

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592729

研究課題名(和文) 中枢神経損傷後におけるニューロン・グリア相互作用の解明

研究課題名(英文) The study of the repair mechanism by neuron and glial cell after central nervous system injury

研究代表者

伊関 憲 (Iseki, Ken)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70332921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳損傷後の修復メカニズムには未だ不明な点が多い。本研究では、プロテオグリカン産生に関わる転写調節因子OASISはアストロサイトでの発現し、神経伸長に關与する可能性が示唆された。また、転写調節因子Oligファミリーの発現解析を行った。Olig1/2共に脳損傷周囲のオリゴデンドロサイト前駆細胞やアストロサイトで発現し、神経幹細胞からの分化誘導を司る可能性が示唆された。脂質代謝酵素DGKファミリーに属するDGKは、脳損傷などのストレス環境で、神経細胞における“ストレスセンサー”の役割を果たすと考えられる。このため上記事象をDGK-KOマウスを用いて解析を行ったが、変化は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor OASIS controls the production of proteoglycan in embryonic development, whereas Olig is a key factor of glial differentiation. However, detailed repair mechanism after brain injury remains unclear. We investigated the expression pattern of these transcription factors after brain injury. Results suggest that OASIS is involved in the regulatory mechanism of non-permissive environments for axonal outgrowth and that Olig genes regulate glial differentiation. The expression pattern of the relevant molecules remained unchanged in KO mice of diacylglycerol kinase, an enzyme responsible for the control of a lipid messenger diacylglycerol.

研究分野：神経解剖学

キーワード：グリオーシス 凍結脳損傷 プロテオグリカン 脂質代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

頭部外傷を含む中枢神経系の損傷では後遺症が問題となるが、その原因は、損傷部位における神経軸索の再生が妨げられ、神経回路の再形成が阻害されることに起因する。これまでの研究により、神経回路再形成阻害のメカニズムに関して以下の知見が明らかにされている。

1) 中枢神経系では、受傷後の急性期炎症反応の消退に引き続き、損傷部位にグリア細胞の増殖、すなわち『グリオシス』と呼ばれる現象が起こる。

2) このグリオシスでは、アストロサイトやミクログリアなどが活性化され、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどの軸索反発因子が大量に産生される。

3) 一方、中枢神経の髄鞘形成担当細胞であるオリゴデンドロサイトでは、神経軸索の変性に伴い脱髄反応がおこり、次いでランダムな再髄鞘化(髄鞘蛋白の発現)が生じる。

4) この再髄鞘化によって産生される髄鞘蛋白には、Nogo などの軸索反発因子が含まれ、神経軸索の伸長を阻害する。

5) 中枢神経系では側脳室周囲に神経幹細胞が存在する。神経幹細胞は損傷が起点となって増殖後、損傷部周囲へと移動し、やがてニューロンやグリア細胞へと分化する。

6) 正常ではニューロンとグリア細胞は互いに連携し『Neuron-glia interaction』により栄養の補給や神経伝達物質の再取込み、髄鞘化等が制御される。

7) しかし、『中枢神経損傷後の Neuron-glia interaction』には未だ不明な点が多く、詳細なメカニズムの解明はなされていない。上記の点を踏まえ、『中枢神経損傷後の Neuron-glia interaction』のメカニズムを解析することにより、神経軸索伸長の阻害要因の軽減ならびに神経回路再生を検討した。

以上を踏まえ我々は、これまで中枢神経系の脳損傷メカニズムについて以下の解析を行ってきた。

『凍結脳損傷モデル』におけるグリオシスでのプロテオグリカンの役割:

1) プロテオグリカンは、コア蛋白にコンドロイチン硫酸鎖やヘパラン硫酸鎖などのグリコサミノグリカンが共有結合した糖タンパク質である。コンドロイチン硫酸鎖: 神経の伸長に対して反発する(軸索反発因子)。ヘパラン硫酸鎖: 種々の神経伸長因子などと結合する(軸索伸長因子)。

2) ヘパラン硫酸プロテオグリカンに着目し、syndecan family の 4 種は、いずれも損傷部周囲に 4 日から 7 日目に反応性アストロサイトに強く発現し、さらに神経伸長因子である FGF2 や pleiotrophin/HB-GAM と共発現することを明らかにした。

3) また glypican family に属する glypican-1 も同様に 4 日から 7 日目に反応性アストロサイトに強く発現し、神経伸長因

子である FGF2 や神経反発因子の slit2 と共発現することを見出した。

4) さらに現在、コア蛋白にコンドロイチン硫酸鎖とヘパラン硫酸鎖の両方を持つハイブリッド型のプロテオグリカンである testican-1 についても解析を進めており、testican-1 も損傷部周囲に発現することを報告した

細胞内情報伝達機構制御因子の発現変化:

1) 生体膜の微量成分であるイノシトールリン脂質の分解産物である脂質性二次伝達物質ジアシルグリセロール(DG)のリン酸化酵素 DG キナーゼ(DGK)は様々な情報伝達機構に参与する。申請者らはラット脳から 5 種の DGK アイソザイム(, , ,)単離し、その分子多様性と脳内遺伝子発現の多様性を報告してきた。

2) また近年、『凍結脳損傷モデル』において、正常脳では、ニューロンに発現する DGK (ゼータ)がミクログリアに出現し、損傷組織のリモデリングに参与する可能性を報告してきた。

2. 研究の目的

1) 従来行われてきた脳損傷モデル研究は、グリア細胞と神経細胞の動態を別個に扱った研究が大部分であった。しかしながら本来、脳は神経細胞とグリア細胞の密接な連携により機能するもので各々独立して応答する訳ではないのは明白であり、損傷後の脳機能回復応答に関して全体像が見逃されている可能性がある。

2) この点に関して、上述した申請者らの研究データにより、本来ニューロンに発現し、脳損傷後にはミクログリアに出現する DGK (ゼータ)、および中枢神経系のオリゴデンドロサイトに発現する DGK (アルファ)が『Neuron-glia interaction』を解析する契機になると考えている。

3) 本研究では、同一モデルによるグリア細胞と神経細胞の経時的動態について、とりわけ、プロテオグリカンと DGK の発現を指標として、ノックアウトマウスを活用した研究を施行した。

3. 研究の方法

1) 凍結脳損傷モデルの作成:

これまでの研究で凍結脳損傷モデルは液体窒素で冷やした鉛を、マウスの頭蓋骨の上から 1 分間脳に押し当て脳に壊死部分を作成した。マウスは損傷後 2 日、4 日、7 日、14 日後に屠殺し、脳を摘出した。

2) プロテオグリカン合成に関する新規転写調節因子の解析:

我々が同定した転写調節因子 OASIS は KO マウスの解析によりプロテオグリカン産生に参与するといわれている。そこで OASIS mRNA が脳損傷部位にどのように発現しているかを in situ hybridization を用いて解析

した。

3) 脳損傷部位で細胞の分化に関する転写調節因子の解析:

神経幹細胞からグリア細胞へと分化するには転写調節因子 olig ファミリーが関与している。脳損傷部位でこの転写調節因子 olig 1、olig2 の発現を解析した。olig1 mRNA と olig2 mRNA を in situ hybridization を用いて解析した。

4) DGK ノックアウトマウスでの脳損傷後のグリア細胞:

DGK 、 、 ノックアウト (KO) マウスにおいて凍結脳損傷を作製し、アストロサイトのマーカーである GFAP、ミクログリアの Iba-1 等の抗体を用いて免疫染色を施行し、その形態学的検討を行った。

4. 研究成果

我々が以前アストロサイトの長期培養により同定した新規転写調節因子 OASIS は、最近の研究によりプロテオグリカンの産生に関与していることが明らかとなった。そこで OASIS が脳損傷部位でどのように発現しているかを in situ hybridization を用いて検討した。

OASIS mRNA は損傷後 2 日目より損傷部周囲に発現し、7 日目にはピークとなった、そして損傷部位の修復と共に発現は弱くなり 14 日目には僅かとなった。発現している細胞を同定するために、各種細胞マーカーと二重染色を行った。反応性アストロサイトのマーカーである GFAP と発現が一致していたが、オリゴデンドロサイトのマーカーである MAB やミクログリアのマーカーである Iba-1 とは一致しなかった。また OASIS と各種プロテオグリカンの発現を比較したところ、NG2、versican などと共存していることが明らかとなった。そして OASIS を強制発現させた細胞の膜分画をシャーレに貼り付けて、神経細胞の軸索伸長を検討したところ、発現させていない細胞膜上と比べて短いことが分かった。このことから OASIS は脳損傷部位で反応性アストロサイトに発現しプロテオグリカンの発現に関与して、神経伸長を抑制していることを見いだした。

次いで我々はグリア細胞が増殖していく機序を知るために、早期のグリアのマーカーである olig1、olig2 の遺伝子がどのように発現しているかを in situ hybridization を用いて検討した。損傷 2 日目より 2 つの遺伝子は損傷周囲に発現しており、7 日目には最も発現が強くなった。さらに各種グリア細胞のマーカーと二重染色するとオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーである NG2 やアストロサイトのマーカーの GFAP と共発現していた。

次なる実験として我々が着目していたイノシトールリン脂質の分解産物である脂質性二次伝達物質ジアシルグリセロール (DG) のリン酸化酵素 DG キナーゼ (DGK) がどの

ようにグリオシスに関与しているかを検討した。これまでの検討から DCK アイソザイムの一つである DGK が損傷後にミクログリアに発現することを見いだしている。そこで DGK ノックアウトマウスにおいて各種のグリア細胞のマーカーで染色を行った。しかし、明らかな形態変化は認められなかった。

我々はこれまでの研究により、中大脳動脈閉鎖による脳梗塞モデルや凍結脳損傷モデルにおいて、正常では神経細胞に発現する DGK が脳損傷部位ではミクログリアに発現誘導されることを報告してきた。また一方では、脳損傷部位にはグリオシスに関連する種々のプロテオグリカン類が発現されることも明らかにした。さらに、DGK が低酸素暴露後に神経細胞の細胞質から核内に移動する現象を見出し、この現象が脳保護に関与する可能性を見出した。このような背景の下、本研究では DGK ファミリーと脳損傷部位に発現する転写調節因子やプロテオグリカン類との関係を検討した。本研究では DGK ファミリーである DGK 、 、 ノックアウト (KO) マウスにおいて凍結脳損傷を作製し、アストロサイトのマーカーである GFAP、ミクログリアの Iba-1 等の抗体を用いて免疫染色を施行し、その形態学的検討を行った。しかし、DGK 、 、 の KO マウスでは脳損傷後のグリア細胞の発現や形態に変化は認められず、これらアイソザイムとグリオシスの関連は低いと考えられた。そこで中枢神経以外の他の臓器において、組織障害後の再生過程における DGK ファミリーの役割を検討した。これまでの実験により、正常肝臓では DGK 、 、 のアイソザイムの発現が認められ、このうち肝切除後の再生過程においては DGK の発現が増加することが明らかになっている。そこで四塩化炭素投与による肝障害モデルを作製し、上記 DGK-KO マウスを用いた実験を行った。その結果、野生型マウスと比較し、DGK -KO マウスにおいて肝線維化マーカーが著しく亢進し、肝障害後の線維化過程には DGK の関与が示唆された。

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)

1) Iseki K, Hagino H, Nikaido T, Zhang Y, Mori T, Yokoya S, Hozumi Y, Goto K, Wanaka A, Tase C. Gliosis-specific transcription factor OASIS coincides with proteoglycan core protein genes in the glial scar and inhibits neurite outgrowth. Biomed Res. 2012; 33: 345-353. (査読有)

2) Matsui H, Hozumi Y, Tanaka T, Okada M, Nakano T, Suzuki Y, Iseki K, Kakehata S, Topham MK, Goto K. Role of the N-terminal hydrophobic residues of

DGKε in targeting the endoplasmic reticulum. Biochim Biophys Acta. 2014;1842:1440-50. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 後藤薫. 一酵素ファミリーから見た生命現象、日本解剖学会第 60 回東北・北海道連合支部学術集会、2014 年 9 月 6 日~7 日(福島市)

2) 中野知之、後藤薫. 型ジアシルグリセロールキナーゼ欠損マウスにおける臓器特異的糖脂質代謝異常と肥満について、日本解剖学会第 60 回東北・北海道連合支部学術集会、2014 年 9 月 6 日~7 日(福島市)

3) 八月朔日泰和、後藤薫. ベータ型ジアシルグリセロールキナーゼは GluR2 を介して線条体投射ニューロンの棘突起形成に關与する、日本解剖学会第 60 回東北・北海道連合支部学術集会、2014 年 9 月 6 日~7 日(福島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊関 憲 (ISEKI KEN)

福島県立医科大学・医学部・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

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号: