

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06486

研究課題名(和文) アストロサイトによるRor2を介した脳内炎症制御機構が組織修復に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Role of Ror2-mediated neuroinflammation in regulating function of reactive astrocytes during tissue repair

研究代表者

遠藤 光晴 (Endo, Mitsuharu)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：90436444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、損傷脳内の反応性アストロサイトにおいて発現誘導される受容体型チロシンキナーゼRor2の発現誘導機構と役割について解析を行った。本研究によりRor2の転写誘導におけるE2F1の関与が明らかになった。また、Ror2が転写因子Nrf2の核内蓄積を促進し、酸化ストレス耐性を促進する働きをもつことを明らかにした。反応性アストロサイトにおけるRor2の発現誘導は損傷修復の促進において重要な役割をもつが、その制御破綻による恒常的なRor2の発現上昇はアストロサイトーマの悪性化に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は脳の損傷修復機構を分子・細胞レベルで明らかにしたものである。本研究により損傷脳内の反応性アストロサイトが出血等により生じる酸化ストレスの存在下でも生存し、神経保護に働く分子機構が明らかになった。また、アストロサイト由来のがん細胞であるアストロサイトーマはこの仕組みを利用して悪性化していることが示唆された。今後、Ror2の発現誘導機構を標的としてこれを人為的に操作する方法を検討することにより、脳の損傷修復の促進や悪性腫瘍の抑制に働く新規治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the molecular mechanism inducing expression of receptor tyrosine kinase Ror2 and its role in reactive astrocytes in the injured brain. We revealed that E2F1 plays an important role in regulating transcriptional induction of Ror2. We also found that Ror2 promotes the nuclear accumulation of Nrf2 and promotes oxidative stress tolerance. Our findings suggest that induced expression of Ror2 in reactive astrocytes plays an important role in promoting tissue repair following injury, and constitutive expression of Ror2 due to its regulatory disruption might contribute to the malignant progression of astrocytomas.

研究分野：分子神経科学

キーワード：Ror2 アストロサイト グリア細胞 脳損傷 神経炎症 酸化ストレス Nrf2 グリオーマ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系に存在するグリア細胞の1つであるアストロサイトは、脳の炎症時に活性化され、反応性アストロサイトへと変化して正常時とは異なる機能を発揮することにより脳機能を制御する。近年、反応性アストロサイトが損傷修復などの保護的な機能に加え、神経変性疾患などの神経炎症時には神経傷害的な機能を発揮して病態の進行に寄与することが明らかになってきた。そのため、反応性アストロサイトの保護的な機能と傷害的な機能を担う分子機構を解明し、これを標的として神経炎症病態を改善する方法の開発に繋げることが強く求められている。反応性アストロサイトが発揮する機能は主に遺伝子発現誘導によって制御されている。しかしながら、反応性アストロサイトの多様性を生み出す遺伝子発現制御機構は未解明である。

申請者は、損傷脳内の損傷部近傍に位置する一部の反応性アストロサイトでは受容体型チロシンキナーゼ *Ror2* の発現が誘導されることを明らかにしている。*Ror2* は *Wnt5a* の受容体として働くことにより発生過程における組織や器官の形成に重要な役割を持つことが知られているが、損傷修復過程における役割は未解明である。また、アストロサイトにおける *Ror2* の発現誘導には FGF シグナルが関与することを見出しているが、FGF シグナルによる *Ror2* の転写制御機構は未解明である。

2. 研究の目的

損傷脳内の一部の反応性アストロサイトにおいて発現誘導される *Ror2* に着目して、その発現誘導機構と脳の損傷修復に果たす役割を解明することを目的とする。本研究を通して、反応性アストロサイトが神経保護作用や神経傷害作用を含む多様な機能を発揮する分子機構を解明し、これを標的として神経炎症病態を改善する方法の開発へと繋げる。

3. 研究の方法

(1) bFGF シグナルによる *Ror2* の転写制御機構の解析

血清不含の Opti-MEM 培地にて 24 時間培養した NIH3T3 細胞を用いて、bFGF で刺激後の *Ror2* の発現量の変化を qRT-PCR 法により解析した。また、ERT2-E2F1 安定発現 NIH3T3 細胞株を用いて、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) 処理後の *Ror2* の発現量の変化を qRT-PCR 法により解析した。さらに、E2F1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により ERT2-E2F1 と共沈する *Ror2* プロモーター領域の量について 4-OHT 処理の有無により比較解析を行った。

(2) *Ror2* の発現誘導における炎症性サイトカインの関与

血清不含培地 (DMEM/F12+Neurobrew-21) にて培養したアストロサイトを IL-1 β (10ng/ml), TNF- α (20ng/ml) 及び bFGF (20ng/ml) で刺激し、3 日後および 5 日後の *Ror2* mRNA とタンパク質の発現量についてそれぞれ qRT-PCR 法および Western blot 法により解析した。

(3) bFGF と炎症性サイトカインによる反応性アストロサイトの機能制御

血清不含培地 (DMEM/F12+Neurobrew-21) にて培養したアストロサイトを炎症性サイトカイン (IL-1 β +TNF- α) のみ、bFGF のみもしくは両者で刺激し、3 日後の遺伝子発現変化について RNA-Seq による網羅的な解析を行った。また、Stab wound injury による脳損傷モデルマウスを用いて脳損傷 3 日目の損傷部に存在する反応性アストロサイトを ACSA2 抗体を用いた FACS により単離し、非損傷脳内より単離したアストロサイトと比較して有意に高発現する遺伝子について RNA-Seq による網羅的な解析を行った。これらの解析により発現変動の認められた遺伝子について qRT-PCR 法による確認を行った。

(4) 反応性アストロサイトにおける *Ror2* の機能解析

Ror2 の発現を siRNA により抑制した培養アストロサイトを炎症性サイトカインと bFGF で刺激した時の遺伝子発現変化についてコントロール siRNA 導入細胞と比較して RNA-Seq による網羅的な解析を行った。また、免疫染色法により Nrf2 の細胞内局在を解析した。さらに、ヘミン (10mM) で 24 時間刺激後のアストロサイトの傷害の程度について培養液中に放出された LDH 活性を測定することにより評価した。

(5) アストロサイトーマの悪性化における *Ror2*-Nrf2 系の関与

cBioPortal を利用して低悪性度グリオーマに関する TCGA データベースを解析し、*Ror2* の発現量と予後との相関および *Ror2* の発現量と Nrf2 の標的遺伝子群の発現量との相関の有無を解析した。さらに、U251 細胞における *Ror2* の発現を siRNA により抑制した時の細胞増殖に与える影響について WST-8 を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) bFGF シグナルによる *Ror2* の転写制御機構の解析

培養アストロサイトを用いた解析から *Ror2* の発現は bFGF 刺激により誘導されることを見出している。線維芽細胞株である NIH3T3 細胞を血清飢餓状態で培養した後、bFGF で刺激した場合においても *Ror2* の発現誘導が認められたことから、この系を用いて bFGF シグナルによる *Ror2* の転写制御機構の解析を行った。血清飢餓状態の NIH3T3 細胞を bFGF で刺激すると 12 時間以内

に細胞周期 G1 期から S 期へと進行する。ドキシソルビシン処理により G1 期から S 期への細胞周期の進行を阻害すると *Ror2* の発現上昇が抑制されたことから、*Ror2* の発現誘導には細胞周期 S 期への進行制御が関与することが示唆された。G1 期から S 期への進行は転写因子 E2F によって制御されることが知られている。*Ror2* のプロモーター領域には E2F の結合配列が複数存在することから、本研究ではこれらの領域に E2F が結合することにより *Ror2* の転写が誘導される可能性について検証を行った。まず、ERT2-E2F1 を発現させた NIH3T3 細胞を用いて 4-OHT 処理により E2F1 を核内移行させたときの *Ror2* の発現変化について解析したところ、4-OHT 処理に依存して *Ror2* の発現量が上昇することが明らかになった (図 1A)。一方、転写活性に必要な C 末領域を欠損した ERT2-E2F1 Δ C 変異体を発現させた細胞を 4-OHT で処理した場合には *Ror2* の発現上昇は認められず、bFGF 刺激による *Ror2* の発現上昇が抑制されることが示された (図 1A)。また、ChIP アッセイを用いて ERT2-E2F1 の *Ror2* プロモーターへの結合を解析したところ、OHT 処理に依存して *Ror2* プロモーターへの結合が増加することが示された (図 1B)。

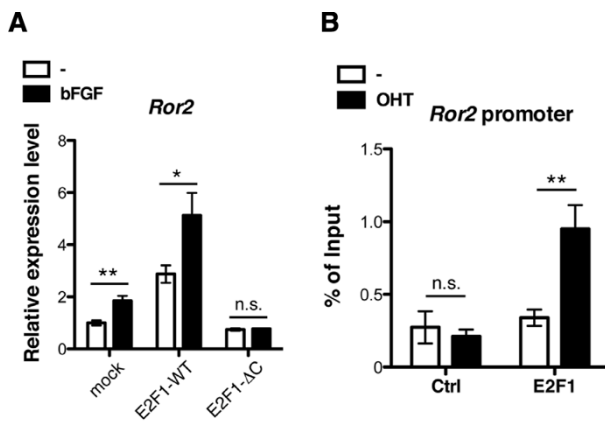


図1. *Ror2* の発現誘導における E2F1 の関与

以上の結果から、bFGF 刺激により活性化された E2F1 が *Ror2* プロモーターに結合することにより *Ror2* の転写誘導に働くことが明らかになった。本研究成果は *Ror2* の転写誘導機構を初めて明らかにしたものであり、今後 *Ror2* の発現制御による各種疾患等の治療法の開発を進めるうえで重要な知見である。

(2) *Ror2* の発現誘導における炎症性サイトカインの関与

損傷脳内において *Ror2* を発現する反応性アストロサイトは損傷部に集積した免疫細胞を取り囲むように分布する。これらの免疫細胞は IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインを産生することから、*Ror2* の発現誘導における炎症性サイトカインの関与について解析を行った。その結果、培養アストロサイトをこれらの炎症性サイトカインで刺激した場合においても *Ror2* の発現量が上昇することが明らかになった (図 2A, B)。さらに炎症性サイトカインと bFGF で同時に刺激したところ、それぞれの単独刺激と比較して *Ror2* の発現量が著しく上昇することが明らかになった (図 2A, B)。

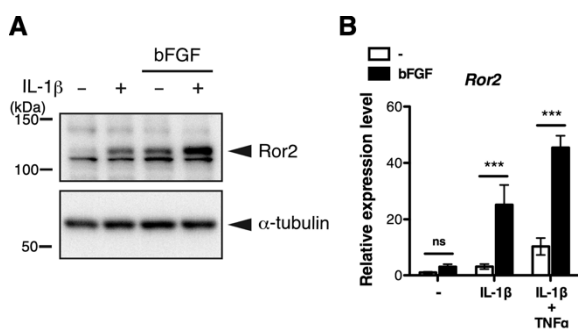


図2. *Ror2* の発現誘導における bFGF と炎症性サイトカインの協調作用

(3) bFGF と炎症性サイトカインによる反応性アストロサイトの機能制御

bFGF と炎症性サイトカインの共刺激によって発現が制御される遺伝子について網羅的な解析を行ったところ、*Ror2* のように共刺激に依存して発現が増強される遺伝子が複数存在することを見出した。また、炎症性サイトカイン刺激によって発現上昇する遺伝子の中には bFGF との共刺激により発現が抑制される遺伝子が存在することも見出した。損傷脳内の反応性アストロサイトで発現上昇する遺伝子についても網羅的な解析を行うことにより、bFGF で発現増強される遺伝子群の多くが損傷脳内の反応性アストロサイトで発現上昇するのに対し、bFGF で発現抑制される遺伝子群の多くは損傷脳内の反応性アストロサイトでは発現上昇しないことが明らかになった。さらに、bFGF 刺激によって発現増強される遺伝子群には神経保護的な反応性アストロサイトとして知られる A2 アストロサイト特異的遺伝子

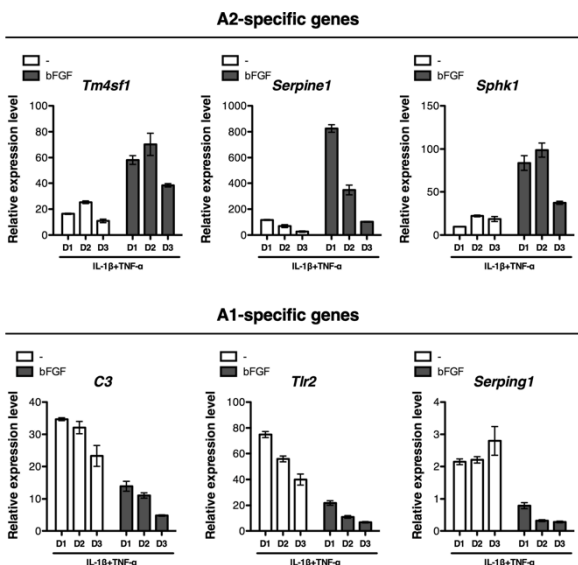


図3. A1およびA2アストロサイト特異的遺伝子群の発現制御における bFGF の関与

群が多く含まれるのに対し、bFGF 刺激によって発現抑制される遺伝子群には神経傷害的な反応性アストロサイトとして知られる A1 アストロサイト特異的遺伝子群が多く含まれることを見出した (図 3)。

以上の結果から、bFGF シグナルは損傷脳内において反応性アストロサイトが神経保護作用を発揮して損傷修復を促進するために重要な役割を担うと考えられる。

(4) 反応性アストロサイトにおける Ror2 の機能解析

炎症性サイトカインと bFGF との共刺激によって発現増強される遺伝子群のなかには 24 時間以内に発現増強される遺伝子群と 24 時間以上経過後に発現増強される遺伝子群が存在する。後者の遺伝子群は前者の転写産物の働きによって発現増強されることを想定し、その制御に Ror2 が関わる可能性を考慮して、Ror2 の発現誘導に依存して発現増強される遺伝子の有無について検討した。その結果、Ror2 の発現抑制によって bFGF 依存的な発現増強が抑制される遺伝子として *Hemoxygenase-1* (*HO-1*) を同定した (図 4A)。HO-1 は酸化ストレスに対する防御因子であり、転写因子である Nrf2 により転写誘導されることが知られている。そこで、Nrf2 の活性制御における Ror2 の関与について検討を行った。その結果、培養アストロサイトを炎症性サイトカインで刺激することにより Nrf2 の核内蓄積が認められ、bFGF との共刺激によって Nrf2 の核内蓄積が促進されること、Ror2 の発現を抑制したアストロサイトでは bFGF 刺激による Nrf2 の核内蓄積の促進作用が認められないことを見出した (図 4B)。さらに、アストロサイトの酸化ストレス耐性能における Ror2 の関与について検討したところ、Ror2 の発現を抑制したアストロサイトでは、ヘミン刺激による細胞傷害作用が増大することが明らかになった (図 4C)。

以上の結果から、損傷脳内の反応性アストロサイトにおける Ror2 の発現誘導は Nrf2 の活性化を促進することによりアストロサイトの酸化ストレス耐性能を亢進させる役割を持つことが示唆された。本研究成果は Ror2 が Nrf2 の活性制御を介して酸化ストレス耐性能の制御に働くことを初めて明らかにしたものである。

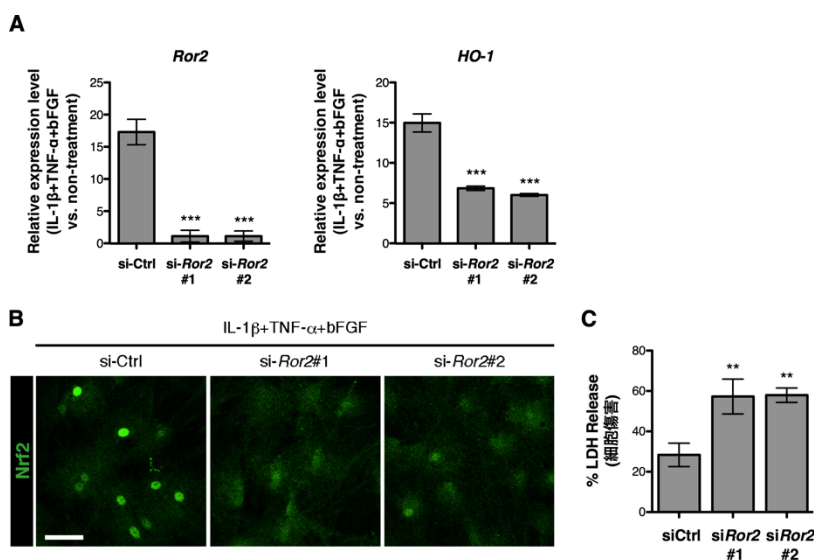


図4. Ror2によるNrf2の活性制御を介したアストロサイトの酸化ストレス耐性能

(5) アストロサイトーマの悪性化における Ror2-Nrf2 系の関与

正常な脳内においては Ror2 の発現はほとんど認められないが、脳損傷後のアストロサイトにおいては炎症性サイトカインや bFGF シグナルによって Ror2 の発現が誘導される。損傷脳内の反応性アストロサイトにおける Ror2 の発現上昇は一過的であり、炎症が収束すると Ror2 の発現上昇も収束する。一方、TCGA データベースを用いた解析から、アストロサイト由来の癌細胞であるアストロサイトーマにおいては Ror2 が高発現しており、Ror2 の発現量と予後に正の相関があることを見出した。さらに、アストロサイトーマにおいて Ror2 の発現量と Nrf2 の標的遺伝子群の発現量の間にも正の相関があることを見出した。アストロサイトーマ細胞株である U251 細胞を用いて解析を行ったところ、U251 細胞においては恒常的に Ror2 が発現しており、Nrf2 が核内に蓄積していることが明らかになった。さらに U251 細胞における Ror2 の発現を siRNA に抑制することにより Nrf2 の核内蓄積が減少し (図 5A)、増殖能が低下することになった (図 5B)。これらの結果から、Ror2 の発現誘導機構の破綻は Nrf2 の活性増強を介して癌の悪性化に寄与することが示唆された。

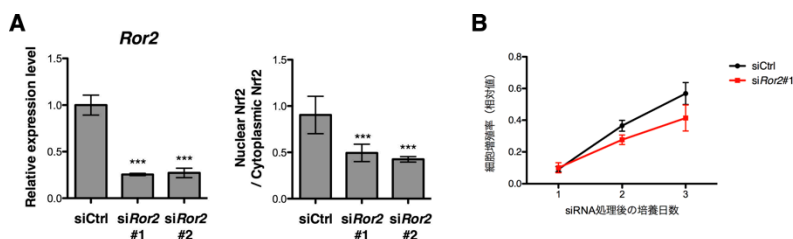


図5. アストロサイトーマU251細胞におけるRor2を介したNrf2の活性制御

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mitsuharu Endo Yuki Tanaka, Mako Otsuka, Yashuhiro Minami	4. 巻 34
2. 論文標題 E2F1-Ror2 Signaling Mediates Coordinated Transcriptional Regulation to Promote G1/S Phase Transition in bFGF-stimulated NIH/3T3 Fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 3413-3428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201902849R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 遠藤光晴、田中祐紀、大塚舞子、南康博
2. 発表標題 Critical role of Ror2 in regulating immature properties of astrocytes in the injured brain.
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Endo, M., Tanaka, Y., Otsuka, M., Minami, Y.
2. 発表標題 The molecular mechanism for generating functional diversity in reactive astrocytes.
3. 学会等名 Young Glia meeting 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka, Y., Endo, M., Miyamoto, A., Wake, H., Minami, Y.
2. 発表標題 Role of Ror2-expressing reactive astrocytes in the injured brain.
3. 学会等名 Young Glia meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤光晴、田中祐紀、大塚舞子、南康博
2. 発表標題 反応性アストロサイトの多様性を生み出す分子機構
3. 学会等名 リエゾンラボ炎症シンポジウムー北大、阪大、新潟大、神戸大合同研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中祐紀、遠藤光晴、南康博
2. 発表標題 Molecular mechanism regulating induced expression of Ror2 in reactive astrocytes and its role in the injured brain.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 祐紀、遠藤 光晴、大塚 舞子、宮本 愛喜子、和氣 弘明、南 康博
2. 発表標題 脳損傷後の神経回路再編成におけるアストロサイトの役割
3. 学会等名 イメージング数理研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsuharu Endo Yuki Tanaka, Mako Otsuka, Yashuhiro Minami
2. 発表標題 The role of Ror2 tyrosine kinase in neural stem/progenitor cells and reactive astrocytes.
3. 学会等名 Japanese-German YoungGlia collaborative meeting for mutual research exchange (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤 光晴、田中 祐紀、大塚 舞子、南 康博
2. 発表標題 Ror2シグナルを介したアストロサイトによる脳損傷修復機構
3. 学会等名 シグナル伝達医学研究展開センタ 若手道場
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関