

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20055

研究課題名(和文) 周術期脳傷害に対する再生医療の応用を目指した基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research on application of regenerative medicine to perioperative brain injury

研究代表者

太田 晴子(OTA, Haruko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90534751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、成体の脳における神経細胞の再生が証明され、再生医療への応用が期待されている。神経細胞移動制御因子としてGmipに注目し、発現抑制ベクターの導入で、神経細胞の速度が加速されることがわかった。また、Gmipの下流のRhoAが新生神経細胞に発現し、形態変化や移動速度に関与する可能性を見出した。そこで、GmipあるいはRhoAの抑制により、障害部位への新生神経細胞の移動を促進する治療法の確立を目指した。

RhoAシグナル阻害剤、Rho関連タンパク質キナーゼ阻害剤、スタチン類などの新生神経細胞への影響を検討や、マウス脳傷害モデルでの検討も行ったが、明確な結果が出ておらず、さらなる検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：In recent years, regeneration of nerve cells in the adult brain has been proved and application to regenerative medicine is expected. Focusing on Gmip as a regulator of neuronal cell migration, it was found that the introduction of the expression suppressing vector accelerated the speed of nerve cells. We also found that RhoA downstream of Gmip is expressed in new neurons and may be involved in morphological change and migration rate. Therefore, we aimed to establish a therapeutic method to promote the movement of new neurons to the injured site by suppressing Gmip or RhoA.

We examined the effects of RhoA signal inhibitor, Rho-related protein kinase inhibitor, statins, etc. on new neurons and examined them in the mouse brain injury model, but no clear results were obtained and further investigation is going.

研究分野：麻酔科学

キーワード：再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

麻酔科医にとって周術期中枢神経障害は、最も注意すべき合併症のひとつである。周術期は、侵襲ストレスや特有の手術手技などにより、脳血管障害や低酸素脳症を来すリスクが通常より高い。一旦損傷を受けた脳は不可逆的な機能障害を来すことが多く、現在行われている様々な脳保護療法を含め、有効な治療法がほとんどないのが現状である。

一方、脳には生涯にわたって神経幹細胞が存在することが明らかとなっている。げっ歯類の側脳室の脳室下帯に存在する神経幹細胞から産生されたニューロンは嗅球まで移動し、介在ニューロンへと分化し、既存の神経回路に組み込まれる。これらのニューロンは嗅球神経回路の維持や嗅覚機能に関与することが分かってきた (Sawada et al., J Neurosci 2011, Kato et al., PLoS One 2012)。さらに、いくつかの脳傷害動物モデルを用いた研究により、脳室下帯で産生されたニューロンのごく一部が損傷部位へと移動することも明らかとなり、再生への関与が示唆されている (Yamashita et al., J Neurosci. 2006, Kojima et al., Stem Cells 2010)。しかしながら、これらのニューロンを適切な速度で正確な位置まで移動させるために、細胞内でのどのような分子機構が働いているのかという点については完全には解明されていない。

申請者は、まず脳室下帯から嗅球へ移動するニューロンに着目し、移動を制御するメカニズムの解明を目指し、新生ニューロンの移動にアクチン結合分子 Girdin が関与することを明らかにした (Wang et al., J Neurosci, 2011)。Girdin は細胞骨格の制御により細胞遊走を制御することが報告されているが、新生ニューロンの移動を制御するメカニズムについては未だ不明である。そこで、申請者は、最近、プロテオミクス的手法を用いて生後早期のマウスの脳内で Girdin と相互作用する分子群を網羅的に探索し、脳室下帯から嗅球へのニューロン移動を制御する新規細胞内蛋白質の同定を試みた。その結果、アクチンや微小管といった細胞骨格の動態制御に関与する分子を複数同定することに成功した (Ota et al., Biochem Biophys Res Commun. 2013)。

いくつかの方法を用いて同定した Girdin 相互作用分子のうち、低分子量 G 蛋白質 RhoA の制御因子である Gmip に着目した。RhoA は様々な細胞の形態や遊走に関与することが知られており、Gmip は RhoA の分子スイッチとして作用し、その活性を制御する。申請者らのグループは、移動中の新生ニューロンにおいて RNA 干渉法と蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) システムを用いた解析により、Gmip が細胞内の局所的な RhoA 活性を制御して、ニューロンの移動速度や最終的な定着位置を調節することを明らかにした (Ota et al., Nature Communications 2014)。このことが

ら、生後も継続的に新生されるニューロンが目的地に移動する際のメカニズムの一端が明らかとなった。

本研究では、脳内を移動する新生ニューロンに注目し、これまでの研究で明らかとなった、Gmip および RhoA による新生ニューロンの移動制御メカニズムを応用し、脳が損傷を受けた際のニューロンの移動への関与の有無を明らかにして、新たな治療法の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、脳内を移動する新生ニューロンに注目し、これまでの研究で明らかとなった、Gmip および RhoA による移動制御メカニズムを応用して、脳が損傷を受けた際のニューロンの移動への関与の有無を明らかにし、内在性の新生ニューロンの傷害部位への移動を促進する新たな治療法の開発を目指すこととした。

## 3. 研究の方法

生後マウス脳内を移動する新生ニューロンの移動制御メカニズムについて、さらに解析を進めるとともに、脳が損傷を受けた際のニューロンの移動に関わるメカニズムの解明、および脳内を移動するニューロン移動を促進する治療法の開発を目的とした研究を計画した。

### (1) マウスの脳における新生ニューロン移動機構の解析

生後早期のマウス脳室下帯をマトリゲル内で三次元培養し、まずは新生ニューロンの移動様式を観察した。

次に Gmip の関与を明らかにするために、Gmip 抑制あるいは過剰発現遺伝子ベクター (Ota et al., Nature Comms. 2014) を導入した場合のニューロンの動きを解析した。

### (2) 脳損傷部位へ移動するニューロンにおける Gmip の関与の確認

申請者の所属する研究室では、いくつかの脳傷害モデルを確立している。当該分野に精通している名古屋市立大学再生医学分野の澤本氏に技術的助言を求め、マウス低酸素脳虚血モデル (Kako et al. Stem Cells 2012)、マウス中大脳動脈閉塞モデル (Yamashita et al., J Neurosci. 2005) を参考に、組織学的に脳傷害を確認し、脳室下帯から傷害部位へのニューロン移動が確認できるモデルの作成を検討した。また、同モデルにおいて、脳室下帯から傷害部位へ移動するニューロンに Gmip が発現しているかどうかについての

組織学的解析を検討した。さらに、Gmip 抑制あるいは過剰発現遺伝子ベクター (Ota et al., Nature Communications 2014) を用いて、Gmip がこれらのニューロンの移動に関与するのかどうかの確認を目指した。

#### (3) ニューロン移動を促進する治療法の開発

生後早期のマウス脳室下帯をマトリゲル内で三次元培養し、既存の薬物を用いて、ニューロンの動きの解析を試みた。

さらには、傷害モデルにおける、傷害部位への新生ニューロンの移動に与える薬物の影響も検討することとした。

薬物には、RhoA シグナル阻害剤、Rho 関連タンパク質キナーゼ阻害剤、スタチン類を採用した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウスの脳における新生ニューロン移動機構の解析

まず、生後早期の野生型マウスの脳を用いて、ニューロンの三次元培養と脳スライス培養の行い、培養中のニューロンの移動について解析した。

先行論文で示されたように、培養中のニューロンは形態を変化させながら移動することが観察された。また、ニューロン新生部位である脳室下帯からニューロン定着部位である嗅球までニューロンが移動する際、その速度が嗅球近くで減速することを明らかにした。Gmip が新生ニューロンに発現していることを確認し、さらにはニューロン移動制御因子として着目した Gmip の発現抑制遺伝子ベクターを導入したニューロンを用いた解析により、野生型ニューロンより移動速度が促進し、減速が弱くなることが明らかになった。

Gmip の過剰発現遺伝子ベクターを導入したニューロンを用いた解析により、野生型ニューロンより移動速度が減速する可能性を示唆する結果を得ているが、今後の確定的な検討を要する状況にある。

Gmip の新生ニューロンの減速作用の機序を解明するため、Gmip の下流分子である RhoA に着目し、RhoA が新生ニューロンに発現することを確認した。移動中の新生ニューロンの形態変化とともに、細胞内の RhoA の活性化部位が変化することも明らかにした。このことから、Gmip の新生ニューロンの減速作用には、RhoA が関与している可能性が示唆されたが、治療薬の開発のためにはさらに詳細な機序の解明が必要である。

#### (2) 脳損傷部位へ移動するニューロンにお

#### ける Gmip の関与の確認

マウス低酸素脳虚血モデルとマウス中大脳動脈閉塞モデルは、安定したモデルの作成に成功した。傷害部位に向かって、一部の新生ニューロンの移動が生じることを確認できた。これらの傷害部位への移動における Gmip の役割を明らかにするため、脳室下帯から傷害部位へ移動するニューロンに Gmip が発現しているかどうかについての組織学的解析を検討したが、Gmip の役割を明確に示す結果を得ることができなかった。

そこで、Gmip 抑制あるいは過剰発現遺伝子ベクター (Ota et al., Nature Communications 2014) を用いて、Gmip がこれらのニューロンの移動に関与するのかどうかの確認を目指した。遺伝子導入の方法を確立することはできたので、今後の研究の手技的な問題は解決できた。Gmip の抑制により、傷害部位への新生ニューロンの移動が促進する可能性を得ることができたが、確定的ではないため、今後さらなる検討が必要と考える。

#### (3) ニューロン移動を促進する治療法の開発

Gmip あるいは RhoA を抑制することにより、障害部位への新生ニューロンの移動を促進する治療法の確立を目指した。生後早期のマウス脳室下帯をマトリゲル内で三次元培養し、各種薬物を投与して、新生ニューロンの動きへの影響の解析を検討した。

RhoA シグナル阻害剤、Rho 関連タンパク質キナーゼ阻害剤、スタチン類を用いて、生後早期のマウス脳室下帯のマトリゲル三次元培養における新生ニューロンや正常脳スライスにおける新生ニューロンの移動への影響を検討したが、Gmip の役割を明確に示す結果を得ることはできなかった。

同様に、脳傷害モデルにおいて、RhoA シグナル阻害剤、Rho 関連タンパク質キナーゼ阻害剤、スタチン類の脳内投与が、傷害部位への新生ニューロンの移動に与える影響について検討したが、明確な結果は出なかった。更なる検討を今後行う必要があると考える。スタチンは、Rho と Rho 関連タンパク質キナーゼ阻害の効果があり、新生神経ニューロンの移動を促進する作用があれば臨床応用しやすいため、今後の詳細な検討が必要と考えている。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

Ota H, et al.

Gmip-mediated inactivation of RhoA controls speed of neuronal migration in

the postnatal mouse brain.  
the 45th annual meeting of the Society for  
Neuroscience, Chicago, USA, 2015

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

太田 晴子 (OTA, Haruko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：9 0 5 3 4 7 5 1