

科学研費補助金研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21200009
 研究課題名（和文）脂質が媒介する細胞間情報伝達に着目した神経回路の発生再生機構の研究
 研究課題名（英文）The role of lipid-mediated intercellular communications in neuronal circuit development and regeneration

研究代表者
 上口 裕之（KAMIGUCHI HIROYUKI）
 独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・チームリーダー
 研究者番号：10233933

研究成果の概要（和文）：

神経回路が構築されるためには、神経細胞から伸びた軸索突起が正しい経路を選択することが必要です。軸索の伸長方向を制御する新たな脂質分子リゾホスファチジルグルコシドを発見し、その受容体および細胞内シグナル伝達機構を同定し、脊髄感覚神経回路の構築における機能的意義を解明しました。これまでの研究ではタンパク質が神経回路構築の主役でしたが、本課題は脂質分子による軸索ガイダンスの重要性を明らかにしました。

研究成果の概要（英文）：

Axon growth along the correct path is necessary for neuronal circuit formation. We have discovered the axon-guiding lipid molecule Lysophosphatidylglucoside (LysoPtdGlc), identified its receptor and downstream signaling pathway, and elucidated its functional significance in the spinal sensory axon tract formation. In contrast to previous studies on the role of proteins as axon guidance cues, this project has demonstrated the importance of lipid-mediated axon guidance in neuronal circuit formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2011年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
総計	23,000,000	6,900,000	29,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：脊髄；後根神経節；感覚神経；軸索ガイダンス；成長円錐；リゾリン脂質；Gタンパク質共役型受容体；カルシウムイオン

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の細胞体から伸長した軸索突起

が標的とシナプスを形成することで神経回路が構築される。伸長過程にある軸索の先端部（成長円錐）は、細胞外環境に存在するガイダンス分子を認識し、軸索を正確な方向へ誘導・牽引する。他の細胞から産生・放出されたガイダンス分子は、成長円錐に発現する受容体に結合して軸索の伸長速度と方向を制御する。国内外の過去15年間の研究により、軸索ガイダンス分子および受容体として機能する数多くのタンパク質が同定され、その作用機序の解明も進んだ。しかし、これまでに同定されたガイダンス分子のほぼ全てはタンパク質であり、非タンパク性因子による軸索ガイダンスは見逃されてきた。脂質は細胞膜を構成する主要分子であり細胞間情報伝達の重要な媒体となりうるが、生物学的実験手法のみでは解析が困難であるなどの理由で研究が立ち遅れていた。研究代表者らは、所属機関内の異分野（有機化学など）との連携研究を遂行し、細胞外に放出されたリゾリン脂質が軸索の伸長方向を制御することを発見し、タンパク性因子のみでは説明不可能な軸索ガイダンス機構の存在を示唆する実験結果を得た。現在までに、培養系で軸索ガイダンス分子として機能するリゾリン脂質 *Lyso*phosphatidylglucoside (*Lyso*PtdGlc) を同定した。*Lyso*PtdGlc は、発生段階の神経組織の放射状グリア細胞と未分化アストログリアが産生する *Phosphatidylglucoside* (PtdGlc) の加水分解産物として細胞外に放出されることを確認した。PtdGlc と *Lyso*PtdGlc の構造を図1に示す。

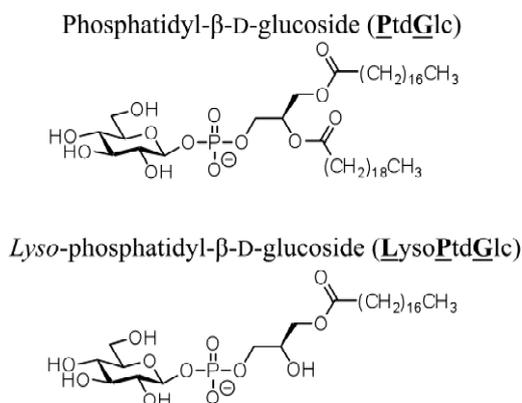


図1 PtdGlc と *Lyso*PtdGlc の分子構造

後根神経節から脊髄へ軸索を投射する感覚神経細胞として、主として、温痛覚を担う

神経成長因子 (NGF) 感受性 TrkA 陽性細胞と固有知覚を担うニューロトロフィン 3 (NT-3) 感受性 TrkC 陽性細胞が知られている。いずれの神経軸索も後根を通り脊髄に進入するが、その後は異なる経路を走行する。TrkA 陽性軸索は脊髄後角の表層に投射し、TrkC 陽性軸索は脊髄の背側部白質（後索）へと進入する（図2）。PtdGlc は後索に限局して存在するため、同部位から放出された *Lyso*PtdGlc が TrkA 陽性軸索を反発することにより、温痛覚と固有知覚を担う軸索が異なる経路を選択できる可能性が示唆された。

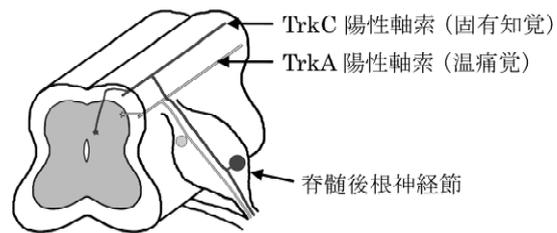


図2 発生段階の脊髄感覚神経路

分散培養したニワトリ胚由来の NGF 感受性 TrkA 陽性神経細胞の軸索成長円錐の近傍に *Lyso*PtdGlc の濃度勾配を作製すると、成長円錐は *Lyso*PtdGlc を避ける方向に旋回した。本実験系での成長円錐近傍の *Lyso*PtdGlc 濃度は約 100 pico-M ~ 1 nano-M であり、*Lyso*PtdGlc は極めて低濃度で作用する軸索伸長阻害/反発性ガイダンス分子であることが判明した。ところが、NT-3 感受性 TrkC 陽性細胞の軸索成長円錐は *Lyso*PtdGlc 濃度勾配に反応せず直進した。以上の結果から、*Lyso*PtdGlc が発生段階での脊髄感覚神経回路の構築に関与することが示唆された。

一方、成体の中枢神経組織では PtdGlc の発現量は顕著に減少するが、外傷が加わると、損傷部位近傍での PtdGlc 発現量は上昇した。このことは、PtdGlc や *Lyso*PtdGlc が成体中枢神経回路の再生阻害因子となることを示唆する。以上の成果を踏まえ、*Lyso*-PtdGlc などのリゾリン脂質を対象とした研究を進展させることは、神経回路の発生再生に関する学問分野へ大きく貢献するものと期待されていた。

2. 研究の目的

上記の背景をふまえ、本課題の具体的な目標（予想される結果）を下記の通り設定した。

(1) *Lyso*PtdGlc の機能阻害抗体あるいはア

ンタゴニストを作製し、LysoPtdGlc 機能阻害実験を実現可能とすること、(2) 脊髄感覚神経回路の構築過程における LysoPtdGlc の機能的意義を明らかにすること、(3) LysoPtdGlc 受容体を同定すること、(4) LysoPtdGlc 受容体下流シグナルと成長円錐旋回の駆動機構を同定すること。

3. 研究の方法

<抗 LysoPtdGlc 抗体の作製>

ADLib 法 (Seo et al., Nat Biotechnol 23: 731-736, 2005) を用いて抗 LysoPtdGlc 抗体を作製した。遺伝子組み換えを人工的に活性化した DT40 細胞を、LysoPtdGlc を結合した磁気ビーズで選択し、抗 LysoPtdGlc 抗体 (IgM) 産生クローンを獲得した。

<成長円錐旋回アッセイ>

微細ガラス管にリゾリン脂質を充填し、ガラス管の先端部を成長円錐の進行方向 45° で 50-100 μm 離れた場所に置き、細胞外液中にリゾリン脂質を圧放出した (Akiyama et al., Science Signaling 2: ra34, 2009)。これにより作製したリゾリン脂質濃度勾配に応答した成長円錐の旋回角度を定量した。

<ニワトリ胚への抗体投与>

胚性 4 日目~5 日目 (Hamburger-Hamilton Stage 22-26) にかけて、ニワトリ胚の脊髄腔内に抗 LysoPtdGlc 抗体あるいは非特異的 IgM を 8 時間毎 (計 4 回) 注入した。胚性 6 日目 (Stage 28-29) にホルマリン固定し、脊髄感覚神経を蛍光標識した。厚さ 300 μm の脊髄ビブラトーム切片を作製し、後根神経節の特定領域に FastDiI を投与し、TrkA 陽性軸索と TrkC 陽性軸索を選択的に標識した。あるいは、一般的な免疫組織化学法により TrkA 陽性軸索と TrkC 陽性軸索を蛍光染色した。

4. 研究成果

ADLib 法により Lyso-PtdGlc に特異的な複数のモノクローナル抗体を得た。細胞外液中の LysoPtdGlc 濃度勾配が TrkA 陽性後根神経節神経細胞の軸索成長円錐を反発することを指標にして、得られ抗体の機能阻害活性を検証し、少なくとも 1 種類の抗 LysoPtdGlc 機能阻害抗体を得た。動物個体レベルでの神経回路構築における LysoPtdGlc の役割を検証するため、本抗体をニワトリ胚の脊髄腔内に注入して LysoPtdGlc の軸索ガイダンス活

性を阻害し、感覚神経の投射パターンを解析した。LysoPtdGlc 機能阻害群では、TrkC 陽性軸索は正常の走行パターンを示したが、TrkA 陽性軸索にはガイダンス異常が検出された。TrkA 陽性軸索は、本来は TrkC 陽性軸索が走行する PtdGlc 陽性の背側部白質 (後索) へ進入していた。対照群 (非特異的 IgM 投与群) では、後根神経節神経細胞から脊髄へ投射する軸索の走行異常は確認されなかった。このように、脊髄背側部白質のグリア細胞が産生・放出する LysoPtdGlc が、異種の感覚を担う軸索を異なる領域へ投射させる働きを担うことが判明した。

LysoPtdGlc 濃度勾配は TrkA 陽性軸索を反発するが、この反発性ガイダンスが G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のシグナル伝達阻害ペプチド (Gi のカルボキシ末端配列) により消失することから、LysoPtdGlc 受容体は GPCR であるとの仮説を立てた。本仮説に基づき GPCR の網羅的解析を行った結果、数 nM の LysoPtdGlc に応答して下流シグナルを活性化する GPCR を特定することに成功した (東北大学の青木淳賢教授との共同研究)。この GPCR が LysoPtdGlc 受容体であることを確認するため、この GPCR 遺伝子を欠損するマウスを得て、軸索ガイダンスアッセイを行った。LysoPtdGlc 濃度勾配は、野生型マウス由来の TrkA 陽性後根神経節神経細胞の軸索を反発したが、GPCR ノックアウトマウス由来の TrkA 陽性軸索の伸長には影響をおよぼさなかった。さらに、動物個体レベルでの神経回路構築異常を検証するため、野生型およびノックアウトマウスの脊髄での感覚神経投射を解析した。受容体ノックアウトマウスの TrkA 陽性軸索は PtdGlc 陽性の背側部白質 (後索) へ進入していた。すなわち、受容体ノックアウトと LysoPtdGlc 機能阻害は同様の軸索ガイダンスエラーを引き起こすことが判明した。以上、LysoPtdGlc による反発性ガイダンスを媒介する受容体の同定に成功した。

次に、LysoPtdGlc が TrkA 陽性軸索を反発する細胞内メカニズムを研究した。LysoPtdGlc の軸索反発活性は成長円錐細胞質のカルシウムイオン (Ca²⁺) シグナルを必要とすることが判明した。さらに詳細な薬理的阻害実験を行い、細胞内 Ca²⁺ ストア (小胞体) からの Ca²⁺ 放出は重要ではなく、Cd²⁺ 依存性チャンネルを介した細胞外からの Ca²⁺ 流入が LysoPtdGlc による反発性ガイダンス

に必須であることを明らかにした。このような Ca^{2+} 流入が軸索を反発するメカニズムを探索した結果、成長円錐片側の Ca^{2+} シグナルはクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを非対称化し、成長円錐片側の形質膜を除去することにより反対側への旋回を駆動することを発見した。

また、LysoPtdGlc による反発性ガイダンスを阻害するアンタゴニストを探索した結果、培養液中にアセチル化 LysoPtdGlc を添加すると LysoPtdGlc による反発性ガイダンスが消失することを見出し、アセチル化 LysoPtdGlc がアンタゴニストとして機能することを示唆する実験結果を得た（理化学研究所の平林義雄チームリーダーとの共同研究）。アセチル化 LysoPtdGlc は生体内の神経組織から検出可能な LysoPtdGlc 誘導体であり、生体内でリガンド (LysoPtdGlc) がアンタゴニスト (アセチル型 LysoPtdGlc) に変換されるという新たなメカニズムの存在が示唆された。

以上、LysoPtdGlc による軸索ガイダンスの機能的意義を見出し、LysoPtdGlc 受容体および下流の細胞内シグナル伝達系と駆動機構を明らかにし、LysoPtdGlc 受容体アンタゴニストの候補分子を得ることに成功した。

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 3 件)

① Tojima T, Hines JH, Henley JR, Kamiguchi H: Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nat Rev Neurosci* 12: 191-203, 2011

② Itofusa R, Kamiguchi H: Polarizing membrane dynamics and adhesion for growth cone navigation. *Mol Cell Neurosci* 48: 332-338, 2011

③ Tojima T, Itofusa R, Kamiguchi H: Asymmetric clathrin-mediated endocytosis drives repulsive growth cone guidance. *Neuron* 66: 370-377, 2010

[学会発表] (計 7 件)

① Kamiguchi H: Growth cone membrane trafficking for axon guidance. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Membranes in Motion", Tahoe City, USA, January 27, 2012

② Kamiguchi H: Membrane dynamics in growth cone guidance. The 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, July 16, 2011

③ Guy A, Nagatsuka Y, Greimel P, Nabetani T, Inoue M, Nakata A, Ooashi N, Ito Y, Ohta K, Hirabayashi Y, Kamiguchi H: Lipid-mediated axon guidance in the developing spinal cord. The 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, July 16, 2011

④ Kamiguchi H: Lysophosphatidylglucoside controls neuronal circuit formation in the spinal cord. The 30th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology II: Domains, Droplets and Diseases, Sapporo, Japan, July 1, 2011

⑤ Kamiguchi H: Lipid-mediated axon guidance in the developing spinal cord. The 6th International Academy of Perinatal Medicine, Osaka, Japan, Oct 23, 2010

⑥ Guy A, Nagatsuka Y, Greimel P, Nabetani T, Ito Y, Ohta K, Hirabayashi Y, Kamiguchi H: Lipid-mediated axon guidance in the developing spinal cord. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Axon Guidance, Synaptic Plasticity and Regeneration, New York, USA, Sep 21, 2010

⑦ 上口裕之: リゾホスファチジルグルコシドによる軸索ガイダンス. 第 32 回日本神経科学大会、名古屋、2009 年 9 月 17 日

[図書] (計 1 件)

Tojima T, Kamiguchi H: The driving machinery for growth cone navigation. In: *Advances in Neurobiology* "Cytoskeleton

of the Nervous System” . (Eds) Nixon RA,
Yuan A, Springer, New York, NY, USA, vol
3, pp447-454, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：リゾホスファチジルグルコシドに結合
する抗体および該抗体を含む組成物

番号：特願 2010-155278

出願年月日：2010年7月7日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上口 裕之 (KAMIGUCHI HIROYUKI)

独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研
究チーム・チームリーダー

研究者番号：10233933

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし