

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860164

研究課題名(和文) Ror1の発現誘導を介したアストロサイトの炎症応答制御

研究課題名(英文) Roles of the Ror-family receptor tyrosine kinases in reactive astrocytes

研究代表者

遠藤 光晴 (Endo, Mitsuharu)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90436444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、Wnt5aの受容体として働くRorファミリー受容体型チロシンキナーゼ(Ror1、Ror2)が損傷を受けた脳内で発現誘導されることが分かった。Ror1が発現誘導される細胞は不明であるが、Ror2は損傷領域の活性化アストロサイトで発現誘導されていた。また、培養アストロサイトにおいて、Ror2はbFGF刺激により発現誘導され、静止期のアストロサイトが細胞周期を再開するために必要であることが明らかになった。すなわち、bFGFによるRor2の発現誘導は、損傷を受けた脳内のアストロサイトが増殖を再開するための分子機構として働いていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The Ror-family receptor tyrosine kinases, Ror1 and Ror2, have been shown to act as receptors for Wnt5a and play essential roles during development. We found that Ror1 and Ror2 are induced in the adult mouse brain following injury. Immunohistochemical analysis using the anti-Ror2 antibody revealed that Ror2 was up-regulated on reactive astrocytes around the lesion site, although Ror1-expressing cells within injured brain regions could not be identified due to lack of a usable anti-mouse Ror1 antibody for immunostaining. We also found that Ror2 was induced upon stimulation with bFGF in cultured astrocytes, and up-regulation of Ror2 was required for bFGF-induced cell cycle re-entry of quiescent astrocytes. These findings indicate that bFGF-induced expression of Ror2 plays an important role in regulating proliferation of reactive astrocytes following brain injury.

研究分野：分子神経科学

キーワード：Ror1 Ror2 Wnt5a アストロサイト 脳損傷 bFGF 増殖 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

アストロサイトは、中枢神経系の恒常性維持に重要な役割を担っており、その機能破綻は中枢神経疾患の発症や進行と深く関わっている。また、アストロサイトは、炎症反応を伴う様々な中枢神経障害時(外傷・虚血・感染・神経疾患など)に活性化され、多様な機能変化を示すことが知られている。例えば、外傷などにより損傷を受けた脳内では、活性化したアストロサイトが未分化性を獲得(脱分化)し、増殖を開始することが知られている。しかしながら、中枢神経障害時にアストロサイトの機能変化をもたらす分子機構については不明な点が多い。

Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼ(Ror1, Ror2)は、液性因子 Wnt5a の受容体として働くことで発生過程の神経幹細胞の未分化性と増殖能を制御する働きをもつ。我々は、培養アストロサイトにおいて、Ror1 の発現が炎症性サイトカイン(IL-1 β , TNF- α)の刺激により誘導されることを見出したことから、炎症性サイトカインによる Ror1 の発現誘導が中枢神経障害に伴うアストロサイトの未分化性や増殖能の獲得などの機能変化に寄与しているのではないかと考えるに至った。一方、Ror2 も Ror1 と同様の機能をもつと考えられるが、培養アストロサイトでは IL-1 β および TNF- α による Ror2 の発現誘導は認められない。

2. 研究の目的

本研究では、中枢神経障害時にアストロサイトで Ror1 の発現が誘導されることで、アストロサイトの未分化性や増殖能の獲得などの機能変化をもたらすのではないかと仮説を立て、これを検証する。具体的には、中枢神経障害時に活性化アストロサイトで Ror1 の発現が誘導されるかどうかを明らかにしたうえで、アストロサイトにおける Ror1 の発現制御機構、Ror1 によるアストロサイトの機能制御、Ror1 によるアストロサイトの機能制御が中枢神経障害過程において担う役割について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳外傷モデルマウスを用いた解析

生後 8~12 週齢のマウスをイソフルランにより深麻酔し、頭皮を切開後、ドリルで削ることで頭蓋に 2 mm 程の穴を開け、22G ニードルを大脳皮質の表層から 1~2mm 挿入することで損傷処置を施した。処置後は頭皮を縫合して解析まで通常飼育を行った。

遺伝子発現解析のために、マウスを安楽死後に脳組織を摘出し、損傷部を含む直径 2mm の組織片より total RNA 抽出して qRT-PCR 法により Ror1, Ror2, GFAP および 18S ribosomal RNA (18S rRNA) の発現量を測定した。サンプル間の各遺伝子の発現量は、18S rRNA の発現量で補正することで比較解析し

た。また、マウスを麻酔下で灌流固定後に脳組織を摘出し、クライオスタットを用いて 20 μ m の切片を作製し、免疫組織染色法により組織学的解析を行った。

(2) 培養アストロサイトを用いた解析

生後 2 日目のマウスの大脳皮質をトリプシンで分散し、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で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。得られた未分化な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分化培地(B27, 2% FBS を含む DMEM/F12 培地)にて培養することでグリア細胞へ分化誘導した。また、高純度のアストロサイトを得るために、分化誘導 3 日後より Ara-C (8 mg/ml) を培地に添加し、さらに 6 日間培養を行うことで、オリゴデンドロサイト前駆細胞(oligodendrocyte precursor cells: OPC)を除去した。得られたアストロサイトは、bFGF 含有培地(B27, 20 ng/ml bFGF を含む DMEM/F12 培地)で 1~7 日間培養した。

発現抑制実験においては、上記の方法により得たアストロサイトに Lipofectamine RNAiMax Transfection Reagent (Life Technologies)を用いて siRNA を導入後に bFGF 含有培地または分化培地にて培養した。

上記の方法により得られた各種細胞は、qRT-PCR 法により各種遺伝子の発現量を解析した。また、4% PFA で固定後の細胞を各種タンパク質に対する特異的抗体を用いて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察することで、細胞集団中の GFAP 陽性アストロサイト、Olig2&PDGFR α 陽性 OPC および Ki67 陽性増殖細胞の割合をそれぞれ測定した。

4. 研究成果

(1) 活性化アストロサイトにおける Ror1 および Ror2 の発現解析

損傷後の脳組織において、Ror1 の発現が誘導されるかどうかを明らかにするために、成体マウスの大脳皮質にニードルで傷をつけることで損傷を与え、その後の損傷組織における遺伝子発現量の変化について、qRT-PCR 法により解析を行った。その結果、損傷 3 日後と 7 日後の組織では、非損傷組織と比較して、Ror1 の発現量の上昇が認められた(図 1)。また、損傷 7 日後の組織では、Ror2 の発現量も上昇することが分かった(図 1)。

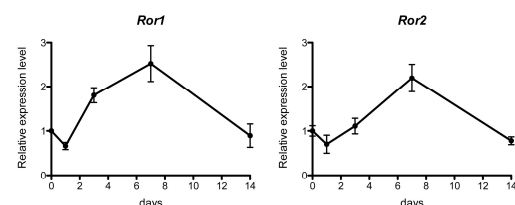


図 1. 外傷を与えた大脳皮質における損傷領域での遺伝子発現変化
days は損傷後の日数。day 0 (非損傷脳) での遺伝子発現を 1.0 とする。

そこで、損傷脳内における *Ror1* 発現細胞と *Ror2* 発現細胞を同定するために、*Ror1* もしくは *Ror2* に対する抗体を用いて免疫組織染色法により解析を行った。その結果、*Ror2* は、損傷部周囲の GFAP 陽性の活性化アストロサイトにおいて発現上昇していることが示された（図 2）。一方、*Ror1* については、抗体の特異性に問題があり、発現細胞の同定には至らなかった。

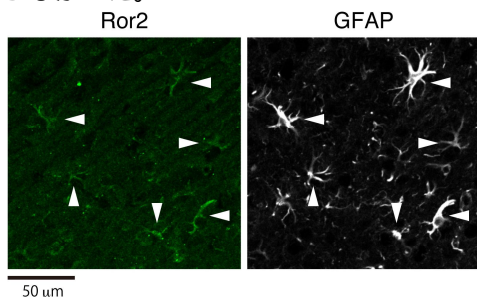


図 2. 損傷領域での活性化アストロサイト（GFAP 陽性細胞）における *Ror2* の発現。矢頭は *Ror2* 発現細胞を示す。

(2) アストロサイトにおける *Ror1*、*Ror2* の発現動態の解析

(1) の解析結果を踏まえて、*Ror2* も本研究の解析対象とし、アストロサイトにおける *Ror1* と *Ror2* の発現動態についての解析を行った。大脳皮質において、アストロサイトは、生後初期に神経幹細胞（グリア前駆細胞）が分化することで産生される。グリア前駆細胞は bFGF と EGF 存在下で培養することで未分化な状態が維持され、bFGF と EGF 非存在下で培養することでグリア細胞（主にアストロサイト）に分化する。分化前と分化誘導 1 週間後の *Ror1* と *Ror2* の発現量を比較解析したところ、分化前と比較して *Ror1* の発現量はわずかに上昇するが、*Ror2* の発現量は著しく低下することが分かった（図 3）。

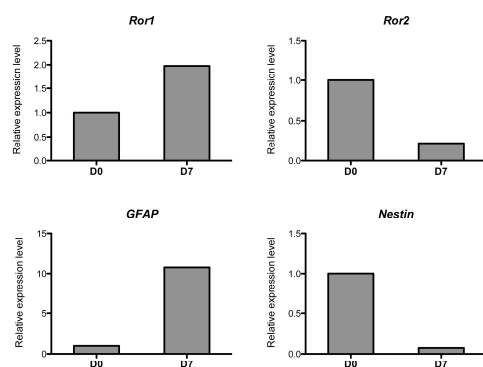


図 3. 神経幹細胞（グリア前駆細胞）の分化前（D0）と分化 1 週間後（D7）での *Ror1* と *Ror2* の発現量の変化。分化後の細胞では、アストロサイトのマーカーである GFAP の発現量が上昇し、未分化な細胞のマーカーである Nestin の発現量が低下する。

また、分化誘導 1 週間後の細胞は、大半が GFAP 陽性のアストロサイトであるが、一部 *Olig2* と PDGFR α 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞（oligodendrocyte precursor cells: OPC）が存在していた。アストロサイトは増殖を停止しているのに対して OPC は増殖能を

保持していることから、分化誘導過程で Ara-C 処理を行うことで、増殖細胞を除去したところ、ほぼすべての OPC が除去され、高純度のアストロサイトを得ることができた。この方法で得られたアストロサイトにおいても *Ror2* の発現量は顕著に低下していたことから、グリア前駆細胞がアストロサイトに分化すると *Ror2* の発現は抑制されることが明らかになった。

(3) アストロサイトにおける *Ror2* の発現抑制機構の解析

アストロサイトへの分化に伴う *Ror2* の発現抑制機構を明らかにするために、DNA メチル化の関与について検討した。グリア前駆細胞からアストロサイトへの分化過程で DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理を行ったところ、アストロサイト分化に伴う *Ror2* の発現低下が抑制された（図 4）。*Ror2* の転写開始点上流 200bp の領域に CpG アイランドが存在することから、この CpG アイランドにおける DNA メチル化により *Ror2* の発現が抑制されることが示唆された。

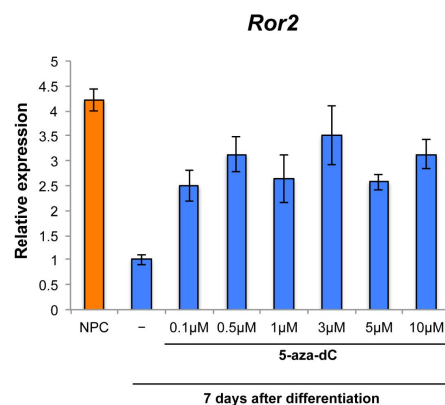


図 4. アストロサイトへの分化に伴う *Ror2* の発現量低下における DNA メチル化の関与。5-aza-dC: 5-aza-2-deoxycytidine, NPC: 神経幹細胞（グリア前駆細胞）

(4) アストロサイトにおける *Ror2* の発現誘導機構の解析

損傷を受けた脳内では様々なサイトカインや増殖因子の発現が誘導されることが知られており、それらがアストロサイトの機能変化をもたらすと考えられる。そのなかで、bFGF は細胞の未分化性の維持や増殖促進に働き、アストロサイトに対しても脱分化の誘導と増殖促進作用をもつ。図 5 に示すように、培養アストロサイトを bFGF で刺激すると未分化な細胞のマーカーである Nestin と増殖細胞のマーカーである Ki67 の発現量が上昇する。bFGF 刺激後のアストロサイトにおける *Ror1* と *Ror2* の発現について解析したところ、*Ror2* の発現量は刺激 3 日後より上昇することが明らかになった（図 5）。一方で *Ror1* の発現量には明らかな変化は認められなかったことから、アストロサイトにおける *Ror1* と *Ror2* の発現制御機構は異なることが示された。

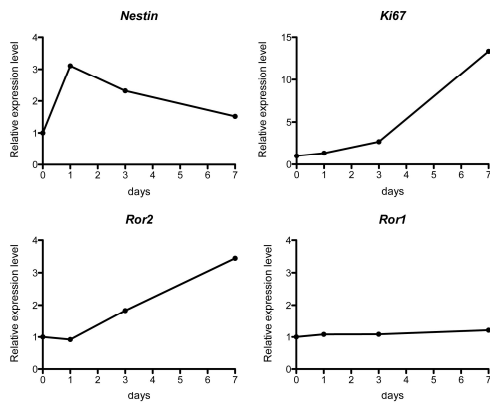


図5. bFGF 刺激後のアストロサイトにおける *Ror1*, *Ror2*, *Ki67* の発現量変化。days は bFGF 刺激後の日数を示す。

(5)アストロサイトにおける *Ror2* の機能解析
成体の脳内におけるアストロサイトは細胞周期の静止期にあり増殖を停止しているが、損傷後には増殖を再開することが知られている。免疫染色法による解析から、bFGF 刺激前のアストロサイトでは *Ki67* 陽性細胞は全く認められなかったことから、本研究で用いたアストロサイトは通常は細胞周期の静止期にあることが分かった。一方、bFGF で刺激すると刺激 3 日後より *Ki67* 陽性細胞がわずかに出現し、刺激 5 日後から 7 日後にかけてその数が急激に増加することが分かった (図 6A)。図 5 より、*Ki67* の発現量も bFGF 刺激 3 日後より急激に上昇しており、このタイミン

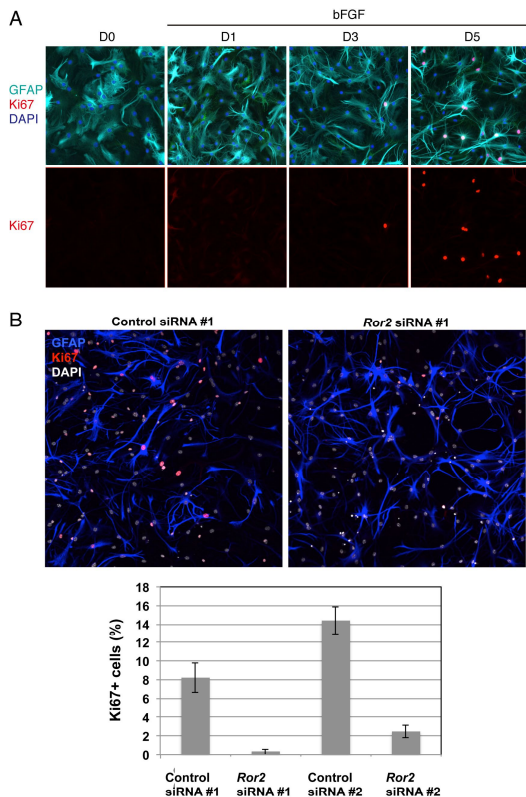


図 6. (A) bFGF 刺激前と刺激後における *Ki67* 陽性アストロサイト (B) bFGF 刺激依存性アストロサイトの増殖における *Ror2* の関与。下のグラフは、bFGF 刺激 5 日後の GFAP 陽性アストロサイトのうち *Ki67* 陽性細胞の割合を示す。

グと一致して、*Ror2* の発現量も上昇することから、*Ror2* の発現上昇がアストロサイトの増殖に關与するのではないかと考えられる。そこで、*Ror2* の発現抑制の影響について検討したところ、siRNA による *Ror2* の発現抑制により bFGF 刺激 5 日後における *Ki67* 陽性細胞の割合が顕著に減少することが明らかになった (図 6B)。この結果から、bFGF 刺激による *Ror2* の発現誘導は、アストロサイトが細胞周期の静止期 (G0 期) から増殖期 (G1/S 期) へと移行して増殖を再開するために必要であることが明らかになった。

(6) *Ror2* によるアストロサイトの増殖制御機構の解析

次に、*Ror2* による細胞周期制御機構を明らかにするために、細胞周期制御因子の関与について検討を行った。その結果、siRNA による *Ror2* の発現抑制により、細胞周期進行促進因子である *CyclinD2* の発現量が減少することが明らかになった (図 7)。この結果より、*Ror2* は *CyclinD2* の発現を促進することによって細胞周期の進行を制御していることが示唆された。

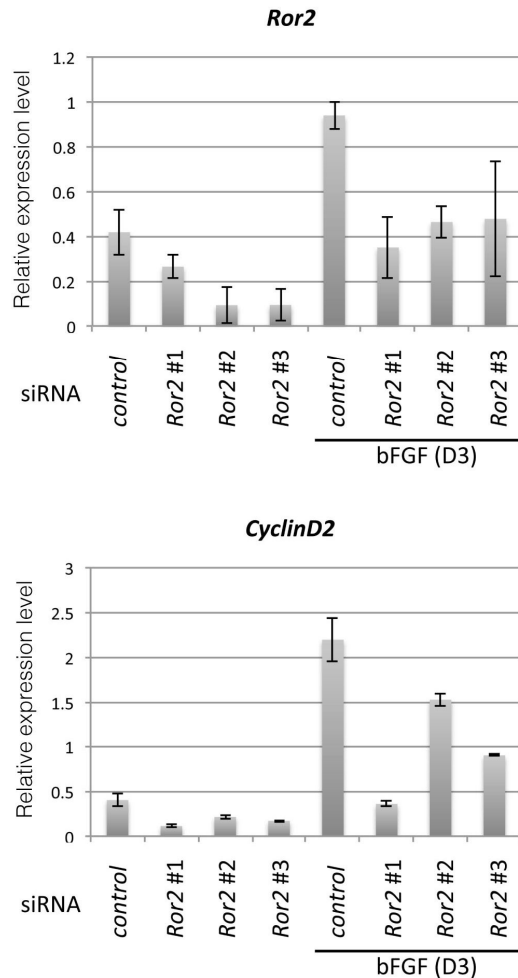


図 7. アストロサイトにおける *Cyclin D2* の発現量に対する *Ror2* 発現抑制の影響。bFGF 刺激前 (左 4 列) と刺激 3 日後 (右 4 列) における *Ror2* と *Cyclin D2* の相対的な発現量を示す。*Ror2* に対する siRNA はターゲット配列の異なる 3 種類の siRNA (#1, #2, #3) を使用した。

Ror1 と Ror2 は、動物の発生過程において様々な組織や器官で発現し、Wnt5a 受容体として働くことで、それらの構築に重要な役割を担っている。一方、成体においては Ror1 と Ror2 の発現は減弱するが、炎症やがんの進展などに伴って再び発現誘導され、それらの病態に密接に関与することが最近明らかになってきた。本研究により、成体マウスの脳内において、損傷に伴い活性化されるアストロサイトで Ror2 の発現が誘導されることが明らかになった。また、培養アストロサイトを用いた解析から、Ror2 は bFGF 刺激により発現誘導され、アストロサイトの増殖の再開に必要であることが示された。脳外傷などにより損傷を受けた脳内では、活性化アストロサイトが損傷部周囲で増殖し、その結果として瘢痕が形成されることが知られており、アストロサイトにおける Ror2 の発現誘導は、増殖を促進することで、瘢痕形成を促す役割を担っているのではないかと考えられる。アストロサイトによる瘢痕形成は、正常部と損傷部の境界を隔てることで炎症の拡大を阻止する働きをもつと考えられており、本研究成果は、脳内の損傷修復機構の理解に繋がる重要な知見であると考えている。また、アストロサイトは、正常な脳内の恒常性維持に必須の役割を担っていることから、その機能は厳密に制御される必要がある。特にアストロサイトの増殖は正常時には停止しており、損傷応答などの緊急時にのみ必要に応じて再開することが重要であると考えられることから、アストロサイトの増殖の再開に関わる Ror2 の発現制御機構の破綻と中枢神経疾患との関連についても興味をもたれる。

Ror1 も脳損傷後の損傷領域で発現誘導されることが示されたが、Ror1 がどの細胞で発現誘導されているのかは不明であり、その解明が今後の課題である。最近、乳癌や B 細胞リンパ腫などにおいて、Ror1 が過剰発現しており、これらの細胞では Ror1 が Ror2 とは異なる機能をもつことが明らかとなってきた。今後、脳損傷時に発現誘導される Ror1 の機能について Ror2 と比較して解析を行うことが重要である。

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., Nishita M., Fujii M., Minami Y.: Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. **Int. Rev. Cell. Mol. Biol.** 査読有、314, 2015, 117-148

Doi: 10.1016/bs.ircmb.2014.10.003.

Doi R., Endo M., Yamakoshi K., Yamanashi Y., Nishita M., Fukada S., Minami Y.: Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/ β -catenin signal in

myogenic cells during differentiation. **Genes Cells** 査読有、19, 2014, 287-296
Doi: 10.1111/gtc.12132.

[学会発表](計 5 件)

Kamisaki K., Doi R., Kato S., Fukada S., Kanagawa M., Toda T., Endo M., Minami Y., Role of NF- κ B-mediated expression of Ror1 during skeletal muscle regeneration. University of Washington and Kobe University International Joint Symposium, 2014. 12.15, Kobe-Portpia Hotel (Hyogo)
加藤 英、土井 亮助、遠藤 光晴、深田 宗一郎、金川 基、戸田 達史、南 康博、受容体型チロシンキナーゼ Ror1 による骨格筋制御、第 37 回日本分子生物学会年会、2014. 11. 27、パシフィコ横浜(神奈川県)
遠藤 光晴、加藤 英、疋田 壮舞、南 康博、反応性アストロサイトにおける Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼの役割、第 36 回日本分子生物学会年会、2013. 12. 3、神戸ポートアイランド(兵庫県)

Endo M., Minami Y., Functional analysis of Wnt5a-Ror signaling in regulation of progenitor proliferation during neocortical neurogenesis. 43th Annual meeting of the Society of Neuroscience, 2013. 11. 11, San Diego (USA)

遠藤 光晴、土井 亮助、西田 満、南 康博、炎症性サイトカインによりアストロサイトで発現誘導される Ror1 受容体の機能解析、2013 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ、2013. 8. 31、名古屋国際会議場(愛知県)

[図書](計 2 件)

遠藤 光晴、南 康博、羊土社、第 10 章 Wnt シグナル【Ror1/2】 **膨大なデータを徹底整理するサイトカイン・増殖因子キーワード辞典**, 2015, 420 (363-365)

Endo M., Minami Y., Nova Science Publishers, Regulation of neural progenitor cells by Wnt5a-signaling in the developmental central nervous system. **Progenitor Cells: Biology, Characterization and Potential Clinical Applications.** 2013, 149 (71-86)

[その他]

ホームページ等

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

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・助教

研究者番号：90436444