

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18374

研究課題名(和文) 中枢神経系脱髄疾患におけるアストロサイト特異的遺伝子Ndr2の重要性

研究課題名(英文) The role of Ndr2 in multiple sclerosis

研究代表者

宝田 美佳 (Takarada, Mika)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40565412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症は自己免疫が関与する中枢神経系の脱髄疾患であるが、中枢神経系の細胞の病態への関与については未だ不明な点が多い。本研究では中枢神経系においてアストロサイト特異的に発現する分子Ndr2に注目し、同分子を介したアストロサイトの多発性硬化症病態への関与と、その分子メカニズムの解明を行った。その結果、アストロサイトNdr2は運動ニューロンのダメージを調節することで麻痺症状に関与し、多発性硬化症の病態形成に寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Multiple sclerosis (MS) is autoimmune disease of the central nervous system (CNS), however, the involvement of the CNS parenchymal cells to the pathology is not fully elucidated. N-myc downstream-regulated gene 2 (Ndr2) is a differentiation-associated molecule predominantly expressed in astrocytes in the central nervous system. In this study, we examined the expression and the role of Ndr2 in MS pathology, and its underlying mechanisms using a mouse model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The current study demonstrated that Ndr2 is involved in neurological symptom through the regulation of motor neuron damages during the pathogenesis of EAE.

研究分野：神経化学・神経薬理学

キーワード：アストロサイト 多発性硬化症 脱髄 炎症

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症は、自己免疫が関与する中枢神経系(CNS)の脱髄疾患である。活性化した免疫細胞が中枢神経系に浸潤し、脱髄を引き起こすことにより麻痺などの神経症状を呈する。これまではそのメディエーターとして種々のT細胞の重要性が明らかとなってきた。しかしながら、これら炎症細胞がまず血管から中枢神経系に侵入する際、侵入先である中枢神経系の細胞からどのように制御されているかは殆ど解明されていない。中枢神経系の血管は血液脳関門(Blood-brain barrier: BBB)と呼ばれる構造を形成しており、グリア細胞の一種であるアストロサイトは、その終足で血管を取り囲み裏打ちすることでBBBに寄与している。一方で、アストロサイトは様々な病態下において劇的な形態変化を伴いながら活性化し、ダイナミックに遺伝子発現を変化させ、炎症の調節や組織修復に関わることが報告されている。

これまでに我々はアストロサイト特異的遺伝子 *Ndr2*(*N-myc downstream-regulated gene 2*)がアストロサイトの活性化に促進的に働くことを、パーキンソン病モデル、脳損傷モデルにおいて明らかにした。更に脳損傷モデルにおいては、*Ndr2* が *IL-6*, *CXCL1*, *CCL2* などのサイトカインやケモカインを介して脳内免疫担当細胞の集積に働くという結果を得ている。これらのことから、活性化アストロサイトの *Ndr2* が、炎症性細胞浸潤の入口において誘因物質の発現に関与することで、脱髄疾患における炎症性細胞の浸潤に対し促進的な役割を果たすのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、多発性硬化症におけるアストロサイトの重要性を検証する。中枢神経系への入り口となる血管をとりまくアストロサイトが、免疫細胞活性化の次のステップである、免疫細胞の浸潤過程を規定する、という仮説を検証し、病態のさらなる理解と克服を目指す。具体的には、中枢神経系においてアストロサイト特異的に発現しその活性化に関与する、*Ndr2* 遺伝子の欠損マウスを用いて多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を作製し解析する。これによりアストロサイトが *Ndr2* を介して多発性硬化症病態におよぼす影響と、その分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

多発性硬化症モデルとして、髄鞘の構成成分であるMOG由来のペプチド抗原による免疫感作を行いEAEを誘導する。アストロサイトの関与を明らかにするために、アストロ

サイト活性化に関わる *Ndr2* の欠損マウスを用いて解析を行う。それにより、アストロサイト活性化減弱が脱髄疾患病態に及ぼす影響、およびアストロサイト *Ndr2* を介した病態制御メカニズムを明らかにする。

アストロサイト活性化減弱が脱髄疾患病態に及ぼす影響については、*Ndr2* 欠損マウスを用いて、多発性硬化症モデルであるEAEを誘導し、その表現形を解析する。機能的変化を麻痺症状のスコア化(0.無症状、1.尾の緊張低下、2.後肢運動低下、3.後肢不完全麻痺、4.後肢完全麻痺、5.死亡)により経時的に解析する。同マウス脊髄を用いてパラフィン切片および凍結切片を作成し組織学的解析を行う。免疫細胞の浸潤、アストロサイト活性化、髄鞘の脱落の指標としてそれぞれ、*CD45*, *GFAP*, *MBP* の免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて観察を行う。組織学的解析についてはEAE誘導後急性期と慢性期にわけて解析を行う。

Ndr2 を介した病態制御メカニズムについて、EAEマウスの免疫組織(血液・脾臓・リンパ節)と中枢神経組織(脳・脊髄)細胞を用いてフローサイトメトリー法(FACS)による解析を行い、*CD4*+T細胞(*IL17*+ *Th17*細胞, *IFN γ* + *Th1*細胞)や*B220*+B細胞、抗原提示細胞(*CD11b*+ *M ϕ* , *CD11c*+ *DC*)いずれの細胞種がいずれの組織で変動しているかを定量化することで、標的プロセスおよび標的細胞をまず同定する。また、野生型および *Ndr2* 欠損マウスのEAEモデルを用いて中枢神経組織からRNAおよびタンパク質を抽出しサイトカインおよびケモカインの発現解析を行う。特に、FACSで同定した標的細胞/プロセスの制御に重要なサイトカイン/分子に注目する。さらに、野生型および *Ndr2*KOマウスからのアストロサイトの単離、あるいはsiRNAによるノックダウンの系を用いて、*Ndr2* による標的分子の機能調節作用を *in vitro* の系でも評価し、それが細胞自律的作用であるかを明らかにする。

4. 研究成果

まず、野生型マウスを用いてMSモデルであるEAEを作製し組織学的解析を行った。その結果、*Ndr2* の発現はとくに灰白質と白質の境界領域において、アストロサイトマーカーである *GFAP* や *S100 β* と一致して認められ、EAE誘導後にはその染色性の増強が認められた。また、Western blot解析の結果から、Sham群と比較してEAEの急性期、慢性期のいずれにおいても *Ndr2* の発現が上昇していることが明らかとなった。

次に、MSモデルを *Ndr2*KOマウスで解析したところ、野生型と比較してEAEの誘導による麻痺症状が軽減していることを見

出した。さらに、髄鞘タンパク質である MBP の免疫組織染色を行ったところ、EAE 誘導による MBP 非染色エリアの割合 脱髄が、Ndr2 欠損マウスでは軽減していることが明らかとなった。同様に、Western blot の解析においても、Ndr2 欠損マウスによる EAE 誘導後の MBP 発現減少の軽減が認められた。これらの傾向は、急性期および慢性期のいずれにおいても認められたが、慢性期においてより顕著な差を示した。

一方で、炎症性細胞の FACS による解析からは、予想に反する結果が得られた。EAE 誘導後の Ndr2KO マウスでは野生型マウスと比較して、CD8+Tcell 等ある種の集団の浸潤の減少は認められたものの、血球系細胞全体を通じた浸潤の減弱は顕著には認められなかった。さらに、急性期における CCL2, CXCL1 をはじめとするケモカインやサイトカインの発現について、野生型と Ndr2 欠損マウスの間で著変は認められなかった。しかし、麻痺症状の差が明らかであったため、次に神経細胞のマーカーについて解析を行った。その結果、EAE 急性期に ChAT 陽性運動ニューロンにおいて、傷害神経細胞のマーカーである ATF3 の発現が上昇し、この発現が Ndr2KO マウスでは減弱していることを見出した。また、神経細胞の汎用マーカーである NeuN は EAE 誘導後に発現が減少し、この減少も Ndr2KO マウスでは軽減されていた。これらに付随して、Western blot の解析から、アストロサイトに発現する特定のアミノ酸トランスポーターが、EAE 誘導後に発現が減少し、Ndr2KO マウスではこの減少程度が軽度であることを見出した。

以上の結果から、アストロサイトに発現する Ndr2 が多発性硬化症の病態形成に重要な役割を果たすことが示唆された。そのメカニズムとしては、当初の予想していた炎症性細胞の浸潤よりはむしろ、神経細胞の機能制御にかかわり麻痺症状を制御していると考えられる。現在、Ndr2 の標的候補分子であるアミノ酸トランスポーターについて、アストロサイトの培養系を用いてその機能制御を確証すべく実験を進めている。今後は、同トランスポーターの発現・機能調節が EAE 病態を回復させるかを明らかにする必要がある。本研究により、多発性硬化症の新規治療法開発に繋がる新たな標的を見出すことができる」と期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

*Hattori T., Kaji M., Ishii H., Jureepon R., Takarada-Iemata M., Ta H.M., Le T.M., Konno A., Hirai H., Shiraiishi Y., Ozaki N., Yamamoto Y., Okamoto H., Yokoyama S., Higashida H., Kitao Y., Hori O. CD38 positively regulates postnatal development of astrocytes cell-autonomously and oligodendrocytes non-cell-autonomously. (2017) *Glia*、査読有、65(6):974-989、doi: 10.1002/glia.23139.

Ta H.M., Le T.M., Ishii H., Takarada-Iemata M., Hattori T., Hashida K., Yamamoto Y., Mori K., Takahashi R., Kitao Y., *Hori O. Atf6a deficiency suppresses microglial activation and ameliorates pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. (2016) *Journal of Neurochemistry*、査読有、139(6):1124-1137、doi: 10.1111/jnc.13714.

Le T.M., Hashida K., Ta H.M., Takarada-Iemata M., Kokame K., Kitao Y., *Hori O. Deletion of Herpud1 enhances heme oxygenase-1 expression in a mouse model of Parkinson's disease. (2016) *Parkinson's Disease*、査読有、2016;2016:6163934、doi: 10.1155/2016/6163934.

Kezuka D., Takarada-Iemata M., Hattori T., Mori K., Takahashi R., Kitao Y., *Hori O. Deletion of Atf6a enhances kainate-induced neuronal death in mice. (2016) *Neurochemistry International*、査読有、92:67-74、doi: 10.1016/j.neuint.2015.12.009.

*Takarada-Iemata M. 中枢神経障害時におけるアストロサイト活性化調節機構 (2015) *Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry*、査読無、54(3):63-68.

[学会発表](計 5 件)

宝田美佳、沖谷なほ子、郡山恵樹、北尾康子、堀修 (2017) 網膜神経細胞死に起因するシグナル連関における小胞体ストレス応答の重要性、第 1 回 Neuro-vascular Meeting、2 月 25 日、神戸薬科大学(兵庫県・神戸市)

宝田美佳 (2016) 中枢神経系疾患におけるアストロサイト、第 59 回日本神経化学学会大会第 9 回神経化学の若手研究者育成セミナー、9 月 8-10 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Ta Minh Hieu, Le Manh Thuong, 石井宏史、宝田美佳、服部剛志、森和俊、高橋良輔、北尾康子、堀修(2016) Atf6a deficiency suppresses microglial activation and ameliorates pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 59 回日本神経化学学会大会、9 月 8-10 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

宝田美佳、郡山恵樹、北尾康子、堀修
(2016) 軸索傷害性神経細胞死における小胞
体ストレス応答の保護的效果、第17回ORIGIN
神経科学研究会、8月27-28日、あわら温泉
まつや千千(福井県・あわら市)

宝田美佳、吉川陽文、会田泰裕、Ta Minh
Hieu、服部剛志、Le Manh Thuong、北尾康子、
中田光俊、堀修(2015) Involvement of Ndr2
in blood-brain barrier disruption after stroke
第58回 日本神経化学会大会、9月10-12日、
大宮ソニックシティ(埼玉県・さいたま市)

〔その他〕

ホームページ等

金沢大学神経解剖学ホームページ

<http://med03.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宝田 美佳 (TAKARADA, Mika)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40565412