

平成22年 5月 7日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20890113

研究課題名(和文) 再生軸索のシナプス形成機序の解明

研究課題名(英文) Investigation for the mechanism of synapse formation by regenerated neurons.

研究代表者

羽田 克彦 (Hata Katsuhiko)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60506228

研究成果の概要(和文)：

申請者は RGMA が中枢神経軸索再生阻害因子で、それを阻害すると脊髄損傷されたラットの有意な機能回復と軸索再生が促されることを見出した。しかし、再生軸索が機能的なシナプスを形成しなくては十分な機能回復は望めない。そこで申請者は RGM 阻害による再生シナプス形成の機構を解析し、Unc5B, LARG, FAK などが RGM の下流で再生軸索のシナプス形成に阻害的に働いていることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：

Synapse formation of the cortico-spinal axons is enhanced by RGMA inhibition. RGMA binding to its receptor neogenin induces RhoA activation, leading to inhibitory/repulsive behavior and collapse of the neuronal growth cone. However, the precise mechanisms that regulate RhoA activation are poorly understood. In this study, we show that Unc5B, a member of the netrin receptor family, interacts with neogenin as a coreceptor for RGMA. Moreover, leukemia-associated guanine nucleotide exchange factor (LARG) associates with Unc5B to transduce the RhoA signal. Focal adhesion kinase (FAK) is involved in RGMA-induced tyrosine phosphorylation of LARG as well as RhoA activation. These findings uncover the molecular basis for inhibition of synapse formation mediated by RGMA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：(1) 中枢神経 (2) 再生医療 (3) シナプス (4) 軸索 (5) 再生阻害蛋白質 (6) RGM (7) 機能回復 (8) 脊髄

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

脳硬塞、脳出血、脳外傷、脊髄損傷などにより損傷を受けた中枢神経系機能は回復しない。中枢神経系がシステムとして再稼動するためには、回路の再形成が鍵となるはずであるが、損傷中枢神経の軸索は成熟動物では再生不能である。その原因として、再生阻害物質の存在が指摘されている。申請者はこれまで RGMA が新規軸索再生阻害蛋白質であること、既知の MAG, Nogo, OMgp と比べて極めて強力な軸索伸展抑制効果を有しており中枢神経再生阻害の main player であることを突き止めた。申請者はさらに RGMA に対する中和抗体（抗 RGMA 抗体）の開発に成功し、これをラットの脊髄損傷モデルに投与することによって有意な機能回復と軸索再生が促されることを見出した (Hata K. et. al., J. Cell. Biol., 2006)。このような中和抗体による疾患治療は近年注目されており、抗 RGMA 抗体も中枢神経損傷の治療薬として使える可能性がある。従って現在、より効果的に RGMA の作用をブロックする中和抗体を開発するプロジェクトに携わっており、既に in vitro の系で強力に RGMA を中和する抗体の開発に成功している。今後、ラット脊髄損傷モデルや脳挫傷モデルでの中和抗体の治療効果を検討する予定である。さらに、RGMA の機能を別のアプローチからブロックするために RGMA の細胞内情報伝達について解析も進めている。

このように申請者は従来まで不可能とされていた中枢神経軸索の再生治療に道を開いた。しかし、中枢神経の十分な機能回復を期待するならば、軸索伸長を促すだけでは不十分である。事実、MAG や Nogo など既知の軸索再生阻害蛋白質をブロックする研究や、Rho の活性制御による軸索再生の研究では十分な機能回復は見られず、申請者の行った抗 RGMA 抗体での研究でさえも完全な機能回復を示すには至らなかった。その理由として一つには軸索再生阻害蛋白質のブロックが不十分であることが考えられ、申請者を含めた国内外の研究者達によってそれらを強力に中和する作用をもつ薬剤の開発が進められている。しかしこの問題が解決されたとしても、十分な機能回復に至るには新たな問題をクリアしなくてはならない。それは神経シナプス形成の問題である。申請者の行なった研究では、抗 RGMA 抗体を投与したラットの皮質脊髄路の切られた線維が損傷部を超えて尾側へ伸ばしていることが観察された。皮質脊髄路は下肢の運動機能を支配する遠心路であり、その再生が見られたことと下肢の運動機能の回復が見られたこととは関連性があることが示唆される。しかし、下肢の筋肉群を支配する神経線維の多くは腰膨

大部の前角に細胞体が存在するため、再生線維が下肢の運動機能を支配するほど機能的に重要な神経路となるためには腰膨大部での二次ニューロンへの投射すなわち神経シナプス形成が達成されなくてはならない。現在までシナプス形成のメカニズムについての研究は記憶や学習の基盤となる可塑性と関連づけてよく行われているが、再生線維のシナプス形成については未だ概念すら登場しておらず、その研究は全く行われていない。そこで申請者は再生線維の神経シナプス形成のメカニズムについて明らかにする事を目的とするに至った。これによって中枢神経再生阻害のメカニズムが明らかになり、中枢神経系を再生させるような治療法の開発に結びつくことが期待される。

2. 研究の目的

申請者は世界に先駆けて RGMA が中枢神経軸索再生阻害の main player であることを突き止め、開発した RGMA に対する中和抗体（抗 RGMA 抗体）をラットの脊髄損傷モデルに投与することによって有意な機能回復と軸索再生が促されることを見出した (Hata K. et. al., J. Cell. Biol., 2006)。このことによって従来まで不可能とされていた中枢神経軸索の再生治療に道が開かれた。しかし、中枢神経の十分な機能回復を期待するならば、軸索伸長を促すだけでは不十分である。すなわち、再生軸索が適切な二次ニューロンに投射して神経シナプス形成を達成して機能的な神経路を形成しなくてはならない。この問題は中枢神経の再生医療にとって極めて重要な課題であるにもかかわらず、現時点ではその概念すら登場しておらず、その研究は全く行われていない。そこで申請者は再生軸索の神経シナプス形成のメカニズムを解析したいと考えている。

そこでまず、脊髄神経シナプスを生化学的に単離する手法を開発し、その構成要素を検討する。次にその構成要素の中で、脊髄神経シナプスに特異的な接着分子を同定する。そして、その接着分子をターゲットとするアンタゴニストを開発することによって、実際にその分子が、脊髄神経シナプスの形成に関与していることと神経伝達へ影響を与えることを明らかにする。これらの成果を踏まえて、ラットの脊髄損傷モデルに接着分子を遺伝子導入することによってその治療効果を検討する。本研究によりシナプス形成の新たな概念と分子メカニズムが生み出され、シナプス形成をターゲットとした中枢神経系を再生させる治療法の開発にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

(1) RGM のシナプス形成への関与とその作用機序の解明①

申請者の研究によって RGM が再生時句作のシナプス形成を阻害していることが明らかとなった。そこで、次にその作用機序を調べる。まず、RGM のレセプターとしては **neogenin** が同定されているがその下流の因子を同定する。過去の報告などから **neogenin** と共通のリガンドを持つ **Unc5** レセプターの関与が示唆されるため、**Unc5** が RGM のシグナルに関与するかを免疫沈降法、**Rho** プルダウン法、**neurite-outgrowth** 法、**growth cone collapse** 法により検証する。

(2) Unc5 レセプターの下流で Rho を活性化する因子の同定

Rho はこれまでの報告によると、中枢神経再生阻害にとって鍵となる分子であることが分かっている。そこで、**Rho** を直接活性化する因子を同定する。**Rho** を活性化する分子は **RhoGEF** タンパク質と呼ばれ、それらの中から RGM の下流で働く分子を同定する。検証方法は (1) と同様にする。

(3) Unc5 阻害剤や RhoGEF 阻害剤を使ってシナプス形成への影響を検証

これらの同定された接着分子の結合様式を生化学的に解析し、その結合を阻害するアンタゴニストを作成する。脊髄損傷後のシナプス再生にこの分子の関与が必要かを明らかにする。まず、ラットの脊髄を第 10 胸髄レベルで背側半切断を行ない、脊髄損傷モデルを作製し、**Rho kinase** 阻害剤や抗 **RGMa** 抗体などによって軸索再生を十分に促す。次に、上記の成果よりシナプス形成阻害に重要な働きをすると考えられる分子の阻害剤を投与する。そして、下肢の運動機能の回復の程度を観察する。機能評価の方法としては、**BBB score**、**grid walking**、**beam walking** を採用する。次に、機能評価が終了した後、大脳皮質の感覚運動野に **BDA** トレーサーを注入する。2 週間後に脊髄を免疫染色して再生軸索が形成しているシナプスの形成を形態学的に確認して、阻害剤投与によって成熟したシナプス形成が促されたかを評価する。

4. 研究成果

RGM によるシナプス形成のシグナル伝達を解明することによって、**Unc5B** レセプターが **neogenin** と co-receptor を形成し、**LARG** という **rhogef** 蛋白の活性化を通して **Rho** の活性化を引き起こしていることを見つけた。さらに、**LARG** は **FAK** によってリン酸化を受けることが分かった。

まず **Unc5B** が RGM のレセプターである **neogenin** と結合することを示した。293 細胞において **neogenin** と **unc5B** の co-ip が確認された。また、ELISA 法によって、**neogenin**

と **unc5b** の細胞外ドメイン同士が結合することも分かった。一方、細胞内ドメイン同士も結合するのだが、その時、**Unc5b** の DB ドメインが必要だということが分かった。この、**neogenin** と **unc5b** の結合は大脳皮質の神経細胞においても確認された。また、神経細胞を RGM 刺激しても、その結合の強さには変化は見られなかった。従って、**neogenin** と **unc5b** は恒常的に結合していることが分かった。

次に我々は **unc5b** が RGM のシグナルに必要なかどうかを **Rho** の活性化を指標に調べた。RGM による **Rho** の活性化は **neogenin** と **unc5b** の両方を発現した 293 細胞でのみ確認された。一方、**neogenin** だけを発現した細胞では確認されなかった。このことから、**Unc5b** の発現が RGM による **rho** の活性化に必要なことが分かった。また、リコンビナントの **Unc5b** 細胞外ドメインを使って RGM のシグナルを阻害できるかを調べた。神経細胞に **Unc5b** 細胞外ドメインを作用させると、RGM 刺激による **rho** の活性化が起らなくなることが分かった。これは、**Unc5b** 細胞外ドメインがドミナントネガティブとして働いていることを示す。さらに **unc5b** の発現を siRNA を用いて抑えられたニューロンでは、RGM による **rho** の活性化が起らなくなった。以上のことから、**unc5b** は **neogenin** に結合し、かつシグナル伝達に関わること、即ち共受容体として働いていることが分かった。

次に我々は RGM による **rho** の活性化に必要な **rhogef** タンパク質の同定を試み、それが **LARG** であることを見出した。**LARG** は **RGS-RhoGEF** サブファミリーとして知られており、これまで IGF や **semaphorin4D** の下流で **Rho** の活性化を担っていることが分かっている。我々は **unc5b** と **LARG** の co-ip を示し、**unc5b** と **LARG** が結合することが分かった。この **unc5b** と **LARG** の結合には、**Unc5b** の death domain と **LARG** の PDZ ドメインが必要だと分かった。

次に、**LARG** が RGM のシグナルにとって必要かを調べた。**LARG** の siRNA を使って、神経細胞の **LARG** の発現をノックダウンすると、RGM による **rho** の活性化が抑えられることが分かった。

また、神経細胞において **Rho** が活性化すると、神経軸索先端部の **growth cone** が collapse することが知られている。RGM で刺激された神経細胞の **growth cone** は collapse するのだが、**larg** を siRNA によってノックダウンすると、RGM による **growth cone collapse** が起らなくなった。

以上のことから、**LARG** が、RGM による **rho** の活性化にとって重要な **rhogef** であることが分かった。

最後に我々は、**LARG** がどのようにして活性化されているのかを調べた。そこで、ニュー

ロンに発現している LARG のリン酸化をみたところ、RGM 刺激後にリン酸化が上昇していることが分かった。このリン酸化は FAK によって引き起こされていることが分かった。ニューロンの FAK を siRNA によって knock-down すると、RGM 刺激による LARG のリン酸化が起こらなくなった。この、FAK による LARG のリン酸化を止めると、RGM による Rho の活性化も起こらなくなった。

これらをまとめると、unc5b は neogenin の co-receptor として働き、larg と結合して、larg が rhogef として rho の活性化を促すことが分かった。さらに、FAK が larg をリン酸化してその活性を制御していることが分かった。現在は Unc5B, LARG, FAK の阻害剤を用いてシナプス形成が促進されるかを in vitro の系を用いて検証している。

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 7 件)

1. Aoki, M., Kishima, H., Yoshimura, Y., Ishihara, M., Ueno, M., Hata, K., Yamashita, T., Iwatsuki, K. and Yoshimine, T. (2010) Transplantation of whole-layer olfactory mucosa promotes restricted functional recovery in rats with complete spinal cord injury. **Journal of Neurosurgery: Spine** 12,122-130.(査読有り)
2. Fujita, Y., Yamaguchi, A. Hata, K., Endo, M., Yamaguchi, N. and Yamashita, T. (2009) Zyxin is a novel interacting partner for SIRT1. **BMC Cell Biol.** 10, 6.(査読有り)
3. Hata, K., Kaibuchi, K., Inagaki, S. and Yamashita, T. (2009) Unc5B associates with LARG to mediate the action of repulsive guidance molecule. **J. Cell Biol.** 184, 737-750.(査読有り)
4. Suda, M., Hata, K., Sawada, A., Nakamura, Y., Kubo, T., Yamaguchi, A. and Yamashita, T. (2008) Peptides derived from repulsive guidance molecule act as antagonists. **Biochem Biophys Res Commun.** 371, 501-504.(査読有り)
5. Kubo, T., Endo, M., Hata, K., Taniguchi, J., Kitajo, K., Tomura, S., Yamaguchi, A., Mueller, B.K. and Yamashita, T. (2008) Myosin IIA is required for neurite outgrowth inhibition produced by RGMa. **J. Neurochem.** 105, 113-126.(査読有り)
6. Matsuura, I., Taniguchi, J., Hata, K., Saeki, N. and Yamashita, T. (2008) BMP inhibition enhances axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. **J. Neurochem.** 105, 1471-1479.(査読有り)

7. Fujita, Y., Taniguchi, J., Uchikawa, M., Endo, M., Hata, K., Kubo, T., Mueller, B.K. and Yamashita, T. (2008) Neogenin regulates neuronal survival through DAP-kinase. **Cell Death Differ.** 15, 1593-1608.(査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

1. 羽田克彦、山下俊英：新規軸索再生阻害因子のシグナル伝達機構、日本分子生物学会第 9 回春季シンポジウム、平成 21 年 5 月、宮崎市
2. 羽田克彦、山下俊英：RGMa の細胞内シグナル伝達機構、BMB2008、平成 20 年 12 月、神戸市
3. 羽田克彦、山下俊英：RGMa の細胞内シグナル伝達機構、第 51 回日本神経化学会大会、平成 20 年 9 月、富山市
4. 羽田克彦、山下俊英：RGMa の細胞内シグナル伝達機構、神経組織の成長・再生・移植研究会 第 23 回学術集会、平成 20 年 5 月、千葉市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽田 克彦 (Hata Katsuhiko)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：60506228

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：