

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700342

研究課題名（和文） 脊髄損傷後の反応性アストロサイトの移動性獲得メカニズム

研究課題名（英文）Mechanisms of reactive astrocyte's migration after spinal cord injury

研究代表者

ルノー三原 フランソワ (Renault Mihara Francois)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：20570427

研究成果の概要（和文）：Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)の阻害剤を用いたアストロサイトの移動活性化メカニズムの詳細の解明と、脊髄損傷治療への応用を試みた。生化学的な実験系で特異的なシグナル阻害薬としての活性しか確認されていなかった GSK-3 特異的な阻害薬剤を脊髄損傷治療薬として応用するために、アストロサイトの移動に対してこの薬剤がどのような効果を示すのか、生体内・試験管内で詳細な検討を行い、客観的かつ定量的に評価した。その結果、脊髄損傷後の機能回復を助ける有用な効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Based on the observation that inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) stimulates the migration of astrocytes, the applicant was able to pharmacologically stimulate this beneficial effect of reactive astrocytes: the administration of a specific inhibitor of GSK-3 after contusive SCI resulted in an accelerated migration of reactive astrocytes that secluded inflammatory cells, reduced the size of the lesions scar, spared more myelinated fibers, and significantly enhanced functional improvement. These findings suggest that the pharmacological stimulation of reactive astrocyte migration holds promise as a new therapeutic strategy for the treatment of spinal cord injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：発生・発達・再生神経科学

1. 研究開始当初の背景

一般的に外傷後には、創傷治癒過程として損傷部を周辺の正常組織から隔離して、機能回復を図る過程があると言われている。

脊髄損傷後には二段階の損傷が存在することが知られており、一つは受傷直後の機械的損傷である一次損傷、そしてもう一つがそれに引き続いて起こる出血や炎症、浮腫によ

って損傷が拡大する二次損傷である。この二次損傷の際に生理的な状態ではあまり移動しないアストロサイトが「反応性」となって集積し、損傷部を囲むようにグリア瘢痕を形成し、脆弱な損傷組織の補強や破綻した血液脳関門の修復に働く。このグリア瘢痕には、Semaphorin 3A や CSPGs などの軸索伸展阻害因子が多く存在するため、神経の再生軸索

が通過できずに機能回復を遅らせる阻害因子の一つであると以前は考えられていた。

しかしこれまでの研究により、反応性アストロサイトが脊髄損傷後の炎症性細胞の浸潤を収束させ、損傷神経の修復を促す細胞としての役割を担い、損傷後の機能回復に有利な側面も持つことが分かってきた(Okada S et al, Nature Medicine 2006)。この論文で、STAT3 遺伝子をアストロサイトで欠損させたマウスと、そのネガティブフィードバック分子である SOCS3 の遺伝子欠損マウスを用いて脊髄損傷を作製し、その機能回復を定量的に解析した。

その結果、STAT3^{-/-}マウスにおいては反応性アストロサイトによるグリア瘢痕が形成されず、機能回復がみられなかったのに対し、SOCS3^{-/-}マウスにおいては早期から反応性アストロサイトによる損傷部の収束がみられ、再生軸索が増加し、早期から有意な運動機能の改善がみられた。

このことから、STAT3 依存性の反応性アストロサイトの遊走能獲得と損傷部の瘢痕の縮小化は脊髄損傷後の修復過程ならびに運動機能回復に大きく関わっていることが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

本研究では、脊髄損傷後の機能回復を促進することを目指し、反応性アストロサイトの遊走能に関わるシグナルの分子機構の解明を試みた。

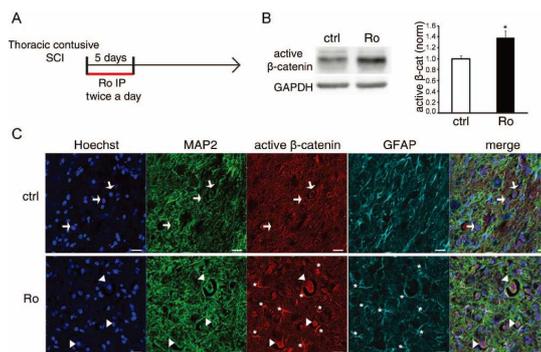
また、臨床応用を視野に入れ、アストロサイト遊走能に関わる新規阻害剤の評価系の確立を目指した。

3. 研究の方法

脊髄損傷後に起こるアストロサイトの遊走をコントロールする分子メカニズムをより詳細に解析すべく、STAT3 シグナルの調節因子の同定を進めた。

STAT3 シグナルは様々な生命・病理現象に重要な複数のシグナルの調節因子であるため、我々は Nestin-Cre による STAT3 および SOCS3 をアストロサイトで欠損させ、そこからアストロサイトを単離し、スクラッチ試験やトランス・ウェル試験を施行し、移動能の変化を野生型と比較して、どのような下流のシグナルカスケードを介して、アストロサイトが遊走するか検証を試みた。

図 1



更に、この知見を応用し、アストロサイトの遊走能に影響する新規薬剤の効果検証のために、新たな評価系を立ち上げた。実験手順としては、上図 1 にあるように脊髄損傷直後から 5 日間にわたって薬剤を投与後に、生体内および試験管内で効果を定量的に評価した。そして、脊髄損傷治療効果の期待される様々な新規薬剤の移動性に対する効果や機能回復などの治療効果を詳細に検討した。

4. 研究成果

我々はまず、反応性アストロサイトで STAT3 の発現を欠失させたマウス由来の初代培養細胞を用い、STAT3 シグナルが損傷後のグリア瘢痕の縮小化やアストロサイトの移動性獲得に必須であることを明らかにした。さらに、アストロサイトの移動性獲得こそが脊髄損傷の二次損傷を最小限に留める大きな要素であることを明らかにし、さらに STAT3 シグナルに関連する幾つかの下流の因子の同定に成功した。

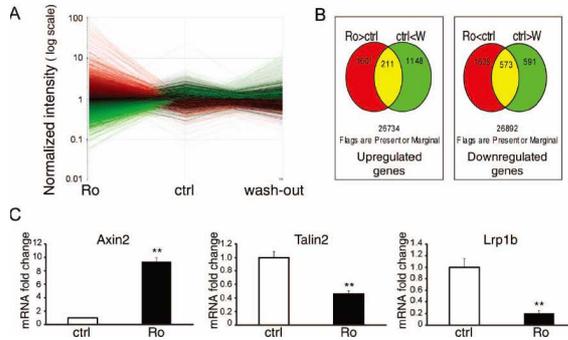
次に Cre 依存的な STAT3 遺伝子の組換えによって、野生型に比べ、アストロサイトの遊走能に対して優性阻害(ドミナントネガティブ)効果の有無を検討した。この優性阻害効果を用いれば、STAT3^{+/+} および STAT3^{-/-} アストロサイトの遊走能を比較検討することでアストロサイト遊走における Stat3 活性の必要性を検討することができると考えた。

そこで、STAT3^{-/-} および STAT3^{+/+} のアストロサイト由来サンプルのウエスタンブロットを行い、組換え後の STAT3 対立遺伝子には優性阻害効果があることを確認した。また、小さなウェルを通過する細胞数から遊走活性を測定するトランス・ウェル試験およびゼラチン融解活性比較法により、STAT3 のリン酸化は、アストロサイトが十分な遊走活性を発揮するために必須であることが必須であることを確認した。

さらに候補標的因子が直接 STAT3 下で機能しているか確認するために、標的因子の遺伝子欠損マウスより単離した反応性アストロ

サイトの遊走能を定量的に解析したところ遊走能には障害があるものの、さらなる他の標的因子の存在が示唆されたため、その同定を行っている。

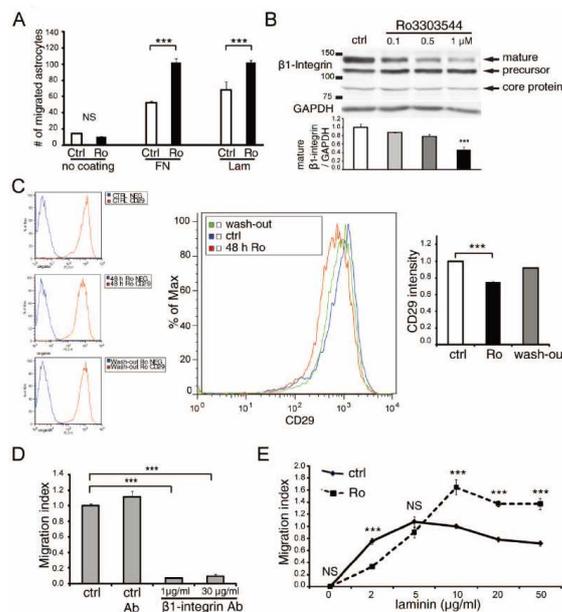
図 2



さらに我々は製薬企業と共同して、Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)の特異的阻害剤が脊髄損傷後に効果的であることを見出した。

上図2のとおり、脊髄損傷後の生体内でのアストロサイトの移動活性化を促して損傷エリア拡大を防ぐこの薬剤の効果を分子生物学的に裏付けるために、マイクロアレイ法を用いて発現遺伝子を網羅的に調べ、脊髄損傷治療効果の作用メカニズムの詳細を明らかにした。その結果、治療効果が期待される幾つかのシグナル関連因子が同定された。

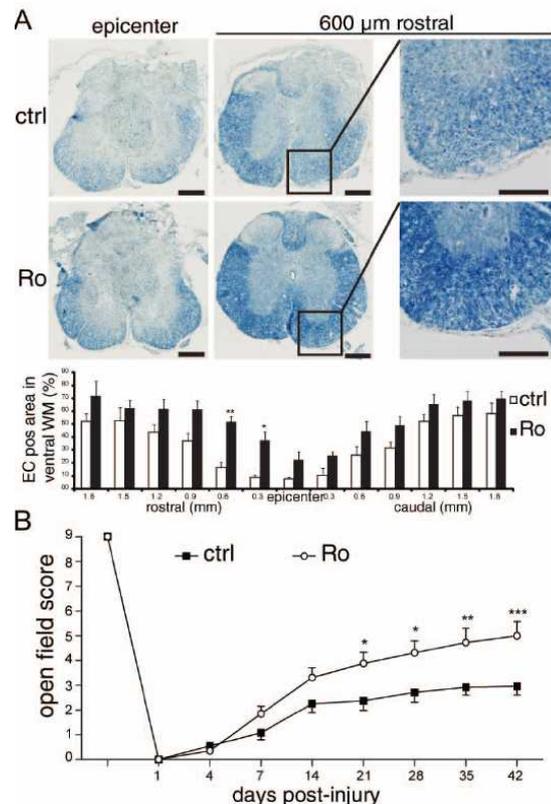
図 3



また、アストロサイトの移動活性化に対する作用に着目して、生体内および試験管内で効果を定量的に評価した結果、上図3のとおり、この薬剤がアストロサイトの移動性を促進することが明らかとなった。

り、この薬剤がアストロサイトの移動性を促進することが明らかとなった。

図 4



さらに、アストロサイトの移動性の促進および、再髄鞘化の促進によって、脊髄損傷後の機能回復を助ける有用な効果を示すことを上図4のとおり、明らかにすることができた。

結論としては、GSK-3 特異的阻害剤の、アストロサイトの移動活性化に対する作用に注目し、生体内および試験管内で薬剤の治療効果を定量的に評価した結果、この薬剤がアストロサイトの移動の活性化を介して脊髄損傷後の機能回復を助ける有用な効果を有していることを明らかにすることができた。

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3件)

Renault-Mihara F, Katoh H, Ikegami T, Iwanami A, Mukaino M, Yasuda A, Nori S, Mabuchi Y, Tada H, Shibata S, Saito K, Matsushita M, Kaibuchi K, Okada S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H.

Beneficial compaction of spinal cord lesion by migrating astrocytes through glycogen synthase kinase-3 inhibition. EMBO Mol Med. 2011 Sep 7. doi: 10.1002/emmm.201100179. [Epub ahead of print] PMID: 2189882 [PubMed - as supplied by publisher]. 査読・有

Shibata S, Yasuda A, **Renault-Mihara F**, Suyama S, Katoh H, Inoue T, Inoue YU, Nagoshi N, Sato M, Nakamura M, Akazawa C, Okano H. Sox10-Venus mice: a new tool for real-time labeling of neural crest lineage cells and oligodendrocytes. Mol Brain. 2010 Oct 31;3(1):31. 査読・有

Mukaino M, Nakamura M, Yamada O, Okada S, Morikawa S, **Renault-Mihara F**, Iwanami A, Ikegami T, Ohsugi Y, Tsuji O, Katoh H, Matsuzaki Y, Toyama Y, Liu M, Okano H. Anti-IL-6-receptor antibody promotes repair of spinal cord injury by inducing microglia-dominant inflammation. Exp Neurol. 2010 Aug;224(2):403-14 査読・有

[学会発表](計4件)

Renault-Mihara F. Beneficial compaction of spinal cord lesion by migrating astrocytes through Glycogen Synthase Kinase-3 inhibition. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Yokohama, Japan. Oral Session: 2011年9月15日

Renault-Mihara F, T. Ikegami, A. Iwanami, H. Katoh, Y. Toyama, M. Nakamura, H. Okano; Stimulation of reactive astrocytes' migration by specific inhibition of GSK-3 enhances locomotor recovery after spinal cord injury. 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA. Poster presentation: 2010年11月13-17日

Renault-Mihara F, T. Ikegami, A. Iwanami, H. Katoh, Y. Toyama, M. Nakamura, H. Okano; Stimulation of reactive astrocytes' migration by specific inhibition of GSK-3 enhances locomotor recovery after spinal cord injury. 29th Naito Conference. GLIA WORLD - Dynamic Function of Glial Cells in the Brain. Shonan, Japan. Poster presentation: 2010年10月5-8日

Renault-Mihara F, M. Mukaino, M. Shinozaki, M. Nakamura, Y. Toyama, H. Okano, Role and Mechanisms of reactive astrocytes' migration after spinal cord injury. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan. Poster presentation: 2010年9月2-4日

[その他]
ホームページ等
<http://www.okano-lab.com/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
ルノー三原 フランソワ
(Renault-Mihara Francois)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号: 20570427