

脳・脊髄損傷後修復におけるアストロサイトの役割解明 —アストロサイトを介し神経修復を促進する化合物のスクリーニングと新薬開発—

申請代表者	上山 健彦	神戸大学自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター分子薬理研究分野	准教授
所外共同研究者	齋藤 尚亮	神戸大学自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター分子薬理研究分野	教授
所外共同研究者	甲村 英二	神戸大学脳神経外科	教授
所内共同研究者	東田 千尋	神経機能学分野	准教授

【報告セミナー要旨】

【緒言】

アストロサイトが中枢神経回路網の発生・維持などに機能することは周知の事実であるが、神経損傷後の機能（特にグリア瘢痕）は複雑で、損傷部の回復促進及び阻害作用の4双方が報告されている。一方、Rhoファミリー低分子量G蛋白質（Rho-family GTPase）であるRac及びCdc42は、増殖（細胞周期）や遊走などに関与することが知られている。今回我々は、脳・脊髄損傷後修復におけるグリア瘢痕及びグリア瘢痕形成におけるRho-family GTPaseの役割を解明するため、アストロサイト特異的Rac1-KO及びCdc42-KOマウスを作製し、圧挫による脊髄損傷及びSPRING8による微小放射線脳損傷モデルを用いて、検討を行なった。

【結果】

脊髄損傷後の運動機能評価では、野生型に比しRac1-KOマウスは、亜急性期から有意に良好な運動機能回復を見せ、損傷後5週では著明に良好な改善を呈した。脊髄損傷後5週の組織学的検討では、Rac1-KOマウスにおいて脊髄損傷部近傍でのGFAP免疫染色性の軽度の低下が認められた。小脳内顆粒層に対する微小放射線脳損傷の検討でも、Rac1-KOマウスにおいて損傷周囲のGFAP免疫染色性は低下していた。Rac1ノックダウン（KD）アストロサイト細胞株を用い、細胞周期（Fucci system-based assay）及び遊走能（wound healing assay）を解析すると、Rac1-KDにより細胞周期延長（G1期停滞）と遊走能低下が認められた。更に、DNAマイクロアレイ解析により、Rac1-KD細胞ではGSPT1（G1 to S phase transition 1）が低下することを見出し、GSPT1-KDにより細胞周期が延長し、Rac1-KDによる細胞周期延長がGSPT1の導入により回復することを確認した。しかし、GSPT1は細胞遊走能には影響を及ぼさなかった。

【結語】

アストロサイト特異的にRac1をKOすると、神経損傷後の機能回復が著明に促進された。その機序の1つとして、Rac1-GSPT1シグナリングが低下し、神経損傷後の過度のグリア瘢痕形成（反応性アストロサイト増殖）が抑制されることを見出した。しかし、アストロサイト特異的Rac1-KOマウスでの脊髄損傷後の運動機能回復が野生型に比べ著明に良好なことを考えると、GSPT1以外のRac1ターゲット分子（下流分子）の関与が予測される。現在、その候補となる新たな分子を同定し、解析を進めている。

■背景・目的

従来、アストロサイトは、脳梗塞や脳外傷などの脳損傷時、活性化・増殖することにより病変部周囲にグリオシス（グリア瘢痕）を形成し、このグリオシスが損傷部の増悪や修復遅延をもたらすと考えられてきた。ところが2006年のマウス脊髄損傷モデルを用いた研究で、グリオシスは、病変部を最小限に食い止めるためにアストロサイトが病変周囲部から遊走して病変部を包み込んだものであるとの報告がなされた。しかし、グリオシス（アストロサイト機能）の抑制・賦活のどちらが脳・脊髄損傷病変の縮小・修復促進、ひいては、神経機能回復に繋がるかどうかの結論は、未だ出ておらず、そのメカニズムについても解っていないのが現状である。

本研究での我々の目標は、

グリオシスの抑制・賦活のどちらが中枢神経損傷後の神経機能回復促進に繋がるのか、

その結果に基づき中枢神経後修復・回復を促進する新規化合物・治療剤・治療法、

を解明・開発することである。

■結果・考察

1. 脊髄損傷モデルを用いた脊髄損傷におけるグリオシスおよびグリオシス形成における Rac1 の役割解明

まず、アストロサイト特異的に Rac1 を Knockout (KO) するマウスを作製した (図1)。アストロサイト特異的 Rac1-KO マウスを脊髄圧挫損傷モデルに供し、脊髄損傷後5週間、下肢・体幹運動機能を経時的に評価すると、野生型に比し Rac1 KO マウスでは著明に良好な神経機能改善を呈した (図2)。免疫組織化学的に損傷脊髄周囲のグリオシス (GFAP 染色) を調べたところ、Rac1-KO マウスでは野生型に比し、軽度のグリオシス減弱を認めることを見出した (図2)。更に、Rac1-KO マウスの中枢神経損傷後のグリオシス減弱は、大型放射光施設 SPring8 を用いた小脳のスリット状放射線損傷モデルでも再現できた。

グリオシス形成は、アストロサイトの損傷部周囲での増殖と損傷周辺部から損傷部周囲への遊走によると考えられている。そこで、不死化アストロサイト細胞株 (LN229細胞) を用いた Rac1-Knockdown (KD) 実験により、アストロサイトの増殖能・遊走能における Rac1 の影響を調べた (図

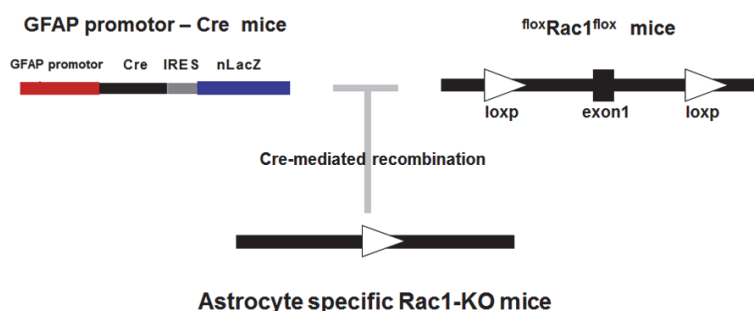


図1 GFAP-Cre マウスと Rac1^{lox} マウスの交配により作製したアストロサイト特異的に Rac1 を KO するマウス

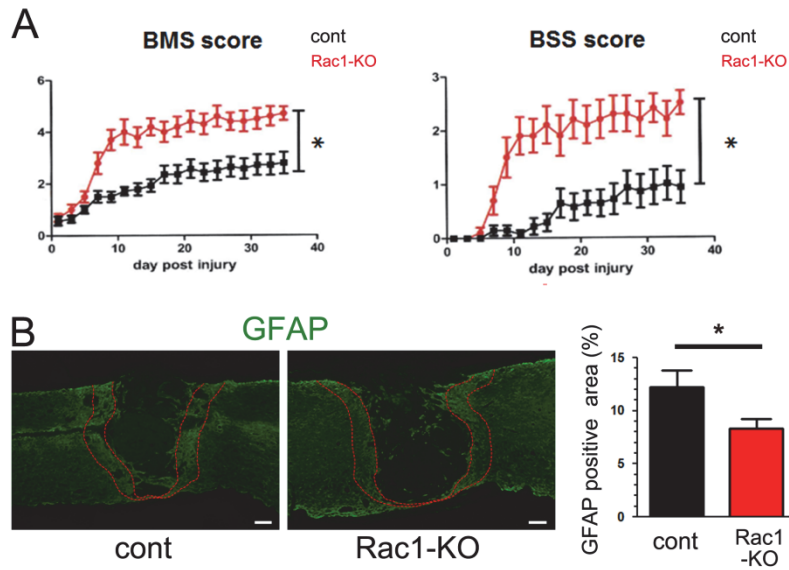


図2 A, 脊髄損傷モデル作製後のBaso Mouse Scale (BMS) : 下肢機能 (0-8点)、Body Support Scale (BSS) : 体幹保持機能 (0-4点) の両者がRac1-KOマウスで著明に良好である (* $P < 0.01$)。B, Rac1-KOマウスでは、脊髄損傷周囲のGFAP免疫反応性 (グリオシス) が低下している (* $P < 0.05$)。

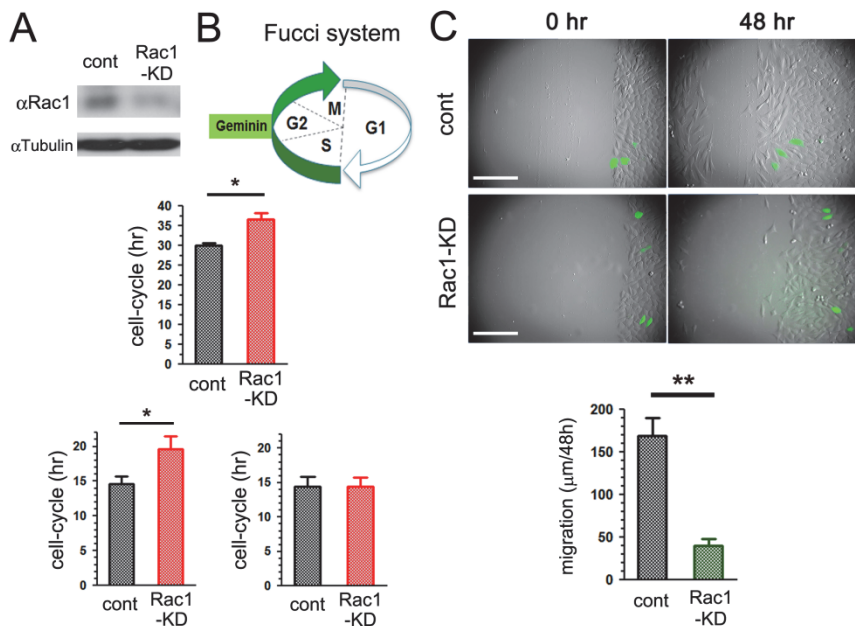


図3 A, shRac1 plasmidの導入により、LN229細胞でのRac1-KDを確認。B, Fucci (Fluorescence ubiquitination-based cell cycle indicator) systemを用いた細胞周期解析により、Rac1-KD細胞では細胞周期の延長、特にG1期が延長する。C, インキュベーター蛍光顕微鏡下でのwound healing assayにより、Rac1-KD細胞では細胞遊走能が低下する (48時間観察)。

3)。まず、インキュベーター蛍光顕微鏡下でFucci (Fluorescence ubiquitination-based cell cycle indicator) systemを用いた細胞周期解析により、Rac1-KD細胞では細胞周期の延長、特にG1期が延長することを明らかにした。次に、インキュベーター蛍光顕微鏡下でのwound healing assayにより、Rac1-KD細胞では細胞遊走能が低下することを突きとめた。

2. アストロサイトの増殖・遊走に関わる Rac1 シグナルの下流分子の同定

次に、アストロサイトの増殖・遊走に関わる Rac1 シグナルの詳細、すなわち、Rac1 の下流分子を同定のため、Rac1-KD LN229 細胞を用いた DNA マイクロアレイによるスクリーニングを行った。コントロール LN229 細胞に比し Rac1-KD 細胞で 2 倍以上に低下もしくは増加している分子に着目した結果、Rac1-KO によりグリオシス形成を抑制する Rac1 の下流分子候補として GSPT1 (G1 to S phase transition 1) を見出した。

Rac1 KD/KO による GSPT1 低下は、2 種の Rac1-siRNA による Rac1-KD LN229 細胞、Rac1-shRNA による Rac1-KD HEK293 細胞、Rac1-KO マウスからの初代培養アストロサイトで確認した。更に、GSPT1 の発現が炎症惹起物質である LPS により上昇し、その上昇が Rac1-KD により抑制されることを明らかにした。この事は、脊髄損傷により惹起される炎症反応状態でも、GSPT1 が Rac1 の下流分子として機能していることを示唆するものであった (図 4)。

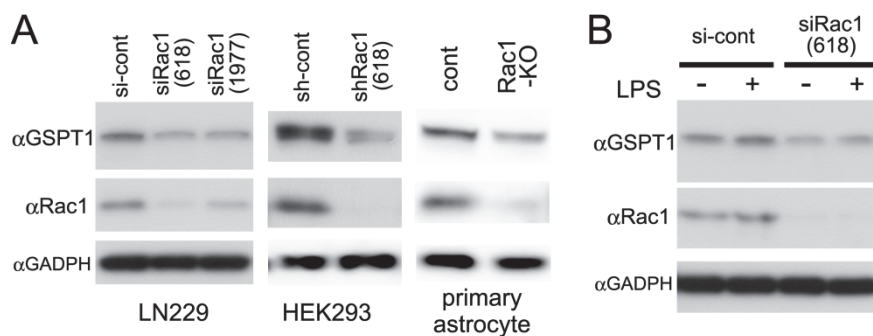


図 4 A, 2 種の Rac1-siRNA (2.5 nM) による Rac1-KD (LN229 細胞)、Rac1-shRNA による Rac1-KD (HEK293 細胞)、Rac1-KO マウスからの初代培養アストロサイトで、GSPT1 低下を認める。
B, GSPT1 の発現が炎症惹起物質である LPS により上昇し、その上昇が Rac1-KD (2.5 nM siRNA) により抑制される。

GSPT1がRac1シグナルの下流分子であることは、我々が見出した新事実であったが、GSPT1が細胞周期のみならず遊走にも関与するとの報告はあった。実際、GSPT1の細胞周期に関与しているかは、インキュベーター蛍光顕微鏡下でFucci systemを用いたGSPT1-KD HeLa細胞の細胞周期解析により確認した。更に、Rac1シグナルの下流でGSPT1が細胞周期を制御（促進）していることは、Rac1-KDによる細胞周期延長がGSPT1の過剰発現により回復することを明らかにした（図5）。しかしながら、GSPT1-KDによる細胞遊走能の低下は、Rac1-KD LN229細胞でもRac1-KD A431細胞でも認められなかった。

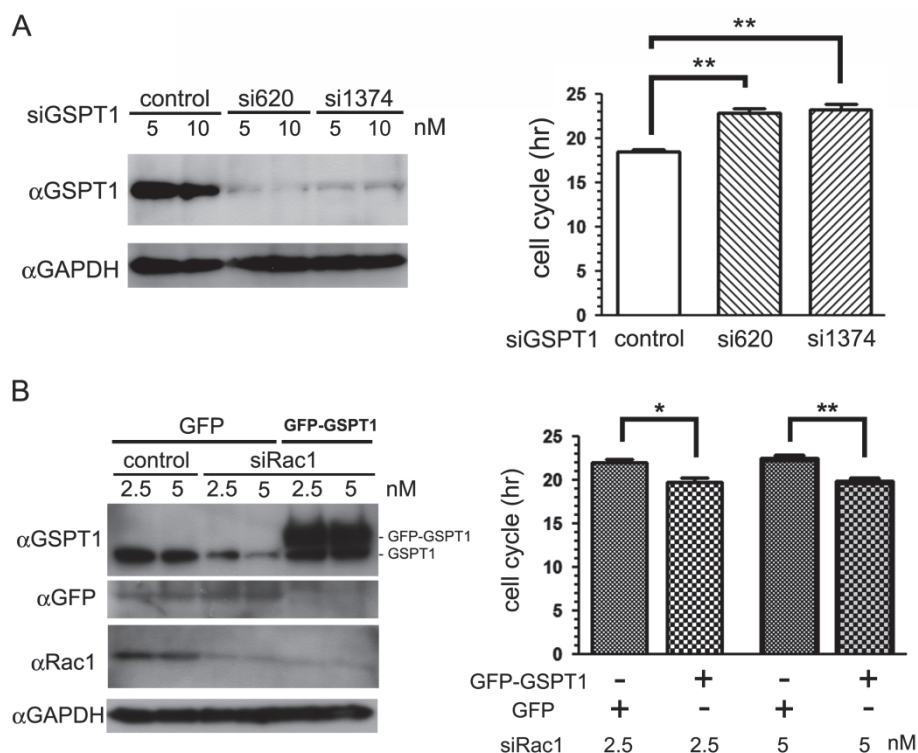


図5 A, 2種のGSPT1-siRNA (5, 10 nM) によるRac1-KD細胞 (HeLa細胞) で、細胞周期の延長を認める。
 B, Rac1-KD細胞 (2.5, 5 nM siRNA, HeLa細胞) では、GSPT1の低下と細胞周期の延長を認める。GFP-GSPT1の過剰発現により、Rac1-KDにより延長した細胞周期が短縮される。

以上より、Rac1シグナルの下流分子としてGSPT1を新規に同定した。Rac1-GSPT1シグナルが関与している機能としては、細胞周期におけるG1期からS期への移行の促進作用を同定したが、細胞遊走能については否定的な結果であった。この事から、Rac1-KOによるグリオシス低下の一因として、Rac1-GSPT1シグナルが関与することを明らかにしたが、遊走に関するRac1シグナルの下流分子の新規同定には至らなかった。

■結論

- ①アストロサイト特異的Rac1-KOマウスを作製した。
- ②Rac1シグナルの抑制が、神経損傷後の過度のグリオシス（増殖・遊走）を抑制し、神経機能回復を促進させる治療ターゲットの1つである。
- ③Rac1-KOによる増殖能低下（細胞周期延長）原因の1つとして、Rac1-GSPT1シグナルが関与することを明らかにした。
- ④②で見出したアストロサイト特異的Rac1-KOマウスにおける脊髄損傷後の著名な神経機能回復をRac1-GSPT1シグナルの低下のみでは説明し難いのも事実である。現在引き続き、グリオシス減弱により中枢神経損傷後の機能回復を促進するRac1シグナル(Rac1の下流シグナル分子)の検索・同定を行っている。

①～④後の我々の最終目標は、Rac1シグナルを抑制する生薬・化合物を見出し、脊髄損傷はもとより脳損傷を含めた中枢神経損傷の修復を促す新規治療法・治療薬の開発に繋がるリード化合物を見出し、新規治療法を開発することである。