

脳梗塞後の軸索再生・機能回復を標的とした Semaphorin3A 阻害薬の治療応用

上野祐司

順天堂大学 医学部 神経学講座

【研究の背景】

脳血管疾患の総患者数は約 118 万人であり、脳血管疾患に関わる医療費は高齢者の総医療費の第 1 位である。特に、多くの患者が運動麻痺等の重度の後遺症に苦慮し、それに対する介護費用が大部分を占める。脳梗塞後の機能回復において「軸索再生」は重要な役割を担うが、軸索再生や機能回復を標的とした治療法の実現には至っていない。

脳梗塞の慢性期においてアストロサイトが形成するグリア瘢痕は軸索再生阻害因子となる。近年中枢神経系においてエクソソームが細胞間伝達に関与することが報告された。脳梗塞後におけるグリア瘢痕やエクソソームを介した軸索再生の分子病態機構を解明する事は重要である。

【目 的】

我々は軸索伸長阻害因子である Semaphorin3A (Sema3A) に着目し、脳梗塞再生治療の新たな分子標的として見出した。脊髄損傷モデルでは Sema3A 阻害剤による治療効果が報告されている。脳梗塞モデルでは、一過性脳虚血マウスの急性期において Sema3A の発現が報告されているのみであり、Sema3A の機能阻害により、脳梗塞後慢性期の軸索再生や機能回復の病態解明に関する報告は未だない。脳梗塞後の軸索再生における Sema3A が作用する新規分子病態機構を明らかにし、選択的 Sema3A 阻害薬 (SM-345431) の軸索再生並びに機能回復作用を検証した。

【方 法】

脳梗塞動物モデルとして 9 週雄性 Wistar ラットを用いて永久的中大脳動脈閉塞モデル (Middle cerebral artery occlusion: MCAO) を作成し、梗塞巣の辺縁より 300 μ m を peri-infarct area と定義した。MCAO 後 3 日～56 日目における Sema3A と pNFH (軸索マーカー)、MAP2 や npNFH (神経細胞体マーカー) の発現を解析した。MCAO 後 7 日目に Alzet pump を用いてラット脳 peri-infarct area に 0.01、0.1、1、3mg/ml の Sema3A 阻害薬 (SM-345431) を 14 日間投与した。MCAO 後、Modified neurological severity score (mNSS) と Rotarod で神経学的所見と運動機能を評価した。

In vitro では、妊娠 17 日 Wistar ラットの胎児前頭葉皮質神経細胞から初代培養神経を作成し、培養 7 日目に 3 時間の無糖無酸素負荷 (Oxygen-glucose deprivation: OGD) を行った。OGD 後、0.1、1nM の recombinant Sema3A (rSema3A)、0.1、1 μ M の SM-345431 を投与した。OGD 後 96 時間目に培養神経細胞を回収し、Western blot にて pNFH、Sema3A シグナル蛋白の発現を解析した。Microfluidic chamber を用いて OGD 後軸索伸展の長さを解析した。生後 0-2 日の Sprague-Dawley 系ラットの前頭葉皮質細胞から初代アストロサイト培養を行い、OGD 後 SM-345431 を投与し 96 時間後の培地からエクソソームを抽出した。活性化アストロサイトマーカーである GFAP を測定し、エクソソームを培養神経細胞に投与し軸索伸展を解析した。OGD 後の培養アストロサイトから放出されるエクソソームにおいて、SM-345431 が制御する microRNA、軸索伸展に関わる mRNA を microarray にて網羅的に解析した。

【結 果】

脳虚血後 peri-infarct area において Sema3A は MAP2 と共発現し、Sema3A/MAP2 陽性細胞は MCAO 後 7 日より 14 日までの急性期から亜急性期にかけて上昇し ($p < 0.05$ vs sham)、その後 MCAO 後 56 日の慢性期において減少した。SM-345431 の脳内投与では、mNSS は 14 日以降で 1mg/ml 群、3mg/ml 投与群で改善した ($p < 0.05$ vs vehicle)。Rotarod では 28 日後において 3mg/ml 投与群では、vehicle に比して改善がみられた ($p < 0.05$ vs vehicle)。梗塞巣の面積は 5 群間で差異はなかった。蛍光免疫染色では、peri-infarct area において Sema3A/MAP2 細胞は SM-345431 投与にて減少し、pGSK3 β /MAP2 細胞は増加した。pNFH の発現は SM-345431 投与で増加した。

In vitro では、OGD 後の初代神経細胞において、rSema3A (1nM) 投与により pNFH は減少し、SM-345431 (1 μ M) 投与では増加した。同時に、SM-345431 投与により Rnd1 の減少、R-Ras、pAkt、pGSK3 β の増加がみられ ($p < 0.05$ vs OGD)、rSema3A 投与では逆の現象が確認された。Microfluidic chamber を用いた軸索伸長の検討では、SM-345431 投与は OGD 後非投与、OGD 後 rSema3A (1nM) 投与に比して軸索伸長がみられた ($p < 0.05$)。蛍光免疫染色において、OGD 後に伸展した軸索に発現する pGSK3 β や、pGSK3-pNFH の共発現は SM-345431 投与において増加した ($p < 0.001$)。初代アストロサイト培養において、GFAP は OGD 後有意に増加し ($p < 0.001$ vs non-OGD)、SM-345431 (1 μ M) 投与にて減少した ($p < 0.05$ vs OGD)。Sema3A も SM-345431 投与で減少した ($p < 0.05$ vs OGD)。アストロサイト内と培養液中から抽出されたエクソソームの形状、量は non-OGD 群、OGD 群、OGD 後 SM-345431 投与群で変化なかった。SM-345431 (1 μ M) 投与の虚血アストロサイトから分泌されたエクソソームを神経細胞に投与したところ、non-OGD 群、OGD 群に比して軸索伸長効果が得られた ($p < 0.05$)。Microarray では、SM-345431 (1 μ M) 投与の虚血アストロサイトから分泌されたエクソソームでは、SM-345431 非投与に比較して、rno-miR-30c-2-3p、rno-miR-326-5p の有意な発現低下が見られた。SM-345431 (1 μ M) 投与の虚血アストロサイトから分泌されたエクソソームを投与した培養神経細胞では、*prostaglandin D2 synthase (ptgds)* の発現が上昇していた。

【考 察】

脳虚血後 peri-infarct area において、神経細胞に発現する Sema3A は亜急性期に上昇し慢性期で低下した。亜急性期に上昇する Sema3A に対し SM-345431 を用いて機能阻害することで、軸索再生や脳梗塞ラットの機能回復が促進された。In vitro では、OGD 後の培養神経細胞において rSema3A と SM-345431 による Sema3A の機能調節が Rnd1/R-Ras/Akt/GSK3 β シグナル、軸索に発現する pGSK3 β を介して pNFH 発現を調節した。SM-345431 は OGD 後のアストロサイトの活性化を抑制し、軸索伸長効果を有するエクソソームを分泌する現象がみられた。SM-345431 は、虚血アストロサイト由来のエクソソームにおける rno-miR-30c-2-3p、rno-miR-326-5p の発現を制御し、また、軸索に取り込まれたエクソソームは *ptgds* を介して虚血後の軸索再生を促進させる作用機構が明らかにされた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

SM-345431 は、脳梗塞後の神経細胞内情報伝達系 (Rnd1/R-Ras/Akt/GSK3 β シグナル) を制御し、アストロサイトの活性化を抑制、軸索伸長効果を有するエクソソームを分泌する現象がみられた。今日では急性期治療が主体となっていた脳梗塞治療において、Sema3A 阻害薬は慢性期神経再生や機能回復をターゲットとした脳梗塞新規治療薬となる可能性がある。脳梗塞患者の QOL を高めるという高い社会的ニーズに答えるのみならず、脳卒中医療を大きく変革させる治療薬となる可能性があり、細胞移植療法に比し安価で高い安全性が期待出来る点でも優越性がある。

【参考・引用文献】

- 1) Ueno Y, Chopp M, Zhang L, Buller B, Liu Z, Lehman NL, et al. Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. *Stroke*. 2012;43:2221-2228.
- 2) Chaudhry N, Filbin MT. Myelin-associated inhibitory signaling and strategies to overcome inhibition. *J Cereb Blood*

Flow Metab. 2007;27:1096-1107.

- 3) Neumann S, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Basbaum AI. Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron*. 2002;34:885-893.
- 4) Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5:146-156.
- 5) Kimura-Kuroda J, Teng X, Komuta Y, Yoshioka N, Sango K, Kawamura K, et al. An in vitro model of the inhibition of axon growth in the lesion scar formed after central nervous system injury. *Mol Cell Neurosci*. 2010;43:177-187.
- 6) Verkhratsky A, Matteoli M, Parpura V, Mothet JP, Zorec R. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: Idiosyncrasies of vesicular secretion. *EMBO J*. 2016;35:239-257.
- 7) Zhang ZG, Chopp M. Exosomes in stroke pathogenesis and therapy. *J Clin Invest*. 2016;126:1190-1197.
- 8) Dickson BJ. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science*. 2002;298:1959-1964.
- 9) Pasterkamp RJ, Giger RJ. Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2009;19:263-274.
- 10) Zhou Y, Gunput RA, Pasterkamp RJ. Semaphorin signaling: Progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci*. 2008;33:161-170.
- 11) Xin H, Wang F, Li Y, Lu QE, Cheung WL, Zhang Y, et al. Secondary release of exosomes from astrocytes contributes to the increase in neural plasticity and improvement of functional recovery after stroke in rats treated with exosomes harvested from MicroRNA 133b-overexpressing multipotent mesenchymal stromal cells. *Cell Transplant*. 2017;26:243-257.
- 12) Ueno Y, Koike M, Shimada Y, Shimura H, Hira K, Tanaka R, et al. L-carnitine enhances axonal plasticity and improves white-matter lesions after chronic hypoperfusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35:382-391.
- 13) Zhang Y, Chopp M, Liu XS, Katakowski M, Wang X, Tian X, et al. Exosomes derived from mesenchymal stromal cells promote axonal growth of cortical neurons. *Mol Neurobiol*. 2017;54:2659-2673.
- 14) Jovicic A, Gitler AD. Distinct repertoires of micrnas present in mouse astrocytes compared to astrocyte-secreted exosomes. *PLoS One*. 2017;12:e0171418.
- 15) Nitzan A, Kermer P, Shirvan A, Bahr M, Barzilai A, Solomon AS. Examination of cellular and molecular events associated with optic nerve axotomy. *Glia*. 2006;54:545-556.
- 16) Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, et al. A selective sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med*. 2006;12:1380-1389.
- 17) Hou ST, Keklikian A, Slinn J, O'Hare M, Jiang SX, Aylsworth A. Sustained up-regulation of semaphorin 3A, neuropilin1, and doublecortin expression in ischemic mouse brain during long-term recovery. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;367:109-115.
- 18) Trimarco A, Forese MG, Alfieri V, Lucente A, Brambilla P, Dina G, et al. Prostaglandin D2 synthase/GPR44: A signaling axis in PNS myelination. *Nat Neurosci*. 2014;17:1682-1692.