底膜は組織によって異なる分子組成を持っており、その基底膜の分布における組織特異性が組織特有の働きや反応に大きく影響すると考えられる。

2. 研究の目的

脊髄損傷後、グリア境界膜は物理的に破壊され、その後の二次損傷においても分解を受けると考えられる。しかしその後、損傷組織の周囲にグリア境界膜が再形成される。本研究では、その再形成過程における IV 型コラーゲンの発現変化や二次損傷との関連性を明らかにし、損傷脊髄の組織修復におけるグリア境界膜の重要性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷マウスモデルの作製

C57/BL6J 野生型マウスあるいは Col4a6 ノックアウトマウスの 8 週齢、雄マウスを用いた。麻酔下で処置を行い、脊髄を露出させ、マウスを固定し、重りを一定の高さから落とすことによって挫滅型の損傷を施す装置を用いて脊髄損傷マウスモデルを作製した。

マウスの処置や管理は「岡山大学実験動物指針」「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、岡山大学動物実験委員会の承認を受けて適切に行った。

(2) 脊髄損傷後の後肢の運動機能評価

Basso Mouse Scale (BMS)法にしたがって、機能評価を行った(J Neurotrauma, 23(5), 635-659, 2006)。直径 115 cmの容器にマウスを入れ、自由に 4 分間歩行させ、その際の後肢の動きを BMS の評価基準に従って点数をつけ、評価した。

(3) 損傷脊髄の免疫組織染色

損傷組織をマウスから採取し、OCT コンパウンドに包埋して、凍結組織標本作製した。クライオスタットを用いて凍結切片を作製し、固定後、ブロッキング処理を行い、一次抗体、二次抗体を順次、反応させ、蛍光減衰防止剤を含むマウンティングメディウムで染色切片を封入した。染色した切片は蛍光顕微鏡で観察し、解析を行った。

(4) 損傷脊髄の mRNA 発現解析

損傷脊髄をマウスから採取し、常法にしたがって RNA を精製した。逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。その後、半定量的 PCR あるいは TaqMan プローブ法やインドシアニンググリーンを用いた定量的 PCR を行い、mRNA の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス脊髄損傷モデルの作製と評価方法の確立

現在、コンピュータ制御のもとで作動する器械を用いて脊髄損傷モデルを作製するこ

とが一般的である。しかし、本研究ではコンピュータ制御を伴わない器械を作製した。金属製の細いプローブはXYZ方向で微妙な位置調節を可能にしたうえで、プローブの先端を露出したマウスの脊髄の中央部にセットし、プローブの上に重りを落とすことによって挫滅型の脊髄損傷を作製した。後肢の運動機能の評価方法としてBMSを用いて、重りを落とす高さについて検討し、モデルの作製プロトコルを確立した。

(2) 脊髄損傷後のIV型コラーゲンのmRNA発現解析

脊髄損傷後、経時的に損傷脊髄を採取し、RNAを精製した。RT-PCRを行い、*Col4a1*~*Col4a6*の各鎖の遺伝子発現について解析を行った。これらの結果から、正常脊髄でのIV型コラーゲンの発現と脊髄損傷後にIV型コラーゲンの発現が各鎖に特有のパターンで変動することが明らかとなった。

(3) 脊髄損傷後のグリア境界膜におけるIV型コラーゲンの発現解析

脊髄損傷後、経時的に損傷脊髄を採取し、凍結切片を作製し、免疫組織染色を行い、グリア境界膜の再生の様子とグリア境界膜におけるIV型コラーゲンの発現の変化について解析を行った。mRNAの発現に変化がみられたので、損傷脊髄のグリア境界膜でのIV型コラーゲンの分布にも変化があると考え、解析を行った。mRNAの発現解析の結果と同様に、グリア境界膜におけるIV型コラーゲンの各鎖の発現とその分布は経時的な変化を示すことが明らかとなった。

また、損傷後に経時的に採取した組織における炎症、血管新生、グリア瘢痕形成、線維瘢痕形成について、免疫組織染色法によって解析を行った。IV型コラーゲンの鎖の分布やグリア境界膜との関連性を明らかにする目的で行った(発表準備中)。

これらの結果により、556(IV)に着目をして、*Col4a6*ノックアウトマウスと野生型マウスにおける損傷脊髄の修復や脊髄の機能の回復を比較することとした。

(4) 損傷脊髄における*Col4a6*の重要性

*Col4a6*ノックアウトマウスと野生型マウスの脊髄損傷モデルを作製し、経時的に損傷脊髄を採取した。免疫組織染色法やRT-PCR法で解析し、組織修復について比較を行った。また、後肢の運動機能の回復についてBMS法を用いて評価し、比較を行った。これらの解析から、予備的な結果を得た。今後、損傷脊髄の修復過程における*Col4a6*の役割やグリア境界膜の経時的な変化と働きを明らかにしたいと考えている。

(5) その他

本研究を進めるにあたり、本研究計画で計画していた以外の細胞外マトリックス成分

成分の損傷脊髄における発現も検討したところ、バーシカン、アグリカン、プレビカン等の発現も変化することが分かった。またそれらの分解酵素であるADAMTSファミリーにも発現の変化があった。さらに、これらの細胞外マトリックス成分と分解酵素の損傷脊髄での分布などを明らかにした。それらの分子群は損傷脊髄において何らかの役割を持つと示唆された。

(6) 今後の展望など

脊髄損傷後、アストロサイトは活性化されて正常なアストロサイトとは表現型の異なる反応性アストロサイトに変化することが分かっている。しかし、近年、反応性アストロサイトが遺伝子発現プロファイルの異なる瘢痕形成アストロサイトに変化すること、反応性アストロサイトは細胞外の環境に依存して正常なアストロサイトの表現型に戻ることのできる可塑性を有すること、瘢痕形成アストロサイトへの変化は不可逆的であり且つその変化は細胞外の環境に依存することが明らかにされた(Hara et al., Nat Med, Vol.23(7), 818-828, 2017)。現在、細胞外マトリックスとその細胞との相互作用に関する新たな重要性が明らかになってきており、分子メカニズムの理解がますます進んでいると思われる。

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3件)

Abali O, Gokce EC, Cemil B, Erdogan B, Yonezawa T, Demircan K, Early induction of ADAMTS 1, -4, -5 and -9 in IL-stimulated mouse astrocytes, Turkish Neurosurgery, 査読有、Vol.24、2014、519-524、DOI:10.5137/1019-5149

Demircan K, Topcu V, Takigawa T, Akyol S, Yonezawa T, Ozturk G, Ugurcu V, Ugurcu V, Hasgul R, Yigitoglu MR, Akyol O, McCulloch DR, Hirohata S, ADAMTS4 and ADAM5 knockout mice are protected from versican but not aggrecan or brevican proteolysis during spinal cord injury, Biomed Res Int, 査読有、2014、693746-693753、DOI:10.1155/2014/693746.

Murata T, Katayama K, Oohashi T, Jahnukainen T, Yonezawa T, Sado Y, Ishikawa E, Nomura S, Trygvason K, Ito M, COL4A6 is dispensable for autosomal recessive Alport syndrome, Scientific Reports, 査読有、Vol. 6、2016、294500、DOI:10.1038/srep29450.

[学会発表](計1件)

米澤朋子、高垣和也、佐渡義一、二宮善文、Functional analysis of type IV collagen alpha6 chain using spinal cord injury mouse model、結合組織学会・マトリックス研究会合同学術集会、2014年6月5日～6月7日、ウインク愛知（愛知県名古屋市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u-mbb.jp/index.html>

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

斎藤健司（SAITO, Kenji）

新見公立短期大学・幼児教育学科・教授
研究者番号：70270014

(3)連携研究者

大塚愛二（OHTSUKA, Aiji）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50168986

(4)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

高垣和也（TAKAGAKI, Kazuya）

岡山大学・医学部保健学科・4年生

井本紗央理（INOMOTO, Saori）

岡山大学・医学部保健学科・4年生

佐渡義一（SADO, Yoshikazu）

岡山大学・医学部・客員研究員

瀧川朋亨（TAKIGAWA, Tomoaki）

岡山大学・大学病院・整形外科学・助教

Kadir Demircan

Turgut Ozal University

二宮善文（NINOMIYA, Yoshifumi）

（元）岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70126241