

令和元年8月30日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08258

研究課題名(和文)細胞外基質との相互作用によるアストロサイトの形態形成機構

研究課題名(英文) Mechanism of astrocyte morphogenesis by interaction with extracellular matrix

研究代表者

力武 良行 (Rikitake, Yoshiyuki)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50419488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：突起を形成するアストロサイトの培養法を樹立し、細胞外基質との相互作用に着目してアストロサイトの突起形成に関わる分子機構を解析した。アストロサイトの突起形成には、細胞外基質の一つであり脳内に豊富に存在するラミニン、ラミニン受容体の一つであるジストログリカン、アストロサイトに豊富に発現する水チャンネルであるアクアポリン4、アクアポリン4を裏打ちする -シントロフィン、ラミニン受容体の一つである 1インテグリン、Rap1 GTPase、及び、細胞骨格再構築の制御に重要なfocal adhesion kinaseが関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アストロサイトの突起形成に関わる分子機構として、ラミニンやその受容体であるジストログリカンを介する細胞内シグナルの重要性、とりわけアクアポリン4の重要性について初めて明らかにした。アストロサイトの突起の形態変化は、脳血管障害や神経変性疾患など多くの疾患で見られ、様々な役割を担っていることから、形態変化の分子機構や治療標的としての意義が明らかになり、アストロサイトの形態制御による新たな疾患治療法開発の端緒となる学術的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：We established a culture method of astrocytes that form processes, and analyzed the molecular mechanism involved in the formation of astrocyte processes, focusing on the interaction with extracellular matrix. We found that laminin which is one of the extracellular matrix and abundant in the brain, dystroglycan which is one of the laminin receptors, aquaporin 4 which is a water channel abundantly expressed in astrocytes, -syntrophin lining aquaporin 4, 1 integrin which is another type of the laminin receptors, Rap1 GTPase, and focal adhesion kinase, which is important for regulation of cytoskeleton remodeling, are involved in the formation of astrocyte processes.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：突起形成機構 アストロサイト アクアポリン4 ラミニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳内では、アストロサイトは外界からのシグナルに応答して、多数の突起を伸長して神経細胞や微小血管とコンタクトし、神経機能を制御している。しかし、これまでの初期培養法による初代培養アストロサイトは突起を形成しないために、突起形成の制御機構の解明は進んでおらず、依然として不明な点が多い。最近、私どもはこの点を克服すべく、突起を形成するアストロサイトの初期培養法を確立した。

2. 研究の目的

突起伸長と細胞運動とではともに細胞骨格系の動態変化が重要な役割を果たしていることから、本研究では、私どものこれまでの細胞運動時のシグナル伝達研究で得られた知見と技術を用いて突起を形成する培養アストロサイトに応用し、アストロサイトの形態形成の制御機構の解明を試みた。中でも細胞外マトリックス、とりわけラミニンとの相互作用の生理的役割の解明に焦点を絞って解析した。さらに、このアストロサイトを用いて単離脳血管との共培養系の構築を試みた。

3. 研究の方法

(1) アストロサイトの初期培養

マウス的大脑基底核原基からニューロスフェアを作製し、分化誘導して細胞外マトリックスのラミニンコート上で分散培養した。

(2) 突起形成

siRNA を用いて培養アストロサイトに発現しているラミニン受容体のジストログリカン、水チャンネルのアクアポリン 4 (AQP4)、AQP4 を細胞内で裏打ちしている β -シントロフィンなどをノックダウンした。F-アクチンとグリア線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) を蛍光免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて形態を観察した。突起の形態は Sholl analysis を用いて解析し、一次突起の数、二次突起の数および突起の長さは Image J を用いて計測した。

(3) 発現・リン酸化の評価

mRNA 発現は real-time PCR 法を用いて、タンパク発現はウエスタンブロット法を用いて評価した。focal adhesion kinase (FAK) の活性化に重要な Tyr397 残基のリン酸化は同部位のリン酸化特異的抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて評価した。

(4) 脳血管の単離とアストロサイトとの共培養系の構築

新生児マウスから脳血管を単離し、ニューロスフェアから分化誘導して作製したアストロサイトと共培養した。共培養 3 日後に、血管内皮細胞のマーカーである isolectin B4、GFAP および AQP4 に対する抗体を用いて三重蛍光免疫染色をおこなった。共焦点レーザー顕微鏡で連続的に画像を撮影し、脳血管とアストロサイトとの接着部の断面および輝度を解析した。

4. 研究成果

(1) 突起形成におけるラミニンとジストログリカンとの相互作用の役割

アストロサイトの突起形成は、ポリ-L-オルニチンやコラーゲンのコート上よりも、ラミニンコート上で有意に促進され、一次突起の数、二次突起の数および突起の長さのすべてが有意に増加した。しかし、血管内皮型ラミニンであるラミニン-411、-511 とアストロサイト型ラミニンであるラミニン-111、-211 との間には有意な差を認めなかった。配列の異なる 2 種類の siRNA を用いてジストログリカンをノックダウンしたところ、いずれの siRNA によっても突起形成は有意に抑制され、一次突起の数はコントロールと有意な差を認めなかったが、二次突起の数および突起の長さは有意に減少した。以上の結果から、アストロサイトの突起形成にはラミニンとその受容体であるジストログリカンの相互作用が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(2) 突起形成におけるジストログリカンからの細胞内シグナルの役割

配列の異なる 2 種類の siRNA を用いて β -シントロフィンをノックダウンしたところ、いずれの siRNA によっても突起形成は抑制され、一次突起の数はコントロールと有意な差を認めなかったが、二次突起の数および突起の長さは有意に減少した。また、ジストログリカンあるいは β -シントロフィンをそれぞれ 2 種類の siRNA を用いてノックダウンしたところ、AQP4 のタンパク発現は減少した。さらに、配列の異なる 2 種類の siRNA を用いて AQP4 をノックダウンしたところ、いずれの siRNA によっても突起形成は抑制され、一次突起の数はコントロールと有意な差を認めなかったが、二次突起の数および突起の長さは有意に減少した。AQP4 の阻害剤によっても同様の結果が得られた。反対に、AQP4 を遺伝子導入して過剰発現させたところ、突起形成は促進され、一次突起の数はコントロールと有意な差を認めなかったが、二次突起の数および突起の長さは有意に増加した。以上の結果から、ジストログリカンは AQP4 を介して突起形成を促進していることが明らかになった。

配列の異なる 2 種類の siRNA を用いて AQP4 をノックダウンしたところ、いずれの siRNA によっても細胞外マトリックスとの接着に重要な $\alpha 1$ インテグリンのタンパク発現は減少した。AQP4

あるいは 1 インテグリンをそれぞれ 2 種類の siRNA を用いてノックダウンしたところ、細胞骨格再構築の制御に重要な FAK のリン酸化が減少した。1 インテグリンのノックダウンによって、突起形成は抑制され、一次突起の数および二次突起の数は有意に減少したが、突起の長さはコントロールと有意な差を認めなかった。FAK 阻害剤によっても、FAK のリン酸化は減少し、突起形成は抑制され、二次突起の数および突起の長さは有意に減少したが、一次突起の数はコントロールと有意な差を認めなかった。1 インテグリンの活性化への関与が報告されている Rap1 GTPase を、Rap1a と Rap1b の 2 つのアイソフォームの siRNA を同時に用いてノックダウンすると突起形成は抑制され、一次突起の数、二次突起の数および突起の長さのすべてが有意に減少した。以上の結果から、AQP4 は 1 インテグリンを介して FAK の活性化を制御することによって、突起形成を促進していることが明らかになった。

(3) 突起形成における内在性ラミニンの役割

アストロサイトの突起形成は、ポリ-L-オルニチンのコート上でも観察されたことから、内在性のラミニンが突起形成に関与している可能性が示唆された。そこで、特異的 siRNA を用いてラミニンのノックダウンを試みたが、いずれの siRNA によっても十分にノックダウンさせることはできなかった。そこで、ラミニンを含む細胞外マトリックスの分泌に関与していると推測される Rab10 をノックダウンしたところ、突起形成は抑制され、一次突起の数、二次突起の数および突起の長さは有意に減少した。以上の結果から、アストロサイト内在性のラミニンが突起形成に関与している可能性が示唆された。

(4) アストロサイトと単離脳血管との共培養系の構築

新生児マウスから脳血管を単離し、ニューロスフェアから分化誘導して作製したアストロサイトと共培養した。共培養 3 日後には、アストロサイトは単離脳血管と接触していた。アストロサイトと単離脳血管との接触部位には、生体内と同様に、AQP4 のシグナルが濃縮して観察された。以上の結果から、アストロサイトは単離脳血管と接着していると考えられた。

ジストログリカンあるいは -シントロフィンそれぞれの特異的 siRNA を用いてノックダウンしたところ、接着部における AQP4 のシグナルの輝度が低下した。以上の結果から、本共培養系においても、アストロサイトと単離脳血管との接着部における AQP4 の局在には、ジストログリカンと -シントロフィンが重要であることが示された。さらに、アストロサイトと単離脳血管との接着部において、周皮細胞のマーカー分子である PDGFR のシグナルが強く認められた。したがって、アストロサイトは血管上の周皮細胞が存在している場所に突起を伸長しており、脳血管とアストロサイトとの接着形成には周皮細胞の局在が重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。以上の結果から、本モデルは生体内を少なくとも一部は反映した *in vitro* モデルになると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Sato J, Horibe S, Kawauchi S, Sasaki N, Hirata K, Rikitake Y. Involvement of aquaporin-4 in laminin-enhanced process formation of mouse astrocytes in 2D culture: Roles of dystroglycan and -syntrophin in the expression of aquaporin-4. *J Neurochem*. 2018;147(4):495-513.
DOI: 10.1111/jnc.14548.

Kawauchi S, Horibe S, Sasaki N, Hirata K, Rikitake Y. A novel *in vitro* co-culture model to assess contact formation between astrocytic processes and cerebral vessels. *Exp Cell Res*. 2019; 374(2019):333-341.
DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.12.006.

〔学会発表〕(計 5 件)

宇野 慎優、堀部 紗世、井上 咲那、後藤 麻友、西岡 詩織、河内 正二、佐々木 直人、平田 健一、力武 良行、ラミニンによるアストロサイトの突起伸長の促進、日本薬学会第 137 年会、2017
岡奈津美、河内 正二、垣内 貴瑛、小巻 美菜子、堀田 優衣、堀部 紗世、佐々木 直人、平田 健一、力武 良行、マウス脳血管とアストロサイトの相互作用モデルの構築、日本薬学会第 137 年会、2017

中江 友軌、堀部 紗世、井上 咲那、宇野 慎優、後藤 麻友、西岡 詩織、佐藤 淳哉、河内 正二、佐々木 直人、小林 成美、平田 健一、力武 良行、ラミニンによるアストロサイトの突起形成促進にはジストログリカンと -シントロフィンを介した AQP4 の発現が関与する、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017

濱口 康介、堀部 紗世、黒井 美希、坂口 恵亮、中江 友軌、橋本 紗季、山本 麻耶、河内 正二、佐々木 直人、平田 健一、力武 良行、ラミニンによるアストロサイト突起形成の分子制御機構、日本薬学会第 138 年会、2018

山本 麻耶、河内 正二、黒井 美希、中江 友軌、坂口 恵亮、橋本 紗季、濱口 康介、堀部 紗

世、佐々木直人、平田健一、力武良行、マウス脳血管とアストロサイトとの接着部での AQP4 局在に果たすシントロフィンおよびジストログリカンの役割、日本薬学会第 138 年会、2018

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：堀部 紗世

ローマ字氏名：HORIBE Sayo

所属研究機関名：神戸薬科大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号(8桁)： 50389110

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。