

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08276

研究課題名(和文) アストロサイトの形態制御におけるWnt5a-Ror2シグナルの役割

研究課題名(英文) Roles of Wnt5a-Ror2 signaling in regulating the morphology of astrocytes

研究代表者

遠藤 光晴 (Endo, Mitsuharu)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：90436444

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)：本研究課題では、神経活動の制御に重要な役割を担うアストロサイトの複雑な形態を
生み出す分子機構の解明を目的とし、発生過程や脳損傷後の修復過程の大脳皮質において未熟なアストロサイト
に発現する受容体型チロシンキナーゼRor2の機能解析を行った。本研究により、単純な形態を示す未熟なアスト
ロサイトにおいて、Ror2シグナルが増殖能と移動能を促進する働きをもつことを見出した。また、アストロサイ
トは細胞体の動きを止めてから突起伸長を開始することを見出した。さらに、未熟なアストロサイトはRor2シグ
ナルを介してシナプス形成を促進することにより、シナプスとの接触を介して複雑な形態に成熟することが示唆
された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to reveal the molecular mechanisms generating the complex
morphology of astrocytes that play important roles in regulating neural activity, we analyzed
function of Ror2 receptor tyrosine kinase in immature astrocytes in the neocortex during development
and repair following brain injury. We found that Ror2 signaling promotes proliferation and motility
of immature astrocytes that have a very simplified morphology. Using time-lapse imaging, we
revealed that immature astrocytes stop their active movement during their maturation, and then start
to elongate multiple processes from their cell body by which astrocytes acquire the complex
morphology. Furthermore, our findings suggest that immature astrocytes might promote synaptogenesis
via Ror2 signaling-mediated production of thrombospondin 2 and/or Hevin, thereby become
morphologically mature through the interaction with newly generated synapses.

研究分野：分子神経科学

キーワード：アストロサイト 形態 シナプス形成 脳損傷 Ror2 増殖 移動 突起伸長

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系に存在するグリア細胞の1つであるアストロサイトは、神経細胞のシナプスの形成、維持および伝達効率を制御することにより、記憶や学習等の高次機能を調節する働きをもつ。アストロサイトは、多数の分岐した突起を周囲に広げた形態をとり、突起を介して神経細胞のシナプスを覆っている。シナプス形成が活発に起こる発生過程や脳損傷後の修復過程においては、アストロサイトの形態がダイナミックに変化する。しかしながら、「どのような分子機構によりアストロサイトの形態変化が制御されるのか」は未だ不明な点が多く、「アストロサイトの形態変化がシナプス形成に果たす役割」についても未解明である。

Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼ Ror2 は分泌性シグナルタンパク質 Wnt5a の受容体として働き、細胞の形態、運動、増殖、分化等の制御に重要な役割をもつ。我々は、発生過程や脳損傷時にアストロサイトにおける Ror2 の発現量がダイナミックに変化することを見出しており、アストロサイトの形態制御やアストロサイトによるシナプス形成制御において Ror2 シグナルが重要な役割を担うのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、マウス由来の初代培養アストロサイトを用いた解析とマウス個体レベルでの解析を行うことにより、アストロサイトの形態制御における Ror2 シグナルの関与を明らかにし、発生過程や脳損傷時におけるアストロサイトの形態制御がシナプスの制御に果たす役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発生過程のマウス大脳皮質におけるアストロサイトの形態および増殖能の解析

アストロサイトで緑色蛍光タンパク質 (GFP) が発現する遺伝子改変マウス (ALDH1L1-GFP マウス) を用いることにより、大脳皮質内のアストロサイトの形態を可視化し、生後 2, 7, 14 日目の大脳皮質における Ki67 陽性の増殖性アストロサイトを免疫組織染色法により観察した。

(2) 発生過程のマウス大脳皮質におけるアストロサイトの動態解析

生後 2 日目もしくは 10 日目の ALDH1L1-GFP マウスより大脳皮質を単離し、スライス培養を行った。培養開始後すぐにタイムラプスイメージング観察を行うことにより大脳皮質内のアストロサイトの動態を解析した。

(3) アストロサイトの培養法

生後 0 日目のマウスより大脳皮質を単離し、パパイんで分散した後、細胞を未分化培地 (B27, 20 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF を含む

DMEM/F12 培地) 中で浮遊培養することにより未分化な神経幹細胞 (生後の大脳皮質内の神経幹細胞はグリア細胞に分化するため、以下、グリア前駆細胞と記述する) を得た。得られたグリア前駆細胞を含む細胞塊をトリプシンにより分散し、poly-L-lysine でコートしたディッシュ上で bFGF 含有培地 (B27, 20 ng/ml bFGF を含む DMEM/F12 培地) にて培養した。この条件により培養したグリア前駆細胞は BMP2 で刺激することにより、ほとんどの細胞がアストロサイトへと分化することから、bFGF 存在下で培養したグリア前駆細胞を「未熟なアストロサイト」と定義し、BMP2 で刺激することにより分化を誘導した。

(4) 培養アストロサイトの細胞遊走解析

培養ディッシュに設置したカルチャーインサート (日本ジェネティクス) 内にアストロサイトを播種し、接着後にインサートを取り除くことにより、細胞がディッシュに広がって移動する様子を経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) 発生過程におけるアストロサイトの形態、増殖能、移動能の変化についての解析

ALDH1L1-GFP マウスを用いて発生過程の大脳皮質におけるアストロサイトの形態と増殖能の経時変化を解析した。その結果、生後 2 日目においては、アストロサイトは単純な形態を示し、増殖能が高いことが示された (図 1、未発表)。また、タイムラプスイメージング解析により、この時期のアストロサイトは活発に増殖と移動を行う様子が観察された。一方、生後 7 日目以降になると増殖能と移動能が低下し、複数の突起を伸長させて複雑な形態に変化することが示された (図 1、未発表)。

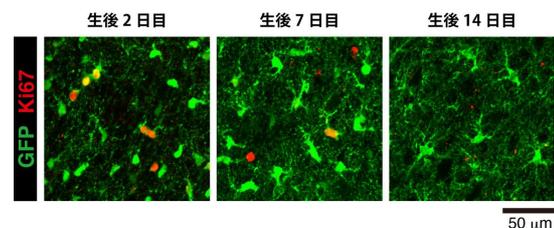


図1. 発生過程のマウス大脳皮質におけるアストロサイト (GFP 発現細胞) および増殖細胞 (Ki67陽性細胞) の分布。

(2) アストロサイトの形態と増殖能・移動能の関係についての解析

bFGF 存在下で培養したアストロサイトおよび BMP2 刺激後 1, 3, 5 日目のアストロサイトにおける各種遺伝子の発現量を qRT-PCR 法により比較解析した。その結果、BMP2 添加によって増殖細胞のマーカー遺伝子である Ki67 と未分化細胞のマーカー遺伝子である Nestin の発現量は次第に低下し、成熟アストロサイトのマーカー遺伝子である Connexin30 の発現量が次第に増加したことから、本実験で用いたアストロサイトは bFGF 存在下で培養することにより増殖能を

持った未熟な状態に維持され、BMP2 を添加することにより増殖を停止して成熟することが示された。また、*Ror2* の発現量は BMP2 刺激によって次第に低下することが明らかになった (図 2A、未発表)。さらに、タイムラプスイメージング法による観察から、FGF2 存在下で培養したアストロサイトは短い突起を伸縮させて細胞体が活発に移動するのに対して、BMP2 を添加すると移動を停止してその場で複数の突起を伸長させることが明らかになった (図 2B、未発表)。このことから、アストロサイトの成熟過程において、移動するための形態制御機構から突起を伸長するための形態制御機構へと切り換えが起こると考えられる。また、細胞遊走解析の結果からも、bFGF 存在下で培養した未熟なアストロサイトは移動能が高く、BMP2 刺激を受けたアストロサイトは移動能が低下することが示された (図 2C、未発表)。

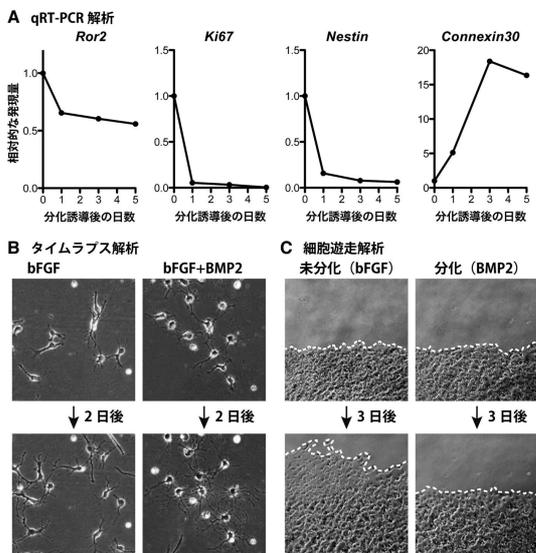


図2. A, bFGF 存在下で培養した未熟なアストロサイトを BMP2 処理により分化誘導した時の経時的な遺伝子発現量の変化。B, bFGF 存在下で培養した未熟なアストロサイトは細胞体の動きが活発である。一方、BMP2 で刺激したアストロサイトは細胞体がほとんど動かずに突起を伸長させる。C, bFGF 存在下で培養した未熟なアストロサイトは高い移動能を示すが、MP2 で刺激したアストロサイトはほとんど移動しない。

(3) アストロサイトの形態および増殖能、移動能の制御における *Ror2* シグナルの関与についての解析

bFGF 存在下で培養したアストロサイトにおける *Ror2* の発現を siRNA により抑制することにより、アストロサイトの形態および増殖能、移動能に与える影響を解析した。その結果、*Ror2* の発現抑制によって形態には大きな影響は認められなかったが、増殖能と移動能が低下することが示された (図 3、未発表)。以上の結果より、未熟なアストロサイトは *Ror2* シグナルの働きにより増殖能や移動能が促進されると考えられる。一方、未熟なアストロサイトが BMP2 のシグナルを受けると、*Ror2* の発現量が低下して増殖能と移動能が低下するとともに、突起が伸長すると考えられる。今後、BMP2 シグナルの下流で働くアストロサイトの突起伸長を促進する分子機構を明らかにすることが重要である。

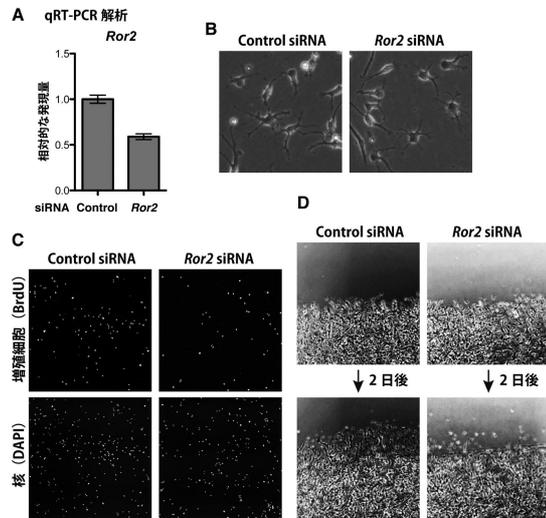


図3. A, siRNA による *Ror2* の発現抑制効果。B, *Ror2* の発現を抑制し、bFGF 存在下で2日間培養したアストロサイトの形態には明らかな変化は認められない。C, D, bFGF 存在下で培養したアストロサイトの増殖能 (C) および移動能 (D) は、*Ror2* の発現抑制により低下する。

(4) *Ror2* の発現制御機構についての解析

アストロサイトにおける *Ror2* の発現は bFGF 刺激によって誘導される。bFGF シグナルがどのような分子機構によって *Ror2* の発現を誘導するのかを明らかにするために、線維芽細胞株である NIH3T3 を用いて解析を行った。10% の血清存在下で培養した NIH3T3 細胞は活発に増殖し、*Ror2* を高発現しているのに対して、血清飢餓条件下で培養した NIH3T3 細胞は増殖を停止し、*Ror2* の発現量が低下することが示された (図 4A、未発表)。また、血清飢餓条件下にて培養した NIH3T3 細胞を bFGF で刺激すると *Ror2* の発現量が上昇することが示された (図 4A、未発表)。 *Ror2* 遺伝子のプロモーター領域には転写因子である E2F が結合するコンセンサス配列が存在する。そこで bFGF シグナルの下流で活性化される E2F が *Ror2* の発現を誘導するのではないかと考えて、変異型エストロゲン受容体 (ERT2) を融合した E2F1 を安定に発現する NIH3T3 細胞株を作成し、この仮説について検証を行った。その結果、ERT2-E2F1 発現 NIH3T3 細胞を 4-hydroxy Tamoxifen (OHT) で刺激して E2F1 を核内移行させると、*Ror2* の発現量が上昇することが示された (図 4B、未発表)。また、NIH3T3 細胞を Doxorubicin

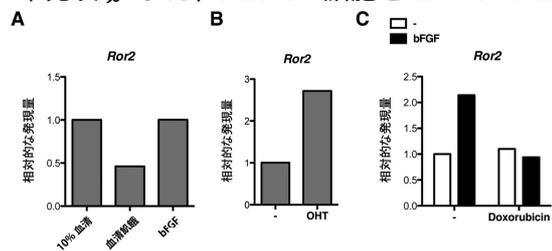


図4. A, 10%血清存在下で培養した NIH3T3 細胞を血清不含有培地に置換し24時間培養した後、bFGF を添加してさらに12時間培養した。各細胞における *Ror2* の発現量を qRT-PCR 法により解析した。B, ERT2-E2F1 を発現する NIH3T3 細胞に OHT (300 nM) を添加して4時間後の *Ror2* の発現量を qRT-PCR 法により解析した。C, 10%血清存在下で培養した NIH3T3 細胞を Doxorubicin (0.1 μM) で24時間処理した後、血清不含有培地に置換して24時間培養した。その後、bFGF を添加してさらに12時間培養した。各細胞における *Ror2* の発現量を qRT-PCR 法により解析した。

で処理して DNA 損傷チェックポイント機構による E2F の不活性化を誘導すると、bFGF 刺激による *Ror2* の発現上昇が阻害されることが明らかになった (図 4C、未発表)。以上の結果から、bFGF シグナルは転写因子である E2F を介して *Ror2* の発現を誘導することが示唆された。

(5) *Ror2* シグナルによる増殖制御機構の解析

血清飢餓条件下で培養した NIH3T3 細胞は細胞周期の G0/G1 期にあり、bFGF で刺激すると S 期を経て G2/M へと移行する (図 5A)。NIH3T3 細胞における *Ror2* の発現を siRNA により抑制すると、bFGF 刺激 16 時間後における S 期以降の細胞の割合が低下することが示された (図 5A、B、未発表)。また、bFGF 刺激 36 時間後においては *Ror2* の発現抑制の有無に関わらずほとんどすべての細胞が S 期に移行することから (図 5B、未発表) *Ror2* シグナルは G0/G1 期から S 期への移行速度を促進する働きをもつと考えられる。

Ror2 シグナルがどのような分子機構により S 期への移行を促進するのかを明らかにするために、細胞周期の進行制御に関わる *Cyclin* の発現誘導および Rb タンパク質のリン酸化レベルについて解析を行った。その結果、*Ror2* の発現抑制により bFGF 刺激による *CyclinE1* および *CyclinA2* の発現誘導と Rb のリン酸化レベルの上昇の程度が低下することが示された (図 5C、D、未発表)。また、*Ror2* の発現抑制により Cyclin dependent kinase の阻害因子である p21、p27 の発現量が上昇することが示された (図 5D、未発表)。これらの結果から、*Ror2* シグナルは p21 と p27 の発現を抑制する働きをもち、これによって Cyclin dependent kinase の活性化を促進することにより細胞周期 G1 期から S 期への移行を促進することが示唆された。

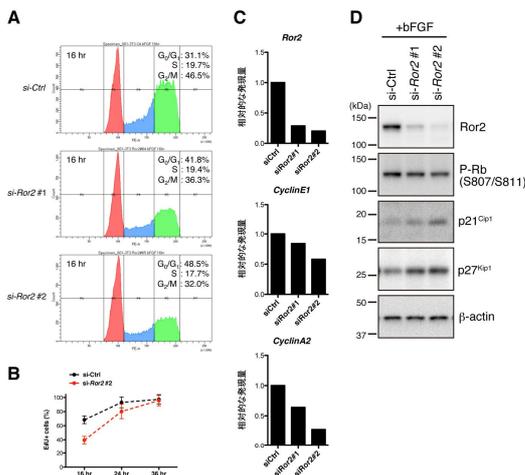
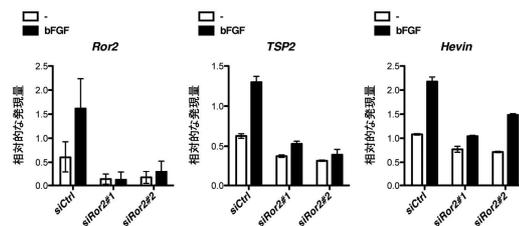


図 5. A, bFGF 刺激 16 時間後の細胞周期の分布をフローサイトメトリー法により解析した。*Ror2* の発現抑制により、bFGF 刺激による細胞周期 G1 期から S/G2/M 期に移行する細胞の割合が低下する。B, bFGF 刺激を受けて S 期に移行した細胞 (EdU+ cells) の割合の経時変化を解析した。*Ror2* の発現抑制により、S 期に移行する速度が低下する。C, *Ror2* の発現抑制により、bFGF 刺激による *CyclinE1* および *CyclinA2* の発現誘導の程度が低下する。D, *Ror2* の発現抑制により、bFGF 刺激による Rb のリン酸化レベルの上昇の程度が低下する。また、*Ror2* の発現抑制により、p21 および p27 の発現量が上昇する。

(6) アストロサイトによるシナプス形成制御における *Ror2* シグナルの関与についての解析

発生過程において、アストロサイトは Thrombospondin や Hevin などの液性因子を分泌することにより神経細胞のシナプス形成を促進することが知られている (Jebelli *et al.*, Ann N Y Acad Sci., 1351: 1-10, 2015)。培養アストロサイトを用いた遺伝子発現解析の結果、bFGF 存在下で培養した未熟なアストロサイトでは *Ror2* の発現に依存して *Thrombospondin 2 (TSP2)* と *Hevin* の mRNA 量が増加することが示された (図 6A、未発表)。我々は外傷により脳に損傷を受けたマウスの損傷部周囲に位置するアストロサイトでは、bFGF の刺激を受けることにより *Ror2* の発現量が上昇し、未熟な性質を再獲得することを明らかにしている。*Ror2* は損傷後 3 日より発現上昇し、このタイミングと一致して *TSP2* の発現も上昇することが示された (図 6B、未発表)。したがって、損傷部周囲の *Ror2* 陽性アストロサイトは損傷による細胞死を免れた神経細胞のシナプス形成を促進する可能性が考えられる。最近、アストロサイトの突起伸長が神経細胞のシナプスと接触することにより促進されることが示された (Stogsdill *et al.*, Nature, 551: 192-197, 2017)。したがって、未熟なアストロサイトは *Ror2* シグナルを介して *TSP2* や *Hevin* を産生することによりシナプス形成を促進し、これにより形成されたシナプスとの接触を介して突起を伸長させることで形態的に成熟すると考えられる。今後、発生過程や脳損傷後の修復過程におけるアストロサイトを介したシナプス形成制御とアストロサイトの形態制御との関係を明らかにすることが重要である。

A qRT-PCR 解析



B qRT-PCR 解析

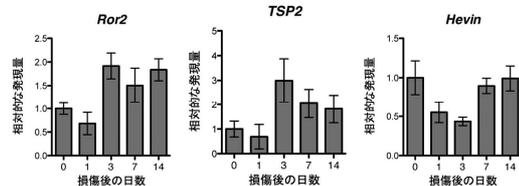


図 6. A, bFGF 存在下で培養したアストロサイトにおける *TSP2* と *Hevin* の発現量は *Ror2* の発現抑制により低下する。B, 脳損傷後の損傷部における *Ror2*、*TSP2*、*Hevin* の発現量の経時変化。

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 2件)

Endo M, Ubulkasim G, Kobayashi C, Onishi R, Aiba A, Minami Y: Critical role of Ror2 receptor tyrosine kinase in regulating cell cycle progression of reactive astrocytes following brain injury. **Glia** 査読有、65, 2017, 182-197

Doi: 10.1002/glia.23086.

Endo M, Minami Y: Diverse roles for the ror-family receptor tyrosine kinases in neurons and glial cells during development and repair of the nervous system. **Dev. Dyn.** 査読有、247, 2018, 24-32

Doi: 10.1002/dvdy.24515.

〔学会発表〕(計 9件)

遠藤 光晴、小林 千穂、疋田 壮舞、グリジャハン オブリカスム、稲垣 貴彦、南 康博、受容体型チロシンキナーゼ Ror2 は静止期のアストロサイトの増殖を再開するために必要である、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.2、神戸ポートアイランド(神戸)

遠藤 光晴、南 康博、脳損傷による Ror2 の発現誘導を介したアストロサイトの増殖制御、第 8 回シグナルネットワーク研究会、2016.5.27、微生物病研究所(大阪)

遠藤 光晴、小林 千穂、グリジャハン オブリカスム、南 康博、エピジェネティック機構を介した受容体型チロシンキナーゼ Ror2 の発現誘導によるアストロサイトの細胞周期制御、第 59 回日本神経化学会大会、2016.9.8、福岡国際会議場(福岡)

遠藤 光晴、大田 絢斗、小林 千穂、饗場 篤、南 康博、神経幹細胞由来アストロサイトの増殖制御機構の解析、第 38 回神経組織培養研究会、2016.11.26、TKP ガーデンシティーPremium 横浜ランドマークタワー(横浜)

遠藤 光晴、大田 絢斗、小林 千穂、大西 怜子、南 康博、Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼは脳損傷に伴うアストロサイトの応答を制御する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016.12.2、パシフィコ横浜(横浜)

Endo M, Minami Y, Role of the Ror-family receptor tyrosine kinases in regulating the cell cycle progression during brain development and repair. International Joint Symposium in Kobe 2017 University of Washington University of Oslo and Kobe University(招待講演), 2017. 3.14, Kobe University Sysmex Hall (Kobe)

遠藤 光晴、大田 絢斗、大西 怜子、南 康博、受容体型チロシンキナーゼ Ror2 による炎症応答制御機構の解析、第 69 回日

本細胞生物学会、2017.6.13、仙台国際センター(仙台)

遠藤 光晴、大田 絢斗、南 康博、脳の損傷修復における増殖性アストロサイトの役割、第 58 回日本組織細胞化学会(招待講演)、2017.9.23、愛媛大学 重信キャンパス(愛媛)

遠藤 光晴、大田 絢斗、南 康博、Role of Ror2 receptor tyrosine kinase in regulating the cell-cycle progression of neural stem/progenitor cells in the developing neocortex、第 2 回 Wnt 研究会、2017.12.10、神戸大学(神戸)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/medzoo/>

神戸大学ホームページ 研究ニュース

http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/2016_11_29_01.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 光晴 (ENDO, Mitsuharu)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90436444