

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21499

研究課題名（和文）ミクログリア由来新規ガイダンス因子による神経回路形成機構の解明と関連病態の解析

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of corpus callosum formation by a novel axon guidance molecule derived from microglia

研究代表者

山岸 覚（Yamagishi, Satoru）

浜松医科大学・フォトンクス医学研究部・教授

研究者番号：40372362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：脳梁はヒトの脳における最大の交連繊維であり、左右の大脳半球を繋ぎ、感覚や言語における情報交換を行っている。脳梁は大脳皮質の神経細胞からの軸索投射によって形成されている。しかしながら、その形成過程については未だに明らかになっていないことが多い。本研究課題では、脳梁形成に必須である新たな因子としてNogginを見出した。大脳皮質神経細胞で発現しており、神経軸索ガイダンス因子として機能していることを見出した。Nogginは骨形成タンパク質（BMP）阻害因子として大変有名であるが、これまでこのような機能があることは知られておらず、貴重な発見となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果として、脳梁形成に必須である新たな因子としてNogginを見出した。これまで神経軸索ガイダンス分子であるNetrinやDCC、セマフォリンなどといった有名分子が知られているが、本因子はこれらに匹敵する重要な分子であることを見出した。一方、Nogginは骨形成タンパク質（BMP）阻害因子として大変有名であるが、これまでこのような機能があることは知られておらず、大変貴重な発見となった。

研究成果の概要（英文）：The corpus callosum is the largest commissural fiber in the human brain, connecting the left and right cerebral hemispheres and facilitating information exchange in sensation and language. The corpus callosum is formed by axonal projections from neurons in the cerebral cortex. However, the formation process of the corpus callosum is still unclear. In this research project, we identified Noggin as a novel factor essential for the formation of the corpus callosum. Noggin is a well-known inhibitor of bone morphogenetic proteins (BMPs), however, its function as an axon guidance molecule has not been reported.

研究分野：神経生物学

キーワード：神経軸索ガイダンス Noggin 脳梁欠損

1. 研究開始当初の背景

脳梁はヒトの脳における最大の交連繊維であり、左右の大脳半球を繋ぎ、感覚や言語における情報交換を行っている。脳梁は大脳皮質 II/III 層の神経細胞からの軸索投射が約 80%、残り約 20%は V 層からの軸索で形成されている。発生過程における脳梁形成は、妊娠後期において、大脳皮質神経細胞が皮質板表層へと移動した後に行われる。先天的な脳梁欠損は米国コンソシアム NODCC (National Organization of Disorders of the Corpus Callosum)によると 3000 人に 1 人の確率で軸索が欠損しており、さらに高頻度で脳梁の低形成 (部分欠損)が生じている。先天性大脳白質形成不全症は我が国でも難病に指定されており、根本的治療法ははまだ存在しない。脳梁欠損・低形成はてんかんを生じたり、自閉症・統合失調症のリスクとなっており、また、脳梁低形成が見られるアイカルディ症候群においても精神遅滞を認める。神経軸索ガイダンス分子ネトリン・セマフォリンなどによって誘導されて脳梁軸索が正中交叉するが、詳細な形成メカニズムや脳梁欠損マウスの行動解析については未解析な部分が多い。先天性疾患であり、原因遺伝子としては *Netrin* や *DCC*、*EphB1*、*EphB2* などが知られているが、その数は決して多くなく、脳梁形成メカニズムは不明な点が多い。

2. 研究の目的

脳梁形成のメカニズムはまだまだ不明な点が多く、新しい分子の登場により、そのメカニズムの解明が期待される。神経軸索誘導因子は分泌型・膜貫通型分子であることが多く、本研究では分泌因子として知られている骨形成タンパク質 (BMP) 阻害因子である *Noggin* 注目し、これが軸索ガイダンス因子として機能している可能性が考えられたため、その機能及びメカニズムの解明を試みた。*Noggin* は BMP を阻害する因子として知られているが、それ以外の機能は明らかになっていないため、神経軸索ガイダンス因子として機能しているならば、このことを証明する必要がある。

3. 研究の方法

発生学的な *Noggin* の発現パターンは *Noggin* プロモーター下で緑色蛍光タンパク質 GFP を発現するトランスジェニックマウスを用いて解析を実施した。また、ミクログリア特異的に *Noggin* をノックアウトするマウスは *csfl1r-iCre*; *Noggin^{lox}* コンディショナルノックアウトマウスを、神経細胞特異的にノックアウトするマウスは *Nestin-Cre*; *Noggin^{lox}* コンディショナルノックアウトマウスを用いた。解析の方法はヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色や免疫染色に加え、脳梁や神経細胞の形態を観察するために、ゴルジ染色も実施した。また、結合タンパク質の解析としては、脳ライセートからリコンビナント *Noggin-Fc* を用いて質量分析で同定を行った。また、神経軸索ガイダンス因子としての機能評価はストライプアッセイを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 脳梁欠損について

Noggin の発現をミクログリア (マクロファージ) から欠損させるため、*Csfl1r-iCre*; *Noggin^{lox}* コンディショナルノックアウトマウスを多数作成し解析したところ、脳梁欠損が見られる個体と、フェノタイプが見られない個体がいることが明らかとなった。さらには、マイルドなフェノタイプとして、脳梁の前後の距離が短い個体も得られた。これらの結果は、ミクログリア (マクロファージ) から分泌される因子によって、脳梁形成が制御されていることを示している。一方で交配を繰り返すことにより、フェノタイプ出現率が減少したため、交配を一時中断した。

一方、興味深いことに、神経系で組み換わる *Nestin-Cre* マウスでも同様に脳梁が欠損するフェノタイプを得ることができた。*Nestin-Cre* を用いたコンディショナルノックアウトマウスは胎生致死になることが大多数であるが、生後も生存する個体も見られ、これのほとんど全ては脳梁欠損フェノタイプが見られた。これらのマウスは体重・体長さが小さく、生後約 1 ヶ月で致死となる個体もいるが、1 年近く生存する個体もいる。また、共通して見られるのは、活動性が低いということである。HE 染色やゴルジ染色により、脳梁を形成すべき軸索繊維は、方向性を失い、蟠を巻いたような状態になっていた。

(2) *Noggin* の発現について

また、*Noggin* がどのような場所で発現しているのかを *Noggin* プロモーター下で GFP を発現する *Noggin-GFP* トランスジェニックマウスを用いて発現を観察した。その結果、脳梁を形成する胎性後期の大脳皮質神経細胞で強く発現していることが確認された。実際、交連する脳梁におい

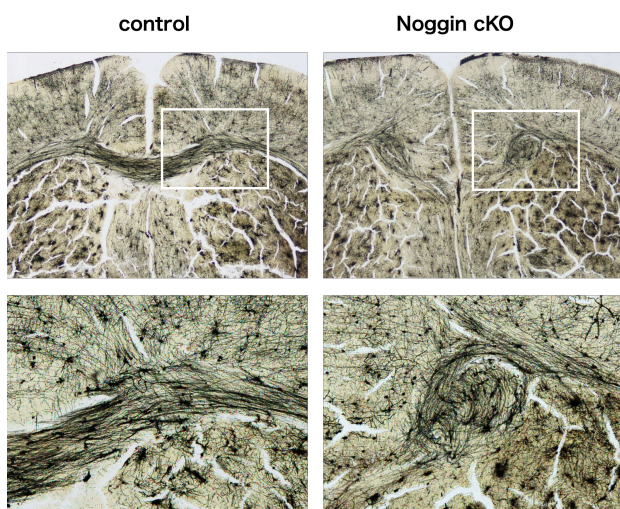
でも GFP の発現が観察された。また、小脳プルキンエ細胞でも強く発現していることが明らかとなった。一方、胎性中期において、正中部に存在するミクログリア/マクロファージが GFP 陽性になることも確認している。したがって、当初見られた *Csf1r-iCre; Noggin^{1x/1x}* マウスにおける脳梁欠損はこれらの細胞からの分泌が関与している可能性が考えられる。一方、これまで報告にある脳室上皮細胞における *Noggin* の発現もこのマウスを用いることで確認することができた。

(3) *Noggin* の神経軸索ガイダンス因子活性について

Noggin が果たして神経軸索ガイダンス因子であるかは、ストライプアッセイを用いて検証した。培養が容易であるということと、プルキンエ細胞で発現しているということから、生後の小脳顆粒細胞を用いて実験を行った。その結果、非常に強い反発因子活性を見ることができた。

(4) *Noggin* 結合因子について

また、*Noggin* の結合因子について、ラットの脳から超遠心によりシナプトソーム分画を集め、*Noggin*-Fc と結合する因子を Protein G を用いることによって精製し、LC-MS/MS 質量分析を実施した。3 回同様の実験を実施したが、毎回の解析で 100 種類以上の結合因子を得た（対照群としては control human Fc を用いた）。この中から 3 回の実験による再現性と、膜貫通型タンパク質であることにより、5 つの候補遺伝子に絞ることができた。現在、これらの因子をクローニングして *Noggin* が結合するかどうかを検証しているところである。



図： *Noggin* cKO マウスにおける脳梁欠損
Control マウスでは、脳梁によって左右の大脳皮質が連絡しているのに対し、*Noggin* cKO マウスでは、軸索が蟠を巻いており反対側へと投射しない（ゴルジ染色）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ando Tomofumi, Tai-Nagara Ikuo, Sugiura Yuki, Kusumoto Dai, Okabayashi Koji, Kido Yasuaki, Sato Kohji, Saya Hideyuki, Navankasattusas Sutip, Li Dean Y., Suematsu Makoto, Kitagawa Yuko, Seiradake Elena, Yamagishi Satoru, Kubota Yoshiaki	4. 巻 132
2. 論文標題 Tumor-specific interendothelial adhesion mediated by FLRT2 facilitates cancer aggressiveness	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e153626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI153626	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamagishi Satoru, Iga Yurika, Ikegaya Shunsuke, Kakiuchi Takeharu, Ohba Hiroyuki, Nishiyama Shingo, Fukomoto Daisuke, Kanazawa Masakatsu, Harada Norihiro, Tsukada Hideo, Sato Kohji, Ouchi Yasuomi	4. 巻 18
2. 論文標題 In vivo alterations of mitochondrial activity and amyloidosis in early-stage senescence-accelerated mice: a positron emission tomography study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-021-02343-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li Juntan, Shinoda Yo, Ogawa Shuhei, Ikegaya Shunsuke, Li Shuo, Matsuyama Yukihiro, Sato Kohji, Yamagishi Satoru	4. 巻 14
2. 論文標題 Expression of FLRT2 in Postnatal Central Nervous System Development and After Spinal Cord Injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 756264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2021.756264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Bando Yuki, Ishibashi Masaru, Yamagishi Satoru, Fukuda Atsuo, Sato Kohji	4. 巻 16
2. 論文標題 Orchestration of Ion Channels and Transporters in Neocortical Development and Neurological Disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 827284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2022.827284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikegaya Shunsuke, Iga Yurika, Mikawa Sumiko, Zhou Li, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Sato Kohji, Yamagishi Satoru	4. 巻 14
2. 論文標題 Decreased Proliferation in the Neurogenic Niche, Disorganized Neuroblast Migration, and Increased Oligodendrogenesis in Adult Netrin-5-Deficient Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 570974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.570974	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Satoru, Bando Yuki, Sato Kohji	4. 巻 8
2. 論文標題 Involvement of Netrins and Their Receptors in Neuronal Migration in the Cerebral Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 590009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.590009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuroda Go, Sasaki Shigekazu, Matsushita Akio, Ohba Kenji, Sakai Yuki, Shinkai Shinsuke, Nakamura Hiroko, Misawa, Yamagishi Satoru, Sato Kohji, Hirahara Naoko, Oki Yutaka, Ito Masahiko, Suzuki Tetsuro, Suda Takafumi	4. 巻 15
2. 論文標題 G ATA2 mediates the negative regulation of the prepro-tyrotropin-releasing hormone gene by liganded T3 receptor 2 in the rat hypothalamic paraventricular nucleus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0242380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0242380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wakayama Yuki, Yamagishi Satoru	4. 巻 13
2. 論文標題 Vascular and Neuronal Network Formation Regulated by Growth Factors and Guidance Cues	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 283 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life13020283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li Shuo, Dinh Hoai Thi Phuong, Matsuyama Yukihiko, Sato Kohji, Yamagishi Satoru	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular Mechanisms in the Vascular and Nervous Systems following Traumatic Spinal Cord Injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 9~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life13010009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa Yuki, Choudhury Mohammed E., Mikami Kanta, Matsuura Taisei, Kubo Madoka, Nagai Masahiro, Yamagishi Satoru, Doi Tomomi, Hisai Manami, Yamamoto Haruto, Yajima Chisato, Nishihara Tasuku, Abe Naoki, Yano Hajime, Yorozuya Toshihiro, Tanaka Junya	4. 巻 163
2. 論文標題 Anti-inflammatory effects of dopamine on microglia and a D1 receptor agonist ameliorates neuroinflammation of the brain in a rat delirium model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105479 ~ 105479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2023.105479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura Takeshi, Yamagishi Satoru, Akimoto Yoshihiro, Saitoh Sei	4. 巻 16
2. 論文標題 Editorial: Brain imaging for glycobiology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 1026499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnana.2022.1026499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Erkhembaatar Munkhsoyol, Yamamoto Iroha, Inoguchi Fuduki, Taki Kosuke, Yamagishi Satoru, Delaney Leanne, Mariko Nishibe, Abe Takaya, Kiyonari Hiroshi, Hanashima Carina, Naka kaneda Hayato, Ihara Dai, Katsuyama Yu	4. 巻 64
2. 論文標題 Involvement of strawberry notch homologue 1 in neurite outgrowth of cortical neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 379 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oishi Tomoya, Ito Masahiko, Koizumi Shinichiro, Horikawa Makoto, Yamamoto Taisuke, Yamagishi Satoru, Yamasaki Tomohiro, Sameshima Tetsuro, Suzuki Tetsuro, Sugimura Haruhiko, Namba Hiroki, Kurozumi Kazuhiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Efficacy of HSV-TK/GCV system suicide gene therapy using SHED expressing modified HSV-TK against lung cancer brain metastases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 253 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2022.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Li Juntan, Shinoda Yo, Ogawa Shuhei, Ikegaya Shunsuke, Li Shuo, Matsuyama Yukihiro, Sato Kohji, Yamagishi Satoru
2. 発表標題 Expression of FLRT2 in Postnatal Central Nervous System Development and After Spinal Cord Injury
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Li Juntan, Shinoda Yo, Ogawa Shuhei, Ikegaya Shunsuke, Li Shuo, Matsuyama Yukihiro, Sato Kohji, Yamagishi Satoru
2. 発表標題 Expression of FLRT2 in Postnatal Central Nervous System Development and After Spinal Cord Injury
3. 学会等名 第64回日本神経化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ikegaya S, Iga Y, Mikawa S, Zhou L, Abe M, Sakimura K, Sato K, Yamagishi S
2. 発表標題 Decreased proliferation in the neurogenic niche, disorganized neuroblast migration and increased oligodendrogenesis in adult netrin-5 deficient mice.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山空明慈、佐藤康二、山岸覚
2. 発表標題 ショットガンプロテオミクスによるNoggin結合因子の同定及び細胞内シグナル伝達経路の解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satoru Yamagishi
2. 発表標題 Functional analysis of novel axon guidance molecules
3. 学会等名 Ringberg meeting, Germany (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関