

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06708

研究課題名(和文)脳神経再生の効率化を目指したプロテアーゼ活性制御による移植細胞の生着性の向上

研究課題名(英文)Efficient neuronal regeneration by regulation of protease activity

研究代表者

河下 映里 (Kawashita, Eri)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80509266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経再生治療における新規創薬戦略の提示を目指し、セルピンの一種である2アンチプラスミン(2AP)が、脳傷害マウスモデルにおける神経新生を制御し、神経細胞の移植後の生着性に関するかどうかを検証した。脳内2AP作用の抑制により、海馬神経新生が亢進することが明らかとなり、脳梗塞モデルマウスの脳室下帯での内因性神経新生は2AP欠損により増加する傾向がみられた。さらに、脳内2APレベルが移植神経細胞の生着性に影響を及ぼす可能性も示唆された。これらの研究成果は、脳神経再生の効率化を目指した創薬標的分子としての2APの可能性を前向きに推進するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞や認知症、パーキンソン病など根治が困難とされてきた脳神経疾患に対して、再生医療の実現化を目指した神経細胞の移植研究が世界中で行われているが、病態の劇的な改善には、移植した神経細胞の生着性の向上が重要となる。本研究では、2アンチプラスミン(2AP)が、生体に本来備わっている神経再生能力や、移植細胞の生着性の向上に関する可能性を示した。本研究成果は、効果的な神経再生療法の応用に繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)：2-Antiplasmin (2AP), a member of the serine protease inhibitor (serpin) family, is known as a principal physiological plasmin inhibitor. In this study, we demonstrated that the inhibition of 2AP by the intracerebroventricular injection of an anti-2AP-neutralizing antibody in WT adult mice enhanced adult hippocampal neurogenesis, and the spatial memory formation and retention. We also found that 2AP is likely to be involved in endogenous neurogenesis after brain injury, and in the engraftment of ES cell-derived cortical neurons transplanted in the cerebral cortex. These findings suggest that 2AP is a potential regulator responsible for functional neurogenesis and reorganization, possibly being useful for efficient neuronal regeneration after brain injury.

研究分野：病態生化学

キーワード：2アンチプラスミン 神経新生 移植

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞や認知症、パーキンソン病など根治が困難とされてきた脳神経疾患に対して、再生医療の実現化を目指した ES 細胞や iPS 細胞由来神経幹細胞などの細胞移植研究が世界中で行われている。しかし、移植細胞の生着率は低く、たとえ生着してもホスト側に移植細胞を維持するだけの環境が整備されていないため、細胞を移植するだけでは病態が劇的に改善しない。

成体脳の海馬や脳室-脳室下帯に存在する神経幹細胞は、血管基底膜の主要構成分子であるラミニンに接着しており、血管内皮細胞から産生される VEGF や IGF-1 などの増殖因子が血管新生だけでなく神経新生も誘導する。脳傷害時においても、血管新生と神経新生は協調して起こり、神経-血管間の微小環境を構築するラミニンの時間的・空間的発現変動が、血管によりガイドされる神経新生を制御すると考えられる。したがって、再生治療において移植細胞の生着性を維持するためには、ホスト側の神経-血管間微小環境の整備が必須となるが、その構築機構については未だ不明な点が多く、微小環境の構築を制御する薬物の創製には、この細胞分子機構を明らかにする必要がある。申請者は、この分子機構に関与する分子として、細胞外セリンプロテアーゼであるプラスミンの生理的阻害因子(セルピンの一種) $\alpha 2$ アンチプラスミン ($\alpha 2$ -antiplasmin: $\alpha 2AP$) に着目している。

プラスミンは、その活性化程度により脳神経機能に対して保護的にも障害的にも作用することが示唆されている。プラスミンは、神経細胞の足場となるラミニンや、ペリニューロナルネットの構成成分であるニューロカンなどの細胞外マトリックスを基質として分解し、神経可塑性の亢進に関与している。また、神経細胞の分化促進および生存に関わる脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) や神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) の前駆体から活性化型への変換にプラスミンが関与することも示されている。一方、プラスミンの作用により、神経変性および神経細胞死が誘発されることや、海馬の苔状線維の軸索ガイダンスが破綻することが報告されており、このメカニズムとしてはプラスミンによるラミニンの分解や単球遊走因子である monocyte chemotactic protein-1 の活性化が示唆されている。これらのプラスミンによる神経毒性作用は、過剰な細胞外タンパク質分解作用によるものと考えられる。このように、プラスミンは、神経細胞の形態変化や移動、神経細胞死、神経可塑性に関与しているが、正常な脳神経機能の発揮には、プラスミンによるタンパク質分解系とその抑制系とのバランスの維持が不可欠であり、プラスミンの作用を抑制する $\alpha 2AP$ は、両作用のバランスを保つ重要な因子であると考えられる。

申請者はこれまでに、 $\alpha 2AP$ 欠損により海馬神経細胞の成熟化が遅延することや (Kawashita et al. J. Neurochem. 2013)、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスでは記憶学習能力の低下や不安様行動を認めることを報告した (Kawashita et al. PLOS ONE 2014)。これらの研究成果より、 $\alpha 2AP$ がプラスミンによる細胞外タンパク質分解を制御することで、脳神経の発達や脳高次機能の発揮に関与していることが示唆される。さらに最近、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウス成体脳のマイクロアレイ解析により、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスにおいて、血管新生を制御する因子の遺伝子発現が変動していることを見出し、 $\alpha 2AP$ が血管新生とそれに伴う神経新生を調節することで神経再生や神経回路形成に関与している可能性が推察される。また、 $\alpha 2AP$ が、プラスミンによるラミニンなどの細胞外基質の分解作用を阻害することから、申請者は、 $\alpha 2AP$ が血管新生や神経新生を制御していると予想し、再生治療における移植細胞の生着性を向上するためのホスト側の微小環境整備を狙った創薬標的分子としての $\alpha 2AP$ の可能性を検討した。

2. 研究の目的

本研究課題では、脳傷害時における神経-血管間の微小環境を整備し、移植細胞の生着性を向上させる創薬標的分子としての $\alpha 2AP$ の可能性を検証する。具体的には、 $\alpha 2AP$ が成体の海馬および脳室-脳室下帯での神経新生および血管新生を制御していることを実証する。また、脳傷害モデルマウスにおける内因性神経新生および血管新生への $\alpha 2AP$ の関与を明らかにする。さらに、脳傷害モデルマウス脳内へ ES 細胞および iPS 細胞由来神経幹細胞を移植し、その後の生着性や神経行動学的機能に対する $\alpha 2AP$ の関与を明確にする。

3. 研究の方法

成体の海馬および脳室-脳室下帯での神経新生における $\alpha 2AP$ の関与を明らかにするため、抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体または $\alpha 2AP$ を脳室内投与した野生型マウスに、プロモデオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与し、凍結脳切片を作製した。抗 BrdU 抗体と、細胞増殖マーカーである Ki67 に対する抗体を用いた免疫組織染色を行ない、新生細胞数をカウントした。さらに、新生ニューロンのマーカーであるダブルコルチン (Dcx) に対する抗体を用いた免疫組織染色を行なった。また、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウスを用いて同様の解析を行なった。一方、 $\alpha 2AP$ 欠損による血管形成への影響を明確にするため、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウスの脳切片について、血管内皮細胞マーカーである CD31 に対する抗体を用いて免疫染色を行なった。脳傷害マウスの神経新生における $\alpha 2AP$ の関与についても、上記の方法と同様に解析した。また、ES 細胞由来神経細胞の移植後の、細胞生着性への $\alpha 2AP$ の関与を明らかにするため、 $\alpha 2AP$ 欠損マ

ウスおよび野生型マウスの大脳皮質に、GFP 発現 ES 細胞分化誘導した神経幹細胞を移植し、生着率を蛍光顕微鏡観察により解析した。

4. 研究成果

脳傷害後には、海馬歯状回や脳室下帯での神経幹細胞由来神経細胞、および大脳皮質での髄膜ペリサイト由来神経細胞が新たに生まれることが明らかにされており、これらの新生ニューロンが脳梗塞後の神経機能の回復において重要な役割を担うと考えられている。本研究では、まず、成体海馬における神経新生に対する抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体または $\alpha 2AP$ の単回投与の影響を明確にするため、12 週齢の野生型マウスの脳室内にコントロール IgG および抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体を投与し、抗 BrdU 抗体と、細胞増殖マーカーである Ki67 に対する抗体を用いた免疫組織染色を行なった。海馬歯状回での BrdU 陽性かつ Ki67 陰性細胞（細胞周期から脱出した細胞）の数は、コントロール IgG 投与群と比較して抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体投与群で有意に増加した（Kawashita et al. *Molecular Brain*, 2020）。また、新生した神経前駆細胞のマーカーである Dcx 陽性細胞の数を解析した結果、コントロール IgG 投与群と比較して、抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体投与群における Dcx 陽性細胞数が有意に増加していた（Kawashita et al. *Molecular Brain*, 2020）。このことから、抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体による脳内 $\alpha 2AP$ 機能の阻害により海馬歯状回での神経新生が亢進することが明らかになった。さらに、抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体投与により記憶保持力が向上したことから、脳内 $\alpha 2AP$ の一過的阻害による神経新生促進が脳高次機能に影響を及ぼすことが示唆される。一方、12 週齢の野生型マウスの脳室内に、生理食塩水（コントロール）および $\alpha 2AP$ を脳室内投与し、同様の解析を行なった。その結果、コントロール群と比較して、 $\alpha 2AP$ 投与群では海馬歯状回における BrdU 陽性かつ Ki67 陰性細胞の数が減少し（Kawashita et al. *Molecular Brain*, 2020）、Dcx 陽性細胞数も有意に減少していた（Kawashita et al. *Molecular Brain*, 2020）。さらに、 $\alpha 2AP$ 投与により記憶保持力が減弱することが明らかとなり、脳内 $\alpha 2AP$ レベルの上昇が神経新生の抑制とそれに伴う記憶学習能力の低下を誘発することが示唆される。次に、 $\alpha 2AP$ 欠損による神経新生への影響を明確にするため、12 週齢の $\alpha 2AP$ 欠損マウス、 $\alpha 2AP$ ヘテロ欠損マウスおよび野生型マウスの海馬歯状回における Dcx 細胞数を比較したが、3 群間で顕著な差はみられなかった。また、 $\alpha 2AP$ 欠損マウス、 $\alpha 2AP$ ヘテロ欠損マウスおよび野生型マウスの脳室-脳室下帯での神経新生についても解析したところ、海馬での検討結果と同様に、3 群間で、Dcx 細胞数に顕著な差はみられなかった。中和抗体による $\alpha 2AP$ 機能の一過的な抑制による神経新生への影響とは異なり、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスでは、成体での神経新生に対する何らかの補完作用が存在すると推察される。

一方、 $\alpha 2AP$ 欠損による血管形成への影響を検討するため、まずは、脳血管網の発達が活発な新生児期の $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウスの大脳皮質について解析した。血管内皮細胞マーカーである CD31 の発現を免疫組織染色により解析した結果、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスの大脳皮質での血管密度が、野生型マウスに比して減少しているように見受けられたが、サンプル数が少ないため、本結果の再現性を確認する必要がある。今後さらに、神経新生を制御することが示唆されている血管フィロポディア（vascular filopodia）のマーカーであるイソレクチン B4 に対する抗体を用いた免疫染色を予定しており、血管形成における $\alpha 2AP$ の関与をより明確にする。

脳傷害マウスの内因性の神経新生における $\alpha 2AP$ の関与を明確にするため、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウスを用い、長浜バイオ大学の永井信夫教授の協力を得て、光化学誘発性脳梗塞（photochemically induced thrombotic brain damage: PIT-BD）モデルを作製し、新生細胞を BrdU ラベリングした。脳梗塞作製 1 週間後に、凍結脳切片を作製し、抗 BrdU 抗体および抗 Dcx 抗体を用いて免疫組織染色を行なった。脳梗塞後の神経機能の回復には、脳室下帯や海馬歯状回での神経幹細胞由来、および大脳皮質での髄膜ペリサイト由来新生神経細胞が重要な役割を担うことから、本研究では、PIT-BD マウスの脳室下帯および大脳皮質における神経新生に対する $\alpha 2AP$ 欠損の影響を解析した。脳梗塞作製 1 週間後の大脳皮質における内因性の神経新生について、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウス間で顕著な差はみられなかった。一方、脳室下帯での新生神経細胞数は、野生型マウスと比較して $\alpha 2AP$ 欠損マウスで増加傾向にあったが、サンプルサイズが小さいため、再現性を確認する必要がある。現在、再現性の確認とともに、脳梗塞作製 2 週間後および 1 ヶ月後の新生神経細胞の数および移動量に対する $\alpha 2AP$ 欠損の影響に関する検討を進めている。さらに、京都薬科大学の西村周泰助教の協力を得て、GFP 発現 ES 細胞を分化誘導することで大脳皮質神経細胞を得、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウスに移植した。3 ヶ月後の移植細胞のグラフトサイズおよび神経突起の長さを解析した結果、脳内 $\alpha 2AP$ レベルが ES 細胞由来大脳皮質神経細胞の移植後の生着性に影響する可能性が示唆された。今後、野生型マウスへの神経細胞の移植後に、 $\alpha 2AP$ および抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体を投与し、一過性の脳内 $\alpha 2AP$ レベル変化が移植細胞の生着性に及ぼす影響を解析する。脳梗塞モデルマウスに対する移植神経細胞の生着性に関する検討もさらに進める。

本研究では、脳内 $\alpha 2AP$ 作用の一過的抑制により、成体海馬での神経新生が亢進することが明確になり、脳梗塞モデルマウスの脳室下帯での内因性神経新生は $\alpha 2AP$ 欠損により増加する傾向がみられた。さらに、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウスに対する GFP 発現 ES 細胞由来神経細胞の移植実験において、脳内 $\alpha 2AP$ レベルが移植神経細胞の生着性に影響を及ぼす可能性が示唆された。これらの研究成果は、脳神経再生の高効率化を目指した創薬標的分子としての $\alpha 2AP$ の可能性を前向きに推進するものであり、脳梗塞に留まらず中枢神経変性疾患に対する幹細胞や ES および iPS 細胞を用いた細胞治療への応用など幅広く貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eri Kawashita, Keiichi Ishihara, Haruko Miyaji, Yu Tanishima, Akiko Kiriya, Osamu Matsuo, Satoshi Akiba.	4. 巻 13
2. 論文標題 2-Antiplasmin as a potential regulator of the spatial memory process and age-related cognitive decline	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00677-3	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Eri Kawashita, Keiichi Ishihara, Osamu Matsuo, Satoshi Akiba
2. 発表標題 2-Antiplasmin as a regulator of adult hippocampal neurogenesis and spatial learning
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Plasminogen Activation and Extracellular Proteolysis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eri Kawashita, Keiichi Ishihara, Yuki Enomoto, Haruko Miyaji, Osamu Matsuo, Satoshi Akiba
2. 発表標題 2-Antiplasmin as a potential mediator contributing to cognitive function and brain aging
3. 学会等名 The 2nd Joint Meeting of the 24th International Society of Fibrinolysis and Proteolysis and the 17th Plasminogen Activation Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷島 優, 河下映里, 石原慶一, 榎本悠紀, 松尾 理, 秋葉 聡
2. 発表標題 海馬神経新生および空間記憶形成における 2-antiplasminの役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮地晴子, 河下映里, 石原慶一, 榎本悠紀, 喜里山暁子, 松尾 理, 秋葉 聡
2. 発表標題 記憶の獲得・保持および加齢性認知機能低下における 2-antiplasminの役割
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019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	永井 信夫 (Nagai Nobuo)		
研究協力者	西村 周泰 (Nishimura Kaneyasu)		
連携研究者	秋葉 聡 (Akiba Satoshi) (70231826)	京都薬科大学・薬学部・教授 (34306)	
連携研究者	石原 慶一 (Ishihara Keiichi) (80340446)	京都薬科大学・薬学部・准教授 (34306)	

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
---------	---------