

## 主論文の要旨

**Matrix metalloproteinase-3 is a possible mediator of neurodevelopmental impairment due to polyI:C-induced innate immune activation of astrocytes**

マトリックスメタロプロテアーゼ - 3 は、アストロサイトにおける polyI:C 誘発性の自然免疫活性化による神経発達障害に関与する

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
臨床薬物情報学講座 医療薬学分野

(指導：山田 清文 教授)

山田 真之亮

## 【諸言】

神経精神疾患は遺伝要因と環境要因が相互に関連して発症に至ると考えられている。遺伝要因に関しては近年の遺伝子解析技術の進歩によって精力的に研究が進められているが、環境要因に着目した研究は少ないのが現状である。神経精神疾患の環境要因の一つとして周産期のウイルス感染が知られている。我々は、toll-like receptor 3 (TLR3) に作用して自然免疫を活性化する二本鎖 RNA 様分子 polyriboinosinic-polyribocytidylic acid (polyI:C) を用いて周産期擬似ウイルス感染モデルを作製し、神経発達障害の分子機構の解明を進めてきた。これまでの研究から、新生仔期に polyI:C を投与したモデル動物の海馬において、interferon-induced transmembrane protein 3 (Ifitm3) の発現がアストロサイトで増加すること、polyI:C を処置した培養アストロサイトの条件培地 (polyI:C-ACM) を初代培養神経細胞に処置すると、神経突起伸展の抑制やシナプス形成障害を引き起こすことを見出した。したがって、polyI:C 処置後の神経発達障害にアストロサイトの分泌する液性因子の変化が関与していると考えられる。本研究では、two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) 法によって polyI:C-ACM 中のタンパク質を網羅的に解析し、同定した matrix metalloproteinase-3 (Mmp3) の機能解析を行った。

## 【方法】

### 1. 培養アストロサイトと ACM の調製

培養アストロサイトは、生後 1-2 日目のマウスの海馬と皮質から調製した。培地を Neurobasal Medium (Invitrogen, Eugene, OR) に交換し、24 時間後に PBS (control) または polyI:C (10 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を処置した。PolyI:C 処置 24 時間後の培養上清を回収し、アストロサイト条件培地 (ACM) とした。時間依存的な発現解析には、polyI:C 処置 6 時間後および 12 時間後の ACM も作製した。RNA 干渉法によるノックダウン解析には、最終培地交換の 6 時間前に Stealth siRNA for Mmp3 (#1 および #2) または Stealth RNAi siRNA negative control (control siRNA) を処置した (Invitrogen)。

### 2. 2D-DIGE 法による polyI:C-ACM の網羅的発現解析

回収した ACM を濃縮した後、CyDye DIGE Fluor, minimal labeling kit (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK) によって、ACM 中のタンパク質を Cy3 または Cy5 で蛍光標識し、二次元電気泳動を行った。各タンパク質スポットの発現強度の解析は PDQuest Advanced Version 8.0 software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いた。有意な発現変化を認めたタンパク質スポットは銀染色の後、質量分析装置 (LC-MS/MS) および MASCOT program (Matrix Science, Boston, MA) によって、タンパク質の同定を行った。

### 3. ウェスタンブロッティング法とリアルタイム PCR 法による発現解析

回収した ACM を濃縮し、ウェスタンブロッティング用のサンプルとした。また、ACM を回収した後のアストロサイトからタンパク質および total RNA を抽出し、それぞれウェスタンブロッティングおよびリアルタイム PCR 用のサンプルとした。

### 4. 初代培養神経細胞の調製と polyI:C-ACM の処置

胎生 15-16 日目のマウスの海馬から初代培養神経細胞を作製した。培養 2 日目に神経細胞の培地を polyI:C-ACM または control-ACM に交換した。siRNA を処置したアストロサイト由来の ACM についても、培養 2 日目に神経細胞の培地として交換した。また、Mmp3 の機能解析のために、最終濃度が 10 nM または 100 nM となるように、リコンビナントマウス (rm) Mmp3 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を control-ACM に添加し、培養 2 日目に神経細胞の培地として交換した。神経細胞をさらに 5 日間培養し、培養 7 日目に MAP2 (樹状突起マーカー) と tau (軸索マーカー) による免疫染色を行い、MAP2 陽性かつ tau 陰性の樹状突起の長さを測定した。

## 【結果】

### 1. 2D-DIGE 法による polyI:C-ACM 中のタンパク質の網羅的解析

取得した 2D-DIGE の画像を Figure 1A に示した。検出された 422 個のタンパク質スポットのうち、13 スポットについて polyI:C-ACM 群で有意な発現変化を示し ( $p < 0.05$ , Fig. 1B, Table 1)、質量分析によりすべてのスポットを同定した (Table 2)。

### 2. Mmp3 の polyI:C-ACM における発現

有意な発現変化を認めたタンパク質スポットのうち、最も発現の強いスポットの候補分子として Mmp3 を同定した (#7, Table 1, 2)。アストロサイトでは polyI:C 処置 6 時間後から、Mmp3 mRNA とタンパク質に有意な発現増加が認められた ( $p < 0.01$ , Fig. 2A-C)。PolyI:C-ACM では 12 時間後から Mmp3 タンパク質の有意な増加が認められた ( $p < 0.01$ , Fig. 2A, 2D)。

### 3. 初代培養神経細胞に対する Mmp3 の神経突起伸展への作用

Control-ACM に 10 nM および 100 nM の rmMmp3 を添加して初代培養神経細胞の培養を行った結果、濃度依存的な神経突起伸展の抑制が認められた ( $p < 0.01$ , Fig. 3)。アストロサイトに Mmp3 siRNA (#1 および #2) を処置すると、polyI:C 処置アストロサイトの Mmp3 mRNA ( $p < 0.01$ , Fig. 4B) とタンパク質 ( $p < 0.05$ , Fig. 4A, 4C) は control 処置レベルまで減少し、ACM 中の Mmp3 タンパク質も control 処置レベルまで減少した ( $p < 0.01$ , Fig. 4A, 4D)。Mmp3 siRNA (#1 および #2) を処置したアストロサイト由来の polyI:C-ACM を用いて初代培養神経細胞の培養を行った結果、control siRNA を処置したアストロサイトの polyI:C-ACM と比較して、その神経突起伸展の抑制作用は有意に減弱した ( $p < 0.01$ , Fig. 4E)。

### 【考察】

2D-DIGE 法による polyI:C-ACM 中のタンパク質の網羅的解析の結果、発現変化を認める 13 個のスポットを同定した。したがって、polyI:C の処置によってアストロサイトの分泌するタンパク質の組成が変化することが示唆された。また、polyI:C 処置によってアストロサイトの Mmp3 mRNA およびタンパク質が増加し、polyI:C-ACM 中にも増加したことから、転写レベルで Mmp3 の細胞外遊離量が調節されていることが示唆された。さらに、rmMmp3 の添加によって神経突起伸展が阻害されたこと、アストロサイトの Mmp3 をノックダウンすると、polyI:C-ACM の神経突起伸展の抑制作用が減弱したことから、Mmp3 はアストロサイトの自然免疫活性化後の神経発達障害に関与する候補分子であることが示唆された。

### 【結語】

Mmp3 は、polyI:C 処置によるアストロサイトの自然免疫活性化に関連して誘発される神経発達障害に関与する候補分子である。