

新規ガイダンス因子による神経新生・血管新生を組み合わせた脳梗塞再生法の開発

山岸 覚

浜松医科大学 器官組織解剖学講座

【研究の背景】

脳虚血後数日間の亜急性期には神経新生が盛んに行われ、神経機能の再生が試みられている。しかしながら新生神経細胞はやがて死滅し、神経機能回復には至っていない。したがって、新生神経細胞を長期にわたり生存させ、大脳皮質で神経細胞へと分化させることができれば、神経機能亢進につながると考えられる(Plane et al., Exp. Neuro., 2008)。我々は最近、神経新生領域で強く発現する新規神経軸索ガイダンス分子、Netrin-5 を見出した(Yamagishi et al., Front Cell Neurosci, 2015)。

【目 的】

Netrin-5 は論文報告がほとんどなく機能未知だが、申請者は梗塞層新生血管、梗塞周囲層ミクログリア、側脳室→梗塞層へ移動中の新生神経細胞で強く発現上昇していることを見出した。本研究課題では①Netrin-5 投与もしくは過剰発現による脳虚血時における再生治療の開発を試み、②Netrin-5 ノックアウトマウスの梗塞モデルを作製し、分子機能・病態発症メカニズムを解明する。

【方 法】

①Netrin-5 リコンビナントについて

Netrin-5 は修飾され細胞外へ放出されリガンドとして機能すると考えられる為、HEK293 細胞を用いて培地中にリコンビナントを得る事を試みた。

②Netrin-5 ノックアウトマウスの解析

Netrin-5 のノックアウトマウスは新潟大学脳研究所崎村建司先生との共同研究で作製された。loxP サイトで挟まれている為、PGK-Cre と掛け合わせることで全身性の、Nestin-Cre との交配で神経系の細胞で Netrin-5 をノックアウトし、脳梗塞モデルを作出して、解析を行った。

【結 果】

①Netrin-5 リコンビナントについて

Netrin-5 cDNA を CMV プロモーター下で発現する pIgplus ベクターへとクローニングした。当該ベクターは Fc タグが付加されるため、抗 Fc 抗体により可視化でき受容体との結合アッセイが容易となる。HEK293 細胞を用いてトランスフェクションし、培地から精製を試みたが、残念ながら極僅かしかリコンビナントを得る事ができなかった。そこで、多量のリコンビナントを得るため、以下、種々の条件を変更し試みた。

- ・FLAG や Myc、His 等小さなタグへの変更
- ・pIgplus から pcDNA3 や pcDNA4、pINFUSE 等バックボーンの変更
- ・N 末シグナルペプチドの変更(実績のある FLRT2、Netrin-1)

・コザック配列の変更

しかしながら、どの条件においても、放出される Netrin-5 は非常に僅かであり、in vivo での実験どころか、in vitro の実験を行うにも十分量を得る事ができなかった。

一方、シグナルペプチドを取り除き、細胞内に発現するように設計すると、Netrin-5 を過剰発現させる事に成功した。したがって、Netrin-5 は細胞外への分泌が厳密に制御され、過剰に放出されないような何らかの細胞内メカニズムが存在すると考えられる。

②Netrin-5 ノックアウトマウスの解析

Netrin-5 のノックアウトマウスは新潟大学脳研究所 崎村先生との共同研究で作製された。loxP で挟まれている為、PGK-Cre で全身性の、Nestin-Cre で神経系の細胞でノックアウトを行った。

Netrin-5 全身性ノックアウトマウスでもメンデルの法則に従って生まれてくる為、発生上フェノタイプは特になく思われる。また、日常的な観察でも、行動異常は見られなかった。中大脳動脈を結紮し、脳梗塞モデルを作製したが、ノックアウトマウスは C57BL/6 バックグラウンドであるため、個体によってバラツキが見られ、定量的な解析が現段階では非常に困難である。

【考 察】

Netrin-5 のリコンビナントの獲得は非常に困難であるが、今後改善点として、①細胞内に過剰発現させた蛋白質からリコンビナントを回収し、翻訳後修飾がされているかを検討する、②特定のドメインのみを発現させてリコンビナントを得ることを検討する、③ウィルスを用いて過剰に発現させる。また、Netrin-5 ノックアウトマウスは CB-17 系統へのバッククロスを行うことで、安定した脳梗塞モデルの作出が可能となると期待される (Kasuhara et al., Neurosci. Res., 2013)。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

Netrin-5 による脳虚血時の神経再生の可能性について、本年だけではまだ十分に検証できていない。しかしながら、Netrin-5 の投与もしくは過剰発現によって脳虚血時における再生治療の道が開ける可能性はまだ十分に考えられる。今後、さらなる研究を遂行し、検証して行く。

【参考・引用文献】

Yamagishi S, Yamada K, Sawada M, Nakano S, Mori N, Sawamoto K and Sato K, Netrin-5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain, *Front Cell Neurosci.*, 9, 146.1-9, 2015.

Yamagishi S, Hampel F, Hata K, del Toro D, Schwark M, Kvachnina E, Bastmeyer M, Yamashita T, Tarabykin V, Klein R, Egea J : FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons. *EMBO J.*, 30, 2920-33, 2011.