

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700402

研究課題名（和文） 細胞死によって誘導されるサイトカインEMAP-IIの神経新生における役割解明

研究課題名（英文） Functional analysis of EMAP-II, a cytokine released during cell death, in the neurogenesis.

研究代表者

猪口 徳一 (IGUCHI TOKUICHI)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号：60509305

研究成果の概要（和文）：脳梗塞などの傷害時には神経新生が起こることが知られており、細胞の死から新生へと至る機構の解明は治療的意味合いが高い。本研究で我々は、細胞死によって分泌される分子EMAP-IIが、脳梗塞時の血管周囲で増加することを見出した。さらに、EMAP-IIは神経幹細胞に作用し、増殖や分化に関与する分子FILIP1Lの発現を増加させること、正常な脳内では共に神経新生が盛んな嗅球に多く存在することが示唆された。これらの成果は、細胞死と神経新生を結びつける新たな機構を明らかにするものである。

研究成果の概要（英文）：It is known that neurogenesis happens at the region of the injuries such as the stroke, and the elucidation of the mechanism leading from the death to the regeneration of the cell has high therapeutic implications. We found that EMAP-II, a molecule secreted owing to cell death, was increased in peripheral blood vessels during a stroke. Furthermore, EMAP-II acted on neural stem cells to induce the expression of FILIP1L which participates in proliferation and differentiation of a cell. Both of them were highly expressed in the olfactory bulb where the neurogenesis occurs actively. These results suggested a part of the mechanism linking cell death and neurogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学，細胞・組織，シグナル伝達，サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

正常時の成体脳において、嗅球・海馬では細胞死とそれに続く神経新生が繰り返されており、それは、神経可塑性や記憶の形成に重要なイベントであることが知られている (Duan et al. Curr Opin Neurobiol. 2008)。一方、異常時である脳障害による細胞死に対

して神経幹細胞が傷害領域へ移動し、増殖・分化を行うことで神経細胞を補おうとする。(Yamashita et al. J Neurosci. 2006)。これらの事実は、神経幹細胞は、細胞死に伴う環境の変化を察知し、遊走・増殖・分化といった行動を起こす事を示している。

上記の環境変化を伝える分子実態として、細胞死と神経新生へのサイトカインの関与

が徐々に分かってきた。例えば、ケモカイン因子 SDF1 は受容体 CXCR4 を介して神経幹細胞の誘因物質として働く (Imitola et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004)。しかし、細胞死によって多様なサイトカインが誘導され、その受容体も多様であるため、細胞死から神経新生に至る一連のイベントを結ぶ分子実態の全貌は必ずしも明らかではない。我々は、ケモカインに誘引された神経幹細胞は増殖を停止し、ニューロンへ適切に分化制御される必要があると、細胞死に誘導されるサイトカインの中に神経幹細胞の増殖分化制御に関与する分子があると考えた。そこで、細胞死に誘導されるサイトカイン EMAPII とそれによって誘導される増殖分化関連因子 FILIP1L が脳内で発現していることに着目し、その役割について研究を行った。

2. 研究の目的

(1) マウス成体脳における EMAPII、FILIP1L それぞれの発現領域を正常時と脳梗塞誘導時とで明らかにし、それぞれの分子を発現する細胞の同定と、神経細胞死とそれら分子の発現との関連性を調べる。

(2) EMAPII が神経幹細胞の細胞増殖・分化・遊走に与える影響を調べ、実際の生体内で起きている現象との関連性を明らかにする。

(3) 神経前駆細胞において EMAPII の刺激による FILIP1L の発現量の変化を定量するとともに、それに至るまでの細胞内でのシグナル経路を解明する。

以上3つに重点を置き研究を進める。そして、その結果を基に脳組織で起こる細胞死と神経細胞新生の2つの現象を結びつけるシグナルにおける両因子の意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) マウス成体脳における EMAPII、FILIP1L の発現様式の解析

EMAPII が胎生期の脳に局在して発現していること、受容体候補分子 CXCR3 が成体マウス脳での解析で、嗅球、海馬歯状回、脳室下帯に特異的な発現を示すことが報告されており、FILIP1L が申請者の予備実験から神経幹細胞で発現することが示されている。しかし、いずれも mRNA の発現を調べたもので、観察対象・時期が異なる。従って、本研究の対象である正常時と脳梗塞モデル成体マウス脳を用いて免疫組織染色・in situ hybridization を行い、正確な局在を明らか

にする

(2) EMAPII 組み換え蛋白質を用いた神経幹細胞に与える影響の評価

EMAPII 組み換え蛋白質を得るため、大腸菌で発現・精製する。初代神経幹細胞培養法により神経幹細胞を培養し、遊走・増殖・分化に対する EMAPII の影響を調べる。遊走実験には研究代表者が以前確立した神経幹細胞塊を用いた評価法 (Iguchi et al. J. Biol. Chem. 2008) を用いる。増殖に対する評価は MTT アッセイ、又は神経幹細胞塊形成率の評価によって行う。分化に関しては、ニューロン・アストロサイト・グリア特異的の抗体を用いて免疫染色を行う。

(3) EMAPII が FILIP1L の遺伝子発現を誘導するシグナルの解析

EMAPII は繊維芽細胞においては、マップキナーゼ ERK のリン酸化を介して創傷治癒を促進することが知られている (Park et al. Am J Pathol. 2005)。また、G タンパク質共役型受容体である CXCR3 は 3 量体 G 蛋白質 G-alpha i と共役しており、G-alpha i は下流でマップキナーゼの活性化を引き起こすことが知られている。以上のことから、EMAPII が CXCR3 を介して G-alpha i を活性化することでマップキナーゼを介して FILIP1L の発現上昇と神経幹細胞の増殖分化に作用すると予測される。この仮説を、アゴニストやアンタゴニスト、または阻害剤を使って検証し、EMAPII が FILIP1L を誘導するに至るまでの細胞内シグナルを明らかにする。

4. 研究成果

(1) EMAPII は正常脳において、嗅球の僧帽細胞に発現する。

正常状態の EMAPII の発現を調べる目的で、成体マウス脳での EMAPII と FILIP1L の発現を組織化学的に解析した。免疫組織染色の結果、EMAPII は嗅球の僧帽細胞層 (MCL) に多く発現しており、その一方、FILIP1L は嗅球細胞全体に発現することがわかった (図 1)。

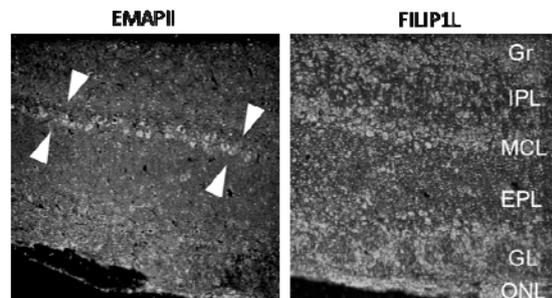


図1 嗅球におけるEMAPIIとFILIP1Lの発現

FILIP1L の発現を *in situ* hybridization で調べると、大脳皮質ではほとんど発現が見られず、嗅球に多く発現しており、EMAP-II 受容体候補因子である CXCR3 も嗅球で高い発現が見られている。このことは、嗅球で僧帽細胞から分泌される EMAPII が周囲の細胞に作用して、FILIP1L の発現を制御している可能性を示している。

(2) EMAPII は脳梗塞巣では血管周辺に強く発現する

脳虚血モデルマウスの脳では、正常脳ではその発現が認められない大脳皮質において、EMAPII の発現が見られ、その発現は、血管内皮細胞マーカー CD31 で染まる細胞に近接していた (図 2)。詳細な観察から、血管内皮と脳実質との間に存在する空間、ウィルヒョウ・ロビン腔に細胞が集積し、それらの細胞周囲で EMAPII の発現が顕著に認められた。それら細胞群の種類は不明であるが、虚血ストレスといった細胞死を引き起こす環境の変化に伴い EMAPII を発現・分泌すると考えられる。

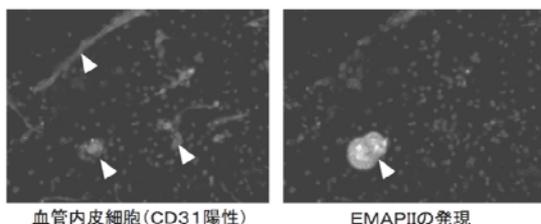


図2 脳梗塞後4日の大脳皮質におけるEMAPIIの発現

(3) 細胞ストレス刺激により EMAPII は切断される

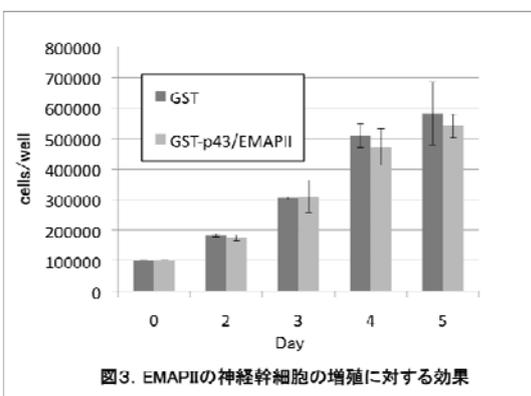
EMAPII は細胞ストレス刺激により切断を受け成熟型となり、細胞外へと分泌されると考えられている。そこで、実際に確かめるため、N 末端と C 末端に異なるタグを付加した EMAPII を発現するベクターを作成し、Cos7 細胞に発現させ、UV 若しくは actinomycin D を作用させることでアポトーシス刺激を与えた。細胞培養上清を濃縮し、イムノブロットによって調べると、EMAPII の全長のバンドより下に C 末タグでのみ検出されるバンドが検出された。このバンドは UV, actinomycin D 処理を行うと増加しており、EMAPII はストレス刺激によって切断、分泌されることが確かめられた。従って、分泌して作用する EMAPII は切断された状態であり、機能的に活性型である可能性が高い。

(4) *in vitro* 培養系において神経幹細胞の増殖・分化に対する EMAPII の影響

脳梗塞傷害領域の血管周辺には神経幹細胞が移動し、増殖・分化を行うことで神経細胞を補う働きをすることが報告されている。

そこで、EMAPII の組み換え蛋白質を精製し、神経幹細胞に作用させ、その遊走・増殖・分化に与える影響を調べた。

神経幹細胞は neurosphere (神経幹細胞塊) として浮遊培養し、その後接着させることで、細胞塊から同心円状に細胞が遊走していく。そこで、EMAPII を培地に添加し遊走に与える影響を調べたが、変化は認められなかった。次に、EMAPII 存在下で 5 日間神経幹細胞を培養し、増殖能について検討したが、細胞増殖への影響は認められなかった (図 3)。さらに、EMAPII が分化に与える影響を調べるために、分化誘導中の神経幹細胞に作用させ、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトそれぞれのマーカーに対する抗体で免疫染色を行ったが、その分化割合に対して影響は見られなかった。



(5) EMAPII が FILIP1L の遺伝子発現を誘導するシグナルの解析

EMAPII が FILIP1L の発現を誘導するメカニズムを明らかにするため、EMAPII によって細胞内で誘導されるシグナル経路に関して検討を行った。EMAPII は繊維芽細胞においては、ERK のリン酸化を介して創傷治癒を促進することが知られており、受容体候補分子 CXCR3 は 3 量体 G 蛋白質 G-alpha i と共役し下流で ERK の活性化を引き起こすことが知られている。そこで、神経幹細胞に EMAPII を作用させ、ERK の活性化を ERK のリン酸化を解析した。しかしながら、ERK の活性化は認められなかった。

本研究において、EMAPII は正常脳で、嗅球の僧帽細胞に発現し、EMAPII によって発現が上昇する分子である FILIP1L は嗅球全体で発現していることを明らかにした。一方、EMAPII が、脳梗塞巣において、血管周囲に集まった細胞群より発現・分泌されることを見出した。また、細胞死等のストレス刺激で細胞外へと分泌される EMAPII は切断をうけており、それが活性化に必要であることが示唆された。切断型 EMAPII の組換えタンパク質を用いた実験においては、神経幹細胞の遊

走・増殖・分化、さらにERKの活性化、いずれに対しても影響が見られなかったが、これは、大腸菌で産生された組換えタンパク質が活性を保持していない可能性を示唆しており、ほ乳類動物細胞等に発現・分泌させたEMAPIIで再度確かめる必要がある。

本研究は、神経細胞死によって誘導されるサイトカインシグナルと細胞の分化増殖に関与する分子の関係を解析することで、細胞死と神経新生を結びつける機構の一端を提示した。本研究を発展させることで、将来的に神経幹細胞の適切な神経誘導が必要な神経再生医療や、脳梗塞治療薬の標的候補分子の提供といった貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計8件)

- ① 八木秀司, 謝 敏カク, 池田 弘, 駒田致和, 猪口徳一, 黒田一樹, 岡部勝, 佐藤 真: FILIP の新たな側面: FILIP 欠損による梨状葉神経細胞棘突起の形態変化. 第116回日本解剖学会全国学術集会・第88回日本生理学会大会, 2011年3月30日, 誌上開催
- ② 謝 敏カク, 黒田一樹, 八木秀司, 駒田致和, 猪口徳一, 佐藤 真: 大脳皮質形成期の法線方向移動における神経細胞の多極性から双極性への形態変化に成長円錐が重要である. 第116回日本解剖学会全国学術集会・第88回日本生理学会大会, 2011年3月30日, 誌上開催
- ③ 猪口徳一: 染色体への導入が可能なTet 誘導型ノックダウンベクターの構築と神経回路研究への応用. ORIGIN 神経科学研究会夏のワークショップ, 2010年9月6日, 奈良.
- ④ 猪口徳一, 黒田一樹, 謝 敏カク, 八木秀司, 佐藤 真: 誘導型遺伝子発現系を利用した神経回路形成におけるアミロイド前駆体たんぱく質の機能解析. Neuro2010, 2010年9月4日, 神戸.
- ⑤ 謝 敏カク, 猪口徳一, 八木秀司, 白尾智明, 佐藤 真: LL5 β は樹状突起スパインの形成及び成熟を制御する. Neuro2010, 2010年9月3日, 神戸.
- ⑥ 八木秀司, 謝 敏カク, 猪口徳一, 黒田一樹, 佐藤 真: 胎仔期神経発生におけるアクチン繊維の可視化. 第115回日本解剖学会・全国学術集会, 2010年3月30日, 岩手.
- ⑦ 猪口徳一, 黒田一樹, 謝 敏カク, 八木秀司, 佐藤 真: 大脳皮質形成関連因子の神経回路形成における機能解析～トランスポゾンによる染色体遺伝子

導入と遺伝子発現誘導系を用いたアプローチ～. 第115回日本解剖学会・全国学術集会, 2010年3月28日, 岩手.

- ⑧ Xie, M-J., Yagi, H., Iguchi, T. and Sato, M. : Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate associated factor LL5 β regulates morphology and maturation of dendritic spines. 大阪大学グローバルCOEプログラム"System Dynamics of Biological Fuction", 2009年10月8日, 淡路島.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/KAIBOU2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪口 徳一 (IGUCHI TOKUICHI)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号: 60509305