

「脳損傷後のアストロサイトによる神経回路の再生・再編制御」

神戸大学 大学院医学研究科

遠藤 光晴

1 研究の背景と目的

中枢神経系は再生能に乏しく、損傷などにより失われた神経機能は再生・回復しないと考えられてきた。しかし、近年の研究から、損傷後の中枢神経回路が活発に再形成されることが明らかになり、その制御におけるグリア細胞の役割が注目されている。中枢神経系のグリア細胞のひとつであるアストロサイトは発生過程において神経回路の形成制御に重要な役割を果たす (Clarke and Barres, Nat. Rev. Neurosci., 2013)。損傷を受けた脳内では成熟したアストロサイトが反応性アストロサイトへと変化することにより未熟なアストロサイトの性質を獲得することが示されており、これらの反応性アストロサイトの働きによって損傷後の神経回路の再生・再編が促進されると考えられる (Götz et al., Glia, 2015)。一方、反応性アストロサイトは神経傷害作用を発揮して、神経変性疾患の発症や進行に関与することが示されている (Liddel et al., Nature, 2017)。反応性アストロサイトの機能は、発現誘導される遺伝子に基づいており、神経回路の再生・再編を促進するアストロサイト (A2 アストロサイト) と神経傷害作用を発揮するアストロサイト (A1 アストロサイト) では異なる遺伝子発現パターンを示すことが明らかになっている (Liddel et al., Nature, 2017)。しかしながら、両者の遺伝子発現パターンの違いが生じるしくみは未だ不明である。

我々は、損傷を受けた脳内のアストロサイトが受容体型チロシンキナーゼ *Ror2* を発現することにより、発生過程のアストロサイトのような未分化な性質を再獲得することを明らかにしている (Endo et al., Glia, 2017)。すなわち、*Ror2* は A2 アストロサイトにおいて発現誘導される遺伝子のひとつであり、脳損傷後のアストロサイトによる神経回路の再生・再編制御において *Ror2* が重要な役割をもつと考えられる。本研究では、損傷脳内においてアストロサイトが神経回路の再生および再編を制御する分子機序を解明することを目的として、反応性アストロサイトにおける *Ror2* の発現誘導機構と *Ror2* の機能解明を行った。

2 研究方法・研究内容

(1) bFGF による *Ror2* の発現誘導機構の解析

我々は培養アストロサイトを用いた解析によって、basic FGF (bFGF) の刺激を受けたアストロサイトでは細胞周期の進行に伴い *Ror2* の発現上昇が起こることを明らかにしている。そこで、bFGF 刺激後の細胞周期の進行に伴う *Ror2* の発現誘導機構を明らかにする目的で、細胞周期の制御が容易である NIH/3T3 細胞を用いて解析を行った。具体的には、NIH/3T3 細胞を血清飢餓条件で培養することにより細胞周期 G1 期に同調させ、その後、bFGF で刺激することにより細胞周期 S 期へと進行する過程における *Ror2* の発現を qRT-PCR 法により解析した。またエストロゲン受容体を融合した野生型 E2F1 (ERT2-E2F1-WT) もしくは転写活性化ドメインを欠失した E2F1 変異体 (ERT2-E2F1-ΔC) を発現させた NIH/3T3 細胞を用いて、4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) 処理により ERT2-E2F1 の核内移行を誘導した時の *Ror2* の発現を qRT-PCR 法により解析した。

(2) アストロサイトにおける *Ror2* の発現誘導機構の解析

アストロサイトは活性化ミクログリアが放出する IL-1 $\beta$ 等の炎症性サイトカインの刺激を受けることにより A1 アストロサイト特異的遺伝子群 (A1 genes) の発現が誘導される。損傷脳内の *Ror2* 発現アストロサイトは活性化ミクログリアを取り囲むように分布することから、*Ror2* 発現アストロサイトは bFGF 刺激に加えて IL-1 $\beta$ 刺激も受けることが推測される。そこで培養アストロサイトを用いて、IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) 単独もしくは bFGF (20 ng/ml) と IL-1 $\beta$  の共刺激を行い、*Ror2* の発現に及ぼす影響を qRT-PCR 法および Western blot 法により解析した。

(3) A2 アストロサイトの誘導機構の解析

*Ror2* は A2 アストロサイトで誘導される遺伝子群 (A2 genes) の 1 つであることから、bFGF と IL-1 $\beta$  の共刺激が他の A2 genes や A1 genes の発現に与える影響について、培養アストロサイトを用いて qRT-PCR 法により解析した。

(4) A2 アストロサイトにおける *Ror2* の機能解析

A2 アストロサイトで発現する *Ror2* の機能を明らかにするために、bFGF と IL-1 $\beta$  の共刺激に依存して発現誘導される A2 genes 群の中で *Ror2* の発現に依存する遺伝子があるか否かを RNA-seq を用いて網羅的に解析した。

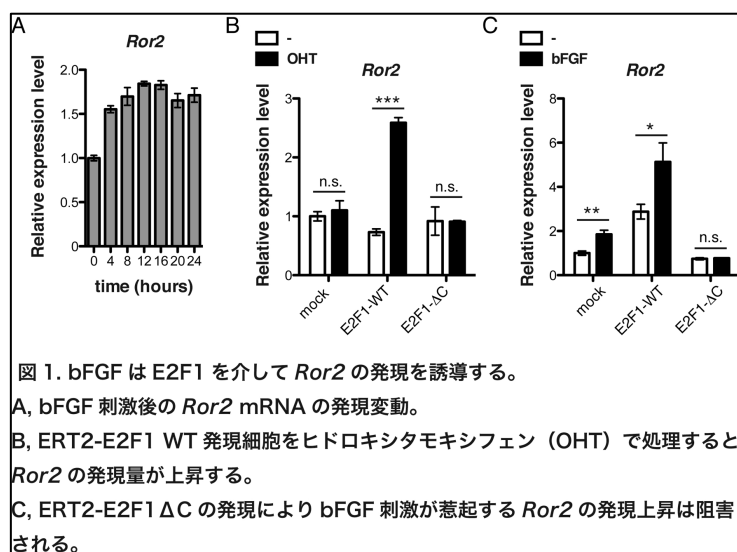
(5) 脳損傷後の神経回路再編制御における *Ror2* 発現アストロサイトの役割

外傷性脳損傷モデルマウスを用いて脳損傷後 1, 3, 7, 14 日目の損傷部周囲の組織と非損傷組織を単離し、Thrombospondin-2 (TSP2) の発現変動を qRT-PCR 法により解析した。また、損傷部周囲の *Ror2* 発現アストロサイトが実際に *Tsp2* を発現するか否かを明らかにするために、免疫組織染色法を用いて解析した。

3 研究成果

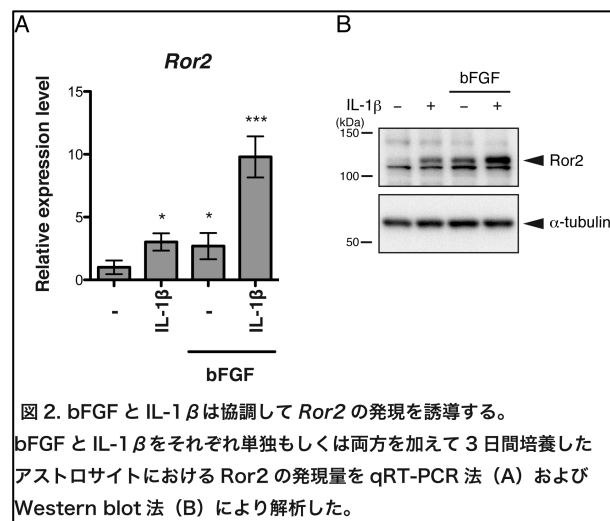
(1) bFGF による *Ror2* の発現誘導機構の解析

血清飢餓条件で培養した NIH/3T3 細胞を bFGF で刺激すると細胞周期 G1 期から S 期への進行に伴い *Ror2* の発現量が上昇することが明らかになった (図 1A)。*Ror2* のプロモーター領域には転写因子 E2F の結合配列が複数存在することから、*Ror2* の発現制御における E2F1 の関与を検討したところ、E2F1 が *Ror2* の転写誘導を促進することが示された (図 1B)。さらに、E2F1 のドミナントネガティブ体の発現により bFGF 刺激による *Ror2* の発現誘導が阻害されたことから、bFGF は E2F1 の活性化を介して *Ror2* の発現を誘導することが示唆された (図 1C)。



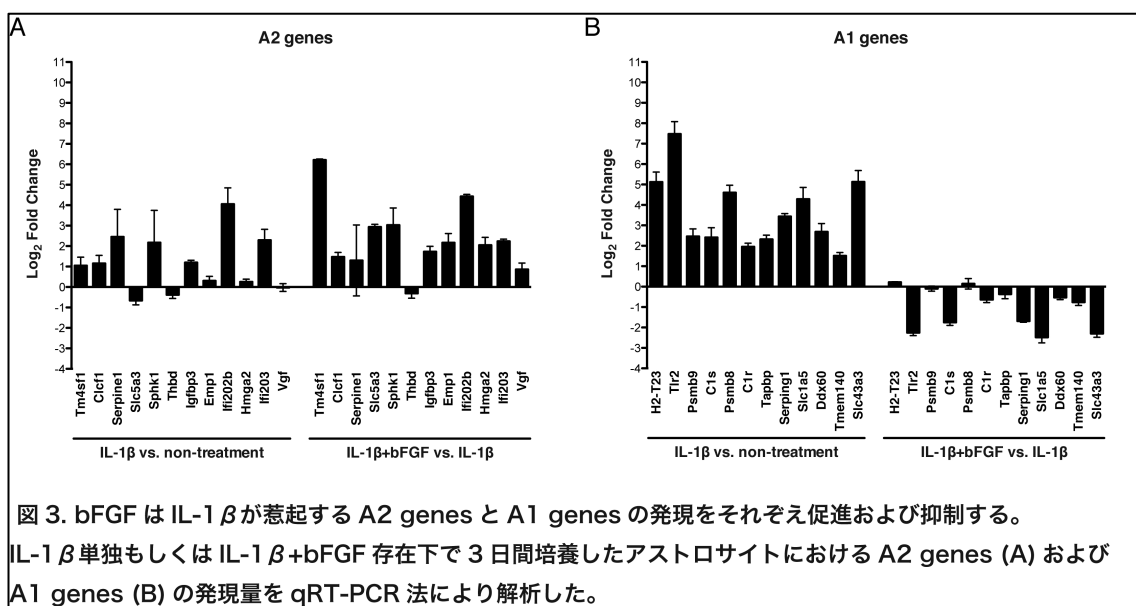
(2) アストロサイトにおける *Ror2* の発現誘導機構の解析

培養アストロサイトを IL-1 $\beta$ 存在下で3日間培養することにより、mRNAおよびタンパク質レベルで *Ror2* の発現上昇が認められたことから、bFGFに加えてIL-1 $\beta$ も *Ror2* の発現誘導を惹起することが示された (図 2A,B)。また、それぞれの単独刺激と比較して、bFGF と IL-1 $\beta$ の共刺激により著しい *Ror2* の発現誘導が認められたことから、bFGF と IL-1 $\beta$ 刺激は *Ror2* の発現誘導に対して相乗的に作用することが示された (図 2A,B)。



(3) A2 アストロサイトの誘導機構の解析

A2 genes の多くは *Ror2* と同様に IL-1 $\beta$ 単独により発現上昇し (図 3A 左側)、かつ bFGF との共刺激によってその発現上昇が増強されることが示された (図 3A 右側)。一方、A1 genes は IL-1 $\beta$ 刺激によって強く発現上昇するものの (図 3B 左側)、その発現上昇は bFGF との共刺激によって抑制されることが示された (図 3B 右側)。bFGF 単独刺激では A2 genes の発現は誘導されなかったことから、bFGF は IL-1 $\beta$  と協調して A2 genes の発現上昇を引き起こすとともに IL-1 $\beta$  が惹起する A1 genes の発現上昇を抑制することが明らかになった。すなわち、IL-1 $\beta$  は A2 アストロサイトと A1 アストロサイトの両者の誘導に関わるが、bFGF 非存在下では A1 アストロサイトへの誘導を強く惹起し、bFGF 存在下では A2 アストロサイトへの誘導を促進することが明らかになった。



(4) A2 アストロサイトにおける Ror2 の機能解析

A2 アストロサイトにおける Ror2 の機能を明らかにするために、bFGF と IL-1 $\beta$  の共刺激に依存して発現誘導される遺伝子群の中で Ror2 の発現に依存する遺伝子について、RNA-seq 法により探索した。その結果、bFGF と IL-1 $\beta$  の共刺激に依存して発現誘導される遺伝子として分泌性シナプス形成促進因子である Thrombospondin-2 (TSP2) を同定するとともに、Tsp2 の発現上昇は Ror2 の発現に依存していることが示された (図 4)。

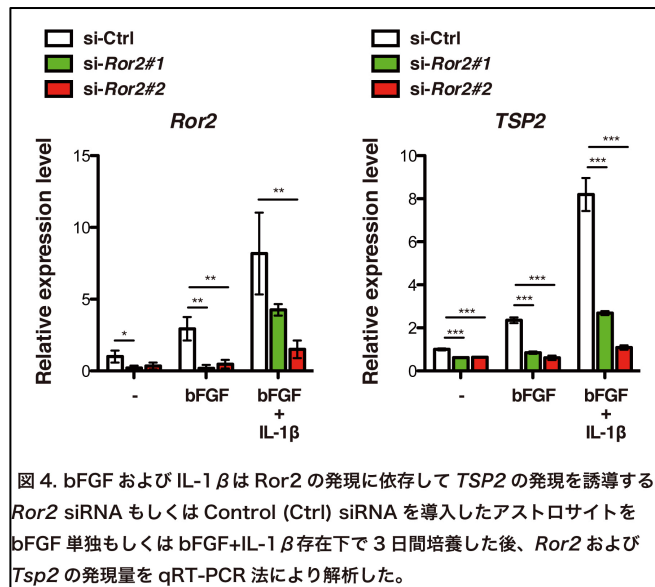


図 4. bFGF および IL-1 $\beta$  は Ror2 の発現に依存して TSP2 の発現を誘導する。Ror2 siRNA もしくは Control (Ctrl) siRNA を導入したアストロサイトを bFGF 単独もしくは bFGF+IL-1 $\beta$  存在下で 3 日間培養した後、Ror2 および Tsp2 の発現量を qRT-PCR 法により解析した。

(5) 脳損傷後の神経回路再編制御における Ror2 発現アストロサイトの役割

傷性脳損傷モデルマウスを用いた解析から、損傷領域において Ror2 の発現上昇のタイミングと一致して TSP2 の発現量が上昇することが示された (図 5A)。また、免疫組織染色法を用いた解析によって、損傷部周囲の GFAP 陽性反応性アストロサイトは Ror2 とともに TSP2 を発現する様子が観察された (図 5B)。以上の結果から、損傷部周囲に出現する Ror2 発現アストロサイトは TSP2 を分泌して新たなシナプス形成を促進することで神経回路の再構築を促進する働きをもつことが示唆された。

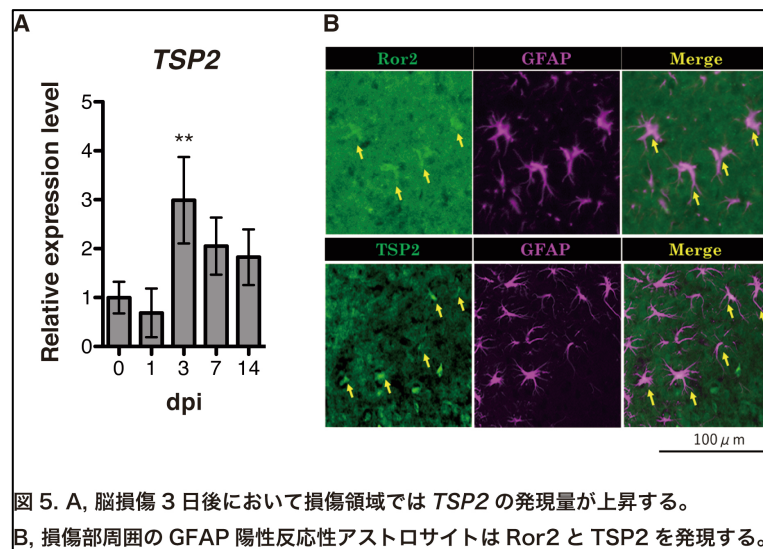


図 5. A. 脳損傷 3 日後において損傷領域では TSP2 の発現量が上昇する。B. 損傷部周囲の GFAP 陽性反応性アストロサイトは Ror2 と TSP2 を発現する。

4 生活や産業への貢献および波及効果

一度出来上がった中枢神経系の神経回路は再生能に乏しく、外傷などにより脳や脊髄の神経回路が壊れると機能不全や麻痺が起こり、社会生活が困難になるため、神経回路の機能を向上させる治療法の開発が強く求められている。本研究成果は、アストロサイトを標的として神経回路の再生や再編を制御する方法の開発に繋がることが期待され、将来的には外傷性脳損傷や脳梗塞による神経機能の低下やこれらの脳障害に伴ううつ病などの精神疾患の病態を改善する新規治療法の開発に繋がることが期待される。