

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13802
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2020
課題番号：17K08512
研究課題名(和文) 新規ガイダンス因子による神経新生と血管新生を組み合わせた脳梗塞再生法の開発

研究課題名(英文) Development of cerebral infarction regeneration method that combines neurogenesis and angiogenesis with new guidance factors

研究代表者
山岸 覚 (Yamagishi, Satoru)
浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40372362
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々が2015年に見出した神経軸索ガイダンス因子Netrin-5は、神経新生関連領域に強い発現が見られるが、その機能に関しては不明であった。本研究課題では、脳梗塞におけるNetrin-5の機能に注目したが、期待された結果は得られなかった。一方で、Netrin-5ノックアウトマウスの解析により神経新生に異常があることを見出した。特に脳室下帯における細胞分裂周期がNetrin-5ノックアウトマウスでは長くなっていたことと、吻側移動流(RMS)の形成が乱れることが明らかとなった(Ikegaya et al., Front Neuroscience, 2020)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Netrin-5ノックアウトマウスでニューロブラストの細胞分裂周期の延長と分裂細胞数の減少が見られたため、脳の老化を反映している可能性が考えられる。すなわちNetrin-5投与による脳老化の抑制効果が期待される。また、脳梗塞時にはニューロブラストおよび血管内皮細胞でNetrin-5の強い発現亢進が見られた。したがって、Netrin-5プロモーターを用いた神経栄養因子の放出方法の樹立など、今後視点を変えた新規手法により脳梗塞再生に向けての発展応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The axon guidance molecule Netrin-5, which we reported in 2015, is strongly expressed in neurogenesis related areas, but its function was unknown. In this research project, we focused on the function of Netrin-5 in cerebral infarction, but did not obtain the expected results. However, analysis of Netrin-5 knockout mice revealed abnormal neurogenesis. The cell division cycle in the SVZ was longer and the number of dividing cells was decreased in Netrin-5 knockout mice. In addition, the formation of RMS was disorganized (Ikegaya et al., Front Neuroscience, 2020). These results indicate that loss of function of Netrin-5 may reflect aging of the brain. In addition, we found that cerebral infarction caused strong upregulation of Netrin-5 in neuroblast and vascular endothelial cells. Therefore, it is expected that new methods such as the establishment of a neurotrophic factor release using the Netrin-5 promoter will be applied to the regeneration of cerebral infarction.

研究分野：解剖学

キーワード：Netrin-5 神経新生 吻側移動流 DCX ガイダンス分子

1. 研究開始当初の背景

神経軸索ガイダンス分子は、神経軸索を誘導するだけでなく、血管の誘導や神経新生など、その機能は多岐にわたる。また、細胞移動や腫瘍の発生など、にも重要な役割を果たしている。これまでに、私は、新規反発性軸索ガイダンス因子として **FLRT** ファミリーを見出し、研究してきた (**Egea, Yamagishi et al., Gene Dev., 2008; Yamagishi et al., EMBO J., 2011**)。また、ネトリンファミリー蛋白質 (**Netrin-1, 3, 4**)も神経軸索ガイダンス分子として良く知られており、様々な機能が報告されている (**Serafini et al., Cell, 1994**)。申請者は **2015** 年に、新規ネトリンファミリー分子として **Netrin-5** を見出し報告した (**Yamagishi et al., Front Cell. Neurosci., 2015**)。 **Netrin-5** は機能未知ではあるが、神経新生部位である脳室下帯や海馬歯状回の **DCX** 陽性ニューロblastや血管内皮細胞に特異的に発現しており、神経新生・血管新生に関わっている可能性が高い (図 1)。

一方、脳梗塞で脳内に傷害が生じた際、神経再生の鍵となるのはニューロblastである。ニューロblastは脳室下帯で産生が亢進し、梗塞領域へと移動して行く。残念ながらこれらのニューロblastはやがて死滅し、大脳皮質で成熟した神経細胞になることは殆どない。しかしながらニューロblastを生存させることができれば、神経機能亢進につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、まず、**Netrin-5** のノックアウトマウスのフェノタイプを解析することにより成体脳における神経新生における機能を明らかにすることを目的とする。さらに、脳梗塞における **Netrin-5** の関与を解析する。また、リコンビナント **Netrin-5** を精製し、脳室内投与による **Netrin-5** の脳梗塞への影響を解析する。すなわち、**Netrin-5** の神経新生・血管新生に関する基礎的な分子機能に関するデータを集めると共に、過剰発現や脳室内投与で脳梗塞再生が可能かを検討することを当初の目的とした。

3. 研究の方法

Netrin-5 コンディショナルノックアウトマウスを作成し、**EdU** インジェクションにより成体脳における神経新生を形態学的に解析する。**EdU** の投与期間は **1** 日後、**7** 日後を解析することにより、分裂時および移動に関する機能を解析できるようにした。

また、脳梗塞モデルは中大脳動脈結紮モデルを用いて作成した。固定後に各種抗体を用いて組織学的な解析を実施した。

4. 研究成果

Netrin-5 コンディショナルノックアウトマウスは、全身性の **PGK-Cre** と交配しても致死性はなく成体まで成長した。一見、行動学的な異常は見られず、主だったフェノタイプはないが、詳細に解析した結果、神経新生に異常があることを見出した。

EdU 投与 1 日後、脳室下帯 (**V-SVZ**) における **EdU** 陽性細胞数は **Netrin-5** ノックアウトマウスにおいて減少が見られた。特に **DCX** 陽性であるニューロプラストームにおける **EdU** 陽性細胞数の減少が観察された。しかしながら、興味深いことに **Ki67** で染色される細胞数には予想に反し有意差が認められなかった。この結果は **Netrin-5** ノックアウトマウスでは細胞分裂周期が長くなっていると考えられる。

さらに、**V-SVZ** で誕生したニューロプラストが吻側移動流 (**RMS**) を通り嗅球へと向かう経路において、通常、ニューロプラストは綺麗な列を形成しているが、**Netrin-5** ノックアウトマウスではこの列の形成が乱れることが明らかとなった。この原因としては、2つの理由が考察され、①**Netrin-5** 陽性のニューロプラストがトンネルを形成するアストロサイトに対して反発力が強くなったか、②ニューロプラスト同士の細胞接着が弱くなったかであると考えられる。一方、ニューロプラストの最終移動先である嗅球では、1 日後・7 日後における **EdU** 陽性細胞数には、野生型と比して変化はなかった (**Ikegaya et al., Front Neuroscience, 2020**)。もう 1 つの神経新生ニッチとして知られている海馬歯状回における **SGZ** では、**Netrin-5** ノックアウトマウスにおける **EdU** 陽性細胞数の変化は見られなかった。

また、大脳皮質や線条体など様々な領域におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の細胞分裂が促進していることも明らかとなった。これは、脳内に広く分布する血管内皮細胞から **Netrin-5** が分泌され、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分裂を抑制しているのではないかと考えられる (**Ikegaya et al., Front Neuroscience, 2020**)。

Netrin-5 の発現を発生過程で観察すると、胎生期の脳皮質で強い発現が観察された。したがって、大脳皮質が形成される際の放射状移動にも **Netrin-5** が関与している可能性が考えられる (**Yamagishi et al., Front Cell Dev Biol, 2021**)。

また、脳梗塞に関して、中大脳動脈結紮後 3 日目において、興味深いことに顕著な **Netrin-5** 陽性細胞の増加が見られた。**Netrin-5** 陽性細胞は **V-SVZ** から梗塞領域に向かう **DCX** 陽性ニューロプラストに強く発現していること、また新生血管の内皮細胞にも強く発現していることが明らかとなった。**Netrin-5** ノックアウトマウスを用いて脳梗塞モデルを作成したが、残念ながら野生型と明確な行動学的・形態学的な違いは観察されなかった (未発表)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Satoru Yamagishi, Yurika Iga, Masato Nakamura, Chika Takizawa, Dai Fukumoto, Takeharu Kakiuchi, Shingo Nishiyama, Hiroyuki Ohba, Hideo Tsukada, Kohji Sato, Yasuomi Ouchi	4. 巻 16
2. 論文標題 Upregulation of Cannabinoid Receptor Type 2, but Not TSPO, in Senescence-Accelerated Neuroinflammation in Mice: A Positron Emission Tomography Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation .	6. 最初と最後の頁 208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-019-1604-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Jumpei Shirakawa, Noriko Takegahara, Hyunsoo Kim, Seoung Hoon Lee, Kohji Sato, Satoru Yamagishi, Yongwon Choi	4. 巻 52
2. 論文標題 Flrt2 Is Involved in Fine-Tuning of Osteoclast Multinucleation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMB Reports	6. 最初と最後の頁 514-519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5483/BMBRep.2019.52.8.116.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tai-Nagara Ikue, Yoshikawa Yusuke, Numata Naoko, Ando Tomofumi, Okabe Keisuke, Sugiura Yuki, Ieda Masaki, Takakura Nobuyuki, Nakagawa Osamu, Zhou Bin, Okabayashi Koji, Suematsu Makoto, Kitagawa Yuko, Bastmeyer Martin, Sato Kohji, Klein R?diger, Navankasattusas Sutip, Li Dean Y., Yamagishi Satoru, Kubota Yoshiaki	4. 巻 144
2. 論文標題 Placental labyrinth formation in mice requires endothelial FLRT2/UNC5B signaling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 2392 ~ 2401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.149757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ikegaya Shunsuke, Iga Yurika, Mikawa Sumiko, Zhou Li, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Sato Kohji, Yamagishi Satoru	4. 巻 14
2. 論文標題 Decreased Proliferation in the Neurogenic Niche, Disorganized Neuroblast Migration, and Increased Oligodendrogenesis in Adult Netrin-5-Deficient Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 570974
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2020.570974	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Satoru, Bando Yuki, Sato Kohji	4. 巻 8
2. 論文標題 Involvement of Netrins and Their Receptors in Neuronal Migration in the Cerebral Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 590009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.590009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuroda Go, Sasaki Shigekazu, Matsushita Akio, Ohba Kenji, Sakai Yuki, Shinkai Shinsuke, Nakamura Hiroko, Misawa, Yamagishi Satoru, Sato Kohji, Hirahara Naoko, Oki Yutaka, Ito Masahiko, Suzuki Tetsuro, Suda Takafumi	4. 巻 15
2. 論文標題 G ATA2 mediates the negative regulation of the prepro-tyrotropin-releasing hormone gene by liganded T3 receptor 2 in the rat hypothalamic paraventricular nucleus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0242380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0242380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Satoru Yamagishi, Fumihito Eto, Yo shinoda, Shuhei Ogawa, Ikuko Yao, Tsuyoshi Miyakawa, Keizo Takao and Kohji Sato
2. 発表標題 Repulsive guidance molecule FLRT2 regulates social behavior
3. 学会等名 Neuro2019 (日本神経科学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoru Yamagishi, Fumihito Eto, Yo shinoda, Shuhei Ogawa, Ikuko Yao, Tsuyoshi Miyakawa, Keizo Takao and Kohji Sato
2. 発表標題 Repulsive guidance molecule FLRT2 regulates social behavior
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoru Yamagishi
2. 発表標題 Involvement of Noggin, a novel repulsive guidance molecule, in glial scar formation of the cerebral infarction
3. 学会等名 New Frontiers in Neuroscience 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八木 亮、山岸 覚、佐藤 康二
2. 発表標題 Nogginノックアウトマウスにおける脳梁形成について
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoru Yamagishi, Yo shinoda, Syuhei Ogawa, Tsuyoshi Miyakawa, Keizo Takao and Kohji Sato
2. 発表標題 Repulsive guidance molecule FLRT2 regulates neuronal migration and social behavior.
3. 学会等名 日本神経科学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoru Yamagishi, Yo shinoda, Syuhei Ogawa, Tsuyoshi Miyakawa, Keizo Takao and Kohji Sato
2. 発表標題 Repulsive guidance molecule FLRT2 regulates neuronal migration and social behavior.
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池ヶ谷俊介、山岸覚、阿部学、崎村建司、佐藤康二
2. 発表標題 Netrin-5ノックアウトマウスにおける成体脳神経新生について
3. 学会等名 日本解剖学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山岸覚
2. 発表標題 神経軸索ガイダンス分子FLRT2による社会性行動制御
3. 学会等名 第123回日本解剖学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoru Yamagishi, Mika Takarada, Masato Sawada, Kazunobu Sawamoto, Osamu Hori, Kohji Sato
2. 発表標題 Netrin-5 is upregulated in the peri-infarct region after middle cerebral artery occlusion.
3. 学会等名 Society for Neuroscience, (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoru Yamagishi, Mika Takarada, Masato Sawada, Kazunobu Sawamoto, Osamu Hori, Kohji Sato
2. 発表標題 Netrin-5 is upregulated in the peri-infarct region after middle cerebral artery occlusion.
3. 学会等名 第60回日本神経化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小山夏輝、山岸覚、佐藤康二
2. 発表標題 Unc5Dノックアウトマウスにおける成体脳神経新生について
3. 学会等名 第123回日本解剖学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikegaya Shunsuke, Iga Yurika, Mikawa Sumiko, Zhou Li, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Sato Kohji, Yamagishi Satoru
2. 発表標題 Decreased proliferation in the neurogenic niche, disorganized neuroblast migration, and increased oligodendrogenesis in adult netrin-5-deficient mice
3. 学会等名 第126回日本解剖学会・第98回 日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	崎村 建司 (SAKIMURA KENJI) (40162325)	新潟大学・脳研究所・フェロー (13101)	
研究協力者	阿部 学 (ABE MANABU) (10334674)	新潟大学・脳研究所・准教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------