

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	神戸大学バイオシグナル総合研究センター・分子薬理研究分野	准教授
所外共同研究者	齋藤 尚亮	神戸大学バイオシグナル総合研究センター・分子薬理研究分野	教授
所外共同研究者	甲田 将章	神戸大学脳神経外科	助教
所内共同研究者	東田 千尋	病態制御部門神経機能学分野	准教授(現 教授)

■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・治療薬・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

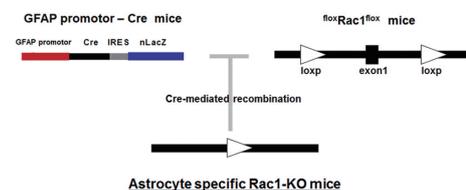


図1

GFAP-Cre マウスと Rac1^{fllox} 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

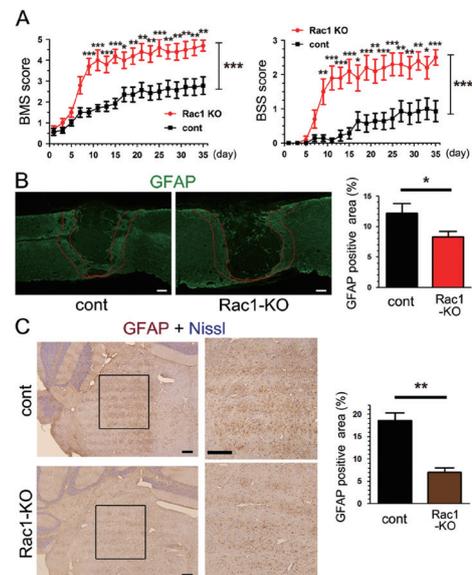


図2

- 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 < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)。
- B, Rac1-KO マウスでは、脊髄損傷5週間後の損傷部周囲の GFAP 免疫反応性(グリオシス)が低下している (*P < 0.05)。
- C, Rac1-KO マウスでは、小脳・脳幹放射線損傷3週間後のスリット状損傷部周囲の GFAP 免疫反応性(グリオシス)が低下している (**P < 0.01)。

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 での小脳・脳幹のスリット状放射線損傷モデル
 でも再現できた (3週間後に評価) (図2)。

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。

上記の Rac1 低下による細胞周期延長及び細胞遊走能
 の低下は、Rac1 を KD した初代培養アストロサイトでも、
 Rac1-KO マウスから得られた初代培養アストロサイ
 トでも確認することが出来た (図4)。

2. アストロサイトの増殖・遊走に関わる Rac1 の下 流ターゲット分子の同定

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 の下流ターゲット分子
 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
 下もしくは増加す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 の下流ターゲッ
 ト分子候補として 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-KO マウスからの初代培養アストロサイトで確認した。
 また、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。更に、LPS により上昇する GSPT1 の発現が、JNK の阻害剤である JNK-

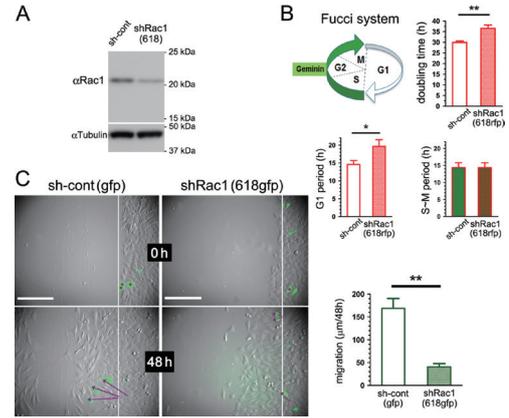


図3

- 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 とインキュベーター蛍光顕微鏡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 (*P < 0.05, **P < 0.01)。
- 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: **P < 0.01)。

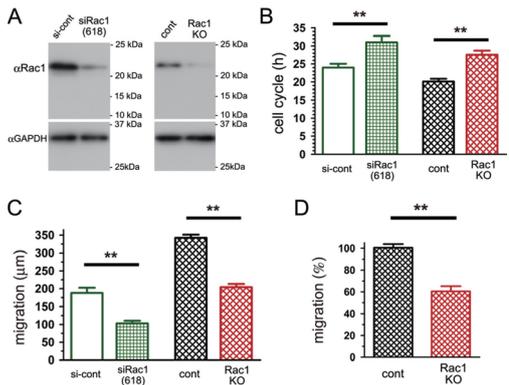


図4

- A, Rac1-siRNA (20nM をリポフェクション) による Rac1-KD マウス初代培養アストロサイト及び 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, Rac1-KD 及び Rac1-KO マウス初代培養アストロサイトで細胞周期の延長を認める (インキュベーター蛍光顕微鏡下: **P < 0.01)。
- C, Rac1-KD 及び Rac1-KO マウス初代培養アストロサイトで遊走能低下を認める (インキュベーター蛍光顕微鏡下での wound healing assay: **P < 0.01)。
- D, Rac1-KD 及び Rac1-KO マウス初代培養アストロサイトで遊走能低下を認める (CytoSelect cell migration assay kit を用いる: **P < 0.01)。

IN-8、ERK の阻害剤である U0126、NF κ B の阻害剤である BAY11-7085 により抑制された。これらの結果は、脊髄を含む中枢神経系の損傷急性期（活性化されたマイクログリアや浸潤してきた白血球・リンパ球により惹起される炎症状態）において、Rac1 の下流シグナルとして機能した JNK・ERK・NF κ B 経路を介して GSPT1 の発現が上昇することを示唆するものであった（図5）。

GSPT1 が Rac1 シグナルの下流ターゲット分子であることは、我々が見出した新事実であったが、GSPT1 は細胞周期のみならず細胞遊走にも関与するとの報告があった。実際、GSPT1 の細胞周期に関与することは、インキュベーター蛍光顕微鏡下での GSPT1-KD HeLa 細胞の細胞周期解析により明らかにした。更に、Rac1 シグナルの下流で GSPT1 が細胞周期を制御（促進）していることを、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により確認した。加えて、初代培養アストロサイトにおいて GSPT1 を KD することでも、細胞周期の延長が認められることを確かめた（図6）。

しかしながら、GSPT1-KD（2種のGSPT1-siRNAを用いる）による細胞遊走能の低下は、LN229細胞でもA431細胞でも確認出来なかった。更に、GSPT1をKDした初代培養アストロサイトにおいても、細胞遊走への関与は証明できなかった（図7）。

以上、Rac1シグナルの下流ターゲット分子としてGSPT1を新規に同定した。Rac1-GSPT1シグナルが関与する機能としては、アストロサイトの細胞周期におけるG1期からS期への移行促進を介してのグリオーシス形成促進が考えられる。一方で、従来の報告にあるGSPT1の細胞遊走促進作用については、我々の研究では、否定的結論であった（支持する結果は得られなかった）。このように、Rac1シグナル（特にGSPT1）の抑制が、神経損傷後の過度のグリオーシス形成（グリア癩痕）を抑制し、損傷後機能回復を促進させる治療ターゲットの1つであることが分かった。

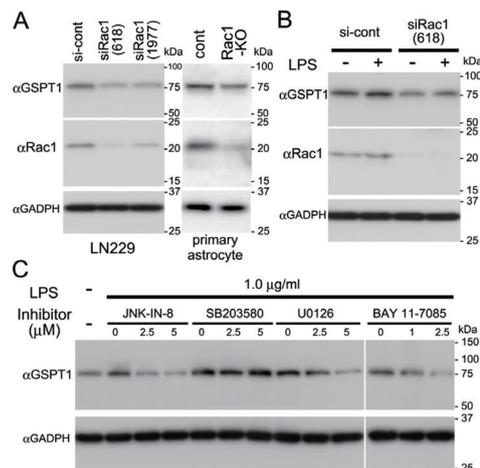


図5

- A, 2種のRac1-siRNA（2.5 nMをリポフェクション）によるRac1-KD（LN229細胞）及び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。
 C, LPSにより上昇するGSPT1の発現が、JNKの阻害剤であるJNK-IN-8、ERKの阻害剤であるU0126、NF κ Bの阻害剤であるBAY11-7085により抑制されるが、p38 MAPKの阻害剤であるSB203580では抑制されない。

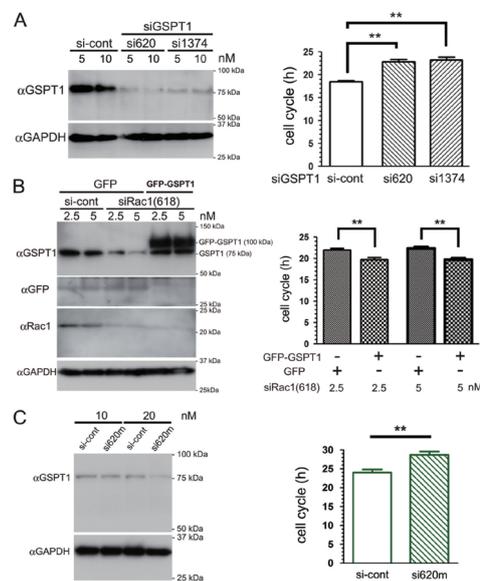


図6

- A, 2種のGSPT1-siRNA（5, 10 nMをリポフェクション）によるGSPT1-KD HeLa細胞で、細胞周期の延長を認める（10 nM、インキュベーター蛍光顕微鏡下：**P < 0.01）。
 B, Rac1-KD HeLa細胞（2.5, 5 nM siRNA）でGSPT1低下を認め、Rac1-KDにより延長した細胞周期は、GFP-GSPT1の過剰発現により回復する（**P < 0.01）。
 C, GSPT1-siRNA（10, 20 nMをエレクトロポレーション）によるGSPT1-KDマウス初代培養アストロサイトで、細胞周期の延長を認める（20 nM：**P < 0.01）。

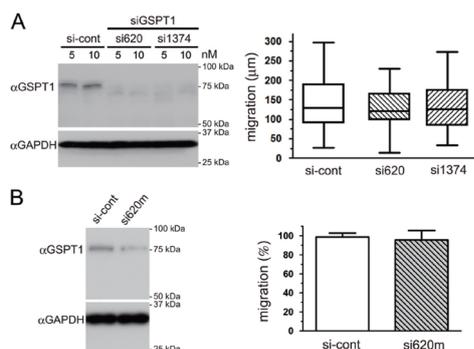


図 7

- A, 2種のGSPT1-siRNA (5, 10 nMをリポフェクション)によるGSPT1-KD LN229細胞で、細胞遊走能低下を認めない(10 nM、インキュベーター蛍光顕微鏡下でのwound healing assay)。
- B, GSPT1-siRNA (20 nMをエレクトロポレーション)によるGSPT1-KDマウス初代培養アストロサイトで、細胞遊走能低下を認めない(CytoSelect cell migration assay kitを用いる)。

結論

- ① アストロサイト特異的 Rac1-KO マウスを作製した。
- ② Rac1 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) を抑制した。
- ③ Rac1-KO による過度のグリオシス抑制 (アストロサイトの細胞周期延長) の原因として、Rac1-GSPT1 シグナルが関与することを明らかにした。
- ④ Rac1 シグナル (特に GSPT1) の抑制が、神経損傷後の過度のグリア瘢痕を抑制し、損傷後機能回復を促進させる治療ターゲットの1つであることが分かった。

一方で、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 シグナル低下のみで説明するのは難しいのも事実である。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 シグナルの下流ターゲット分子) の検索・同定が必要と考えられた。

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薬・治療法を開発することであり、更なる研究の発展が必要である。

以上の研究成果は、下記に報告及び報告予定である。

- 1) Ishii T, Ueyama T, Shigyo M, Kohta M, Kondoh T, Kuboyama T, Uebi T, Hamada T, Gutmann DH, Aiba A, Kohmura E, Tohda C, Saito N: A novel Rac1-GSPT1 signaling pathway controls astrogliosis following central nervous system injury. *J Biol Chem*, 2017, 292, 1240-1250
- 2) Sakamoto I, Ueyama T, Hayashibe M, Shigyo M, Tohda C, Saito N: Roles of Cdc42 and Rac in Bergmann glia during cerebellar corticogenesis. Manuscript in preparation