

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650197

研究課題名(和文) 中枢神経損傷における血管機能の役割

研究課題名(英文) The role of blood vessel in the central nervous system injury

研究代表者

村松 里衣子 (Muramatsu, Rieko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90536880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：脳脊髄からなる中枢神経系が炎症が外傷により傷つくと、様々な神経機能に障害があらわれる。症状を改善させるには神経組織を修復する必要があるが、いかにして神経組織が修復するか、メカニズムには不明な点が多い。我々はこれまでに、神経組織の修復が病巣に新たに形成した血管によって促されることを発見している。血管の機能が神経組織の修復に影響を与えるか検証することを目標として、本研究では、血管の機能に関連するシグナル伝達分子の脳内での発現パターンについての解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Central nervous system (CNS) injury causes severe neurological deficits. Recovery from this symptom needs to repair of neural tissue; however, the mechanism of tissue repair is not fully elucidated. We previously revealed that neovessels formed though CNS inflammation promotes axonal rewiring. In this project, we hypothesized that vascular function is involved in tissue repair after CNS injury, and investigated the expression pattern of the protein that is related with vascular function in the CNS.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：大脳皮質

## 1. 研究開始当初の背景

外傷や炎症により脳脊髄からなる中枢神経系が障害されると、傷ついた部位に応じて様々な神経機能障害があらわれる。重篤な神経症状を回復させるには、神経組織を修復させる必要がある。しかし、成体の神経組織には修復を負に制御する物質が豊富に含まれていると知られている。また末梢神経や発生の神経細胞と異なり、成体の神経細胞自身は修復力も低いことが知られている。そのため何らかの人為的な処置を施して、中枢神経環境を修復に適したものにすることや、神経細胞の修復力を高める必要があると考えられている。

中枢神経系を修復に適した環境にする点については、修復を妨げる物質を同定し、その物質の作用を減弱させる処置を施すアプローチが試みられている。この手法によって、神経組織の修復やそれに関連する神経機能の回復など、一定の効果が得られている。そのような手法に加え、神経細胞自身の修復ポテンシャルを高めることでより効果的な神経修復治療戦略が構築できると期待されているが、神経細胞の修復を促すメカニズムについては不明な点が多かった。

そのような中、研究代表者らは、中枢神経傷害後の神経組織の修復に先だって旺盛な血管新生を観察した。また、ここで新しく形成した血管を構成する血管内皮細胞から放出される物質が、神経回路の修復を促すことを突き止めた。ここで着目したのは、血管内皮細胞が恒常的に産生する物質であり、その作用を高めることで神経組織の修復が促されることが示された。しかし、血管内皮細胞が恒常的に産生する物質の作用を高める処置を中枢神経傷害モデル動物に施しても、十分な神経機能改善効果が見られなかった。新しく血管ができることは、血管を構成する細胞が補完されるだけではなく、循環系が回復するという意味ももつ。中枢神経系に限らない一般的な話ではあるが、血管新生は傷害による虚血状態の組織に対して酸素を再供給することで虚血を改善させるものと知られている。また血管新生にともなう循環系の回復は、栄養分の供給も回復させる。これらのことから、血管新生による血管機能の改善は神経組織の修復へ繋がると考えた。しかし、血管の機能と神経組織の修復について、それらに関連があるか、またある場合にどのような分子メカニズムが関与するか、明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

中枢神経傷害後の血管機能と神経回路の修復について解析するため、酸素濃度に依存して発現パターンが変わる物質の脳内での発現解析を行った。酸素感受性タンパク質としては特に prolyl hydroxylase (PHD) に着目し、成体マウス脳における PHD の発現につ

いて解析した。PHD を豊富に発現する脳部位の細胞を用いて、PHD の働きを弱める処置を施すことで、神経突起の進展が抑制されるかについても *in vitro* で検討した。

## 3. 研究の方法

### PHD たんぱく質の発現解析

発生期ならびに成体のマウス (ともに C57BL/6j、オス、哺乳 1 日齢あるいは 8 週齢) の脳における PHD たんぱく質発現を解析するため、生理食塩水で灌流した後に、全脳あるいは脳を部位ごとに採取した。たんぱく質発現は、ウエスタンブロット法を用いて行った。抗 PDH 抗体を用いた検討に加え、インターナルコントロールとして、抗 tubulin 抗体を用いた検討も行った。

PHD たんぱく質を発現する細胞についての組織学的な解析のため、マウスを経心的に 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、脳切片を作成した。抗 PHD 抗体を用いて免疫染色を行った。PHD を発現する細胞種を同定するため、神経細胞マーカーである抗 NeuN 抗体、アストロサイトマーカーである抗 GFAP 抗体、ミクログリアマーカーである抗 Iba1 抗体、血管マーカーである抗 CD31 抗体を用いて共染色して、PHD を発現する細胞の同定を行った。

### 神経突起の伸長に対する解析

神経回路の修復効果を *in vitro* で検証するため、哺乳 1 日齢のマウスから大脳皮質神経細胞を単離し、トリプシン処理を行って単一細胞を採取した。予めポリエルリジンでコーティングしておいた培養皿に細胞を播種し、生着後に PHD 阻害剤を添加した。培養後に細胞を 4%パラホルムアルデヒド陽的で固定し、洗浄後、神経細胞マーカーである抗 Tuj1 抗体を用いて免疫染色を行った。Tuj1 陽性神経突起長を ImageJ (NIH) を用いて測定し、神経回路の修復への効果を評価した。

培養細胞においても PHD が存在することを確認するため、大脳皮質神経細胞を培養後に抗 PHD 抗体ならびに抗 Tuj1 抗体で免疫染色を行った。

### PHD による神経突起の伸長に関わる細胞内シグナル伝達機構の解明

PHD が神経細胞に与える影響を解析するため、哺乳 1 日齢マウスから採取した大脳皮質新家細胞を PHD 阻害剤存在下で培養した。一定時間培養後に培養細胞から細胞抽出液を調整し、細胞内シグナル伝達機構について解析した。PHD は低酸素誘導たんぱく質 Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 の発現を制御していることが知られているので、まず HIF-1 の発現量の変化を検討する。さらに、HIF-1 の下流で神経突起長に関わる分子を探索するため、ここでは特に低分子量 G たんぱく質の発現量の変化を中心に解析した。

PHD 阻害剤による神経突起伸長への抑制

効果が、低分子量 G たんぱく質を介したものであるかは、目的とする分子の阻害剤を共処置して検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PHD たんぱく質の発現解析

哺乳 1 日齢ならびに 8 週齢のマウスにおいてそれぞれ PHD たんぱく質の発現を解析したところ、どちらのサンプルにおいても PHD たんぱく質が発現していることがわかった。また、両群に有意な差は認められなかった。続いて、脳の部位別に PHD たんぱく質の発現について解析した。哺乳 1 日齢ならびに 8 週齢のマウスともに、大脳皮質で PHD が豊富に発現していた。

大脳皮質で PHD を発現している細胞について解析した。哺乳 1 日齢ならびに 8 週齢のマウス共に、NeuN 陽性の神経細胞で PHD の発現が良く観察された。また、大脳皮質の中でも第 5 層の神経細胞で豊富に発現していた。

GFAP 陽性アストロサイト、Iba1 陽性ミクログリア、CD31 陽性血管内皮細胞での PHD の発現は弱かった。このことから、発生期においても成体であっても、酸素濃度の変化を感知した神経細胞が、PHD を介した細胞内シグナル伝達を導くことが示唆された。

##### (2) 神経突起長に対する解析

大脳皮質神経細胞における PHD の発現を確認するため、抗 PHD 抗体で染色を行った結果、Tuj1 陽性の神経細胞で PHD の発現が確認された。

続いて、大脳皮質神経細胞を PHD 阻害剤存在下で培養した。24 時間培養後の Tuj1 陽性神経突起長を計測したところ、PHD 阻害剤の濃度依存的に神経突起長の伸長抑制が観察された。培養 72 時間後においても、同様の傾向が認められた。これらのことから、大脳皮質神経細胞の神経突起伸長は PHD を介したシグナルにより促されることが示唆された。

##### (3) PHD による神経突起の伸長に関わる細胞内シグナル伝達機構の解明

大脳皮質神経細胞培養に PHD 阻害剤を添加し培養後、細胞抽出液を調整して、HIF-1 の発現変化をウエスタンブロット法によって解析した。その結果、PHD 阻害剤を添加して 2 時間後から HIF-1 たんぱく質の発現が増加しており、その効果は 24 時間まで持続していた。また、培養 24 時間後における HIF-1 たんぱく質の発現の変化に対する PHD 阻害剤の効果を濃度依存的に検討したところ、濃度依存的に HIF-1 たんぱく質の発現が上昇していた。このことから、大脳皮質神経細胞においても PHD を阻害することで HIF-1 の安定化が促されることが示された。

続いて、PHD 阻害剤による大脳皮質神経

突起伸長抑制に関わる分子機構について検討した。中枢神経系の神経突起伸長を制御する分子として、低分子量 G 蛋白質の Ras や Rho の活性化あるいは不活性化が重要であることが知られている。本研究では PHD 阻害剤を添加した後の低分子量 G 蛋白質の発現量の変化について、ウエスタンブロット法を用いて検討した。その結果、大脳皮質神経細胞培養へ PHD 阻害剤を添加し 8 時間後に、RhoA たんぱく質の発現量が増加している様子が観察された。また、その作用は培養を開始して 24 時間後においても観察された。このことから、PHD 阻害剤は何らかの機序を介して RhoA たんぱく質の発現を高めることが示唆された。

そこで、PHD 阻害剤による神経突起伸長効果が、RhoA を介した現象であるか、検討した。大脳皮質培養神経細胞に対して Rho 阻害剤を添加して培養を行い、その後に PHD 阻害剤を添加してさらに培養を行った。その結果、PHD 阻害剤による大脳皮質神経突起伸長の抑制は、Rho 阻害剤を添加することで抑制された。一方、Rho 阻害剤の単独処置では、コントロールと比べて神経突起長に差は認められなかった。これらのことから、大脳皮質培養神経細胞においては、PHD を阻害することで Rho の発現が高まり、それにより Rho を介した細胞内シグナル伝達に変化して神経突起伸長が抑制されることが示された。

今後、PHD 阻害剤の効果が個体レベルでの神経回路の修復も阻害するか、検討していく。これらの実験を通して、PHD を軸として、血管の機能回復と神経回路の修復の関連を見出すことができると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

村松里衣子、山下俊英、中枢神経傷害後の皮質脊髄路の再編成と機能回復のメカニズム、脳 21、16、42-45.

〔学会発表〕(計 1 件)

村松里衣子、山下俊英、中枢神経系の恒常性の破綻・維持を制御する分子細胞メカニズム、京都産業大学セミナー(招待講演)2013 年 12 月 26 日、京都

〔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

村松 里衣子 (MURAMATSU, Rieko)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90536880