

平成21年 5月14日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890044

研究課題名（和文） 軸索伸展阻害因子 RGMa の免疫細胞における機能の解明

研究課題名（英文） Analysis of RGMa functions in immune cells

研究代表者

氏名（ローマ字）：久保 武一（KUBO TAKEKAZU）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：80451756

研究成果の概要：中枢神経軸索の再生阻害因子 repulsive guidance molecule (RGMa) が免疫細胞にどのような効果を示すかを検討した結果、RGMa は CD4 陽性ヘルパーT 細胞を含む免疫細胞を活性化することを見出した。また RGMa の作用を抑制することで、過剰な免疫反応により誘導される動物疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎が抑制されることを発見した。本結果は、RGMa が過剰な免疫反応を原因とする多発性硬化症などの中枢神経疾患の治療標的となることを示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳・神経，神経疾患，神経科学，免疫学，中枢神経傷害，神経免疫

1. 研究開始当初の背景

中枢神経軸索は、末梢神経軸索と異なり、傷害を受けると再生しないが、この原因の一つに、中枢神経軸索の進展を阻害する因子の存在が報告されている。研究代表者はこれら軸索伸展阻害因子の一つである repulsive guidance molecule (RGMa) に着目した。先行研究より、RGMa の作用をブロックすると、ラット脊髄損傷モデルにおいて、著名な中枢神経軸索の伸展を認め運動機能の回復が観察されていたことから、RGMa は中枢神経傷害時

における主要な軸索伸展阻害因子であると考えられた。従ってその機能の解析は、中枢神経傷害のメカニズムを解明し治療法を開発する上で大変重要であると考えられる。またこの研究過程で観察された興味深い実験結果として、RGMa の発現分布が挙げられる。RGMa は、他の軸索伸展阻害因子同様、オリゴデンドロサイトおよびミエリンでの発現に加えて、ニューロンならびにミクログリア/マクロファージにも発現が認められた。ミクログリア/マクロファージは CD4 陽性ヘルパ

一T 細胞に対して抗原提示能を持つ免疫細胞であり、これら免疫細胞における RGMa の発現は、RGMa の免疫系での作用を予想させた。しかしながら、RGMa の免疫系での作用に関しては全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、中枢神経傷害時に軸索伸展を阻害する因子として同定された RGMa の免疫細胞における機能を解明し、さらに RGMa を介して免疫細胞が中枢神経系にどのような影響を与えるかを解明することである。神経関連分子が免疫細胞の機能調節を行うことに関してはいくつかの報告があるものの、実際に免疫系と神経系のクロストークに関する報告は数少なく、本研究での解析対象である RGMa に関しては全く報告がない。また中枢神経系における自己免疫疾患の一つである多発性硬化症の動物モデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスの病態発症に RGMa の関与が認められれば、中枢神経関連分子 RGMa の免疫系での作用を強く指摘することが出来、また自己免疫反応を主病因とする中枢神経疾患である多発性硬化症などの治療標的としても RGMa が有望視できる。

3. 研究の方法

(1) RGMa の発現解析

抗原提示細胞の一種である培養樹状細胞が LPS 刺激で RGMa を発現するかどうかを、定量的 RT-PCR 法ならびにウェスタンブロット法で検討した。樹状細胞の分離培養は、研究代表者が従来行ってきた方法で行った (Kubo et al., J. Immunol. 173, 7249-7258 (2004))。

(2) RGMa 処理した免疫細胞の機能解析

免疫細胞である脾臓細胞を利用して、RGMa が免疫細胞表面に結合するかどうかを、フローサイトメトリー (FACS) で解析した。また脾臓細胞ならびに CD4 陽性ヘルパーT 細胞を組み換え型 RGMa で処理することにより、細胞内シグナル分子である低分子型 G 蛋白質 Rap1、RhoA の活性化が起こるかどうかを検討した。さらに免疫細胞において Rap1、RhoA の活性化は、細胞外基質への接着性の向上につながるということが知られているため、RGMa 処理した脾臓細胞の ICAM-1 に対する接着能を既存の方法で確認した (Katagiri et al., Nat. Immunol. 4, 741-748 (2003))。脾臓細胞ならびに CD4 陽性ヘルパーT 細胞の分離培養は

研究代表者が従来行ってきた方法で行う (Kubo et al., J. Immunol. 173, 7249-7258 (2004))。

(3) 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスの病態発症における RGMa の役割の解析

①ポリクローナル RGMa 中和抗体の作製

EAE マウスの病態発症における RGMa の役割を解析するにあたり、多くの RGMa 中和抗体が必要となるため、RGMa ポリクローナル抗体を作製した。作製方法は従来の方法に従った (Hata et al., J. Cell Biol. 173, 47-58 (2006))。また RGMa 中和抗体はアフィニティーカラムで精製後、実験に使用した。

②EAE マウスに対する RGMa 中和抗体の治療効果の検討

EAE マウスは C57BL/6 マウスにミエリンオリゴ糖蛋白の部分ペプチド (MOG35-55) を免疫することで作製した。作製方法は従来の方法に従った (J. Neuroimmunol. 131, 115-125 (2002))。この EAE マウスに RGMa 中和抗体 (500 μ g) もしくはコントロール抗体 (500 μ g) を病態誘導 7、10 日後に静脈内投与し、EAE 病態に対する治療効果を解析した。解析項目としては、EAE 病態スコアで尾ならびに前後肢の麻痺の度合いを検討した。

4. 研究成果

(1) RGMa の発現解析

RGMa の免疫系での作用を検討する目的で、獲得免疫系の最初の段階で CD4 陽性ヘルパーT 細胞に抗原提示を行い、免疫反応を惹起するとされる樹状細胞における RGMa の発現を、定量的 RT-PCR 法ならびにウェスタンブロット法を利用して解析した。その結果、定量的 RT-PCR 法により、無刺激群と比較して、10ng/ml~1000ng/ml の LPS 刺激に伴い、約 3~7 倍の RGMa mRNA の発現上昇が樹状細胞において認められた。またウェスタンブロット法により、10ng/ml~1000ng/ml の LPS 刺激に伴い、RGMa 蛋白質の発現増強が観察された。以上の結果は、活性化刺激により抗原提示細胞である樹状細胞において RGMa の発現が誘導されることを示しており、RGMa の免疫系での作用を強く示唆するものと考えられる。

(2) RGMa 処理した免疫細胞の機能解析

RGMa の免疫細胞に対する作用を検討する目的で、免疫細胞である脾臓細胞を利用して実験を行った。最初に RGMa が免疫細胞である CD4 陽性ヘルパーT 細胞ならびにマクロファージの表面に結合するかどうかを検討する目的で、FACS 解析を行った。その結果、CD4 陽性ヘルパーT 細胞ならびに CD11b 陽性マクロファージいずれに対しても、約 1 μ g/ml の濃度で飽和する形で組み換え型 RGMa が結合することが示された。次に RGMa が免疫細胞

を活性化するかどうかを検討する目的で、細胞内シグナル分子である低分子型 G 蛋白質 Rap1、RhoA の活性化を解析した。その結果、組み換え型 RGMa (1 μ g/ml) 刺激に伴い、脾臓細胞ならびに CD4 陽性ヘルパー T 細胞において Rap1 (図 1) 及び RhoA の活性化が認められた。

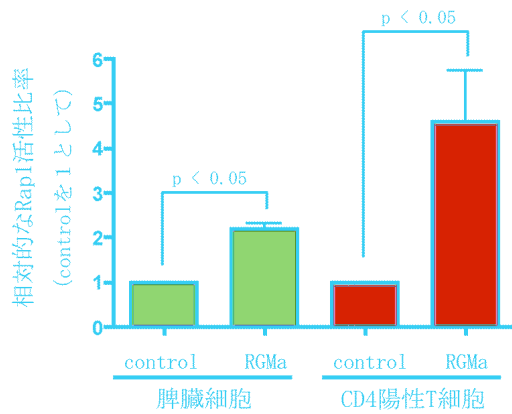


図 1. RGMa 刺激に伴う Rap1 の活性化

Rap1 及び RhoA の活性化に伴い、細胞外基質である ICAM-1 や fibronectin に対する細胞接着性が向上することが、免疫細胞において知られている。そこで組み換え型 RGMa 処理した脾臓細胞の ICAM-1 に対する接着性を解析したところ、未処理群と比較して、約 2 倍程度細胞接着性が向上することが示された (図 2)。以上の結果は、樹状細胞が発現した RGMa により CD4 陽性ヘルパー T 細胞などの免疫細胞が活性化され、免疫反応が増強されることを示唆する。

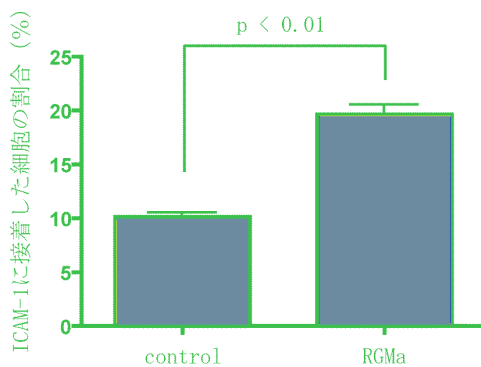


図 2. ICAM-1 に対する脾臓細胞接着性

(3) 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスの病態発症における RGMa の役割の解析
培養免疫細胞を利用した実験から、RGMa が免疫細胞に作用し免疫反応を増強する可能性が指摘された。そこで生体内での免疫反応における RGMa の役割を解析する目的で、過

剰な免疫反応を主病因として中枢神経障害を示す EAE マウスモデルで RGMa の役割を検討した。本目的の為に、RGMa の作用をブロックする RGMa 中和抗体を作製し実験に使用した。C57BL/6 マウスにミエリンオリゴ糖蛋白の部分ペプチド (MOG35-55) を免疫して EAE を誘導し、リン酸緩衝溶液に溶解した RGMa 中和抗体 (500 μ g) もしくはコントロール抗体 (500 μ g) を病態誘導 7、10 日後に静脈内投与して治療効果を解析した。EAE 病態の評価は、尾ならびに前後肢の麻痺を 0-5 でスコア化した EAE スコアで行った。スコアが高い程、麻痺が進行していることを示す。その結果、図 3 に示すように、RGMa 中和抗体を投与することで EAE 病態が顕著に抑制されることが観察された。またこの抑制効果は、EAE 誘導 14 日以降いずれも有意差 (p < 0.05) を持って観察された。

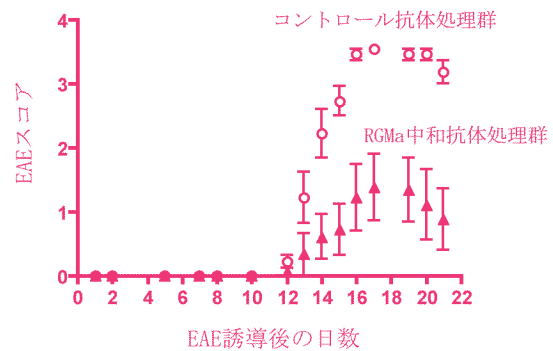


図 3. RGMa 中和抗体の EAE 病態抑制効果

以上の結果は、免疫細胞由来の RGMa が、CD4 陽性ヘルパー T 細胞等の活性化を中心とした過剰な自己免疫反応を増強することで、EAE 病態を増悪していることを示唆しており、RGMa の免疫系における新規作用として興味深い知見であると考えられる。また本研究結果は、多発性硬化症等の中枢神経系における自己免疫疾患の治療標的として RGMa が有望視出来ることを示しており、治療薬開発を考える上でも、重要な知見であると考えられる。

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 11 件)

① Ohshima Y, Kubo T (corresponding author), Koyama R, Ueno M, Nakagawa M, Yamashita T. Regulation of axonal elongation and pathfinding from the entorhinal cortex to the dentate gyrus in the hippocampus by the chemokine stromal cell-derived factor 1alpha. Journal of

Neuroscience 28, 8344-8353 (2008) 査読有り

② Fujita Y., Taniguchi J., Uchikawa M., Endo M., Hata K., Kubo T., Mueller B.K. and Yamashita T. Neogenin regulates neuronal survival through DAP-kinase. Cell Death and Differentiation 15, 1593-1608 (2008) 査読有り

③ Yoshida J., Kubo T. and Yamashita T. Inhibition of branching and spine maturation by repulsive guidance molecule in cultured cortical neurons. Biochemical and Biophysical Research Communications 372, 725-729 (2008) 査読有り

④ Suda M, Hata K, Sawada A, Nakamura Y, Kubo T., Yamaguchi A, Yamashita T. Peptides derived from repulsive guidance molecule act as antagonists. Biochemical and Biophysical Research Communications 371, 501-504 (2008) 査読有り

⑤ Kubo T (corresponding author), Yamaguchi A, Iwata N, Yamashita T. The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders. Therapeutics and Clinical Risk Management. 4, 605-615 (2008) 査読有り

⑥ Kubo T (corresponding author), Endo M, Hata K, Taniguchi J, Kitajo K, Tomura S, Yamaguchi A, Mueller BK, Yamashita T. Myosin IIA is required for neurite outgrowth inhibition produced by RGMa. Journal of Neurochemistry 105, 113-126 (2008) 査読有り

⑦ Taniguchi J, Fujitani M, Endo M, Kubo T., Fujitani M, Miller FD, Kaplan DR and Yamashita T. Rap1 is involved in the signal transduction of myelin-associated glycoprotein. Cell Death and Differentiation 15, 408-419 (2008) 査読有り

⑧ Matsuura I, Endo M, Hata K, Kubo T., Yamaguchi A, Saeki N, Yamashita T. BMP inhibits neurite growth by a mechanism dependent on LIM-kinase. Biochemical and Biophysical Research Communications 360, 868-873 (2007) 査読有り

⑨ Kaneko M, Kubo T., Hata K, Yamaguchi A, Yamashita T. Repulsion of cerebellar granule neurons by chondroitin sulfate proteoglycans is mediated by MAPK pathway. Neuroscience Letters 423, 62-67 (2007).

⑩ Kubo T (corresponding author), Hata K, Yamaguchi A, Yamashita T. Rho-ROCK inhibitors as emerging strategies to promote nerve regeneration. Current Pharmaceutical Design 13, 2493-2499 (2007) 査読無し

⑪ Kubo T (corresponding author), Yamashita T. Rho-ROCK inhibitors for the treatment of CNS injury. Recent Patents on CNS Drug Discovery 2, 173-179 (2007) 査読無し

[学会発表] (計1件)

① 久保武一 「RGMaの軸索伸展阻害効果はミオシン IIA を介する」第22回神経組織の成長・再生・移植研究会 平成19年5月26日 岡山コンベンションセンター

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/neurobio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 武一 (KUBO TAKEKAZU)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：80451756

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し