

令和元年5月7日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08447

研究課題名(和文) 神経回路形成及び高次脳機能におけるセマフォリンの機能解析

研究課題名(英文) The functional analysis of semaphorin in the neural network formation and higher brain function.

研究代表者

谷口 雅彦 (TANIGUCHI, Masahiko)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70260346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：複雑な脳神経系において正確な神経回路形成は脳神経系が正しく機能するために必須である。神経回路形成過程は軸索ガイダンス分子が制御しているが、分子機構はまだ良く分かっていない。正確に形成されないと神経・精神疾患や機能不全になる。セマフォリンは主要な軸索ガイダンス分子である。本研究では、神経回路形成及び高次脳機能におけるセマフォリンの機能解析を目的としている。特に申請者が同定した新規セマフォリンであるセマフォリン3G (Sema3G)の機能解析を主に行った。ノックアウトマウスを使用した形態学的と行動学的解析を行い、Sema3Gが成体脳と末梢神経系の神経回路形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、セマフォリン(特にSema3G)の神経発生における機能解析を主に行った。セマフォリンはアレルギーや自己免疫疾患、骨代謝疾患、神経変性・精神疾患、不整脈、がんの発生等の種々の疾患に関与していることが最近報告されてきており、セマフォリンは疾患の「鍵分子」と考え始められている。本研究は最終的に神経・精神疾患(主に海馬系)や運動機能障害(主に小脳系)等の診断・創薬・治療に有益な成果を目指している。だが、セマフォリンは多彩で重要な生物活性を持つので、本研究により新しい機能が解明され、神経疾患のみならず他の疾患・疾病の創薬・治療に繋がる役立つ成果が得られることも期待できる。

研究成果の概要(英文)： During embryogenesis, axons reach their specific targets correctly to form the complex neural network found in the mature functional nervous system. Several groups of axon guidance molecules such as semaphorins, ephrins, netrins, and Slits have been reported to regulate the neural network formation. Semaphorin gene family contains a large number of secreted and transmembrane proteins, and some of them function as the repulsive and attractive cues of axon guidance. The failure of the correct neural network formation causes the neurological and mental disorders. In this study I analyzed the function of semaphorin (especially semaphorin 3G) in the neural network formation and higher brain function. By use of Sema3G-deficient mice on the morphological and behavioral analyses, it is suggested that Sema3G functions as the axon guidance molecules on the neural network formation of adult brain and peripheral nervous system.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経発生 軸索ガイダンス 脳神経系 ノックアウトマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳は数百億～一千億個の細胞より形成されていると言われている。このような複雑な脳神経系において機能的な神経回路が形成されるためには、標的細胞への神経軸索の正確な投射が必須である。この正確な軸索投射を制御する分子として軸索ガイダンス分子が存在し、誘引分子と反発分子がある。軸索ガイダンス分子としては、スリット、エフリン、ネトリン、セマフォリン等が同定されている。現在までに軸索ガイダンス分子は多数同定されてきたが、これらの分子がどのように神経回路形成過程を制御しているかという分子メカニズムはまだあまり研究が進んでいない。申請者は主として反発性軸索ガイダンス分子として機能するセマフォリンに注目して研究を進めている。

(2) セマフォリンは当初反発性軸索ガイダンス分子として同定され、神経系での研究が進んできた。その後の研究によりセマフォリンは約 30 種類同定されており、セマフォリンファミリー分子は細胞外に約 500 アミノ酸からなる Sema 領域(機能領域だと考えられている)を持っている。セマフォリンはウイルスからヒトに至るまでの生物に存在し、細胞膜結合型と分泌型に分けられ、Sema 領域以外の構造の違いにより 8 種類のクラスに分類される。セマフォリンの主な受容体はニューロピリン(脊椎動物で 2 種類)とプレキシシン(脊椎動物で 9 種類)であるが、インテグリン等にも結合することが知られている。セマフォリンの多彩な機能を反映してか、複雑なリガンド-受容体関係を有する。セマフォリンは神経発生以外の機能として、免疫調節、血管・脈管形成、がんの発生・転移・浸潤、骨代謝調節、網膜恒常性維持などに関与していることが明らかになっている。そして、アトピー性皮膚炎、喘息、多発性硬化症等のアレルギーや自己免疫疾患、骨代謝疾患、アルツハイマー病等の神経変性疾患、統合失調症などの精神疾患、網膜色素変性症、心臓の突然死・不整脈、がんの浸潤・転移等の種々の疾患にセマフォリンが関わっているのが最近報告されてきている。セマフォリンのバイオロジーは分野の垣根を越えた展開を見せるとともに、ヒトの疾患の診断・治療法を目指した研究が精力的に行われている。セマフォリンは「疾患の鍵分子」であると考えられ始めている。このようにセマフォリンの研究は、研究成果が他の分野の研究にも有益である可能性があるし、もちろん神経疾患の治療にも有益な情報が得られると考えられる。

(3) 脊椎動物で最初に同定されたセマフォリンである Semaphorin 3A (Sema3A)は一番解析が進んでいる分子であるが、申請者がノックアウトマウスを作成するまでは生体内での神経回路形成における機能はほとんど分かっていなかった。Sema3A ノックアウトマウスの解析において、初期発生中の末梢神経系の神経回路形成に異常が認められることを解明した。さらに Sema3A の機能的なレセプターがニューロピリン-1 であることも共同研究により明らかにした。これらのことより Sema3A とニューロピリン-1 により、末梢神経系の初期発生において軸索投射が正確に起こるといふ分子メカニズムを世界で初めて解明した。また、Sema3A の発現は成体の嗅球等の中枢神経系においても特異的に認められる。嗅覚系の神経回路形成に軸索ガイダンス分子が関与している報告はほとんどなかった。嗅覚系において嗅球の糸球体の空間配置は嗅球における嗅覚系感覚地図、いわゆる「匂い地図」を形成する。Sema3A が匂い地図形成に必須であることを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 申請者はセマフォリンに注目して研究を進めている。本研究の最大の目的は、生体内における神経回路形成及び高次脳機能における分子メカニズムを様々なセマフォリン(特に新規セマフォリンである Sema3G)を指標にして解明することである。

(2) 最近、マウスにおいて 2 種類の新規セマフォリン分子(Sema3G と Sema6D)のクローニングに成功した。発現解析を行った結果、Sema6D は脳に特異的に発現が認められたが、他の研究グループも解析を進めており、ある程度の成果はすでに出ている。Sema3G は成体脳において小脳の顆粒細胞層と海馬に発現している。これらのセマフォリンは神経軸索に対して反発活性があることをすでに明らかにしている。これら新規セマフォリン、特にまだ解析のほとんど進んでいない Sema3G の生体内における機能解析が本研究課題における最大の目的である。生体内での機能解析のためにノックアウトマウスを作成して、生体内での機能解析を行う計画である。発現様式等よりこれらの新規セマフォリンは今までにクローニングされたセマフォリンよりも興味深く、解析により新しい機能の情報が得られると考えられる。

(3) 申請者は基礎研究だけでなく、臨床系の研究室との共同研究によりセマフォリンの機能解析も行ってきた。脊髄損傷の部位に Sema3A の阻害剤を投与すると神経再生が促進し、運動機能も回復することを明らかにした。また、心臓への交感神経の正確な投射と不整脈防止ににおいて Sema3A が必須であることも解明した。免疫系においては Sema3A が樹状細胞の移動に関与していること、Sema3A が骨形成に関与していること(骨防御因子として機能)も解明した。骨粗鬆症の治療に有益な成果である。このようにセマフォリンの臨床応用を考えた研究も進めていて、現在も進行中である。このことも目的の 1 つである。

(4) Sema3G と Sema3A 以外のセマフォリン分子で海馬や小脳における研究はいくつか進められていたが、まだ明らかな機能は分かっていない。さらに、セマフォリンノックアウトマウスで行動解析をしたと言う報告はまだない。本研究により、セマフォリンの海馬や小脳における機能の一端が解明されると、海馬と高次脳機能、小脳と運動機能等の研究に役立つと考えられる。

Sema3G は血管内皮細胞にも発現していて、がんとの関係の解析も進められている。Sema3A も神経系以外の研究も進んでいる。Sema3A は例えば骨粗鬆症の治療薬やアトピー性皮膚炎の痒みの軽減や治療にも効果がある可能性が報告されているので、翻訳制御の機構が解明されれば、それらの治療法にも有益な情報が得られる。本研究では、もちろん神経・精神疾患や運動機能障害等の創薬・治療に役立つ成果を目指しているが、セマフォリンは多彩で重要な生物活性を持つので、本研究により新しい機能が解明され、他の生物機能の解明にも役立つ可能性もあると考えている。他の生物機能の解明にも有益な情報が得られれば最高の成果であり、神経疾患のみならず他の疾患・疾病の創薬・治療に繋がる役立つ成果が得られることも期待している。

3. 研究の方法

新規セマフォリンである Sema3G 及び Sema3A のノックアウトマウスを使用しての機能解析を主として計画している。研究計画を簡潔に挙げると、1) 成体脳(海馬と小脳)の神経投射解析、2) 胎児の末梢神経系における神経投射解析、3) オスのノックアウトマウスを使用する行動解析、4) 抗 Sema3G 抗体の作成、5) Sema3G のシグナル伝達機構の解析、6) Sema3A の翻訳制御の分子機構解析、7) Sema3G と Sema3A のクロストークの解析である。

(1) Sema3G ノックアウトマウスを使用した解析

最初に Sema3G の生体内での機能解析のためにノックアウトマウスを作成した。

成体脳の形態学的解析

まずは神経回路形成解析のために、成体脳での海馬と小脳の形態学的解析を行う。具体的には、海馬においては Prox1, Math2 等の抗体を使用した免疫染色、トレーサーを使用した解析等を行う。また、海馬の歯状回は成体脳では数少ない神経新生をしている領域なので、神経新生についての解析も行う。小脳においては、VGLUT1 (平行線維の解析) 等の抗体を使用した免疫染色等を行う。顆粒細胞層に Sema3G は発現しているため、顆粒細胞の移動に関与しているかの解析も行う。

初期発生中の末梢神経系における神経投射の解析

Sema3G は胎児では全体的に発現している。形態形成に関与している可能性もあるが、神経回路形成の解析を目的としているので、まずは初期発生中の末梢神経系の神経投射について解析する。ニューロフィラメント抗体を使用した胎児 (E10~E12 の胎児) の全胚染色を行うことにより、脳神経や脊髄神経等の神経投射を解析する。この方法は以前に Sema3A ノックアウトマウスで行ったことがあるので、問題なく行える。発生の進んだ胎児では、胎児の切片を使用したニューロフィラメント抗体等での免疫染色を行う。また、Sema3G は DRG (後根神経節) にも発現しているため、DRG から脊髄への神経投射を免疫染色法及び Dil 等のトレーサーを使用して解析する。

オスマウスを使用した行動学的解析

学習・記憶などの高次脳機能等を解析するために行動実験を行うが、実験はマウスにとってストレスが少ないと思われる実験から順に行う。まずは約 20 種類の実験を行う。計画している行動実験をいくつか説明すると、筋力の測定、不安様行動の測定、運動学習の測定、記憶学習の測定等である。行動実験は 10 週齢前後のオスマウスにおいてコントロールマウスとノックアウトマウスをそれぞれ約 20 匹使用して行う計画である。メスマウスがいるとその匂いによりオスマウスの行動に影響が出ることが防ぐために、オスマウスのみを使用する。匹数の根拠は、このぐらいの数で実験を行えば差が出るものがあれば統計的に有意な差が出るからである。行動実験に関しては、マウス行動学の専門家である藤田医科大学の宮川剛先生に助言をもらう計画である。Sema3G は海馬と小脳に発現しているため、記憶学習や運動機能等に何か差が認められることを期待している。海馬の歯状回における神経新生は記憶形成に関与していると言われているので、特に詳細に解析する。

(2) 抗 Sema3G 抗体の作成

市販の抗体をいくつか試したが良い抗体はなく、作成に成功した研究者もいない。まずはポリクローナル抗体の作成を試みるが、無理そうなら Sema3G ノックアウトマウスを使用したモノクローナル抗体の作成を試みる計画である。Sema3G マウスには LacZ 遺伝子が挿入されているため、Sema3G の発現を見ることは可能である。

(3) Sema3G のシグナル伝達機構解析

Sema3G の受容体はニューロピリン-2であることを以前に解明したが、セマフォリンの受容体は受容体複合体を形成することが多いと言われているので、受容体複合体の解析及びその下流の解析を行う。Sema3G のシグナル伝達機構解析はまだほとんど進んでいない。ニューロピリンにはプレキシンが結合することが知られているので、まずは9種類あるプレキシンのどれが結合するかどうかを解析する。その後、セマフォリンのシグナル伝達に参与していると言われている分子（例えば、Rac, Rnd, Rho 等の低分子量 G タンパク質）がシグナル伝達に参与しているかの解析を行う。

(4) Sema3A ノックアウトマウスにおける成体脳の形態学的解析

Sema3A は海馬と小脳ではプルキンエ細胞層だけに発現が認められるので、軸索投射を見るために Dil などのトレーサーを使用した解析や海馬・小脳特異的な抗体染色による形態学的解析を Sema3G ノックアウトマウスの解析と同様に行う。

(5) Sema3A の翻訳制御の分子メカニズムの解析

mRNA(転写産物)としては存在するがタンパク質(翻訳産物)として存在している時期は厳密に制御されている可能性が以前に示唆された。つまりは mRNA からの翻訳とタンパク質分解が厳密に制御されている可能性があるということである。翻訳とタンパク質分解に注目しているので、まずは miRNA(microRNA)とユビキチンの関与を考えているので、これらの解析を行う。

(6) Sema3A と Sema3G のクロストークの解析

セマフォリン同士が相互作用するという報告はないが、Sema3A と Sema3G のシグナル伝達が関係していたら大変興味深いので、Sema3A/Sema3G ダブルノックアウトマウスを交配により作成して上記と同様な形態学的や行動学的解析を行う。Sema3A と Sema3G が関係していると言う報告やデータは現在全くないが、解析したい。何も関係ないという可能性はもちろんあるが、何か興味深い関係があるという可能性も少ないとは考えるが当然ある。研究はやってみないと分からないと考えている。

4. 研究成果

(1) Sema3G ノックアウトマウス作成に関しては苦労したが、ノックアウトマウスの作成に成功した。このマウスは LacZ の発現により Sema3G の発現も解析できるマウスである。

成体脳の形態学的解析に関しては、様々な抗体や染色方法を使用して解析を行ったが、現在の所海馬において少し変異を見出したが、まだ大きな表現型の変異は見付けられていない。今後はさらなる詳細の解析(シナプスの解析等も)と別の視点からの解析を行う計画である。例えば、MRI を使用した解析を計画している。

初期発生中の末梢神経系における神経投射に関する解析に関しては、脳神経や脊髄神経に関しては明らかな変異は認められなかった。現在は、DRG から脊髄への神経投射を解析しているところであり、少し変異が見出したので別の抗体などを使用して詳細に解析しているところである。

行動実験に関しては、少しの解析に関しては有意な差が見られたが、本当にその機能に変異が認められるのかどうかを確認するために詳しい解析や新しい行動実験も行っているところである。

(2) 抗 Sema3G 抗体の作成に関しては、ポリクローナル抗体の作成を数カ所のエピトープを使用して、3回行ったが良い抗体は得られなかった。ここで言う良い抗体とは、ウェスタンブロットや免疫染色に使用できる抗体という意味である。今後はモノクローナル抗体の作成も視野に入れて再び行う計画である。

(3) Sema3G のシグナル伝達解析に関しては、以前にニューロピリン-2 が Sema3G のレセプターであることを解明していたので、その下流を解析した。プレキシン-A4 がニューロピリン-2 に結合して受容体複合体を形成し、Sema3G の機能に参与していることを明らかにした。また、その下流には Rac が参与していることも明らかにした。

(4) Sema3A ノックアウトマウスの海馬と小脳における解析に関しては、様々な抗体を使用した免疫染色やトレーサーを使用した解析を行ったが、小脳において少し変異が認められたが、まだ大きな表現型の変異が認められていない。今後は別の方法も使用しながら(例えば MRI)、解析を行う計画である。

(5) Sema3A の翻訳制御の分子メカニズムの解析に関しては、まずは miRNA の関与を解析したが、今のところ miRNA が関与しているという結果は認められていない。今後はさらに詳細に、そしてユビキチンの解析も行う計画である。

(6) Sema3A と Sema3G のクロストークの解析に関しては、Sema3A/Sema3G ダブルノックアウトマウスを交配により作成して初期発生中の形態学的解析を少し行ったが、現在のところ、それぞれのシングルノックアウトマウスと比較して明らかに変異が激しくなった結果はまだ得られていない。また、ダブルノックアウトマウスを得るのも苦労している。今後はさらなる詳細な解析と成体での形態学的解析を行う計画である。

本研究自体は研究計画をした時に考えたスケジュールでほぼ進んだが、研究成果は計画した時よりは得られなかった。だが、全く得られなかった訳ではなく、想像以上の成果が出た解析もある。まだ途中の研究もいくつかあるので、今後の進展に期待している。研究成果から神経疾患の診断・治療等に有益な情報が得られることも期待しているし目指している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計3件）

Fumio Nakamura, Takako Okada, Maria Shishikura, Noriko Uetani, Masahiko Taniguchi, Takeshi Yagi, Yoichiro Iwakura, Toshio Ohshima, Yoshio Goshima, and Stephen Strittmatter. Protein Tyrosine Phosphatase mediates the Sema3A-induced cortical basal dendritic arborization through the activation of Fyn tyrosine kinase. *J. Neurosci.*, 37, 7125-7139, 2017. 査読有

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2519-16.2017.

Tomoyuki Masuda and Masahiko Taniguchi. Contribution of semaphorins to the formation of the peripheral nervous system in higher vertebrates. *Cell Adh. Migr.*, 10, 593-603, 2016. 査読有

DOI: 10.1080/19336918.2016.1243644

Masahiko Taniguchi. Foreword: Special focus issue on semaphorins. *Cell Adh. Migr.*, 10, 591-592, 2016. 査読有

DOI: 10.1080/19336918.2016.1262128

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。