

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06733

研究課題名(和文)海馬神経新生における軸索ガイダンス因子draxinの機能解析

研究課題名(英文)The roles of the chemo-repellent draxin in hippocampal neurogenesis

研究代表者

依山 寛司 (Tawarayama, Hiroshi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20402414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：海馬神経新生には様々な分泌型分子の関与が報告されている。本研究で我々は、海馬神経新生における分泌型軸索反発分子ドラキシンの機能解析を行った。ドラキシンはTbr2(+)前駆体細胞及びNeuro2D(+)神経芽細胞に特異的に発現し、他方、その受容体候補分子DCCは主にニューロプラストに発現していた。また、ドラキシンノックアウトマウスにおける表現型解析の結果から、同マウスでは、DCC(+)ニューロプラストの細胞死が亢進することを見出し、他方、*in vitro*の実験からドラキシンがDCC誘導性細胞死を抑制することを見出した。以上の結果からドラキシンによる海馬神経新生制御機序の一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Hippocampal neurogenesis in the dentate gyrus (DG) is controlled by various diffusible molecules that modulate neurogenic processes. To elucidate the mechanisms underlying hippocampal neurogenesis, we investigated the function of draxin in the regulation of neuronal survival in the DG. Draxin was expressed in Tbr2 (+) late progenitors and NeuroD1 (+) neuroblasts in the dentate granule cell lineage, whereas expression of its receptor DCC was mainly detectable in neuroblasts. Our phenotypic analysis revealed that draxin deficiency led to enhanced apoptosis of DCC-expressing neuroblasts in the neurogenic areas. Furthermore, *in vitro* assays using a hippocampal neural stem/progenitor cell (HNSPC) line indicated that draxin inhibited apoptosis in differentiating HNSPCs, which express DCC. Taken together, we postulate that draxin plays a pivotal role in postnatal DG neurogenesis as a dependence receptor ligand for DCC to maintain and promote survival of neuroblasts.

研究分野：神経発生学

キーワード：draxin DCC 海馬神経新生 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

哺乳類において海馬は、記憶の形成や空間把握、情動調節など、高次脳機能を司る重要な脳組織の一つであるが、これらの機能は歯状回の顆粒細胞によって担われている。歯状回顆粒細胞は、齧歯類では胎生期後期から生み出され、新生児期、幼若期、成熟期と、長期にわたって新たな神経細胞が産生される。この間、神経新生のニッチは、海馬采と歯状回の境界部分である歯状回切痕(dentate notch)、歯状回門、顆粒細胞下帯(sub-granular zone: SGZ)の順に移り変わり、SGZでは一生涯に渡って新たな顆粒細胞が生み出される。これまでの研究から、細胞増殖・神経分化・細胞死など、海馬神経新生の異なるフェーズに関与する分子、また、新生神経細胞の軸索ガイドに関与する分子が数多く同定されている。例えば、海馬神経新生において重要な役割を担う分子の一つとして、canonical Wntファミリーが挙げられる。Canonical Wntシグナルは、LRPとfrizzlesの複合体によって受容され、 β -カテニンを介して各種遺伝子発現を活性化し、神経前駆体細胞の増殖や分化を誘導する(1)。他方、顆粒細胞の神経線維である苔状線維の軸索ガイダンスでは、反発性軸索ガイド因子であるセマフォリンの関与が報告されている(2,3)。苔状線維にはセマフォリン受容体であるplexin-A4が発現しているため、反発因子Sema6A及び6Bが発現するCornu Ammonis(CA)3には投射することができない。しかし、苔状線維投射予定域に発現するplexin-A2がSema6A及び6Bに結合することでこれらの反発活性を抑制し、他方、plexin-A2が苔状線維の伸長を促進することでCA3への苔状線維投射を可能にする。現在までに海馬新生神経及び軸索ガイダンスに関与する多くの外因性・内因性因子が報告されているが、既知分子のこれらの生命現象への関与など、今なお未知な点も多い。

分泌型タンパクであるdraxinは、熊本大学の故・田中英明先生らのグループによって同定された新規反発性軸索ガイダンス因子であり、そのノックアウト(KO)マウスの表現型解析の結果から、大脳交連神経の形成に必要不可欠であることが明らかとなっている(4)。また、同グループによりdraxin受容体の探索が行われ、draxinが既知のnetrin受容体であるUnc5ファミリー、DCC、neogenin、DSCAMに対して結合能を示すものの、現在のところ、受容体としての機能が確認されているのはDCCおよびneogeninのみである(5,6)。前述のように、draxinは軸索ガイダンスに関連する分子として同定された経緯があるが、その後の研究から、海馬形成においても必須であることが示された(7)。Draxin KOマウスの成体では、歯状回の顆粒細胞数が減少するとともに、海馬全体が萎縮する。また、胎児期においては海馬での死細胞が著しく増加することから、同KOマウスでは、何らかの理由で細胞死が亢進し、その結果、海馬が萎縮すると考えられる。しかし、draxinの作用機序については明らかになっていない。また、draxinは苔状線維形成期の海馬に強く発現しており、同線維の伸長に関与する可能性がある。

2. 研究の目的

前項で述べた知見から、draxinが海馬神経新生に関与していることが示唆されているが、その作用機序については明らかになっていない。また、draxinが海馬に投射する遠心性神経線維のガイダンスに関与するかどうか不明である。本研究課題では、draxin KOマウス海馬における表現型解析、及び*in vitro*レベルでの機能解析を通じ、海馬形成におけるdraxinの役割について、包括的な研究を実施した。

3. 研究の方法

KOマウスにおける表現型解析は、主に各種抗体を用いた免疫組織学的手法により行った。

新生神経細胞の分化過程を追跡する実験では、タモキシフェン投与により、nestin を発現する神経幹/前駆体細胞を時期特異的に蛍光標識可能なトランスジェニック・マウス (Nestin-CreERT2;Rosa-stop-YFP) を用いた。海馬苔状線維の軸索投射パターンの解析には、脂溶性色素 DiO あるいは Dil を用いた神経線維ラベリング法を用いた。In vitro レベルでの draxin の機能解析実験では、ラット成体の海馬歯状回由来神経幹/前駆体細胞を用いて行った。

4. 研究成果

(1)海馬歯状回における draxin 発現細胞の同定

Draxin は神経新生の盛んな領域に強く発現しているが、その発現細胞の正体については明らかになっていない。そこで、グリア細胞や顆粒細胞系譜の異なる分化段階の細胞を特異的に認識する抗体を用いて免疫組織染色を行い、歯状回における draxin 発現細胞の同定を試みた。その結果、draxin はアストロサイトには発現しておらず、顆粒細胞系譜に属する神経前駆体細胞の一部及び神経芽細胞に特異的に発現していることが判明した。また、新生児期、幼若期、成熟期のそれぞれにおいて、draxin は同一種の細胞に発現していることから、海馬神経新生における draxin の役割は、発達段階に関わらず共通していることが示唆された。

(2)歯状回の萎縮とアポトーシスの増加

以前我々は、draxin KO マウスの成体における海馬の萎縮と胎生期におけるアポトーシス細胞の増加について報告したが、発達に伴うこれら表現型の変遷に対しては、関心が向けられていなかった (7)。今回我々は、draxin KO マウスにおける歯状回の面積及び死細胞数に関して、発達段階を追って解析を行った。その結果、(a)歯状回の萎縮は生後直後から顕著になり、幼若期、成熟期にかけて重篤に

なっていくこと、(b)以前の報告とは異なり、歯状回におけるアポトーシス細胞数は、胎生期では野生型、KO 間で差はなく、生後から KO マウスにおいて著しく増加すること、が明らかになった。以上の結果から、歯状回の萎縮とアポトーシスの増加には何らかの因果関係が示唆され、おそらく前者は後者に起因すると考えられる。

(3)アポトーシス細胞の同定

KO マウスの歯状回では、アポトーシス細胞が有意に増加するが、その細胞の正体については明らかになっていない。そこで様々な発現マーカーを用いて死細胞の同定を試みたところ、KO マウスでは、細胞死を被る神経芽細胞の数が劇的に増加することが明らかになった。これを支持するように、KO マウスでは神経芽細胞数が有意に減少することを確認した。神経幹細胞については、野生型、KO とともに、その数に差は認められなかったが、面白いことに、細胞死の亢進が認められない前駆体細胞においても、その数が有意に減少していた。

(4)Draxin とその受容体による抗アポトーシス活性

KO マウスではアポトーシスが亢進することから、draxin が抗アポトーシス活性を有することが示唆される。その可能性について検討するため、ラット成体海馬から樹立した神経幹/前駆体細胞を用い、in vitro レベルで draxin の機能解析を行った。神経幹/前駆体細胞の分化を促すため、分化誘導剤であるレチノイン酸とフォルスコリンを含む培地中で数日培養し、その後、様々な濃度の外因性 draxin タンパクを添加した。その結果、draxin は同細胞に起こりうるアポトーシスを濃度依存的に抑制することが明らかになった。また、draxin による抗アポトーシス効果は、draxin の機能的受容体として知られている DCC(Deleted in Colorectal

Cancer)をノックダウンすることで減弱し、他方、DCC類似タンパクであるneogeninのノックダウンでは、アポトーシスに何ら影響しなかった。また、同細胞にDCCを強制発現させたところ、draxinの存在下では抗アポトーシス効果が増強され、非存在下ではむしろアポトーシスを増加させた。DCCは「依存性受容体」に属する膜タンパクであり、過去の研究から、リガンド存在下においては、その発現細胞に細胞死を引き起こすことが知られている。従って以上の知見から、DCCが分化中の神経幹/前駆体細胞において依存受容体としての性質を示し、DCC誘導性のアポトーシスはそのリガンドであるdraxinの存在下では抑制されるということが判明した。なお、分化中の神経幹/前駆体細胞におけるDCCの発現は、western blotting法によって確認済みである。

(5)KOマウスにおける神経分化の促進

(3)で述べたように、KOマウスでは神経芽細胞におけるアポトーシスが亢進し、その数が減少する。一方で、過剰なアポトーシスを被っていない神経前駆体細胞の数も有意に減少していた。その理由を明らかにするため、KOマウスにおける神経幹/前駆体細胞の分化過程を詳細に追跡した。Draxinノックアウトあるいは野生型のバックグラウンドのNestin-CreER^{T2};Rosa-stop-EFPトランスジェニック・マウスにタモキシフェンを注入し、Nestinを発現する神経幹/前駆体細胞をYFPで蛍光標識した後、これらの細胞の分化過程を経時的に解析した。その結果、KOマウスでは蛍光標識された神経幹/前駆体細胞の分化が促進され、野生型マウスに比べて早く成熟顆粒細胞に分化することが明らかになった。以上のことから、KOマウスにおける神経前駆体細胞の減少は、その分化速度が促進されたことに起因すると考えられた。

(6)神経分化制御因子としてのdraxinの機能

ゼブラフィッシュを用いた以前の研究では、draxinがcanonical Wntの受容体コンポーネントであるLRPに結合し、Wntシグナルのアンタゴニストとして機能することが報告されている(8,9)。Wntは、海馬において新生神経細胞の分化に関与していることから、KOマウスにおける神経細胞の分化異常は、Wntアンタゴニストとしてのdraxinの機能を失ったことに起因しているのではないかと考えた。そこで、*in vitro*の実験系を用い、draxinがWntの分化誘導活性に何らかの影響を与えるかどうか検討を行った。まず、Wntを添加した培地中で前述のラット海馬由来神経幹/前駆体細胞を培養したところ、Tuj-1陽性神経細胞への分化が顕著に促進された。次に、その培地中にWntの100倍量の外因性draxinタンパクを加えたところ、Wntによる分化誘導活性が有意に減弱した。以上のことから、draxinがWntアンタゴニストとして機能し、Wntによる神経分化誘導能を調節している可能性が示唆された。興味深いことに、draxinタンパクは単独でも分化誘導活性が認められたが、その活性はWntに比べると非常に微弱であり(1/100以下)、 β -cateninを介さないという点で、Wntの作用機序と全く異なるものであると考えられた。

(7)苔状線維形成における軸索ガイダンス分子としてのdraxinの機能

前述のように、Draxinは軸索に対して反発的な作用を発揮するガイダンス分子として同定されたが、draxinによる軸索反発作用が海馬での神経ネットワーク形成にどのような役割を担っているのか不明であった。そこで、海馬における主要な遠心性神経線維である苔状線維、交連・連合線維、貫通線維について、draxin KOマウスでの表現型を解析した。マウス海馬切片に対してTimm染色を施し、可視化された苔状線維の投射パターンを調べたところ、draxin KOマウスでは錐体下束の形成が不十分であり、個体によっては形成されていなかった。

た。また、顆粒細胞層の錐体上部、下部に脂溶性色素 Dil 及び DiO を注入し、苔状線維の錐体上束、錐体下束をそれぞれトレースした実験からも同様の結果が得られた。他方、カルレチニン染色及び Dil ラベリングにより、交連・連合線維、貫通線維の投射パターンをそれぞれ解析したところ、これらの神経線維の投射パターンは draxin KO により影響を受けなかった。また、歯状回由来単離細胞を用いた *in vitro* 実験の結果から、draxin が苔状線維の伸長を抑制することが見出された。苔状線維形成期において、draxin は同線維の投射領域に強く発現しており、draxin による苔状線維のガイダンス機構の存在が示唆された。

<References>

1. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell.* 2009 Jul;17(1):9–26. PMID: PMC2861485
2. Suto F, Tsuboi M, Kamiya H, Mizuno H, Kiyama Y, Komai S, et al. Interactions between plexin-A2, plexin-A4, and semaphorin 6A control lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. *Neuron.* 2007 Feb 15;53(4):535–47.
3. Tawarayama H, Yoshida Y, Suto F, Mitchell KJ, Fujisawa H. Roles of semaphorin-6B and plexin-A2 in lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. *J. Neurosci.* 2010 May 19;30(20):7049–60. PMID: PMC3046408
4. Islam SM, Shinmyo Y, Okafuji T, Su Y, Naser IB, Ahmed G, et al. Draxin, a repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. *Science.* 2009 Jan 16;323(5912):388–93.
5. Shinmyo Y, Asrafuzzaman Riyadh M, Ahmed G, Bin Naser I, Hossain M, Takebayashi H, et al. Draxin from neocortical neurons controls the guidance of thalamocortical projections into the neocortex. *Nat Commun. Nature Publishing Group;* 2015;6:10232. PMID: PMC4682175
6. Ahmed G, Shinmyo Y, Ohta K, Islam SM, Hossain M, Naser IB, et al. Draxin inhibits axonal outgrowth through the netrin receptor DCC. *J. Neurosci.* 2011 Sep 28;31(39):14018–23.
7. Zhang S, Su Y, Shinmyo Y, Islam SM, Naser IB, Ahmed G, et al. Draxin, a repulsive axon guidance protein, is involved in hippocampal development. *Neurosci. Res.* 2010 Jan;66(1):53–61.
8. Miyake A, Takahashi Y, Miwa H, Shimada A, Konishi M, Itoh N. Neucrin is a novel neural-specific secreted antagonist to canonical Wnt signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009 Dec 18;390(3):1051–5.
9. Miyake A, Nihno S, Murakoshi Y, Satsuka A, Nakayama Y, Itoh N. Neucrin, a novel secreted antagonist of canonical Wnt signaling, plays roles in developing neural tissues in zebrafish. *Mech. Dev.* 2012 Jan;128(11-12):577–90.

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 4 件)

1. Draxin regulates hippocampal neurogenesis in the postnatal dentate gyrus by inhibiting DCC-induced apoptosis. Tawarayama H, Yamada H, Amin R, Morita-Fujimura Y, Cooper HM, Shinmyo Y, Kawata M, Ikawa S, Tanaka H. *Sci Rep.* 2018 Jan 16;8(1):840. doi: 10.1038/s41598-018-19346-6. (査読有り)
2. The neuroprotective effect of hesperidin in NMDA-induced retinal injury acts by suppressing oxidative stress and excessive calpain activation. Maekawa S, Sato K, Fujita K, Daigaku R, Tawarayama H, Murayama N, Moritoh S, Yabana T, Shiga Y, Omodaka K, Maruyama K, Nishiguchi KM, Nakazawa T. *Sci Rep.* 2017 Jul 31;7(1):6885. doi: 10.1038/s41598-017-06969-4. (査読有り)
3. Metabolomic profiling of reactive persulfides and polysulfides in the aqueous and vitreous humors. Kunikata H, Ida T, Sato K, Aizawa N, Sawa T, Tawarayama H, Murayama N, Fujii S, Akaike T, Nakazawa T. *Sci Rep.* 2017 Feb 7;7:41984. doi: 10.1038/srep41984. (査読有り)
4. $\Delta Np63\alpha$ induces quiescence and downregulates the BRCA1 pathway in estrogen receptor-positive luminal breast cancer cell line MCF7 but not in other breast cancer cell lines.

Amin R, Morita-Fujimura Y, Tawarayama H, Semba K, Chiba N, Fukumoto M, Ikawa S.
Mol Oncol. 2016 Apr;10(4):575-93. doi:
10.1016/j.molonc.2015.11.009. Epub 2015 Nov 24.
(査読有り)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 俵山寛司, 山田博久, 藤村維子, Ruhul Amin, Helen Cooper, 新明洋平, 河田雅圭, 井川俊太郎, 田中英明「ドラキシンはDCCによるアポトーシスとWntによる分化を抑制することにより海馬神経新生を制御する」第39回日本神経科学会, 2016年7月20-22日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

俵山 寛司 (Hiroshi Tawarayama)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20402414

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()