

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670090

研究課題名(和文)骨形成因子(BMP)阻害因子によるアストロサイト移動制御機構

研究課題名(英文)The analysis of regulation mechanisms of astrocyte migration by Bone Morphogenetic Protein inhibitor

研究代表者

山岸 覚(Satoru, Yamagishi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：40372362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトは脳損傷時に脳室下帯で分裂を開始し、速やかに損傷部へと移行する。しかしながら損傷部への移動メカニズムの実態は良く分かっていない。申請者はこのような因子の1つとして、BMP阻害因子を見出した。BMP阻害因子を用いたストライプアッセイによって、アストロサイトに対する強い反発活性が見られた。また、初期エンドソーム・後期エンドソームへの取り込まれており、新規メカニズムでBMP阻害因子が機能している事を示が明らかとなった。さらに、中大脳動脈梗塞施術3日後、当該因子は、アストロサイトが侵入しない梗塞領域に非常に強く発現しており、NG2陽性ミクログリアから分泌されている事も判明した。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes start to divide in the subventricular zone at the brain injury and promptly move to the damaged area. However, the mechanism of migration to the region is not well understood. We found one of BMP inhibitor is a strong repellent to the astrocytes. Strong assay using BMP inhibitor showed the avoidance of astrocyte A1 cells to the protein. In addition, the BMP inhibitor was incorporated into the early endosome and late endosome, indicating the novel mechanisms. Furthermore, three days after the middle cerebral artery occlusion, the factor was highly upregulated in the infarct region where astrocyte did not invade, and was secreted from NG2 positive microglia.

研究分野：解剖学

キーワード：骨形成因子阻害因子 アストロサイト 脳梗塞 グリア瘢痕 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

発生過程において、アストロサイトはニューロジェネシス終了後、脳室下帯のラディアルグリアから分裂によって発生し、大脳皮質内に分布することが知られている(Greig et al., Nat. Rev. Neurosci., 2013)。アストロサイトには神経細胞や他のグリア細胞を栄養するだけでなく、血液脳関門を形成する重要な役割もある(Goldstein, Ann. NY. Acad. Sci., 1988)。一方で、脳損傷時には脳室下帯で分裂を開始し、速やかに損傷部へと移行することが最近、報告された(Benner et al., Nature, 2013)。これらアストログリア細胞は適材適所へと移動する際、様々な外的因子によって制御されていると考えられるが、その実態は良く分かっていない。申請者は近年、神経細胞が脳室帯や脳室下帯で誕生した後、多極性細胞になり、ガイダンス因子によって移動を制御されている事を報告した(Yamagishi et al., EMBO J., 2011)。アストロサイトはニューロジェネシス終了後に同じくラディアルグリアから誕生するが、アストロサイトの移動を規定する分泌因子はほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

申請者はこのような因子の1つとして、BMP 阻害因子が役割を担っている可能性を見出した。当該 BMP 阻害因子は古典的な背側化因子として知られており、腹側化の機能がある BMP2 濃度を阻害剤として不活化することにより腹側化を抑制している。また、ノックアウトマウスの解析により、骨形成因子に関わっていることが報告されている。中枢神経系の発生においては、ニューロジェネシスが終了し、アストロサイトが形成・成熟される頃(生後5日齢以降)から徐々に発現が上昇し、成体脳では非常に高い発現量が観察される(Allen Brain Atlas)。しかし、脳の成熟とともに発現上昇する当該 BMP 阻害因子の役割は全く分かっていない。

したがって、本研究課題では、当該 BMP 阻害因子がアストロサイトの移動を規定しているか、中大脳動脈結紮モデルを用いて当該分子の挙動を解析し、その機能を解明する事

に努めた。

3. 研究の方法

(1) ストライプアッセイを用いたアストロサイト反発作用の評価

当該 BMP 阻害因子リコンビナントを基質として縞状にコートしたストライプアッセイを行う事により、アストロサイトが反発作用を受けるかどうか、検討を行った。

(2) アストロサイトへの細胞内取り込み経路解析

当該 BMP 阻害因子は通常細胞外で作用すると考えられている。しかしながら、一般的なガイダンス因子は細胞内へと取り込まれる事が知られている。従って、当該分子が細胞内へと取り込まれているかを解析し、その細胞内経路について、免疫染色を用いて解析した。

(3) 脳梗塞・脊髄損傷モデルにおける Noggin によるグリア瘢痕形成阻害作用の解析

中大脳動脈を結紮することにより、脳梗塞モデルマウスを作出した。経時的に解析し、当該 BMP 阻害因子がどのように発現上昇してくるかを解析した。また、この時のアストロサイトの集積も抗 GFAP 抗体により染色し確認した。

4. 研究成果

(1) ストライプアッセイを用いたアストロサイト反発作用の評価

BMP 阻害因子を基質としてディッシュ上に予めコートし、マウス由来アストロサイトである A1 細胞を培養した所、24時間後、ほぼ全てのアストロサイトが BMP 阻害因子から反発するという事を見出し、再現性を確認した。タイムラプス顕微鏡を用いて詳しく観察すると、エンドサイトーシスにより蛍光標識した精製蛋白質が積極的に細胞内へと取り込まれていることを見出した。すなわち、細胞外で BMP の阻害因子として機能すると思われる分子が、おそらく BMP とは無関係に(受容体を介して)細胞内へ取り込まれていることを明らかとした。また、この反発活性はアストロサイトだけではなく、小脳顆粒細

胞に対しても反発活性を示したことから、神経細胞に対しても反発性ガイダンス因子として作用することを見出した。この反発性機能は軸索だけでなく、神経細胞体も反発作用を受けることが明らかとなった。すなわち、当該 BMP 阻害因子は培養アストロサイトや神経細胞軸索、細胞体は BMP 阻害因子より反発作用を受けていた。

(2) アストロサイトへの細胞内取り込み経路解析

当該 BMP 阻害因子は、細胞内への取り込み方法としてエンドサイトーシス経路についての解析も行った。その結果、初期エンドソームとの共局在、後期エンドソームとの共局在を確認した。しかしながら、両エンドソームに共局在する数は少なく、他の経路を介している可能性も考えられる。各種マーカーを用いてトランスゴルジネットワーク、リソソームやエクソソーム内に取り込まれている可能性を検討したが、現在の所、共局在は見られていない。

また、マウス由来アストロサイトである A1 細胞に対し、endocytosis 阻害剤である様々な濃度の MitMAB 存在下でスポットアッセイを行い、タイムラプスムービーを撮影して BMP 阻害因子に対する応答性を解析した。その結果、MitMAB により骨形成因子阻害因子のエンドサイトーシスは一部抑制する事ができたものの、反発作用は抑制されなかった。この結果から、2つの可能性が考えられる。すなわち、エンドサイトーシスをする事と、反発作用は関係がない事。もう1つは、MitMAB によるエンドサイトーシス阻害が不十分であったため、反発作用が見られてしまった事である。

(3) 脳梗塞・脊髄損傷モデルにおける BMP 阻害因子によるグリア瘢痕形成阻害作用の解析

中大脳動脈梗塞施術3日後、アストロサイトの集積及び BMP 阻害因子の発現を抗体により免疫染色を行った。BMP 阻害因子の発現は、非常に興味深い事に、アストロサイトの集積していない部分に非常に強く発現していた。また、BMP 阻害因子の発現細胞を種々の細胞マーカーを用いて同定を試みた所、NG2 陽性

ミクログリアである事が判明した。これは、脳実質に内在しているミクログリアではなく、損傷部位から侵入して来る単球由来のミクログリアであることが判明した。

これらの結果は、当該因子がアストロサイトに対して反発的に作用している事、血中に存在する単球に発現する BMP 阻害因子の発現を操作する事により、脳梗塞損傷領域・グリア瘢痕形成が改善できる可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

*Hattori T., Kaji M., Ishii H., Jureepon R., Takarada-Iemata M., Ta H.M., Le T.M., Konno A., Hirai H., Shiraishi Y., Ozaki N., Yamamoto Y., Okamoto H., Yokoyama S., Higashida H., Kitao Y., Hori O. CD38 positively regulates postnatal development of astrocytes cell-autonomously and oligodendrocytes non-cell-autonomously. (2017) *GLIA*, 査読有、65(6):974-989, doi: 10.1002/glia.23139.

Kesavamoorthy G, Mikawa S, Kusakawa Y, Sato T, Miyagi M, Yamagishi S*, Sato K*. BMP signaling-related proteins are differentially expressed in the adult cerebellum. *J Brain Sci*, *in press*, 査読有り

Yamagishi S*, Kesavamoorthy G, Bastmeyer M and Sato K. Stripe assay to study the attractive or repulsive activity of a protein substrate using dissociated hippocampal neurons, **J Vis Exp**, 112, 2016, 査読有、doi: 10.3791/54096.

Ta H.M., Le T.M., Ishii H., Takarada-Iemata M., Hattori T., Hashida K., Yamamoto Y., Mori K., Takahashi R., Kitao Y., *Hori O. Atf6 α deficiency suppresses microglial activation and ameliorates pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. (2016) *Journal of Neurochemistry*, 査読有、139(6):1124-1137, doi: 10.1111/jnc.13714.

Le T.M., Hashida K., Ta H.M., Takarada-Iemata M., Kokame K., Kitao Y., *Hori O. Deletion of Herpud1 enhances heme oxygenase-1 expression in a mouse model of Parkinson's disease. (2016) *Parkinson's Disease*,

査読有、2016;2016:6163934、doi: 10.1155/2016/6163934.

Kezuka D., Takarada-Iemata M., Hattori T., Mori K., Takahashi R., Kitao Y., *Hori O. Deletion of *Atf6a* enhances kainate-induced neuronal death in mice. (2016) *Neurochemistry International*、査読有、92:67-74、doi: 10.1016/j.neuint.2015.12.009.

Yamagishi S*, Yamada K, Sawada M, Nakano S, Mori N, Sawamoto K and Sato K, Netrin-5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain, *Front Cell Neurosci*, 9, 146.1-9, 2015, 査読有、doi.org/10.3389/fncel.2015.00146

*Takarada-Iemata M. 中枢神経障害時におけるアストロサイト活性化調節機構 (2015) *Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry*、査読無、54(3):63-68.

Yoshikawa A., Kamide T., Hashida K., Ta H.M., Inahata Y., Takarada-Iemata M., Hattori T., Mori K., Takahashi R., Matsuyama T., Hayashi Y., Kitao Y., *Hori O. Deletion of *Atf6a* impairs astroglial activation and enhances neuronal death following brain ischemia in mice. (2016) *Journal of Neurochemistry*、査読有、132:342-353、doi: 10.1111/jnc.12981.

*Takarada-Iemata M., Kezuka D., Takeichi T., Ikawa M., Hattori T., Kitao Y., *Hori O. Deletion of N-myc downstream-regulated gene 2 attenuates reactive astrogliosis and inflammatory response in a mouse model of cortical stab injury. (2014) *Journal of Neurochemistry*、査読有、130:374-387、doi: 10.1111/jnc.12729.

〔学会発表〕(計8件)

葉山瑠美、膜貫通型反発性ガイダンス分子 FLRT2 による血管形成機構、第 122 回日本解剖学会全国学術集会、2017.3.28、長崎

山岸覚、Netrin-5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain. 第 58 回日本神経化学学会大会、2015.9.13、大宮

山岸覚、新規軸索ガイダンス分子 Netrin-5 の神経新生領域における発現、日本解剖学会第 75 回中部支部学術集会、2015.10.3、福井

Satoru Yamagishi, The role of FLRT2, a

new axon guidance molecule indevelopment of the vascular systems. 血管生物学会春期シンポジウム、2016.6.3、大阪

Satoru Yamagishi. Roles of axon guidance molecule FLRT2 in development of vascular system. 第 120 回日本解剖学会総会、2015.3.21-23、神戸

山岸覚、反発性ガイダンス因子 FLRT2 による血管形成機構、日本解剖学会第 74 回中部支部学術集会、2014.10.11-12、金沢

山岸覚、佐藤康二、反発性神経軸索ガイダンス因子 FLRT2 による突起伸長抑制、第 57 回日本神経化学学会ポスター、2014.9.29-10.1、奈良

中野秀、山岸覚、山田浩平、澤田雅人、森則夫、澤本和延、佐藤康二、Netrin-5 の成体マウス神経新生関連領域における特異的発現、第 120 回日本解剖学会総会、2015.3.21-23、神戸

〔図書〕(計10件)

山岸覚、Hot Gene (MHC1 / PUMA) 脳 21、19、86-87、2016

山岸覚、Hot Gene (GDF10 / IGSF11) 脳 21、19、74-75、2016

山岸覚、Hot Gene (NELL2 / -Secretase (MT5-MMP)) 脳 21、金芳堂、京都、18、74-75、2016

山岸覚、Hot Gene (Sil1 / Kataninp80) 脳 21、金芳堂、18、227-228、2015

山岸覚、Hot Gene (Netrin-5 / PICALM) 脳 21、金芳堂、18、217-218、2015

山岸覚、Hot Gene (Na,K-ATPase a3 / b2-microglobulin) 脳 21、金芳堂、18、341-342、2015

山岸覚、Hot Gene (Mysterin / GINIP) 脳 21、18、112-113、2015

山岸覚、Hot Gene (BTBD3 / MEGF10) 脳 21、17、2014、246-247、2014

山岸覚、Hot Gene (FLRT3 / Chornichon2) 脳 21、17、369-370、2014

山岸覚、Hot Gene (SDCCAG8 / LRRC8) 脳 21、7、503-504、2014

〔その他〕

英文総説

Yamagishi S*, Ishida K, Taguchi A and Sato K : The unsolved mystery of PARK3 locus of Parkinson's disease, EC Neurology, 5, 192-195, 2017、査読有、
<https://www.econicon.com/ecne/pdf/ECNE-05-00141.pdf>

Akita T*[#], Kumada T[#], Yoshihara S[#], Egea J[#] and Yamagishi S[#] : Ion channels, guidance molecules, intracellular signaling and transcription factors regulating nervous and vascular system development, J Physiol Sci, 66, 175-88, 2016 ([#]contributed equally) 、査読有、
doi: 10.1007/s12576-015-0416-1

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山岸 覚 (Satoru Yamagishi)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：40372362

(2)研究分担者

宝田 美佳 (Mika Takarada)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：40565412