

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：23790219

研究課題名(和文) アストロサイト特異的に発現する分化関連因子Ndr g 2の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of N-myc downstream-regulated gene 2 in astrocytes

研究代表者

宝田 美佳 (TAKARADA, Mika)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40565412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：様々な中枢神経系疾患において、アストロサイトの活性化が起こることが知られているが、その役割は未だ明らかとなっていない。本研究では中枢神経系においてアストロサイト特異的に発現する分子Ndr g 2に注目し、アストロサイトの活性化の病態への関与と分子メカニズムの解明を目標とした。Ndr g 2欠損マウスの脳損傷モデルにおける解析から、Ndr g 2がIL6-STAT3経路を介してアストロサイト活性化を調節し、脳内の炎症細胞の集積や神経細胞死の調節に関与することを明らかにした。以上の結果より、Ndr g 2の機能解析が脳内炎症を伴う中枢神経系疾患の分子メカニズム解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes are known to respond to various brain injuries, however, the signaling events underlying reactive astrogliosis remain unclear. N-myc downstream-regulated gene 2 (Ndr g 2) is a differentiation-associated molecule predominantly expressed in astrocytes in the central nervous system. In this study, we examined the expression and the role of Ndr g 2 after cortical stab injury. The current study demonstrated that Ndr g 2 is an injury-responsive gene that is involved in the early phase of astroglial activation and that it positively regulates reactive astrogliosis and the subsequent inflammatory response and neuronal death through the activation of IL-6/STAT3 signaling. Thus, Ndr g 2 could be a new therapeutic target in various neurological conditions related to astroglial activation and inflammation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般

キーワード：アストロサイト 脳損傷 Ndr g 2

1. 研究開始当初の背景

N-myc down-regulated gene2 (Ndrng2)は、分化関連遺伝子 Ndrng ファミリーメンバーの1つである。細胞の分化や増殖抑制に関与すること、各種ストレスによって発現が誘導されること、構造としてC末端にリン酸化部位を持つことが知られているが、機能未知の新規遺伝子である。中枢神経系においては、Ndrng2 はアストロサイトに特異的な分布様式を示す。

アストロサイトは中枢神経系において数多く存在する細胞であり、ストレスに対し応答性を示す。物質代謝やイオン制御、グリオトランスミッター分泌を介して、神経細胞の生存環境と密接に関わり、病態改善に寄与することが近年に明らかとなってきた。

研究代表者はこれまでに、ストレス応答性因子が、細胞の増殖や分化、病態を様々にコントロールすることを報告してきた。そこで、「神経障害時に活性化し、病態に重要な役割を果たすアストロサイトの機能制御が、新規治療ターゲットとなる」という構想のもと、ストレスで誘導される Ndrng2 による、アストロサイト機能制御の可能性に着目した。

これまでに研究代表者は、アストロサイトにおける Ndrng2 の働きとして、以下の実験結果を得ている。(1)マウス脳梗塞モデル、パーキンソン病モデル、更にパーキンソン病患者脳で、活性化アストロサイトに Ndrng2 が高発現している。(2)Ndrng2 がアストロサイトの細胞質、および突起先端に存在し、重合型アクチン量(F-actin)を Ndrng2 過剰発現系で増加、ノックダウン系で減少させる。(3)Ndrng2 はアストロサイトの増殖に抑制的に作用する。(4)Ndrng2 のノックダウンによりストレス誘導剤暴露後の細胞生存率が低下する。

以上の結果から、Ndrng2 は活性化アストロサイトの増殖および形態変化を制御している可能性が示唆される。さらに、マウスモデルおよび患者脳でその発現が認められることから、Ndrng2 は病態において重要な役割を果たすことが示唆される。

2. 研究の目的

これまでの解析結果から、Ndrng2 が活性化アストロサイトの機能へ関与する可能性が示唆されている。本研究では、Ndrng2 が活性化アストロサイトを介して神経系疾患の病態に与える影響とその分子メカニズムを解明し、病態生理学的役割と治療標的としての可能性を明らかにしていく。

(1)Ndrng2 がアストロサイトの機能を制御するメカニズムについて、Ndrng2 ノックダウンや過剰発現系でのアストロサイト機能および活性化シグナル変化について解析する。(2)Ndrng2 発現制御が活性化アストロサイトと病態に及ぼす影響について、Ndrng2 欠損マウスを用いて疾患モデルを作製し、病態の表現系を免疫組織化学的に解析する。

3. 研究の方法

(1) Ndrng2 欠損マウスの作製

Ndrng2 遺伝子の exon 3-4 を loxP 配列にて挟んだ Targetting vector を用いてキメラマウスを作製し、C57BL6 マウスと交配後、CAG-Cre マウスとの交配により、Ndrng2 全身欠損マウスを得た。

(2) 疾患モデルマウス

当初、パーキンソン病モデルおよび脳梗塞モデルを想定していたが、脳損傷モデルへと変更を行った。MPTP 誘導性パーキンソンモデルはアストロサイトでの薬剤代謝を発症機序とするため、Ndrng2 がアストロサイトの薬剤代謝に影響を与える可能性が否定できないことから不適当とした。また脳梗塞モデルは手技獲得に時間を要したため、アストロサイト活性化の解析によく用いられるシンプルな系として stab wound 脳損傷モデルを用いた。

(3) 疾患モデルにおける Ndrng2 発現制御が病態におよぼす影響

脳損傷後 1,4,7 日後に、免疫組織染色、ウエスタンブロット、リアルタイム PCR などの組織学的・分子生物学的解析を行い、野生型と Ndrng2 欠損マウス間における差異の有無を検討した。

(4) Ndrng2 発現制御によるアストロサイト機能の in vitro 解析

野生型および Ndrng2 欠損マウス由来培養アストロサイトを用いて、アストロサイトの増殖能および遊走能について、それぞれ MTT assay、wound healing assay を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) stab wound 脳損傷後、活性化アストロサイトのマーカーである GFAP について免疫組織染色を用いて解析した。対照側の脳皮質において、GFAP 発現は脳表面や血管周囲にわずかに認められるのみであるのに対し、障害側では損傷後 1 日目に僅かな GFAP 染色性の増加が認められ、4 日後に顕著な GFAP 染色性の増加と肥大化が認められた。一方で、Ndrng2 染色性の増加は損傷後 1 日目から認められ、GFAP 陽性および GFAP 陰性のアストロサイトに発現していることを見出した。Ndrng2 の発現上昇はウエスタンブロットにおいても損傷後一日目に認められた。また損傷前、損傷後共にミクログリアや神経細胞には Ndrng2 発現を認めなかった。以上の結果から、脳損傷後、活性化の指標である GFAP の発現上昇に先んじて、Ndrng2 の発現がアストロサイトにおいて上昇する可能性が示唆された。

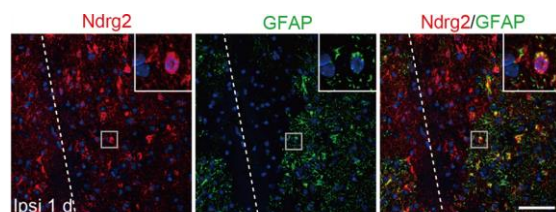


図1 脳損傷後1日の障害側におけるNdrng2の発現

(2) stab wound 脳損傷後4日目において、野生型マウスで認められた障害部位での GFAP 染色性の増加は、Ndr2 欠損マウスにおいて、損傷部位からの 100-400 μ m のいずれの部位においても有意に減少していた。さらに、障害部位での Iba1 陽性ミクログリア数も Ndr2 欠損マウスで減少していた。同様に、ウェスタンブロット、qPCR 法においても GFAP および Iba1 の発現は Ndr2 欠損マウスで有意に減少していた。加えて、qPCR による解析では CXCL1, CCL2 などのケモカインやケモカイン誘導性サイトカインの Lipocalin2 の発現も Ndr2 欠損マウスで減少していた。したがって、アストロサイトで脳損傷後に発現が増加する Ndr2 は、アストロサイト活性化を正に調節することが明らかとなった。さらに、ケモカイン発現等を介し間接的に炎症性細胞の集積に影響を与える可能性が示唆された。

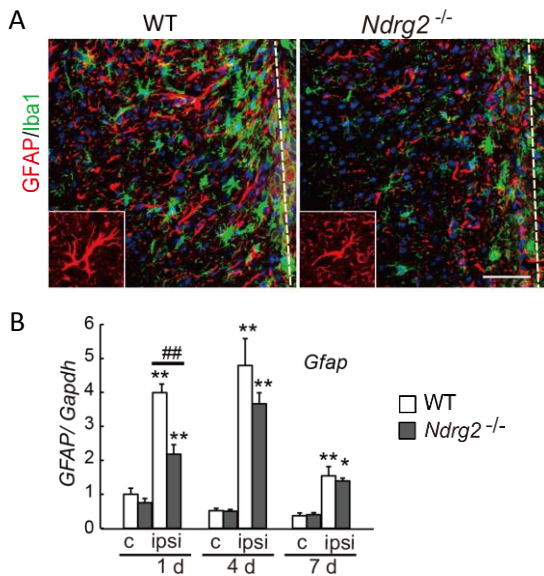


図2. 脳損傷後のグリアマーカーの発現
(A) 脳損傷後4日目におけるGFAP(赤)およびIba1(緑)の免疫染色像
(B) 脳損傷後1~7日目におけるGFAPのmRNA発現変化

(3) アストロサイト活性化が減弱した原因を解析するために、損傷後早期の 24 時間のサンプルを用いて解析した。これまでに脊髄損傷などのモデルにおいて、アストロサイトの活性化には STAT3 経路が重要であることが報告されている。この経路の上流には IL-6 ファミリーサイトカインが知られているが、IL-6、LIF、CNTF について qPCR により解析したところ、Ndr2 欠損マウスにおいていずれも損傷後の発現誘導レベルが抑制されていた。また、脳損傷モデルの系において、これらの中では IL-6 が最も早期に応答する発現パターンをとった。また、脳損傷後1日目のサンプルを用いて、STAT3 の活性化の指標となるリン酸化 (Tyr705) をウェスタンブロットにより解析したところ、損傷後のリン酸化レベルは Ndr2 欠損マウスにおいて有意に減少していた。以上から、Ndr2 は IL-6/STAT3 経路を介してアストロサイト活性化に関与する可能性が考えられた。

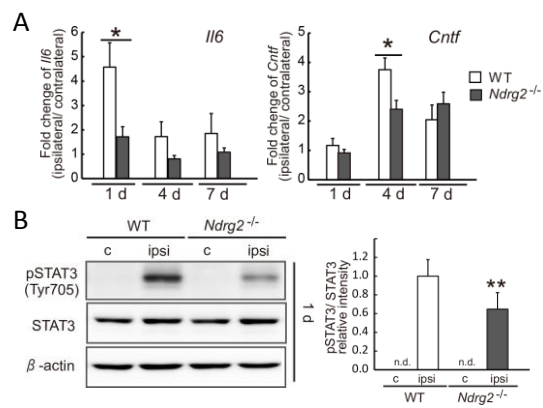


図3. 脳損傷後のSTAT3経路の解析
(A)脳損傷後1~7日目におけるIL-6およびCNTFのmRNA発現変化
(B)脳損傷後1日目におけるSTAT3の活性化レベル

(4)次に、in vivo で得られた表現型の違いがアストロサイトでの Ndr2 欠損に由来することを確認する目的で、野生型および Ndr2 欠損マウスからアストロサイトを単離し、単培養系で解析を行った。増殖能と遊走能について MTT assay および Scratch wound assay により解析したところ、いずれにおいても顕著な変化は認められなかった。次に、これまでにアストロサイトの機能変化に関与することが報告される各種試薬 (Forskolin, ATP, LPS, Endothelin-1, TGF- β) 刺激下での Ndr2 および GFAP の発現変化を解析したところ双方の発現を増加させる試薬として Forskolin が最も適していた。野生型マウス由来アストロサイトでは 10 μ M Forskolin の刺激条件下で IL-6 および GFAP の mRNA 発現上昇が観察されたが、この誘導レベルはいずれも Ndr2 欠損アストロサイトにおいて減少していた。また、Ndr2 欠損アストロサイトでみられた IL-6 の発現減少は、mRNA および分泌タンパクレベルにおいて共に、Ndr2 のアデノウイルスによる過剰発現によって回復した。以上の結果から、アストロサイトにおける Ndr2 は IL-6 および GFAP の発現を正に調節することが明らかとなった。

(5)Ndr2 が神経細胞に与える影響について、脳損傷後4日目における ssDNA の免疫染色および Fluoro-JadeC 染色により評価を行った。その結果、Ndr2 欠損マウスでは損傷後4日目において、ssDNA および Fluoro-JadeC 共陽性な変性神経細胞数が減少していた。神経障害マーカーとして知られる ATF3 の qPCR 解析からも同様の結果が得られた。Ndr2 を介したアストロサイトの機能変化が、神経細胞死に寄与することが明らかとなった。

本研究の結果より、Ndr2 が IL6/STAT3 経路を介してアストロサイト活性化に促進的に働くという知見を得た。さらに、脳内の炎症細胞の集積や神経細胞死の調節に関与する可能性が示唆された。また、本解析は Ndr2 欠損マウスを用いて神経系の病態における Ndr2 の役割を明らかにした初めての報告である。今後は、Ndr2 の標的因子の同定に取

り組むとともに、病態形成への関与をさらに詳細に解析する予定である。Ndr2 の機能解析は、脳内炎症を伴う中枢神経疾患の分子メカニズム解明と、新たな治療戦略の開発につながると期待される。

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 3 件)

- ① Mika Takarada-Iemata, Dai Kezuka, Toshiaki Takeichi, Masahito Ikawa, Tsuyoshi Hattori, Yasuko Kitao and Osamu Hori (2014) Deletion of N-myc downstream-regulated gene 2 (Ndr2) attenuates reactive astrogliosis and inflammatory response in a mouse model of cortical stab injury. *Journal of Neurochemistry* in press. doi: 10.1111/jnc.12729. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 宝田 美佳、毛塚 大、武市 敏明、北尾康子、堀 修 (2014) Regulation of astroglial activation by N-myc downstream-regulated gene 2 (Ndr2) after cortical stab injury 第 87 回日本薬理学会年会 3 月 19-21 日 仙台国際センター (宮城県)
- ② 宝田 美佳、毛塚 大、武市 敏明、北尾康子、堀 修 (2013) Ndr2 は脳損傷後のアストロサイト活性化を促進する Neuro2013 6 月 20-23 日 京都国際会議場 (京都府)
- ③ Mika Takarada-Iemata, Dai Kezuka, Toshiaki Takeichi T, Yasuko Kitao and Osamu Hori (2013) The role of Ndr2 on astroglial activation in stab wound injury model. ISN and ASN 24th Biennial Joint Meeting, April 21-25, Cancun Center (Mexico)
- ④ 宝田 美佳、毛塚 大、武市 敏明、北尾康子、堀 修 (2012) マウス脳損傷モデルにおける Ndr2 の重要性 第 72 回日本解剖学会中部支部会 10 月 13 -14 日 じゅうろくプラザ (岐阜県)
- ⑤ 宝田 美佳、毛塚 大、武市 敏明、北尾康子、堀 修 (2012) マウス脳損傷モデルを用いた Ndr2 欠損マウスの解析 第 17 回グリア研究会 10 月 2 日 神戸国際会議場 (兵庫県)

[その他]

ホームページ等

<http://med03.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宝田 美佳 (TAKARADA, Mika)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：4 0 5 6 5 4 1 2