

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592086

研究課題名（和文）

損傷脳におけるグリア細胞による修復機構の解明

研究課題名（英文）

The study of repair mechanism by glial cells in injured brain

研究代表者

伊関 憲（ISEKI KEN）

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：70332921

研究成果の概要：

ヘパラン硫酸プロテオグリカンの一種であるアグリン (agrin) が脳損傷部位で発現するか否かを、in situ hybridization や免疫染色を用いて検討した。アグリン mRNA は脳損傷周囲のアストロサイトで7日目にもっとも強く発現することが判明した。免疫組織学的検討ではアストロサイトと血管周囲に発現しており、免疫電顕を用いることにより脳血管閉門を形成するアストロサイトの足突起に発現していた。また、損傷部位で神経誘導物質の FGF-2 や HBGM と共発現していた。これらのことからアグリンは損傷脳において神経回路の再生や脳血管閉門の修復に関与している可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード： グリオシス グリア細胞 反応性アストロサイト プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系にストレスが加わると、損傷部位にグリオシスとよばれるグリア細胞の反応が起こる。アストロサイトは反応性アストロサイト (reactive astrocyte) へ、ミクログリアは活性型ミクログリア (activated microglia) と形を変える。このグリオシスが神経再生の大きく関わっている。反応性アストロサイトはコンドロイチン硫酸プロテオグリカンのような神経伸長をさまたげる

ような物質を産生し、一般的には神経伸長阻害に働くとされる。

我々はプロテオグリカンの一種であるヘパラン硫酸プロテオグリカンに着目した。これまでコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが中枢神経系損傷部位に発現することは数多くの文献で示唆されてきた。しかしながらヘパラン硫酸プロテオグリカンについての報告はなかった。そこで我々はヘパラン硫酸プロテオグリカンの一種であるシンデカ

ンファミリー(Syndecan family)が脳損傷部位の反応性アストロサイトに発現することを報告した(Iseki K et al. Glia)。また、グリピカンファミリー(Glypican family)のうちグリピカン glypican-1 も脳損傷部位の反応性アストロサイトに発現していることが判明した(Hagino S, Iseki K et al. Glia)。この研究で最も興味深いのはシンデカンファミリーとグリピカン-1は反応性アストロサイト上で神経伸長に HBGAM(heparin-binding growth-associated molecule)や FGF2 と共発現していることであった。これらの研究からヘパラン硫酸プロテオグリカンは中枢神経系損傷部位で神経伸長に働き、脳保護に働いている可能性を示唆した。

2. 研究の目的

今回の研究ではヘパラン硫酸プロテオグリカンの一つであるアグリン (agrin) に着目した。アグリンは胎生期の中枢神経系において神経やグリア細胞に発現し、神経軸索誘導や脳血管閉門など重要な役割を担っている。そこでこれまでの研究からヘパラン硫酸プロテオグリカンは脳損傷部位で神経伸長に対する何らかの関与がある可能性を考えるうえでアグリンが脳損傷部位周囲に発現するか否かを検討しなければならない。また、脳損傷をおこした周囲の組織から血管新生がおり、破綻した脳血管閉門を修復して組織を修復していく。この過程において胎生期と同様に血管新生が脳損傷部位でも発現するのかをさらに検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 脳損傷モデル

成獣の ICR 雄マウスを実験に用いた。ジエチルエーテル麻酔下に凍結脳損傷を作成した。凍結脳損傷は液体窒素で冷却した鉛を頭蓋骨に一分間押し当てた。

マウスは損傷後 2, 4, 7, 14 日後にエーテル麻酔下に屠殺し、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定をおこなって脳を摘出した。摘出脳は 4%パラホルムアルデヒドに入れて 4、24 時間再固定した。その後 30%ショ糖液に移した後に OTC コンパウンドに包埋した。

その後 -80 に保存した後、クライオスタットで 10 μ m の厚さで冠状断の切片を作成し、スライド上に貼り付けた。これらの標本は in situ hybridization や免疫染色に用いた。

(2) in situ hybridization

in situ hybridization のためジゴキシゲニンアグリン cRNA プローブを作成した。Non-R1 in situ hybridization は Roche 社製

キットを用いて行った。標本に対してジゴキシゲニン agrin cRNA プローブを反応させ、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いた。その後 NBT/BCIP を用いて発色させた。

(3) 免疫染色

一次抗体にはウサギ抗アグリンポリクローナル抗体を用いた。また、二次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体を用い、DAB で発色させた。

(4) in situ hybridization 二重染色

in situ hybridization 二重染色をおこなうため FITC アグリン cRNA プローブを作成した。また、FGF2 と HBGAM の cRNA プローブはジゴキシゲニン標識で作成した。in situ hybridization の条件は上記と同様におこなった。FITC の増幅をおこなうために、TSA Fluorescence System (NEN Life Science Products) を用いた。

(5) 免疫電顕

免疫組織で得られた標本より、金コロイド標識として電子顕微鏡で検討した。

4. 研究成果

(1) 凍結脳損傷部位でのアグリン mRNA 発現

凍結損傷後 7 日目の脳を in situ hybridization によりアグリン mRNA が発現するか否かを検討した。



図1 損傷7日目のアグリン mRNA の発現
(a) anti-sense プローブ (b) sense プローブ
Ne: 壊死組織

アグリン mRNA は脳損傷部の壊死組織を取り囲むように発現していることが判明した。このため脳損傷部位でのアグリン mRNA が時間的、空間的にどのように発現しているかを検討した。損傷後 2 日目、4 日目、7 日目、14 日目の脳損傷部位での発現を比較検討した。

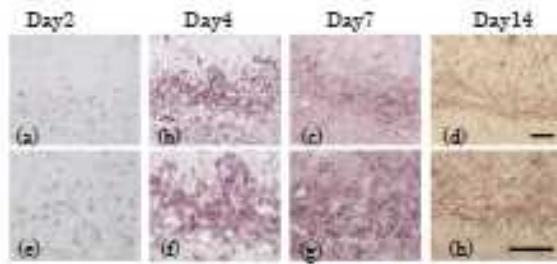


図2 アグリン mRNA の発現の時間的検討
(a,e) 2日目、(b,f)4日目、(c,g) 7日目、
(d,h)14日目

アグリン mRNA は損傷 2 日目より発現が始まり、4 日目から 7 日目にかけて強く発現する。14 日になるとその発現は弱くなる。

次いでアグリンの蛋白がどのように発現しているのかを検討するために免疫染色を用いた。

(2) 凍結脳損傷部位でのアグリン蛋白発現

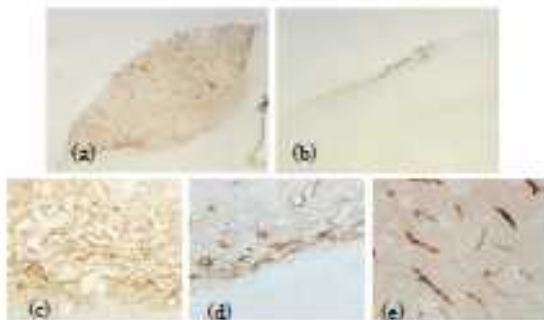


図3 アグリンの免疫組織学的検討

(a) 7 日目、(b)14 日目、(c,d) 7 日目の損傷部周囲の強拡大、(e) 7 日目の壊死組織の強拡大

アグリンは脳損傷周囲の組織と血管に発現していた。また、蛋白に発現は 14 日目にはほとんど認められなくなった。

そこで血管周囲に発現したアグリンの局在を明らかにするため免疫電顕をおこなった。

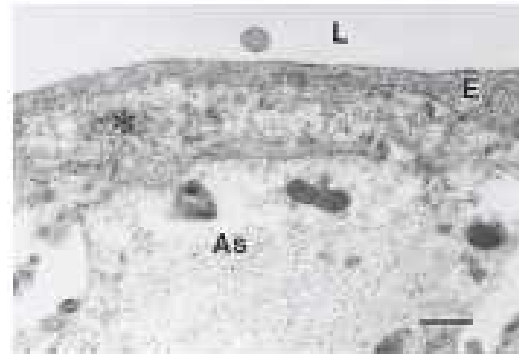


図4 血管周囲に発現したアグリンの局在解析

アストロサイトの足突起が血管周囲を取り囲んでいることが判明した。この足突起から血管内皮細胞外側の basal lamina にアグリンの集積を認めた。

(3) 組織学的検討によるアグリンの機能解析

図5に示すとおりアグリンには FGF2 や HBGAM のような神経軸索誘導物質との結合部位を持つ。胎生期にアグリンはグリア細胞の細胞膜上に発現し、FGF2 や HBGAM と結合することによって神経伸長を誘導する。

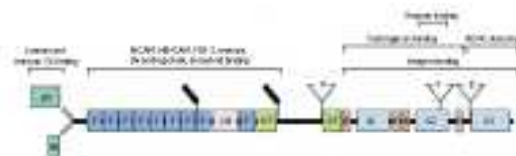


図5 アグリンの構造

(Smith MA, Neuroreport.13:1485 2002 より引用)

これまでの研究から脳損傷部位周囲に FGF2 や HBGAM が発現することが知られている。また、我々の研究からはヘパラン硫酸プロテオグリカンのシンデカンファミリーやグリピカン-1 が FGF2 や HBGAM と共発現しており、神経伸長に関わる可能性を示唆してきた。

このためアグリンと FGF2 や HBGAM がどのような関係があるのかを検討するために、in situ hybridization 二重染色をおこなった。

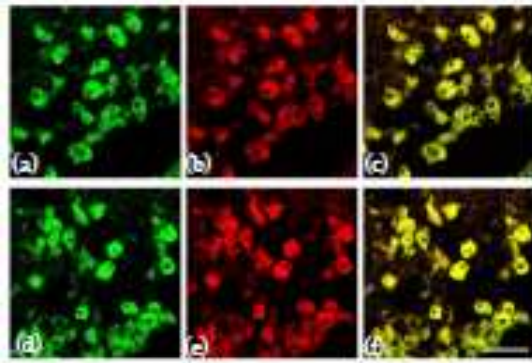


図6 アグリン mRNA と FGF2 mRNA や HBGAM mRNA の関係

損傷後7日目の脳で、アグリン mRNA と FGF2 mRNA や HBGAM mRNA は共発現していた。

(4) 考察

アグリン mRNA は脳損傷周囲に発現していた。そして発現パターンは4~7日後をピークに増加していた。これらの発現のパターンはシンデカンファミリーやグリピカン-1の発現パターンと同様であった。

アグリンは損傷部周囲のアストロサイトに発現していた。アストロサイトでは神経軸索誘導物質の FGF2 や HBGAM と共発現していた。これらは胎生期と同様に脳損傷部位で神経軸索誘導をおこなっている可能性が示唆された。

アグリンは損傷部周囲の血管周囲に発現していた。アストロサイトの足突起から basal lamina にかけて発現しており、胎生期と同様に破綻した脳血管関門の修復に関わっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Hasegawa H, Nakano T, Hozumi Y, Takagi M, Ogino T, Okada M, Iseki K, Kondo H, Watanabe M, Martelli AM, Goto K. Diacylglycerol kinase zeta is associated with chromatin, but dissociates from condensed chromatin during mitotic phase in NIH3T3 cells. J Cell Biochem. 2008;105:756-765 (査読有)

Goto K, Hozumi Y, Nakano T, Saino-S S, Kondo H: Cellular biology and

pathophysiology of diacylglycerol kinase family, an enzyme responsible for lipid second messenger metabolism: morphological aspects in tissues and organs. Int. Rev. Cytol. 2007;264:25-63 (査読有)

[学会発表](計 2 件)

Goto K: Nuclear diacylglycerol kinase zeta quickly disappears in neurons under ischemic conditions. Japan-Taiwan Joint Conference on Anatomy and Cell Biology, Sendai; 2007.8.7

Kaoru Goto. Functional implications of the diacylglycerol kinase family in the brain. 23rd Joint Annual Conference of Biomedical Sciences, Taipei, Taiwan; 2008.3.29

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊関 憲 (ISEKI KEN)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号: 70332921

(2) 研究分担者

後藤 薫 (GOTO KAORU)

山形大学・医学部・教授

研究者番号: 30234975