

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19756

研究課題名(和文)脳内環境変化によるメンタルヘルス破綻 その分子機序の解明とPTSDの治療への応用

研究課題名(英文)Disruption of mental health induced by changes in brain environment: molecular mechanism and application to treatment of PTSD

研究代表者

森川 吉博(Morikawa, Yoshihiro)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60230108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：可溶性TROYとヒトIgG1のキメラ蛋白(TROY-Fc)を用いて成獣マウスの脳におけるTROYリガンドの局在を組織学的に検討した結果、海馬のGFAP陽性の血管周囲アストロサイトに認められた。さらに、TROYからのシグナルを抑制するためにTROY-Fcを過剰発現したトランスジェニックマウスの脳の組織学的解析、及びin vitroでのTROYの過剰発現による機能解析の結果より、海馬の血管周囲アストロサイトのTROYリガンドがTROY陽性アストロサイトに結合し、SSeCKSの発現を制御することにより、血液-脳関門(BBB)の形成や透過性の維持に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液-脳関門(BBB)の破綻は高度のストレス負荷による高次脳機能障害を惹起するだけでなく、脳血管障害やアルツハイマー病などの中枢神経疾患の発症や病状進展においても注目されている。本研究において、TROYがアストロサイトによるBBBの成熟や維持に関与している可能性を示唆したことは、TNFRスーパーファミリーの新たな機能を発見しただけでなく、TNFRスーパーファミリーがBBBの破綻による中枢神経疾患の発症の病態に重要な役割を担う可能性を示唆したという観点からも学術的意義が高い。将来的には、TROYのシグナル伝達を標的として脳内環境の修復を目指す分子標的療法の開発につながることも期待される。

研究成果の概要(英文)： To investigate the localization of TROY ligand in the brain, we used a chimeric protein consisting of the extracellular domain of mouse TROY and the Fc portion of human IgG1 (TROY-Fc). Double-immunofluorescence staining revealed that TROY-Fc was localized in GFAP-positive perivascular cells, suggesting that TROY ligands may be produced in perivascular astrocytes. To further elucidate the role of TROY and its ligand in the CNS in vivo, we generated transgenic (TG) mice expressing TROY-Fc under CAG promoter, in which TROY-Fc neutralize TROY ligands. Western blot analysis showed that expression levels of SSeCKS were significantly lower in the hippocampus of TG mice compared with wild-type mice. Overexpression of TROY in an astrocytoma cell line revealed that TROY signaling induced the protein expression of SSeCKS. These results indicate that TROY signaling in astrocytes may be involved in the formation and maintenance of BBB through the regulation of SSeCKS.

研究分野：健康科学、神経科学

キーワード：腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー 血液 脳関門 心的外傷後ストレス障害 運動 ストレス

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)TROY は腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリーのメンバーで、2000年に我々がクローニングし(J Biol Chem, 2000)、発達過程の神経上皮細胞や放射状グリアに発現していることを報告した(Brain Res, 2003)。2005年に後根神経節細胞において TROY が神経再生阻害因子である Nogo のレセプターの co-receptor として機能すると報告され(Neuron, 2005; Neuron, 2005)、神経再生阻害因子としての TROY の役割が注目された。しかし、正常状態では中枢神経系の神経細胞には TROY の発現は見られないということが報告された(Mol Cell Neurosci, 2007)。我々も、生後、及び成獣の中枢神経系においては、神経前駆細胞や成熟神経細胞ではなく、未分化な神経幹細胞や線維性、及び原形質性アストロサイトに発現し、神経細胞への分化を抑制し、アストロサイトへの分化に関与する可能性を報告してきた(Eur J Neurosci, 2006; Brain Res, 2006)。2012年に発達過程の脳の血管形成に TROY が関与していることが報告された(Dev Cell, 2012)が、生後のアストロサイトの分化・成熟期から成獣にかけて、中枢神経系における TROY の役割は不明である。

(2)TROY リガンドに関しては、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ )が TROY と結合し、毛包の発生に関与するという報告がある(Cell Cycle, 2008)が、LT- $\alpha$ と TROY は結合しないという報告もあり(J Biol Chem, 2006)、一定の見解は得られていない。

### 2. 研究の目的

研究代表者は腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリーのメンバーである TROY をクローニングし、TROY がアストロサイトの分化に関与する可能性を報告してきた。TROY のシグナルの抑制を目的として、可溶性 TROY とヒト IgG のキメラ蛋白(TROY-Fc)を過剰発現したトランスジェニック(TG)マウスを作製したところ、TG マウスにおいて、血液-脳関門(BBB)の破綻、及びストレス負荷による心的外傷後ストレス障害(PTSD)の早期発症を認めた。近年、PTSD の治療法として運動療法が注目され、また、運動療法が BBB の破綻を修復することが報告されている。本研究の目的は、TROY シグナル不活性化による BBB の破綻と PTSD 発症の関連性を明らかにし、PTSD の運動療法における TROY シグナルの関与を検討することにより、TROY シグナルを用いた新しい PTSD 治療法の開発へと繋げることである。

### 3. 研究の方法

(1)生後の発達過程、及び成獣マウスの中枢神経系における TROY 発現細胞の同定

生後 0 日齢、7 日齢、14 日齢、21 日齢、及び成獣において、TROY と中枢神経系の種々の細胞のマーカーを用いて蛍光二重免疫染色法により検討した。

(2)TROY リガンドの局在の検討

TROY-Fc とアストロサイトのマーカーである GFAP との蛍光二重染色法により、成獣マウスの脳組織における TROY リガンドの局在を検討した。

(3) *in vivo* の実験系を用いた BBB の形成・維持における TROY の役割の検討

TROY のシグナルを抑制するために TROY-Fc を過剰発現したトランスジェニック(TG)マウスを用いて、BBB の形成・維持における TROY の役割を生体内で検討した。まず、成獣の野生型、及び TG マウスの脳におけるアストロサイトの数や脳内における局在を、アストロサイトのマーカーである GFAP の免疫染色法により解析した。次に、BBB の形成・維持や透過性に関連する分子(SSeCKS)の発現レベルをウェスタンブロット法により解析した。

(4) *in vitro* の実験系を用いたアストロサイトにおける TROY の役割の検討

TROY は過剰発現させることでその下流のシグナルを活性化できるため、グリオーマ(アストロサイトーマ)細胞株に TROY を IRES-GFP ベクターを用いて過剰発現させ、TROY、及び GFP 蛋白の発現を蛍光二重免疫染色法により確認した。また、TROY を過剰発現した細胞株において TROY の下流のシグナルの活性化が認められるかを確認するために、核分画を抽出し、TROY の下流のシグナル分子の一つである NF- $\kappa$ B、及び JNK の下流の転写因子の一つである *c-fos* の発現変化をウェスタンブロット法により解析した。次に、アストロサイトへの分化制御に関与する転写因子である *Hes1*、及び TROY 過剰発現細胞株において TG マウスで異常の認められた SSeCKS の発現変化についても同様の方法で解析した。

### 4. 研究成果

(1)発達過程、及び成獣マウスの中枢神経系における TROY 発現細胞の同定

TROY と中枢神経系の細胞の各種マーカーを用いて、生後 0 日齢、7 日齢、14 日齢、21 日齢、及び成獣の大脳皮質において蛍光二重免疫染色法を行った。生後 0 日齢(図 1A-1C)では、TROY 陽性細胞は全て BLBP 陽性で、生後 7 日齢でも多くが BLBP 陽性(図 1D-1F)であったことから、新生仔の初期において TROY は放射状グリアに発現していることが示唆された。生後 7 日齢、14 日齢(図 2)、21 日齢、及び成獣の大脳皮質では、GFAP、及び S100 $\beta$ 陽性のアストロサイトに発現していた。生後 0 日齢、7 日齢、14 日齢(図 3)、21 日齢、及び成獣において、TROY 発現細胞は NeuN、CNPase、Iba-1、CD31、PDGFR $\beta$ 陰性であったことから、神経細胞、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、血管内皮細胞、ペリサイトには発現していないことが判明した。これらの結果から、TROY は放射状グリアからアストロサイトへの分化、成熟期にかけて、これらの細胞に持続的に発現していることが示唆された。

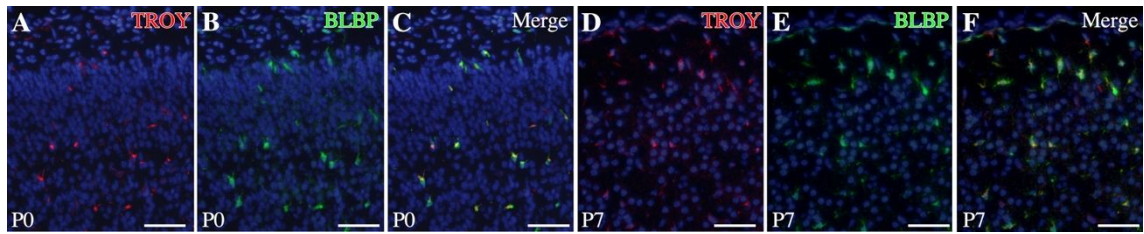


図1 大脳皮質における TROY(A, D; 赤)と BLBP(B, E; 緑)との蛍光二重免疫染色。生後0日齢(A-C)、及び7日齢(D-F)の大脳皮質の冠状断。C, Fは各々、AとB, DとEの重ね合わせ像。全てのパネルが DAPI(青)との重ね合わせ像。スケールバー: 50  $\mu\text{m}$ 。

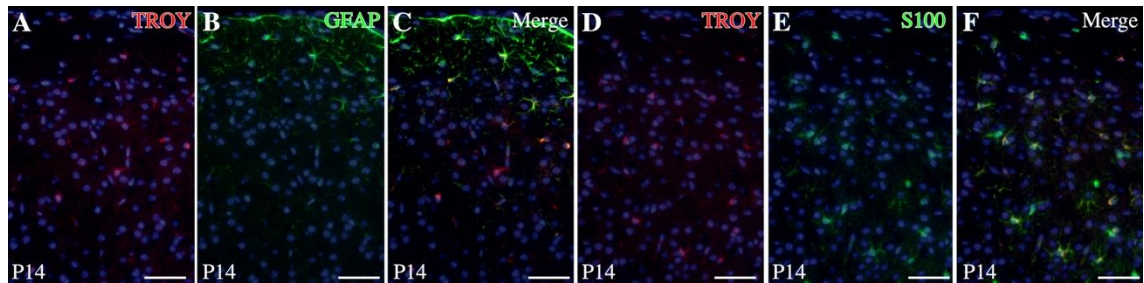


図2 大脳皮質における TROY(A, D; 赤)と GFAP(B), 及び S100(E)との蛍光二重免疫染色。生後14日齢の大脳皮質の冠状断。C, Fは各々、AとB, DとEの重ね合わせ像。全てのパネルが DAPI(青)との重ね合わせ像。スケールバー: 50  $\mu\text{m}$ 。

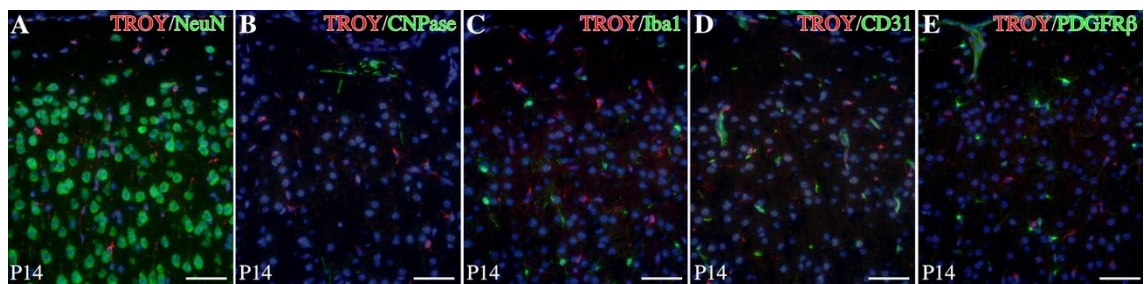


図3 大脳皮質における TROY(A-E; 赤)と NeuN(A, 緑), CNPase(B, 緑), Iba1(C, 緑), CD31(D, 緑), 及び PDGFR $\beta$ (E, 緑)との蛍光二重免疫染色。生後14日齢の大脳皮質の冠状断。全てのパネルが DAPI(青)との重ね合わせ像。スケールバー: 50  $\mu\text{m}$ 。

## (2) TROY リガンドの同定

脳における TROY リガンドの局在を TROY-Fc と GFAP の蛍光二重染色を用いて組織学的に検討した結果、海馬において GFAP 陽性の血管周囲アストロサイトに認められた(図4)。

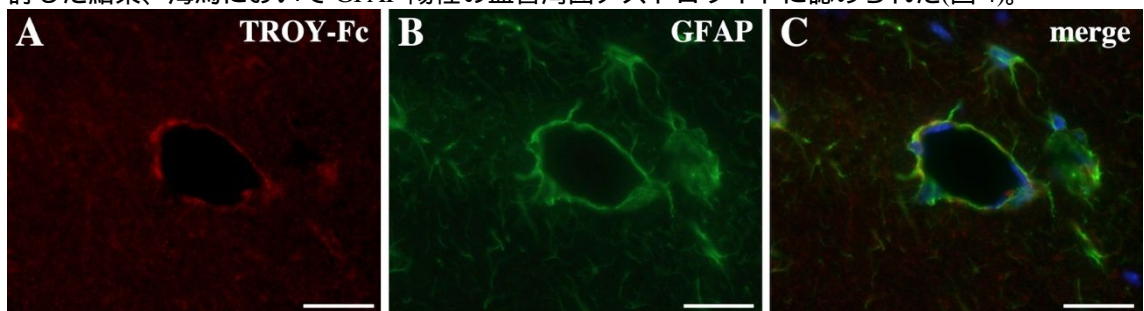


図4 海馬における TROY-Fc(A; 赤)と GFAP(B; 緑)の蛍光二重染色。成獣の野生型マウスの海馬の冠状断。CはA, B, 及び DAPI(青)との重ね合わせ像。スケールバー: 25  $\mu\text{m}$ 。

## (3) in vivo の実験系を用いた BBB の形成・維持における TROY の役割の検討

成獣の野生型、及び TG マウスの海馬や大脳皮質において、アストロサイトの数や脳内における局在をアストロサイトのマーカーである GFAP の免疫染色を用いて検討した結果、GFAP 発現細胞の数や脳内における局在に有意な差は見られなかった(図5A-5E)。さらに、BBB の維持や透過性に関連する分子(SSeCKS)の海馬における発現を、ウェスタンブロット法により解析した結果、野生型と比べて TG マウスにおいて有意な発現量の低下が見られた(図5F)。

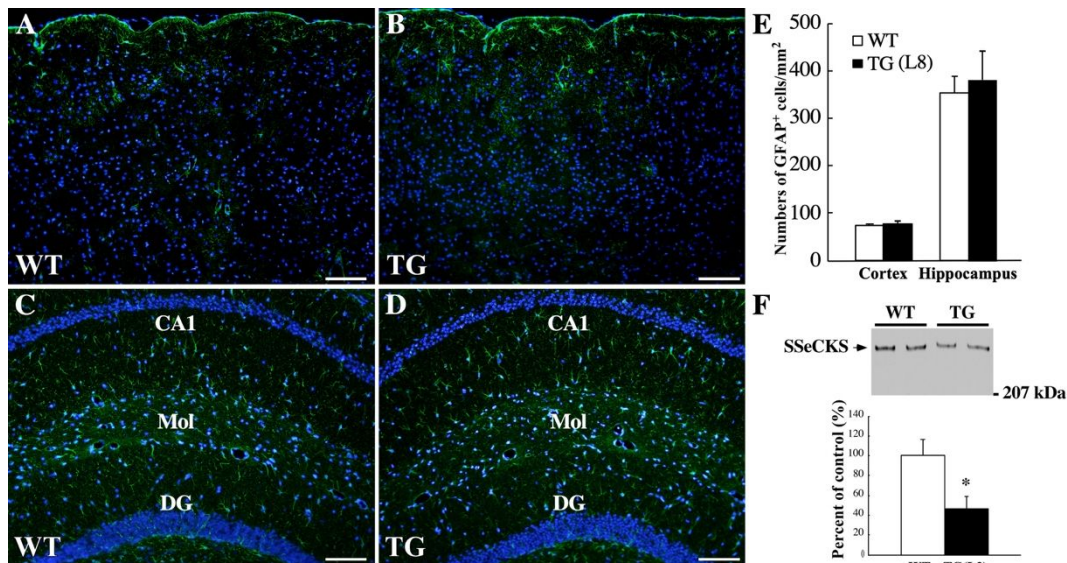


図5 野生型(WT)と TG マウス的大脑皮質(A, B)や海馬(C, D, F)における GFAP(A-D)、及び SSeCKS(F)の発現。(A-D)野生型(WT)と TG マウス的大脑皮質(A, B)、及び海馬(C, D)における GFAP(緑)の蛍光免疫染色像。全て DAPI(青)との重ね合わせ像。Mol; molecular layer(分子層), DG; dentate gyrus(歯状回)。スケールバー: 100  $\mu$ m。(E)野生型(WT)と TG マウス的大脑皮質(cortex)、及び海馬(hippocampus)における GFAP 陽性細胞数。(F)野生型(WT)と TG マウス的大海馬における SSeCKS 蛋白のウェスタンブロット解析(n=4, \*p<0.05)。

(4) *in vitro* の実験系を用いたアストロサイトにおける TROY の役割の検討

TROY-IRES-GFP ベクターを導入したグリオーマ(アストロサイトマ)細胞株とコントロールベクター(mock)を導入したグリオーマ細胞株において、TROY と GFP との蛍光二重染色を行った。その結果、TROY-IRES-GFP ベクターを導入した細胞株でのみ、TROY、及び GFP 陽性で突起を伸展している細胞が認められた(図 6A-6F)ことから、TROY の過剰発現によりアストロサイトへの分化が促進した可能性が示唆された。次に、TROY を過剰発現した細胞株から核分画を抽出し、TROY の下流のシグナル分子である NF- $\kappa$ B、及び JNK の下流の転写因子の一つである c-fos の発現変化をウェスタンブロット法により解析した。TROY を過剰発現した細胞株においてのみ、TROY の発現が認められ、核内での NF- $\kappa$ B や c-fos の発現レベルの増加が見出された(図 6G)。さらに、アストロサイトへの分化制御に関与する転写因子である Hes1、及び TG マウスで異常の認められた SSeCKS の発現変化について解析した結果、コントロールと比べて TROY 過剰発現細胞において、Hes1、及び SSeCKS の発現が増加していた(図 6G)。これらの結果から、TROY が Hes1、及び SSeCKS の発現とアストロサイトへの分化を促進している可能性が示唆された。

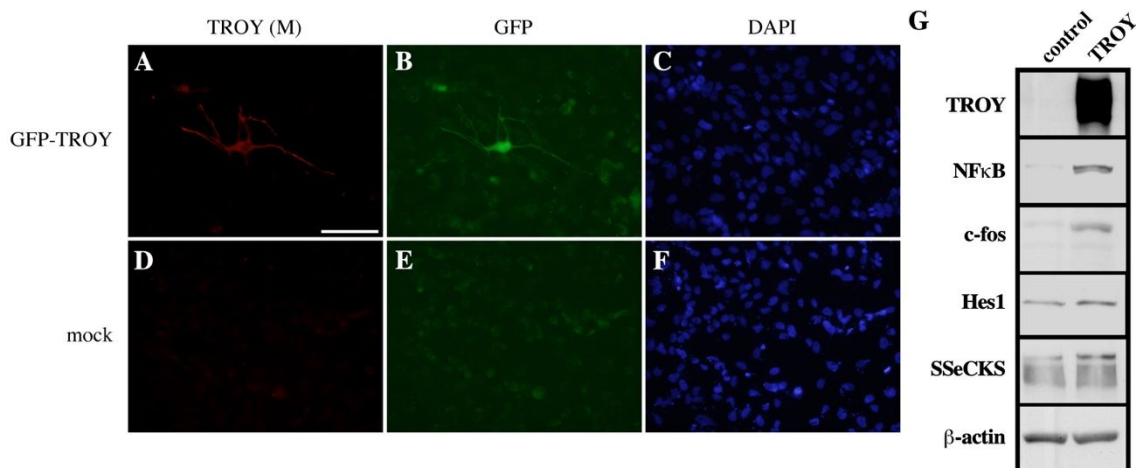


図6 グリオーマ細胞への TROY の過剰発現による機能解析。(A-F)TROY-IRES-GFP ベクターを導入したグリオーマ細胞株(A-C)とコントロールベクター(mock)を導入したグリオーマ細胞株(D-F)における TROY(A, D; 赤)と GFP(B, E; 緑)の蛍光二重染色像。C, F は DAPI(青)による核染色像。スケールバー: 100  $\mu$ m。(G)コントロールベクターを導入したグリオーマ細胞株(control)と TROY-IRES-GFP ベクターを導入したグリオーマ細胞株(TROY)における TROY、NF- $\kappa$ B、c-fos、Hes1、及び SSeCKS のウェスタンブロット写真。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hisaoka T, Komori T, Kitamura T, Morikawa Y.
2. 発表標題 Expression and potential roles of TROY, a member of the TNF receptor superfamily, in astrocytes.
3. 学会等名 10th IBRO World Congress of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久岡朋子、小森忠祐、北村俊雄、森川吉博
2. 発表標題 TNFレセプタースーパーファミリーのメンバー、TROYのアストロサイトにおける局在と機能
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020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
研究協力者	久岡 朋子  (Hisaoka Tomoko)		
研究協力者	小森 忠祐  (Komori Tadasuke)		