

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21689013

研究課題名（和文）新生仔期及び成体における神経新生のメカニズムと精神機能の分子病態

研究課題名（英文）Molecular mechanisms for neurogenesis and psychiatric dysfunction in postnatal and adult periods

研究代表者

榎本 篤 (ENOMOTO ATSUSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：20432255

研究成果の概要（和文）：本研究ではアクチン結合分子 Girdin が統合失調症の脆弱性因子である DISC1 分子と結合し、新生仔期と成体期における海馬歯状回の神経新生、特に神経芽細胞の移動と位置決定を制御していることを明らかにした。Girdin は脳室下帯で新生した神経芽細胞の嗅球への移動にも重要であることも示した。さらに Girdin のファミリー分子である Gipie および Daple の機能についても解析を行い、それぞれ小胞体ストレス応答および Wnt シグナル伝達機構を制御することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We showed that the actin-binding protein Girdin binds to DISC1, a susceptibility gene for schizophrenia, and regulates the migration and positioning of newborn neurons in the dentate gyrus of the hippocampus during postnatal and adult periods. Furthermore, we identified that Girdin is crucial for the migration of neuroblasts born in the subventricular zone. We also studied the function of two members of the Girdin family of proteins, Gipie and Daple, and found that they regulate the ER stress response and the Wnt signaling pathway, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2011年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
総計	20,700,000	6,210,000	26,910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：分子、発生医学

1. 研究開始当初の背景

これまで、ほ乳類の中枢神経系の神経細胞は二度と再生されないと教科書に記載されてきた。しかしながら近年、げっ歯類および霊長類において、発生を終えた生後の中枢神経系でも神経幹細胞から神経細胞が新生することが明らかにされている。特に成体（新生仔期後～死亡するまで）の海馬および脳室周

囲における神経新生は「adult neurogenesis」と呼称され、再生医療、脳血管疾患や変性疾患の治療、および精神・記憶の形成機序という観点から多方面の研究者に注目されている。胎生期の中枢神経系の発生については過去に多くの知見が集積しているが、生後における神経新生を特異的に制御する分子はほとんど明らかになっていないのが現状である。

DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) は、統合失調症や双極性障害の原因の一つとして注目されている分子である。2007年、米国のグループがレトロウイルスを用いた単一幹細胞のラベリング技術を用いて、DISC1が海馬における神経幹細胞の分化と位置決定に重要であることを発表した (Duan X et al., Cell, 2007)。この論文は生後の神経幹細胞の分化の異常が精神疾患発症と密接に関連していることを初めて明らかにした報告として各方面の研究者から注目された。

引き続いて、英国のグループにより DISC1の結合分子を包括的に同定する目的で行われた酵母 two-hybrid 法の結果が報告された (Camargo LM et al., Molecular Psychiatry, 2007)。この論文中で、DISC1 および DISC1 結合分子として知られる Nudel

(NudeE-like) の新規相互作用分子として私達が研究をすすめていたアクチン結合タンパク質 Girdin (ガーディン) が候補として挙げられており、今回の研究の発案に至っている。

Girdin のノックアウトマウスを作製したところ、胎生期中枢神経の発生の異常は認めず、生後の神経新生が特異的に障害されるという興味深い表現系を示した。さらに予備的な解析により、Girdin は DISC1 と神経細胞内で結合し、この両者からなる分子複合体が海馬における新生ニューロンの移動と分化を制御している可能性が明らかになった。以上の結果は生後の神経幹細胞の移動や分化が Girdin および DISC1 によって制御されており、その異常が統合失調症などの精神疾患の病理に関与していることを示唆するものである。今回の研究は以上の背景および予備的実験結果をもとに発案されたものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Girdin と DISC1 の機能解析を通して生後、すなわち新生仔(児)期と成体期における神経新生の分子メカニズムと精神機能の分子病態を解明することである。さらに Girdin の発現制御機構やそのファミリー分子の解析を通して、生後の神経新生を制御するより普遍的な分子ネットワークおよび細胞内シグナル伝達機構を明らかにすることを試みた。Girdin のファミリー分子には FLJ00354 (後に Gipie と命名) と Daple

が存在するが、研究開始時点でそれらの機能は未知の点が多かったため、まず培養細胞を用いた細胞生物学的手法によりそれぞれの分子の機能の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) すでに作製されている Girdin ノックアウトマウスの海馬および脳室下帯における神経新生を免疫染色で評価した。Girdin と DISC1/Nudel を含む分子複合体が新生仔期における海馬歯状回の顆粒細胞の新生、およびその分化・移動を制御する機構を明らかにした。方法として生体中の単一神経幹細胞をレトロウイルスでラベルして、その挙動を経時的に観察する方法 (Duan X et al., Cell, 2007 他) を用いた。また、脳室下帯における神経新生と神経芽細胞の移動についても免疫染色およびレトロウイルスによるラベリング実験で評価した。

(2) Girdin ノックアウトマウスは4週齢程で死亡するため、成体期における神経新生や精神疾患の基盤となる中間表現系の解析(行動解析など)が不可能である。本研究では Girdin の各種変異体マウスおよびタモキシフェンにより Girdin の機能喪失を誘導できるコンディショナルノックアウトマウスの作製を試みた。

(3) Girdin は以前私達の研究室でセリン・スレオニンキナーゼ Akt の基質として同定された分子である。Akt の遺伝子多型は統合失調症のリスクファクターとして報告されている (Emamian ES et al., Nature Genetics, 2004 他)。本研究ではリン酸化され得ない Girdin 変異体のノックインマウスおよびもう一種の変異体のノックインマウスを用いて、その行動解析を行い、Girdin の機能異常が精神機能に与える影響を検討した。

(4) Girdin のファミリー分子 (Daple と FLJ00354) の機能について、DISC1 との関連を含め、培養細胞を用いて細胞生物学的に機能を検討する他、Daple に関しては遺伝子改変動物を作製して表現系を解析した。

4. 研究成果

(1) Girdin ノックアウトマウスの表現系解析と DISC1 との相互作用の意義の解明

神経芽細胞のマーカーとして知られている doublecortin の抗体を用いて免疫染色を施行したところ、Girdin ノックアウトマウスでは海馬歯状回の神経芽細胞の細胞移動および顆粒細胞の神経突起（苔状線維）の伸長が特異的に障害されていることを明らかにした。Girdin ノックアウトマウスの脳は、生後直後では正常（野生型）との間に明確な形態学的な差異を認めないが、成長するに従って海馬歯状回と嗅球の組織構造に異常がみられるようになり、生後 3-4 週間になると死亡する（死因は現時点で不明）。この免疫染色の結果から、Girdin が海馬歯状回の生後発生に非常に重要な役割を果たす分子であることが示唆された。尚、ノックアウトマウスの作成は共同研究者の名古屋大学大学院医学系研究科高橋雅英教授および浅井直也准教授によるものである。

次に野生型のラット新生仔（生後 6 日目）の海馬歯状回に Girdin shRNA (short hairpin RNA) を組み込んだレトロウイルスを注入する実験を行った。2 週間後の海馬切片を作製し、組織免疫染色を用いて観察したところ、神経幹細胞から分化した神経芽細胞の過剰移動と位置異常が観察された（東京医科大学石龍徳教授および名古屋大学大学院医学系研究科の難波隆志助教との共同研究）。

次に、Girdin と DISC1 の結合について、脳抽出液を用いた免疫沈降法や発現ベクターを用いた強制発現実験の系で証明した。これらの実験により、DISC1 の N 末端前半領域が Girdin の N 末端ドメインに結合することが明らかとなった。Girdin の N 末端ドメインを強制発現させると、競合的に Girdin と DISC1 の結合が阻害され、さらに神経芽細胞の過剰異動と位置異常が引き起こされた。

上記の結果より、Girdin と DISC1 は共に海馬歯状回の神経芽細胞の分化や位置決定に重要であることが明らかとなった（Enomoto et al., Neuron, 2009）。

次に、共同研究者により、Girdin の膜非結合型の変異体 Basic-mut と Akt によってリン酸化されない変異体 SA のノックインマウスが作成された。興味深いことに、海馬歯状回の神経芽細胞の位置異常は Basic-mut マウスでは観察されたが、SA マウスでは観察され

なかった。以前、私たちが培養細胞を用いた実験結果から推定される作業仮説では、Akt による Girdin のリン酸化が細胞運動に必要であると考えられていたが、個体内、少なくとも神経系組織においては Akt による Girdin のリン酸化は目立った解剖学的異常を引き起こさないものと結論された。

(2) Girdin ノックアウトマウスにおける脳室下帯の神経新生の異常

生後あるいは成体期において神経新生が観察される場所には、上述の海馬歯状回の他に脳室下帯が知られている。Girdin ノックアウトマウスにおいて脳室下帯を観察したところ、神経芽細胞の産生には異常がないが、同細胞の嗅球に向かう細胞運動が顕著に障害されていることが判明した。脳室下帯で産生された神経芽細胞が嗅球に向かって移動する経路は RMS (rostral migratory stream) と呼ばれているが、RMS における細胞運動を制御する特異的な分子メカニズムは完全に解明されていない。本研究の結果から Girdin が RMS の細胞運動を制御する分子の一つであることが判明した (Wang, Y. et al., J. Neurosci., 2011)。

また共同研究者によって Girdin の神経細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスが作製された。現在、その神経系組織における表現系を詳細に検討中である（未発表）。

(3) 行動解析

上記の研究で作製された各種変異体マウスの一部を用いて、行動解析を行った。本研究は名古屋大学医学部附属病院薬剤部山田清文教授との共同研究として進行中である（未発表）。

(4) 抑制性介在神経の分化および移動における Girdin の機能

Girdin が統合失調症などの精神疾患発症の病態に関与している可能性から、大脳皮質における抑制性介在ニューロンの分布および細胞数を解析した。HE 標本および Nissl 染色法などの通常の観察法では大脳皮質の細胞構築に異常を認めないが、各種マーカー分子に対する抗体を用いた免疫染色で検討すると、

Girdin ノックアウトマウスでは大脳皮質における Parvalbumin 陽性の介在ニューロンが著明に減少していることが判明した。ただし本解析のみでは介在ニューロンの基底核原基からの移動が障害されているのか、成熟・分化に異常があるのか明らかではない。今後は子宮内胎仔脳へのエレクトロポレーションと RNA 干渉を用いた実験により、基底核原基の介在ニューロン前駆細胞における Girdin の発現を抑制し、介在ニューロンの移動に対する影響を経時的に観察する予定である。

(5) Girdin ファミリー分子 Daple の機能解析

Wnt シグナルの重要なシグナル分子 Dishevelled の結合分子として同定された Daple は Girdin のファミリー分子である。Daple の詳細な機能を検討するため、本研究では培養細胞を用いて同分子の機能解析を行うとともに、ノックアウトマウスの作成に着手した。得られた Daple ノックアウトマウスを解析した結果、神経系には明らかな異常を認めないが、成長に従って体重が低下するという現象が観察された。

一方、培養細胞を用いた解析では、Daple の C 末端ドメインを細胞に発現させると低分子量 G 蛋白質の一つである Rac が特異的に活性化されることが明らかとなった。Dishevelled への結合領域を欠いた変異体では Rac の活性化能が失われていた。Rac は微小管やアクチン線維など細胞骨格を制御することが知られている。以上のことから Daple は Dishevelled と協調し、Wnt シグナル依存的な Rac の活性を制御している可能性が明らかとなった (Takagishi et al., Nat. Commun. in revision)。

Wnt シグナルは海馬歯状回の神経新生においても重要な役割を有していることが他の研究グループによって示されている。今後は細胞生物学的解析にとどまらず、神経細胞の移動における Daple の役割についても検討する予定である。

(6) Girdin ファミリー分子 FLJ00354 (Gipie) の機能解析

Girdin ファミリー分子の一つである FLJ00354 の結合分子を免疫沈降と質量分析を組み合

わせた方法で探索した。その結果、FLJ00354 の結合分子の一つとして GRP78 を同定した。GRP78 は小胞体に発現するシャペロン分子であり、細胞に様々な原因で小胞体ストレスの負荷が加わったときに細胞内の細胞死シグナル伝達機構を制御する分子である。培養細胞を用いた検討により、FLJ00354 が GRP78 と結合すると GRP78/IRE1 間の結合が安定化され、結果として IRE1 から発せられる細胞死シグナルを抑制することで細胞の生存に向かわせることを明らかにした。さらに FLJ00354 が血管内皮細胞に発現しており、内皮細胞がストレスに曝される環境下では FLJ00354 の発現が上昇することを示した。これらの結果を受けて FLJ00354 を Gipie (GRP78-interacting protein induced by ER stress) と命名し、その解析結果を論文で発表した (Matsushita et al., Mol Biol Cell, 2011)。

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 12 件)

全て査読有

1. Kuroda K, Yamada S, Tanaka M, Iizuka M, Yano H, Mori D, Tsuboi D, Nishioka T, Namba T, Iizuka Y, Kubota S, Nagai T, Ibi D, Wang R, Enomoto A, Isotani-Sakakibara M, Asai N, Kimura K, Kiyonari H, Abe T, Mizoguchi A, Sokabe M, Takahashi M, Yamada K, Kaibuchi K. Behavioral alterations associated with targeted disruption of exons 2 and 3 of the Disc1 gene in the mouse. *Hum Mol Genet.* 20:4666-83. 2011.
2. Wang Y, Kaneko N, Asai N, Enomoto A, Isotani-Sakakibara M, Kato T, Asai M, Murakumo Y, Ota H, Hikita T, Namba T, Kuroda K, Kaibuchi K, Ming GL, Song H, Sawamoto K, Takahashi M. Girdin is an intrinsic regulator of neuroblast chain migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain. *J Neurosci.* 31:8109-22. 2011.
3. Namba T, Ming GL, Song H, Waga C,

- Enomoto A, Kaibuchi K, Kohsaka S, Uchino S. NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the adult hippocampus via Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1). *J Neurochem.* 18:34-44. 2011.
4. Miyake H, Maeda K, Asai N, Shibata R, Ichimiya H, Isotani-Sakakibara M, Yamamura Y, Kato K, Enomoto A, Takahashi M, Murohara T. The actin-binding protein Girdin and its Akt-mediated phosphorylation regulate neointima formation after vascular injury. *Circ Res.* 108:1170-9. 2011.
 5. Matsushita, E., Asai, N., Enomoto, A., Kawamoto, Y., Kato, T., Mii, S., Maeda, K., Shibata, R., Hattori, S., Hagikura, M., Takahashi, K., Sokabe, M., Murakumo, Y., Murohara, T., and Takahashi, M. Protective role of Girdin, a Girdin family protein, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 22:736-47. 2011.
 6. Saito, S., Murakumo, Y., Tsuzuki, T., Dambara, A., Kato, T., Enomoto, A., Asai, N., Maruyama, S., Matsuo, S., and Takahashi, M. Analysis of GDNF-inducible zinc finger protein 1 expression in human diseased kidney. *Human Pathol.*, 42:848-58. 2011.
 7. Miyamoto R, Jijiwa M, Asai M, Kawai K, Ishida-Takagishi M, Mii S, Asai N, Enomoto A, Murakumo Y, Yoshimura A, Takahashi M. Loss of Sprouty2 partially rescues renal hypoplasia and stomach hypoganglionosis but not intestinal aganglionosis in Ret Y1062F mutant mice. *Dev Biol.* 349:160-8. 2011.
 8. Kurotsuchi A, Murakumo Y, Jijiwa M, Kurokawa K, Itoh Y, Kodama Y, Kato T, Enomoto A, Asai N, Terasaki H, Takahashi M. Analysis of DOK-6 function in downstream signaling of RET in human neuroblastoma cells. *Cancer Sci.* 101: 1147-1155, 2010.
 9. Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M. Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron* 63:774-87, 2009.
 10. Tsukamoto H, Kato T, Enomoto A, Nakamura N, Shimono Y, Jijiwa M, Asai N, Murakumo Y, Shibata K, Kikkawa F, Takahashi M. Expression of Ret finger protein correlates with outcomes in endometrial cancer. *Cancer Sci.* 100:1895-901, 2009.
 11. Puseenam A, Yoshioka Y, Nagai R, Hashimoto R, Suyari O, Itoh M, Enomoto A, Takahashi M, Yamaguchi M. A novel Drosophila Girdin-like protein is involved in Akt pathway control of cell size. *Exp. Cell Res.* 315:3370-80, 2009.
 12. Kato T, Shimono Y, Hasegawa M, Jijiwa M, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M. Characterization of the HDAC1 complex that regulates the sensitivity of cancer cells to oxidative stress. *Cancer Res.* 69:3597-604, 2009.
- [学会発表] (計 5 件)
1. Weng, L., Enomoto, A., Takahashi, M. Girdin/GIV's partner Rabenosyn-5 controls turnover of Akt. The American Society of Cell Biology, 2011 Annual Meeting, Denver, Dec 12, 2011.
 2. Kato, T., Enomoto, A., Weng, L., Asai, M., Murakumo, Y., Takahashi, M. Cell-cell contact dependent regulatory role of RFP in integrin beta1 expression. The American Society of Cell Biology,

- 2011 Annual Meeting, Denver, Dec 13, 2011.
3. Kuroda, K., Mori, D., Namba, T., Tsuboi, D., Yano, H., Ibi, D., Tanaka, M., Isotani, M., Enomoto, A., Yamada, K., Sokabe, M., Takahashi, M., Kaibuchi, K. Analysis of DISC1 using knockout mice and new antibodies. Neuroscience 2010, SfN's 40th annual meeting, San Diego, Nov 15, 2010.
 4. Takagishi, M., Enomoto, A., Kikuchi, A., Takahashi, M. The Dvl-associating protein Daple regulates the activation of Rac and the remodeling of actin cytoskeleton. The American Society of Cell Biology, 49th Annual Meeting, San Diego, Dec 7, 2009.
 5. Enomoto, A. Roles of Disrupted-In-Schizophrenia 1-interacting protein Girdin in postnatal development of the dentate gyrus. Global COE Program, the second international symposium, Nagoya, Nov 26, 2009.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

プレスリリース

(1) 「「海馬」形成の遺伝子特定」、中日新聞、2009年9月24日

(2) 「記憶つかさどる「海馬」形成遺伝子発見」、朝日新聞、2009年9月24日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 篤 (ENOMOTO ATSUSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号 : 20432255

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし