様　式　C－１９、F－１９、Z－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ５ 月 ２８ 日現在

機関番号： ２３９０３
研究種目： 若手研究(A)
研究期間： 2011～2014
課題番号： ２３６８００４１

研究課題名（和文） 脳梗塞後のニューロン再生過程における新生ニューロン－アストロサイト相互作用の解析

研究課題名（英文） New neurons interact with activated astrocytes during migration toward the injured area in the post-stroke brain.

研究代表者

金子　奈穂子（Kaneko, Naoko）

名古屋市立大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：２０４６４５７１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　16,800,000円

研究成果の概要（和文）：成熟脳の脳室下帯で産生される幼若な新生ニューロンは、傷害により活性化したアストロサイトが密生する領域を移動し、傷害部でニューロンを再生するが、その数や分布範囲は非常に限定されている。本研究では、脳梗塞モデルマウスを用いて、新生ニューロンが分泌するSlit1蛋白質が、その受容体を介して活性化アストロサイトの細胞骨格を制御することが、新生ニューロンのスムーズな移動に必要であることを明らかにした。更にSlit1の発現を増強させることで、新生ニューロンの傷害部への供給を促進することができた。これらの知見は、内在性の再生システムを活用した脳傷害への再生医学的アプローチの推進に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：After brain injury, immature new neurons generated in the adult ventricular-subventricular zone (V-SVZ) migrate toward injured areas through the dense meshwork of activated astrocytes to regenerate neurons. However, their number and migration efficiency are insufficient to induce functional recovery. Using a mouse model of ischemic stroke, we found that V-SVZ-derived new neurons secrete the Slit1 protein, a ligand for Robo2 expressed in activated astrocytes. The Slit-Robo signaling causes cytoskeletal modification in the astrocytes in contact with new neurons, which increases the efficiency of neuronal migration. Moreover, overexpression of Slit1 in the new neurons promotes their migration toward the injured area. These findings may contribute to the development of new strategies for the treatment of neurological diseases using the endogenous neuro-regeneration system.

研究分野： 神経科学・神経化学・再生医学

キーワード： 脳室下帯　新生ニューロン　脳梗塞　再生　Slit　Robo

１．研究開始当初の背景

（１）長い間、ニューロンは発達期を終えた脳内では産生されないと考えられてきたが、近年の研究により、成体脳においても一部の領域ではニューロンが産生され続けていることが明らかになった。脳室周囲の「脳室下帯」は成体脳で最大のニューロン産生部位である。ここで産生された新生ニューロンは、細長い鎖状の細胞集団を形成し、多数のグリアや神経突起が存在する脳内を長距離にわたり高速で移動し、嗅覚の一次中枢である嗅球で成熟ニューロンとなる（図１・左）。

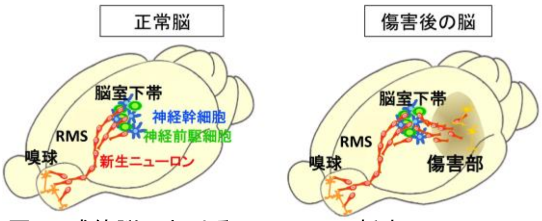

図１.成体脳におけるニューロン新生

我々は一貫してこの移動メカニズムの研究を行ってきた。新生ニューロンとその移動経路に分布するアストロサイトの相互作用に着目し、分泌性の蛋白質 Slit1 を介する新生ニューロンからのシグナルに応じて形成されるアストロサイトのトンネル構造が、新生ニューロンの高速

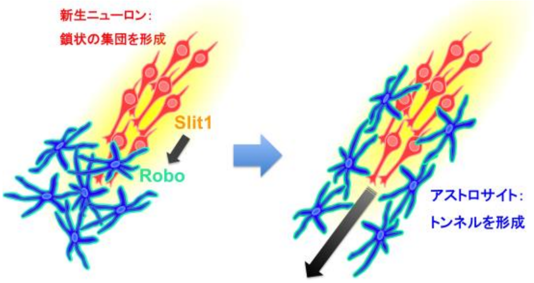

図２.新生ニューロンによるアストロサイトのトンネル形成誘導

移動に重要であることを見出した(Kaneko et al, *Neuron*, 2010)（図２）。

（２）脳に傷害が起こると、産生された新生ニューロンの一部は傷害部に移動してニューロンを再生する（図１・右)。我々は、脳梗塞モデルマウスを作成し、この移動メカニズムの解析を行ってきた。傷害後には、肥厚した突起を持つ活性化アストロサイトが増生する（図３)。新生

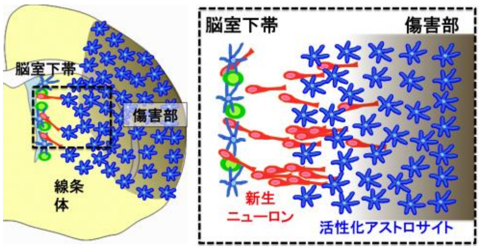

図３.傷害部への新生ニューロンの移動

ニューロンはこの中を移動しなければ傷害部に達することはできないが、新生ニューロン-活性化アストロサイトの相互作用はほとんど解析されていなかった。

２．研究の目的

（１）脳梗塞後の再生過程における新生ニューロン-活性化アストロサイトの相互作用における Slit-Robo シグナルの機能の役割とその詳細な分子メカニズムを明らかにする。

（２）解明したメカニズムを基盤として、内在性のニューロン再生機構の促進による、脳傷害への再生医学的アプローチの可能性を示す。

３．研究の方法

（１）中大脳動脈の一過性閉塞により作製したマウス脳梗塞モデルの固定脳切片を用いて免疫染色を行い、脳梗塞後の脳において、Slit・Robo 蛋白質の発現パターンがどのように変化するかを解析する。

（２）同様に作製した固定脳切片において、新生ニューロンにおける Slit1 遺伝子欠損・活性化アストロサイトにおける Robo 遺伝子発現抑制が、新生ニューロンの傷害脳での分布にどのような影響を与えるかを、免疫染色法を用いて解析する。

（３）傷害脳を移動する新生ニューロンが周囲の細胞・構造とどのように接触しているのかを、電子顕微鏡を用いて解析する。

（４）新生ニューロン-活性化アストロサイトの共培養実験系を用いて、Slit-Robo シグナルの下流の詳細な分子メカニズムを解析する。

（５）Slit-Robo シグナルを活性化したときの梗塞巣への新生ニューロンの移動能を解析し、組織学的・神経学的な神経再生の促進法・応用性を検討する。

４．研究成果

（１）脳梗塞モデルマウスの脳におけるSlit1・Robo2発現パターンの変化

申請者の所属研究室にて確立したマウス中大脳動脈閉塞（MCAO）モデルを作製して、脳梗塞後のSlit1,Robo蛋白質の局在を免疫染色法により解析した。脳梗塞巣に出現する活性化アストロサイトは、梗塞後７日の時点ですでにSlitタンパク質の受容体であるRobo2を強く発現していた。この発現は、急性期を終え器質化が進行する35日目においても持続していた。よって、傷害によって活性化したアストロサイトは、Slit1への反応性を獲得していると考えられる。

次に、Slit1の発現を蛍光蛋白質GFPによりモニターできるノックインマウスを用い、梗塞巣へ移動する新生ニューロン各々の移動距

離・形態とSlit1発現の相関について解析した。脳室下帯では、全ての新生ニューロンがSlitを発現していた。一方、傷害部に向かって移動を始めた新生ニューロンではSlit1の発現は低下しており、特に脳室下帯から遠い位置にある新生ニューロンや、長い突起を伸長させて分化が進んだ細胞では、より減少していた。よって、新生ニューロンの移動能とSlit1発現とが相関していると考えられた。

（２）Slit1・Roboシグナル阻害による新生ニューロンの傷害部への移動

新生ニューロン自身が発現するSlit1の役割を明らかにするため、脳梗塞誘導後の野生型マウス脳にSlit1欠損または野生型新生ニューロンを移植し、傷害部への移動を比較した。野生型新生ニューロンは、移植部から梗塞巣に向けて広く分布したが、Slit1欠損新生ニューロンの大部分は移植部付近に留まり、周囲のアストロサイトとの接触にも異常がみられた。

次に、活性化アストロサイトが発現する受容体Robo2の役割を検証した。shRNAをコードするレンチウィルスを線条体アストロサイトに導入したのち、脳梗塞を誘導し、脳室下帯から傷害部へ移動してきた新生ニューロンの分布を解析した。活性化アストロサイトにおけるRobo2の発現を抑制した個体では、Robo2の発現に影響を与えないベクターを導入したコントロール群に比べて、新生ニューロンの移動距離が有意に減少していた。これらの結果から、新生ニューロンが発現するSlit1と活性化アストロサイトが発現するRobo2の相互作用が、新生ニューロンの傷害部へのスムーズな移動に必要であることが示唆された。

（３）傷害部へ移動する新生ニューロンの微小環境の解析

傷害部では活性化したアストロサイトが肥大・増殖するが、アストロサイトの細かい突起は光学顕微鏡レベルでは追跡できない。そこで、傷害部へ移動する新生ニューロンがどの程度アストロサイトと接触しているか、また、Slit1欠損により、その接触に量・質的変化が見られるかを、電子顕微鏡を用いて解析した。鎖状に連なって移動する新生ニューロンにおいて、新生ニューロン同士の接触部を除くと、細胞膜の３割以上がアストロサイトの突起と接していた。また、Slit1欠損マウスでは、アストロサイトとの接触部が３倍に増加していた。また、野生型マウスでは、アストロサイトの突起は新生ニューロン同士が作る鎖状の細胞集団の外側を覆うように分布しているのに対し、Slit1欠損マウスでは、アストロサイトの突起が新生ニューロンの集団の内部に入り込むなどの異常が見られた。これらから、新生ニューロンのSlit1が、傷害脳の活性化アストロサイトとの適切な相互作用に重要であることが示唆された。

（４）新生ニューロンによる活性化アストロサイトの細胞骨格制御メカニズム

新生ニューロン-アストロサイトの相互作用メカニズムを解析するため、遺伝子導入や解析の容易な培養実験系を構築した。線条体アストロサイトは一般的な培養条件下ではRobo受容体の発現レベルは非常に低い。しかし、低酸素に２０時間曝露すると活性化し、４日後にはRobo2の発現が増加することが分かった。この低酸素刺激後のアストロサイトに重合アクチンを可視化するプローブを導入したのち新生ニューロンと共培養し、新生ニューロンの接触によるアクチン細胞骨格の変化を解析した。移動する新生ニューロンと接触すると、局所的・一過性に重合アクチンのシグナルが低下した。一方、Slit1を欠損する新生ニューロンは、接触したアストロサイトにこのような変化を誘導しなかった。この結果から、新生ニューロンがSlit1を介してアストロサイトのアクチン細胞骨格を一過性に変化させていると考えられた。

Slit-Roboシグナルは、RhoファミリーGTPaseであるRhoA，Rac1，Cdc42の活性を変化させることにより、アクチン重合を制御することが知られている。新生ニューロンによるアストロサイトのアクチン重合抑制にもこれらの分子の活性変化が関与しているのかを検討した。アストロサイトにおけるRhoA，Rac1，Cdc42の活性状態は、FRETプローブを導入してモニターした。新生ニューロンが接触した部位では、Cdc42の活性が一時的に低下した。一方、RhoA・Rac1の活性は、新生ニューロンの接触では変化しなかった。Slit1を欠損した新生ニューロンとの共培養や、アストロサイトに恒常活性型Cdc42を導入した場合には、Cdc42の活性低下は見られなかった。これらの結果から、新生ニューロンがSlit-Roboシグナルを介してCdc42活性を抑制することにより、接触部でアストロサイトのアクチン重合を低下させることが示唆された。

（６）Slit-Roboシグナルを応用したニューロン再生促進法の検討

新生ニューロンの傷害部への効率よい移動には、Slit-Robo シグナルを介した活性化アストロサイトとの相互作用が重要であることが示唆された。そこで、Slit1 遺伝子をコードするレンチウィルスベクターを脳室下帯から単離した新生ニューロンに導入して持続的に Slit1 を発現させ、梗塞部付近に移植した。6 日後の移植細胞の分布を解析したところ、傷害部周囲へ移動した細胞の割合や移動距離が、Slit1 遺伝子配列を欠くコントロールベクター導入群と比較して増加していた。

同じベクターを、マウス ES 細胞から誘導した神経前駆細胞に導入し、脳梗塞モデルマウスの傷害部付近に移植した。ES 細胞由来神経前駆細胞は、脳室下帯由来新生ニューロンと比較して移動能が低かったが、Slit1 発現誘導によって傷害部への移動は促進された。

以上の結果から、Slit-Roboシグナルを増強して新生ニューロン－活性化アストロサイトの相互作用を促進することにより、新生ニューロンの傷害部への移動効率が向上することが示された（図４）。

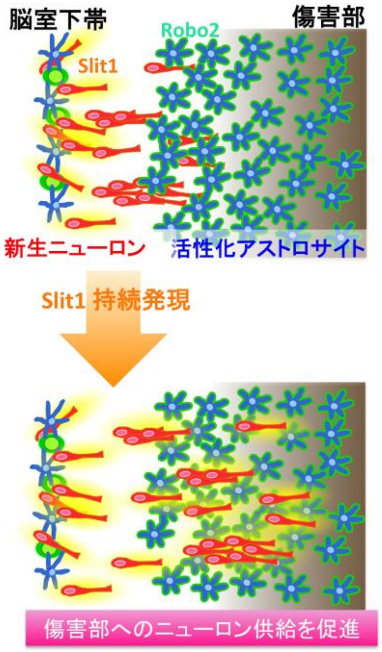

図４.Slit シグナル増強による新生ニューロンの移動促進

＜引用文献＞

① Sawamoto K, et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*, 311:629-32, 2006.
② Kaneko N, et al. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron*, 67:213-23, 2010.
③ Yamashita T, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *The Journal of Neuroscience*, 26:6627-36, 2006.
④ Kojima T, et al. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells*, 28:545-54, 2010.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１５件）

① Zheng LS, Kaneko N#, Sawamoto K#. (#corresponding author) Minocycline treatment ameliorates interferon-alpha-induced neurogenic defects and depression-like behaviors in mice., *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 5, 2015, doi: 10.3389/fncel.2015.00005, 査読あり

② Zheng LS*, Hitoshi S*, Kaneko N*#, Takao K, Miyakawa T, Tanaka Y, Xia H, Kalinke U, Kudo K, Kanba S, Ikenaka K, Sawamoto K#. (*equal contribution, #corresponding author) Mechanisms for Interferon-α-Induced Depression and Neural Stem Cell Dysfunction., *Stem Cell Reports*. 3:73-84, 2014, doi: 10.1016/j.stemcr.2014.05.015, 査読あり

③ Kaneko N, Kako E, Sawamoto K. Enhancement of ventricular-subventricular zone-derived neurogenesis and oligodendrogenesis by erythropoietin and its derivatives., *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7: 235, 2013, doi: 10.3389/fncel.2013.00235, 査読あり

④ Yamagata M, Yamamoto A, Kako E, Kaneko N, Matsubara K, Sakai K, Sawamoto K, Ueda M. Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice., *Stroke*, 44:551-554, 2013, doi: 10.1161/STROKEAHA.112.676759, 査読あり

⑤ Kato Y*, Kaneko N*, Sawada M*, Ito K, Arakawa S, Murakami S, Sawamoto K. (*equal contribution) A subtype-specific critical period for neurogenesis in the postnatal development of mouse olfactory glomeruli. *PLoS One*, 7: e48431, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0048431, 査読あり

⑥ Nakaguchi K, Jinnou H, Kaneko N, Sawada M, Hikita T, Saito S, Tabata Y, Sawamoto K. Growth factors released from gelatin hydrogel microspheres increase new neurons in the adult mouse brain. *Stem Cell International*, 2012: 915160, 2012, doi: 10.1155/2012/915160, 査読あり

⑦ Kako E, Kaneko N, Aoyama M, Hida H, Takebayashi H, Ikenaka K, Asai K, Togari H, Sobue K, Sawamoto K. Subventricular zone-derived oligodendrogenesis in injured neonatal white matter in mice enhanced by a nonerythropoietic erythropoietin derivative. *Stem Cells*, 30:2234-2247, 2012, doi: 10.1002/stem.1202, 査読あり

⑧ Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Kaneko N, Sawamoto K, Watanabe K, Takebayashi H, Kiyonari H, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S. A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in

tangential migration of interneuron precursors. *Nature Neuroscience,* 15:373-380, 2012, doi: 10.1038/nn.3020, 査読あり

⑨ Sawada M, Kaneko N, Inada H, Wake H, Kato Y, Yanagawa Y, Kobayashi K, Nemoto T, Nabekura J, Sawamoto K. Sensory input regulates spatial and subtype-specific patterns of neuronal turnover in the adult olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*, 31:11578-11596, 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0614-11.2011, 査読あり

⑩ Wang Y*, Kaneko N*, Asai N*, Enomoto A, Isotani-Sakakibara M, Kato T, Asai M, Murakumo Y, Ota H, Hikita T, Namba T, Kuroda K, Kaibuchi K, Ming G, Song H, Sawamoto K, Takahashi M. (*equal contribution) Girdin is an Intrinsic Regulator of Neuroblast Chain Migration in the Rostral Migratory Stream of the Postnatal Brain. *The Journal of Neuroscience*, 31:8109-8122, 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1130-11.2011, 査読あり

⑪ Nakaguchi K, Masuda H, Kaneko N, Sawamoto K. Strategies for regenerating striatal neurons in the adult brain by using endogenous neural stem cells. *Neurology Research International*, 2011:898012, 2011, doi: 10.1155/2011/898012, 査読あり

⑫ Kaneko N, Kako E, Sawamoto K. Prospects and Limitations of Using Endogenous Neural Stem Cells for Brain Regeneration. *Genes*, 2:107-130, 2011, doi: 10.3390/genes2010107, 査読あり

〔学会発表〕(計３７件)

① Naoko Kaneko, Lianshun Zheng, Seiji Hitoshi, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Yasuhito Tanaka, Ulrich Kalinke, Koutaro Kudo, Shigenobu Kanba, Kazuhiro Ikenaka, Kazunobu Sawamoto. Interferon-α inhibits neurogenesis and induces depression-like behavioral phenotype via interferon receptors expressed in the mouse brain. Neuroscience 2014 (Society for Neuroscience), 2014.11.15, Washington D.C.（アメリカ合衆国）

② 金子奈穂子・澤本和延，「インターフェロン療法中のうつ病発症と海馬のニューロン新生の変化」，第 57 回日本神経化学会シンポジウム:成体脳の細胞編成リモデリングと精神機能－細胞新生から気分を考える，2014.10.01，奈良県新公会堂（奈良県・奈良市）

③ Kaneko N, Sawamoto K. New neurons express Slit1 for their efficient migration through activated astrocytes in stroke-injured brain. Neuroscience2014 (The 37th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society), 2014.09.12, パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

④ 金子奈穂子・澤本和延，「アストロサイトによる脳傷害部への新生ニューロンの移動制御」，第 87 回日本薬理学会年会　シンポジウム「グリア病の薬理学」，2014.03.19，仙台国際センター（宮城県・仙台市）

⑤ 金子奈穂子・澤本和延，「成体脳内を移動する新生ニューロンによるアストロサイトの形態制御」，第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会　シンポジウム「グリア細胞の形態と脳機能」，2012.03.26，山梨大学甲府キャンパス（山梨県・甲府市）

⑥ Naoko Kaneko, Oscar Marín, Masato Koike, Yuki Hirota, Yasuo Uchiyama, Jane Y Wu, Qiang Lu, Marc Tessier-Lavigne, Arturo Alvarez-Buylla, Hideyuki Okano, John L. R. Rubenstein and Kazunobu Sawamoto. New neurons use Slit1 to maintain astrocytic tunnels for their rapid migration in the adult brain. Neuroscience 2011 (Society for Neuroscience), Postnatal Neurogenesis VI. Nanosymposium, 2011.11.16, Washington D.C.（アメリカ合衆国）

〔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

金子　奈穂子（KAKEKO, Naoko）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：２０４６４５７１