

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19790157
 研究課題名(和文) ネットリン受容体 DCC の細胞表面移行を介した大脳皮質ニューロン軸索分岐の調節
 研究課題名(英文) Modulation of axon branching in cerebral cortical neurons via translocation of a netrin receptor DCC to the cell surface
 研究代表者 松本 英子 (MATSUMOTO HIDEKO)
 埼玉医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00312257

研究成果の概要：

ハムスター大脳皮質ニューロン初代培養系を用い、神経回路形成に働く軸索ガイダンス因子 ネットリン-1 のもつ軸索分岐形成作用に、ネットリン受容体 DCC の細胞表面移行が関与するか否かを調べた。大脳皮質ニューロン軸索シャフトではネットリン-1 刺激により糸状仮足を経て分岐が形成されるが、糸状仮足形成時にシャフト表面で DCC レベル上昇・クラスター形成がエキソサイトーシス依存的に認められ、DCC の細胞表面移行が軸索分岐の調節に関わることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：神経回路形成、大脳皮質ニューロン、軸索ガイダンス、軸索分岐形成、軸索シャフト、ネットリン-1、DCC、エキソサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 発生過程で起こる神経回路の形成におい

て、軸索が伸長と分岐とを繰り返し標的へと投射する際には、様々な軸索ガイダ

ンス因子が働くことが知られる。軸索ガイダンス因子の一つであるネトリン-1 は、種々のニューロンにおいて軸索の伸長 / 誘引 / 反発 / 分岐形成などの多様な機能を発揮することが報告されている。

(2) 大脳皮質ニューロンにおける軸索分岐形成には、軸索の先端に存在する成長円錐を介して分枝が生ずる様式と、軸索シャフトに生ずる糸状仮足が分枝へと発達する様式との二通りが知られ、ネトリン-1 は後者を刺激するといわれている。

(3) ネトリン-1 受容体の一つである DCC (deleted in colorectal cancer) は、脊髄交連ニューロンにおいては細胞内の小胞に局在しており、DCC 小胞がエキソサイトーシスを介して細胞表面へと移行することによりネトリン-1 の軸索伸長作用が増強されるという報告がある。

2 . 研究の目的

本研究ではネトリン-1により促進される大脳皮質ニューロン軸索分岐形成に、小胞輸送を介したネトリン-1受容体DCCの細胞

表面移行が関与するか否かを検証することを目指した。

3 . 研究の方法

ハムスター新生仔大脳皮質より初代培養ニューロンを調製し、5~7日間の培養の後、培地中にネトリン-1 を加えてニューロンを刺激した。またエキソサイトーシスの関与があるか否かを明らかにするため、v-SNARE (R-SNARE) タンパク質類の分解・無効化を介したエキソサイトーシス阻害剤である破傷風毒素を、ネトリン-1 添加の 15 分前より培地中に加えた。これらの条件下で以下の解析を行った。

(1) 細胞を固定した後に検鏡し、軸索シャフトにみられる糸状仮足数と分岐数を数えて、これらに変化がみられるか調べた。

(2) 細胞表面 DCC の分布とレベルの変化について調べるため、DCC の細胞外ドメインに対する抗体を用いた細胞表面 DCC の蛍光免疫組織化学を行った後、軸索のシャフト部分と成長円錐部分の各々について定量的画像解析を行った。

4. 研究成果

(1) ハムスター新生仔大脳皮質由来の初代培養ニューロンに4時間のネトリン-1刺激を行ったところ、軸索分岐数の増加が認められた。30分間のネトリン-1刺激を行った際には、軸索シャフトに糸状仮足の増加が認められ、ニューロンは軸索分岐形成の前段階にあるものと考えられた。

(2) 30分間のネトリン-1刺激を行った大脳皮質ニューロンにおいて、細胞表面DCCの分布とレベルの変化に関し定量的画像解析を行ったところ、以下の結果が得られた。

軸索シャフト部分の細胞表面では、ネトリン-1刺激に反応して、DCCが偏在し微細なクラスター様の構造が形成された。またこれに伴ってDCCのレベルが上昇した。

シャフト表面DCCにみられたネトリン-1に対するこのような反応は、エキソサイトシスの阻害剤である破傷風毒素により妨げられた。

軸索の成長円錐部分の細胞表面におい

ては、DCCの分布とレベルに、ネトリン-1刺激による変化は認められなかった。

(3) これらの結果より以下の考察に至った。

大脳皮質ニューロンの細胞内にも DCC 小胞が存在し、この小胞がネトリン-1 刺激に応じエキソサイトシスを介して細胞表面に移行することにより、細胞表面における DCC の分布とレベルの調節が行われるものと考えられた。

小胞輸送を介した細胞表面 DCC の調節機構が、ネトリン-1 により引き起こされる、シャフトから糸状仮足を経て分枝が生ずる様式の軸索分岐形成に関与していることが示唆された。

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)

Matsumoto H, Nagashima M. (2008)
Imaging analysis of the effect of netrin-1 on the distribution of its receptor DCC at the surface of axon

shafts in hamster primary cortical neurons. Mol. Biol. Cell 19 Suppl. pp. 65; abstract #215 (CD-ROM). 査読無。

Matsumoto H, Nagashima M. (2008) Imaging analysis of cell surface DCC changes in response to its ligand netrin-1 in hamster primary cortical neurons. Neurosci. Res. 61 Suppl. 1: S147. 査読無。

Matsumoto H, Nagashima M. (2007) Changes in cell surface DCC at the promotion of neurite branching by its ligand netrin-1 in hamster primary cortical neurons. Mol. Biol. Cell 18 Suppl. pp. 61; abstract #2652 (CD-ROM). 査読無。

Matsumoto H, Nagashima M. (2007) Netrin-1 regulates cell surface distribution of its receptor DCC in hamster primary cortical neurons. Neurosci. Res. 58 Suppl. 1: S148. 査読無。

〔学会発表〕(計7件)

松本英子、永島雅文。大脳皮質ニューロン軸索表面でネトリン-1によりエキソサイトーシス依存的に引き起こされるDCCクラスター形成の定量的画像解析。第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009年3月30日、岡山。

Matsumoto H, Nagashima M. Imaging analysis of the effect of netrin-1 on the distribution of its receptor DCC at the surface of axon shafts in hamster primary cortical neurons. The 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, December 14th, 2008, San Francisco, USA.

松本英子、永島雅文。大脳皮質ニューロン細胞表面におけるDCCのネトリン-1刺激時変化の画像解析。Neuroscience 2008 (第31回日本神経科学大会)、2008年7月10日、東京。

松本英子、永島雅文。ネトリン-1刺激に対する分岐形成反応を示す大脳皮質ニュー

ーロンにおける細胞表面DCCの分布変化の解析。第113回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008年3月28日、大分。

松本英子、永島雅文。DCCはネトリン-1刺激により大脳皮質ニューロン表面においてクラスターを形成する。BMB2007(第30回分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)、2007年12月13日、神奈川。

Matsumoto H, Nagashima M. Changes in cell surface DCC at the promotion of neurite branching by its ligand netrin-1 in hamster primary cortical neurons. The 47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, December 5th, 2007, Washington, DC, USA.

松本英子、永島雅文。大脳皮質ニューロン細胞表面におけるDCCの分布はネトリン-1により変化する。Neuro2007(第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会

合同大会、2007年9月11日、神奈川。

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 英子 (MATSUMOTO HIDEKO)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00312257

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし