

## 日本神経化学会奨励賞受賞者研究紹介

### 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

宝田 美佳

(金沢大学医薬保健研究域医学系神経分子標的学)

#### はじめに

アストロサイトは中枢神経系に豊富に存在する“glue（にかわ、糊）”細胞であるが、神経細胞への構造的支持だけではなく、シナプスでの伝達物質調節や微小循環調節を介して神経活動の制御に関与している<sup>1)2)</sup>。これらの生理的役割に加え、外傷や脳梗塞、神経変性疾患等の神経細胞死を伴う神経病態においても、アストロサイトは重要な役割を果たす。形態変化としての肥大化や中間系フィラメントの発現上昇を特徴とした活性化アストロサイトとなり、神経障害に応じて増殖し、傷害部位周囲の glial scar と呼ばれるバリア構造形成を行う<sup>3)4)</sup>。しかし、それがどのタイミングで、どのようなシグナルを介し調節されているか、そして能動的に神経細胞死をコントロールしているのか、その詳細については未だ不明な点が多い。

アストロサイトは脆弱な神経細胞と比較し、病態時の種々のストレスに耐性を持つ細胞である。活性化アストロサイトは両面性を持ち、炎症性反応に関わることや軸索の再生阻害に関わることが知られる一方で<sup>4)</sup>、炎症の限局化や組織修復に関わり神経保護に働く作用が報告されている<sup>5)</sup>。我々は、最終的にアストロサイトの機能調節による中枢神経系病態の改善を目指しており、現在、適切なレベルとタイミングでアストロサイトを制御するための、病態におけるアストロサイト活性化分子機構の解明を行っている<sup>6)7)</sup>。これまで主に、①中枢神経系においてアストロサイト特異的発現パターンを示し、②ストレスに応答する特徴を持つ分子として N-myc downstream-regulated gene 2

(Ndrg2) に注目し解析を行ってきた。Ndrg2 は、グルココルチコイドや低酸素条件、重金属を含む種々のストレスに応答する、アストロサイト特異的な機能未知の遺伝子である。本稿では、病態下のアストロサイト活性化における Ndrg2 の重要性とその分子機構について紹介する。

#### 中枢神経系障害におけるアストロサイト活性化と Ndrg2 の発現

Ndrg2 は Ndrg1 から Ndrg4 で構成される Ndrg ファミリー分子であり、分化やストレスの関連分子として同定された<sup>8)</sup>。Ndrg2 は脳や心臓、筋に高発現し、複数のリン酸化サイトをもつ細胞質タンパクであるが、直接の標的分子や機能の詳細は明らかになっていない。これまでに、Ndrg2 の発現が腫瘍細胞の増殖・浸潤に抑制的に働くことが、ヒト由来腫瘍組織やがん細胞を含む多くのモデルで報告されている<sup>9)10)</sup>。中枢神経系においては、Ndrg1 はオリゴデンドロサイトに、Ndrg2 はアストロサイトに、Ndrg3 と Ndrg4 は広く発現が認められる<sup>11)</sup>。Ndrg2 の発現調節はステロイドホルモンや虚血条件下により上方調節され、一方で抗うつ薬の長期投与により下方調節されるという特徴をもつ<sup>12)</sup>。

これまでに中枢神経系の病態では、中大脳動脈閉塞脳虚血モデル早期に Ndrg2 の発現がアストロサイトにおいて上昇し、細胞質から核へ局在が移行することが報告されている<sup>13)</sup>。我々は、Ndrg2 が、MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) 急性投与マウスパーキンソン病モデル

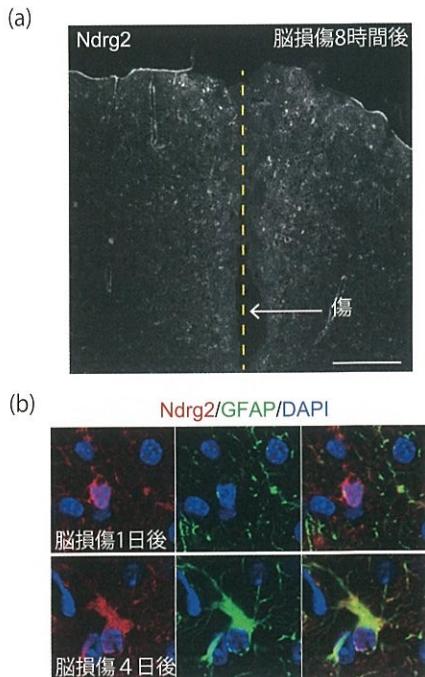


図1 Cortical stab injury 脳損傷マウスモデルにおける Ndrbg2 の発現

(a) 脳損傷後 8 時間の Ndrbg2 免疫染色像。  
 (Scale bar : 200μm) (b) 脳損傷後 1-4 日後の Ndrbg2 (赤) および GFAP (緑) の免疫染色像。活性化アストロサイトマーカー GFAP の発現上昇に先んじて、脳損傷後早期から損傷部周囲アストロサイトでは Ndrbg2 の発現上昇が認められる。

における活性化アストロサイトに高発現しており、パーキンソン病および大脳皮質基底核変性症の患者脳においても、アストロサイト様細胞に高発現することを報告した<sup>14)</sup>。中間系フィラメントの1つで活性化アストロサイトマーカーである、glial fibrillary acidic protein (GFAP) はアストロサイトの太い突起を染め出すのに対し、Ndrbg2 は細胞質に存在するため微細な突起にも染色性が認められた。また、Cortical stab injury 脳損傷モデル<sup>15)</sup>の解析から、脳損傷後 24 時間以内の早期の時点から、活性化マーカーである GFAP の発現上昇に先んじて、損傷周囲アストロサイトにおいて Ndrbg2 の発現が上昇することを報告した(図1)<sup>16)</sup>。すなわち、Ndrbg2 はマウスおよびヒト活性化

アストロサイトいずれにおいても高発現しており、活性化の過程に関与する可能性が示唆される。古くから広く使われてきたアストロサイト活性化指標 GFAP は、その神経障害への応答は数日を要する。アストロサイトの病態に対する能動的役割を追求するため、神経障害に対してより早期に応答し、かつアストロサイト特異的である分子に注目することがアストロサイト特異的機能の解明につながると考え、個体レベルでの Ndrbg2 の役割を解析した。

### Ndrbg2 はアストロサイト活性化に促進的に働く

我々は Ndrbg2 の exon3、4 欠失による機能欠損マウスを作製し、Cortical stab injury 脳損傷モデルを用いて個体病態レベルでのアストロサイト活性化における Ndrbg2 の重要性を検討した。野生型マウスでは健常側に対し障害側において、ストレス応答性分子である Heme oxygenase-1 (HO-1) およびアストロサイト活性化マーカー GFAP の有意な発現上昇が認められた。Ndrbg2 欠損マウスでは、脳損傷後の HO-1 および GFAP の発現誘導が有意に減弱していた。また、大脳皮質では海馬等とは異なり、アストロサイトは血管周囲および皮質表層の一部の細胞を除き GFAP 隆性である。脳損傷後には損傷周辺部のアストロサイトが GFAP 陽性になり 3-5 日目をピークとしてアストロサイトの肥大化が認められた。脳損傷後 4 日目における組織学的解析から、Ndrbg2 欠損マウスでは、肥大化した活性化アストロサイト面積の減少が認められた(図2)。すなわち、中間系フィラメントの発現上昇と細胞の肥大化を特徴とする、アストロサイトの活性化が Ndrbg2 の欠損マウスでは減弱していることが明らかとなった<sup>16)</sup>。

### Ndrbg2 は IL-6-STAT3 経路を介してアストロサイト活性化に寄与する

アストロサイトの活性化に関わる分子として、Transforming growth factor-β (TGFβ)<sup>17)</sup>や Endothelin-1 (ET-1)<sup>18)</sup>、signal transducer and activator

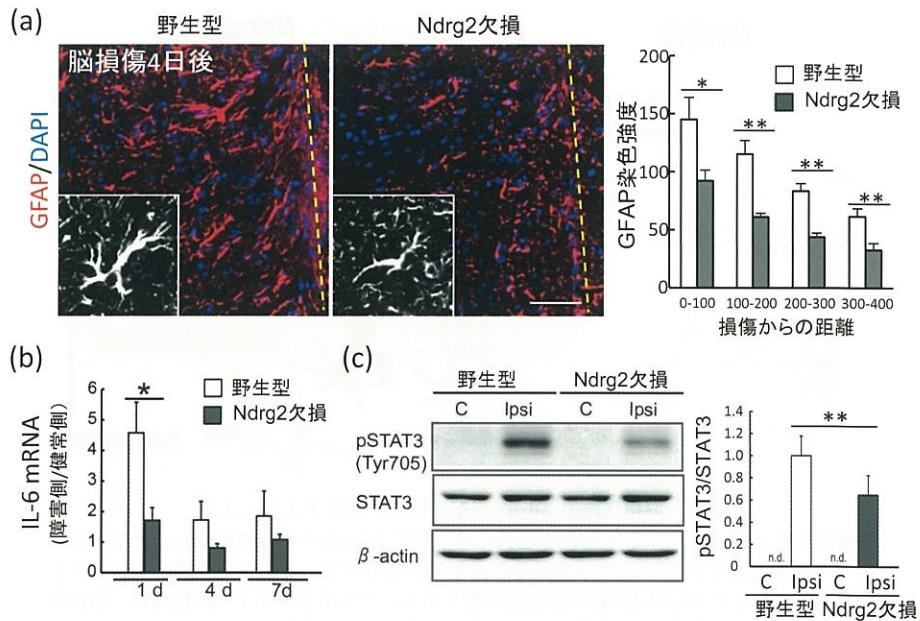


図2 Ndrd2機能欠失によりアストロサイトの活性化が減弱する

(a) 脳損傷後4日目におけるGFAP(赤)の免疫染色像。(Scale bar: 50μm) (b) 脳損傷後1、4、7日後におけるIL-6のmRNA発現。(c) 脳損傷後24時間におけるSTAT3のTyr705リン酸化。Ndrd2欠損マウスでは脳損傷後のIL-6-STAT3経路活性化の減弱が認められる。文献16)  
Takarada-Iemata et al. J. Neurochem. より改変。

of transcription 3 (STAT3) 経路等が挙げられ、特にSTAT3経路はコンディショナルノックアウトマウスを用いた脊髄損傷モデルでの機能欠失、機能促進の解析によりその重要性が報告されている<sup>5)19)</sup>。Ndrd2欠損マウスで見られたアストロサイト活性化減弱の分子機構として、これらの関与を検討したところ、ET-1およびTGFβ経路の関与は認められなかった。STAT3経路について検討したところ、Ndrd2欠損マウスでは、脳損傷後24時間後において、STAT3の活性化を担うチロシン705のリン酸化レベルが有意に減弱していることが明らかとなった(図2)。

このSTAT3の活性化の上流分子について検討する目的で、Interleukin-6 (IL-6) ファミリー分子である、IL-6、Ciliary neurotrophic factor (CNTF)、Leukemia inhibitory factor (LIF) の経時的 mRNA 発現について解析を行った。いずれの分子も脳損傷後に障害側で発現上昇が認められ、Ndrd2欠損マウスにおいてはいずれの遺伝子についても発現

誘導の有意な減弱を認めた。qPCR解析による時系列の結果から、損傷に最も早期に応答していたIL-6について、アストロサイトにおける発現を脳損傷24時間の組織切片で解析した。IL-6とGFAPの共染色を行ったところ、野生型マウスと比較してNdrd2欠損マウスでは、共陽性のIL-6を発現するアストロサイトの数が有意に減少していた。すなわち、アストロサイトに発現するNdrd2は、IL-6-STAT3経路を介してアストロサイトの活性化を正に調節している可能性が示唆された。

続いて、Ndrd2のアストロサイト活性化における役割をより明確にするため、野生型およびNdrd2欠損マウス由来アストロサイトを用いたin vitroの系で解析を行った。これまでに、アストロサイトの活性化における増殖能と移動能の重要性が報告されているため<sup>18)20)</sup>、同機能への影響の有無を解析するために、MTT assayによる増殖能の検討とScratch wound assayによる移動能の検討

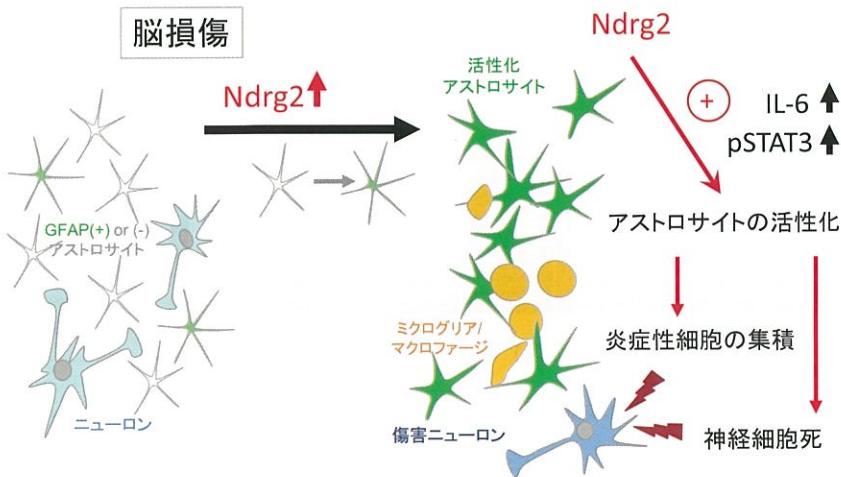


図3 脳損傷後のNdrg2の重要性とその分子メカニズム

脳損傷後のアストロサイト活性化の過程では早期にNdrg2の発現が上昇し、アストロサイトの肥大化およびGFAPの発現誘導に促進的に寄与する。その分子機構としてIL-6の発現調節を介したSTAT3経路の活性化が関与する。アストロサイトの活性化は、脳損傷後の炎症性細胞の集積や神経細胞死などの病態の形成に寄与している。

を行った。その結果、両解析系において、野生型マウス由来およびNdrg2欠損マウス由来アストロサイトの間に顕著な違いは認められなかった。次に、脳損傷モデルで認められたIL-6遺伝子発現についての検討を行った。培養系のアストロサイトは既に活性化アストロサイトに近いという問題点を持つが<sup>21)</sup>、脳損傷モデルで見られたNdrg2およびGFAPの発現上昇が認められる刺激として複数の薬剤からForskolinを選択した。細胞内cAMPレベルを上昇させるForskolin刺激により、Ndrg2、GFAPおよびIL-6の発現が誘導された。Ndrg2欠損マウスでは野生型アストロサイトと比較して、誘導されるGFAPおよびIL-6の低発現が認められた。IL-6の発現はmRNAに加え培養中の分泌タンパク質レベルでも低下しており、この減少はいずれもNdrg2の強制発現によって回復した。

以上の結果から、アストロサイトに発現するNdrg2がIL-6の発現調節を介してアストロサイト活性化を正に制御することが明らかとなつた<sup>16)</sup>。

#### 脳損傷後の炎症性細胞集積、神経細胞死におけるアストロサイトNdrg2の重要性

脳損傷後におけるアストロサイト活性化は、その他の細胞、炎症性細胞の集積や神経細胞死にどのような影響を与えるのだろうか。Ndrg2欠損マウスでは、脳損傷4日目の損傷中心部において、細胞死マーカーであるsingle-strand DNA陽性細胞数、およびFluoro-Jade C陽性の変性神経細胞数の減少が認められた。また、損傷部位へのIba1陽性ミクログリア/マクロファージの集積細胞数の減少が認められた。また、これらの細胞誘因に関わるケモカイン、chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1)、chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)のmRNA発現誘導が、Ndrg2欠損マウスでは脳損傷後1日目から有意な減弱を示していた。Ndrg2はアストロサイトに発現が限局しているため、同欠損マウスの結果はアストロサイトが病態に及ぼす影響だと推察される。すなわち、Ndrg2は脳損傷後のアストロサイト活性化を介して、間接的に炎症性細胞の集積と続く神経細胞死を調節している可能性が示唆された（図3）。

## おわりに

本研究から、脳損傷後のアストロサイト活性化早期の過程において発現が上昇する分子としてNdrg2を見出し、Ndrg2を介したIL-6-STAT3経路が重要であるという新たな調節機構を明らかとした。本研究成果は、アストロサイト特異的遺伝子の機能欠失が組織炎症と神経変性に関わることを明らかとし、病態下におけるアストロサイトの重要性を示した点においても意義がある。

アストロサイトの活性化は様々な神経系疾患において認められるが、その病態毎に遺伝子発現様式が異なり<sup>21)</sup>、アストロサイトの活性化が画一的でない可能性も報告されている。様々な病態では何が共通で何が異なるのか、グリア細胞の機能をミクロとマクロの視点で複合的に理解することで、将来的には神経障害時の神経機能の可塑性に環境細胞の機能制御によりアプローチできるのではないかと考えている。現在は脳梗塞を含む複数の病態モデルを用いて解析を行っている。新規治療標的確立にむけた神経系疾患研究の展開の上で、基盤となる知見への寄与を目指すものである。

## 謝 辞

本稿で紹介した研究の遂行にあたり、ご指導を賜りました金沢大学医薬保健研究域医学系神経分子標的学の堀修教授、並びに研究室の皆様、これまでお世話になりました全ての先生方に、心より感謝申し上げます。最後に、本稿執筆の機会を与えて下さいました神経化学会奨励賞選考委員の先生方、広報委員の先生方、並びに関係者の先生方に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*, 22, 208-215 (1999).
- 2) Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*, 10, 1369-1376 (2007).
- 3) Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32, 638-647 (2009).
- 4) Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, 5, 146-156 (2004).
- 5) Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med*, 12, 829-834 (2006).
- 6) Hashida K, Kitao Y, Sudo H, Awa Y, Maeda S, Mori K, Takahashi R, Iinuma M, Hori O. ATF6alpha promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One*, 7, e47950 (2012).
- 7) Yoshikawa A, Kamide T, Hashida K, Ta HM, Inahata Y, Takarada-Iemata M, Hattori T, Mori K, Takahashi R, Matsuyama T, Hayashi Y, Kitao Y, Hori O. Deletion of Atf6α impairs astroglial activation and enhances neuronal death following brain ischemia in mice. *J Neurochem*, 132, 342-353 (2015).
- 8) Qu X, Zhai Y, Wei H, Zhang C, Xing G, Yu Y, He F. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. *Mol Cell Biochem*, 229, 35-44 (2002).
- 9) Lusis EA, Watson MA, Chicoine MR, Lyman M, Roerig P, Reifenberger G, Gutmann DH, Perry A. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res*, 65, 7121-7126 (2005).
- 10) Kim A, Kim MJ, Yang Y, Kim JW, Yeom YI, Lim JS. Suppression of NF-kappaB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells. *Carcinogenesis*, 30, 927-936 (2009).
- 11) Okuda T, Kokame K, Miyata T. Differential ex-

- pression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system. *J Histochem Cytochem*, 56, 175-182 (2008).
- 12) Nichols NR. *Ndrg2*, a novel gene regulated by adrenal steroids and antidepressants, is highly expressed in astrocytes. *Ann N Y Acad Sc*, 1007, 349-356 (2003).
  - 13) Li Y, Shen L, Cai L, Wang Q, Hou W, Wang F, Zeng Y, Zhao G, Yao L, Xiong L. Spatial-temporal expression of NDRG2 in rat brain after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res*, 1382, 252-258 (2011).
  - 14) Takeichi T, Takarada-Iemata M, Hashida K, Sudo H, Okuda T, Kokame K, Hatano T, Takanashi M, Funabe S, Hattori N, Kitamura O, Kitao Y, Hori O. The effect of *Ndrg2* expression on astroglial activation. *Neurochem Int*, 59, 21-27 (2011).
  - 15) Auguste KI, Jin S, Uchida K, Yan D, Manley GT, Papadopoulos MC, Verkman AS. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury. *FASEB J*, 21, 108-116 (2007).
  - 16) Takarada-Iemata M, Kezuka D, Takeichi T, Ikawa M, Hattori T, Kitao Y, Hori O. Deletion of N-myc downstream-regulated gene 2 attenuates reactive astrogliosis and inflammatory response in a mouse model of cortical stab injury. *J Neurochem*, 130, 374-387 (2014).
  - 17) Schachtrup C, Ryu JK, Helmrick MJ, Vagena E, Galanakis DK, Degen JL, Margolis RU, Akassoglou K. Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. *J Neurosci*, 30, 5843-5854 (2010).
  - 18) Gadea A, Schinelli S, Gallo V. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci*, 28, 2394-2408 (2008).
  - 19) Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci*, 28, 7231-7243 (2008).
  - 20) Robel S, Bardehle S, Lepier A, Brakebusch C, Götz M. Genetic deletion of cdc42 reveals a crucial role for astrocyte recruitment to the injury site in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 31, 12471-12482 (2011).
  - 21) Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*, 32, 6391-6410 (2012).