

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 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：25861276

研究課題名(和文)中枢神経損傷時のRacシグナルを中心とした神経機能回復メカニズムの解析

研究課題名(英文)The role of rac in recovery of motor function after central nervous system injury

研究代表者

甲田 将章 (KOHTA, MASAAKI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80590843

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)：脊髄損傷モデルを用いた検討により、アストロサイト特異的Rac1ノックアウト(KO)マウスでは、脊髄損傷後の運動機能回復が促進されることが示された。組織学的検討では、脊髄損傷部近傍に集積する反応性アストロサイトは、アストロサイト特異的Rac1 KOマウスで低下していた。神経膠腫細胞であるLN229細胞を用いた検討では、Rac1をノックダウンすると、遊走能、分裂能の低下が認められ、アストロサイトにおけるRac1は、遊走能、分裂能に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that in astrocyte-specific Rac1 knockout mice the recovery of the motor function after spinal cord injury was enhanced and reactive astrocyte around injury decreased. Knockdown of Rac1 expression in LN229 cells decreased cell migration and proliferation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アストロサイト Rac1 中枢神経損傷 脊髄損傷

1. 研究開始当初の背景

中枢神経が脳卒中、頭部外傷、脊髄損傷などの傷害を受けると、神経細胞の死滅や神経軸索の断裂により神経ネットワークは破壊され、運動機能の障害が生じる。神経ネットワークの自然再生能は限られているため、運動機能障害はしばしば永続的となる。

損傷を受けた中枢神経では、損傷周囲に反応性アストロサイトが集積し、グリア瘢痕と呼ばれる瘢痕組織を形成する。このグリア瘢痕は、損傷された神経軸索の再生を阻害する物理的バリアとなり得る。また、損傷部位に集積する反応性アストロサイトは、神経軸索の伸長を阻害するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを産生することがあきらかになっている。一方で、グリア瘢痕による損傷治癒や機能回復の促進作用についての報告もなされている。グリア瘢痕の形成により、炎症細胞の遊走や細胞の変性を局所にとどめることができ、損傷領域を最小限に抑えられると考えられている。このように中枢神経損傷後の反応性アストロサイトの機能は複雑であり、その作用は神経軸索再生阻害および促進のいずれの報告もあり、明確な結論が得られていない。

Rac は、Rho ファミリー (Rac1-3、RhoA-D、Cdc42、Rnd 等) 低分子量 G 蛋白に属しており、アクチン線維のネットワーク形成、葉状仮足 (lamellipodia) に関与していることが知られている。神経損傷後においては、損傷により活性化されるアストロサイトやマイクログリアの病巣への遊走やグリア瘢痕の形成に関連していると考えられる。Rac には、Rac1、2、3 のサブタイプが存在するが、Rac1 は全身の細胞、Rac2 は骨髄系細胞、Rac3 は主として神経細胞に発現することが知られている。グリア細胞及び神経細胞における Rac の役割 (特にグリア瘢痕が神経修復を促進するか増悪させるか) を解明するため、アストロサイト特異的 Rac1 ノックアウト (KO) マウ

ス、全身 Rac3 KO マウス、Rac1/Rac3 ダブル KO マウスを作製し、これまで研究をおこなってきた。

我々の施設では、高輝度放射線装置であるスプリング 8 を用いた研究で、マウス脳に高線量の局所放射線照射をおこない、マウス微小脳損傷モデルを作成することに成功している。アストロサイト特異的 Rac1 KO マウスの小脳に対する微小脳損傷モデルを用いた検討では、野生型マウスと比較して、小脳顆粒細胞の脱落幅には有意差を認めなかった ($18.52 \pm 0.79 \mu\text{m}$ vs. $19.99 \pm 0.88 \mu\text{m}$) が、損傷周囲のアストロサイトの染色性の低下を認めた。このことより、中枢神経損傷後の反応性アストロサイトの活性化には、Rac1 が関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

中枢神経損傷後、損傷部位にはアストロサイトなどの細胞が遊走し、組織修復に関与している。Rho ファミリー低分子量 G 蛋白に属する Rac は、細胞の極性や増殖のみならず、極性を有する細胞の方向性遊走や神経突起 (軸索および樹状突起) の伸長に関与しており、中枢神経損傷後においても重要な役割を果たしていると考えられる。中枢神経損傷後のアストロサイトにおける Rac の役割を解明し、Rac の機能を制御することによる神経機能回復の促進について検討することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷後の反応性アストロサイトにおける Rac1 のはたらきについて検討するため、アストロサイト特異的 Rac1 KO マウスを用いた実験をおこなった。マウス脊髄損傷モデルを作成し、損傷後の運動機能を評価した。対照群として野生型マウスを用いて比較検討した。脊髄損傷は、脊髄 L1 レベルに 6.5g のおもりを 7mm の高さから落下させ作成した (圧挫モデル)。下肢運動機能は BMS スコア

を用いて評価した。下肢運動機能の詳細な評価をおこなうため、富山大学和漢医薬学総合研究所神経機能学分野で開発されたBSSスコアを用いた検討もおこなった。運動機能の評価は脊髄損傷直後から損傷35日目までおこなった。

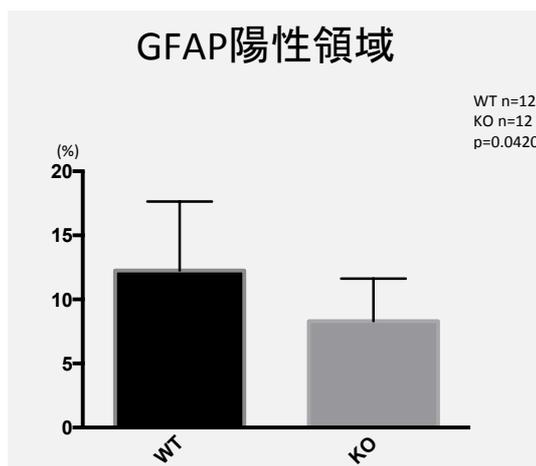
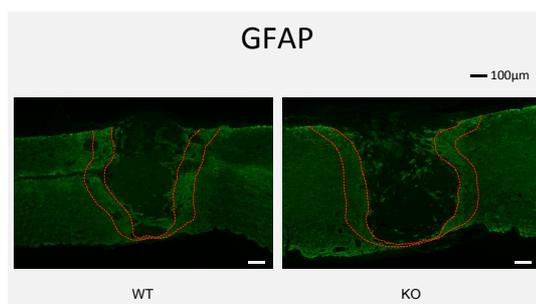
(2) 脊髄損傷後の反応性アストロサイトにに関して評価するため、組織学的検討をおこなった。脊髄損傷35日後の脊髄を採取し、損傷周囲のアストロサイトの集積について、GFAP染色を用いて検討した。採取した脊髄は矢状面でスライス(3 μ m)し、損傷中心より100 μ mの範囲におけるGFAP陽性領域の割合を算出した。

(3) アストロサイトの分裂能、遊走能におけるRac1の機能を評価するため、glioblastoma細胞であるLN229細胞を用いた検討をおこなった。LN229細胞におけるRac1をノックダウン(KD)し、以下の手法により分裂能および遊走能に関して検討した。分裂能については、細胞周期特異的蛍光プローブを用いて分裂周期時間を計測し、検討をおこなった。遊走能に関しては、Cell migration in scratch assayを利用して検討した。いずれの検討でもRac1KD(+)とRac1KD(-)のLN229細胞を比較した。

4. 研究成果

(1) 脊髄損傷後のBMS(Basso Mouse Scale)スコアを用いた運動機能評価では、Rac1KOマウスは亜急性期から有意な運動機能の回復を認め、損傷5週後でも有意な改善がみられた(4.70 vs. 2.79 (P<0.0001))。下肢運動機能の評価するBSS(Body Support Score)でも、同様に亜急性期からの有意な下肢運動機能回復がみられた(2.50 vs. 0.93 (P<0.0001))。

(2) 脊髄損傷5週後の組織学的検討では、アストロサイト特異的Rac1KOマウスにおいて、脊髄損傷部近傍(損傷中心より100 μ mの範囲)でのGFAP陽性領域の低下がみられた(8.303% vs. 12.25% (P<0.05))。



(3) Rac1KD(+)LN229細胞では、細胞分裂周期が有意に遅延していた。また、遊走能に関する検討では、一定時間内に細胞が遊走する距離が短くなっており、遊走能の低下が認められた。

以上のことより、Rac1は中枢神経組織損傷後のアストロサイトの反応性を増大させることが判明した。また、その反応を制御することにより、神経機能の回復を促進できる可能性があることが示された。

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)

[学会発表] (計2件)

(1) 石井 大嗣、上山 健彦、坂本 勲勇、執行 美智子、久保山 友晴、甲田 将章、東田 千尋、甲村 英二、齋藤 尚亮、アストロサイト特異的Rac1ノックアウトによる神経損傷回復促進、第124回薬理学会近畿支部、2013年11月1日、京都ガーデンパレス(京都)

(2) 甲田将章、上山健彦、執行美智子、近

藤威、久保山友晴、石井大嗣、東田千尋、齋藤尚亮、甲村英二、第 72 回脳神経外科学会総会、神経損傷後のアストロサイトの反応性には低分子量タンパク質 Rac1 が関与する、2013 年 10 月 16 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲田 将章 (KOHTA MASA AKI)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：80590843