

## 新規ガイダンス因子によるグリア瘢痕除去を伴っ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】

発生過程において、アストロサイトはニューロジェネシス終了後、脳室下帯のラディアलगリアから分裂によって発生し、大脳皮質内に分布することが知られている。アストロサイトには神経細胞や他のグリア細胞を栄養するだけでなく、血液脳関門を形成する重要な役割もある。一方で、脳損傷時には脳室下帯で分裂を開始し、速やかに損傷部へと移行することが近年、報告された (Benner et al., Nature, 2013)。これらアストログリア細胞は適材適所へと移動する際、様々な外的因子によって制御されていると考えられるが、その実態は良く分かっていない。申請者は近年、神経細胞が脳室帯や脳室下帯で誕生した後、多極性細胞になり、ガイダンス因子によって移動を制御されている事を報告した (Yamagishi et al., EMBO J., 2011)。アストロサイトはニューロジェネシス終了後に同じくラディアलगリアから誕生するが、アストロサイトの移動を規定する分泌因子はほとんど報告されていない。

### 【目 的】

申請者はこのようなアストロサイトの移動を制御する分子として、BMP 阻害因子が役割を担っている可能性を見出した。BMP 阻害因子は古典的な背側化因子として知られており、腹側化の機能がある BMP2 濃度を阻害剤として不活化することにより腹側化を抑制している。また、ノックアウトマウスの解析により、骨形成因子に関わっていることが報告されている。中枢神経系の発生においては、ニューロジェネシスが終了し、アストロサイトが形成・成熟される頃から徐々に発現が上昇し、成体脳では非常に高い発現量が観察される (Allen Brain Atlas)。しかし、脳の成熟とともに発現上昇する BMP 阻害因子の役割は全く分かっていない。したがって、本研究課題では、BMP 阻害因子がアストロサイトの移動を規定しているか、中大脳動脈結紮モデルを用いて分子の挙動を解析し、その機能を解明する事に努めた。

### 【方 法】

#### (1) スライプアッセイを用いたアストロサイト反発作用の評価

BMP 阻害因子リコンビナントを基質として縞状にコートしたスライプアッセイを行う事により、アストロサイトが反発作用を受けるかどうか、検討を行った。

#### (2) アストロサイトへの細胞内取り込み経路解析

BMP 阻害因子は通常細胞外で作用すると考えられている。一方で、一般的なガイダンス因子はエンドサイトーシスにより細胞内へと取り込まれる事が知られている。従って、分子が細胞内へと取り込まれているかを解析し、その細胞内経路について、免疫染色を用いて解析した。

#### (3) 脳梗塞・脊髄損傷モデルにおける BMP 阻害因子によるグリア瘢痕形成阻害作用の解析

中大脳動脈を結紮することにより、脳梗塞モデルマウスを作出した。経時的に解析し、BMP 阻害因子がどのように発現上昇をしてくるかを解析した。また、この時のアストロサイトの集積も抗 GFAP 抗体により染色し確認した。

#### (4) 脳損傷モデルにおける BMP 阻害因子投与によるグリア瘢痕形成の解析

凍結脳損傷モデルにおいて BMP 阻害因子を投与し、グリア瘢痕形成において損傷領域におけるアストロサイトの集積領域が異なるかを免疫染色により解析を行った。

## 【結 果】

## (1) ストライプアッセイを用いたアストロサイト反発作用の評価

BMP 阻害因子を基質としてディッシュ上に予めコートし、マウス由来アストロサイトである A1 細胞を培養した所、24 時間後、ほぼ全てのアストロサイトが BMP 阻害因子から反発するというところを見出した。

## (2) アストロサイトへの細胞内取り込み経路解析

BMP 阻害因子の初期エンドソームとの共局在、後期エンドソームとの共局在を確認した。しかしながら、両エンドソームに共局在する数は少なく、他の経路を介している可能性も考えられる。各種マーカーを用いてトランスゴルジネットワーク、リソソームやエクソソーム内に取り込まれている可能性を検討したが、現在の所、共局在は見られていない。

## (3) 脳梗塞・脊髄損傷モデルにおける BMP 阻害因子によるグリア瘢痕形成阻害作用の解析

中大脳動脈梗塞手術 3 日後における BMP 阻害因子の発現は、非常に興味深い事に、アストロサイトの集積していない部分に非常に強く発現していた。また、BMP 阻害因子の発現細胞は NG2 陽性ミクログリアである事が判明した。これは、脳実質に内在しているミクログリアではなく、損傷部位から侵入して来る単球由来のミクログリアであると考えられる。

## (4) 脳損傷モデルにおける BMP 阻害因子投与によるグリア瘢痕形成の解析

BMP 阻害因子を投与すると、アストロサイトは損傷部位に集積してくるものの、BMP 阻害因子の存在領域を避けて分布した。

## 【考 察】

本研究課題により、細胞外で BMP の阻害因子として機能すると思われていた分子が、おそらく BMP とは無関係に(受容体を介して)細胞内へ取り込まれていることを明らかとした。また、この反発活性はアストロサイトだけではなく、小脳顆粒細胞に対しても反発活性を示したことから、神経細胞に対しても反発性ガイダンス因子として作用すると考えられる。さらには、因子が *in vivo* においてもアストロサイトに対して反発的に作用している事から、BMP 阻害因子の発現を操作する事により、脳梗塞損傷領域・グリア瘢痕形成が改善できる可能性を示唆している。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究課題により、BMP 阻害因子による脳虚血時の神経再生の可能性を見出すことができたが、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、BMP 阻害因子の投与、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。したがって、今後さらなる研究を遂行し、検証して行く予定である。

## 【参考・引用文献】

1. Benner EJ, Luciano D, Jo R, Abdi K, Paez-Gonzalez P, Sheng H, Warner DS, Liu C, Eroglu C, Kuo CT. Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature*, 497, 369-73, 2013.
2. 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.*, 2011, 30, 2920-33
3. 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.
4. Tai-Nagara I, Yoshikawa Y, Numata N, Ando T, Okabe K, Sugiura Y, Ieda M, Takakura N, Nakagawa O, Zhou B, Okabayashi K, Suematsu M, Kitagawa Y, Bastmeyer M, Sato K, Klein R, Navankasattusas S, Li DY, Yamagishi S\*, Kubota Y\*. Placental labyrinth formation in mice requires endothelial FLRT2-UNC5B signaling. *Development*. 144, 2392-2401, 2017