

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791036

研究課題名(和文)ニューラルネットワーク形成障害を導く環境要因と候補遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Elucidated of environmental and genetic effects on the neural network disorders.

研究代表者

松本 由樹 (MATSUMOTO YOSHIKI)

香川大学・農学部・助教

研究者番号：90335844

研究成果の概要(和文)：ニューラルネットワーク形成における遺伝的要因と環境要因による影響について解析した。成体ラット由来海馬細胞を用いた分化誘導は、神経伸長とその受容体機能の相関を解明し、幹細胞性保持への作用も明らかにできた。一方、成体ラット脳で受傷したニューロンでは、シナプス膜形態を大きく変化させ、神経細胞軸索内に留まる分子とその挙動に新たな可能性を見出した。特に、迷走神経への蛍光標識注入は、成体を用いた神経終末の物質移動の可視化に繋がり、神経終末における新たな膜構造変化(Autocrine-like, Diacrine-like 構造)の同定に貢献した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated the effects of environmental and genetic cues for the neural network formations. First, to clarify the response of environmental stress were analyzed using neuronal progenitor cells. Those effects and related signal transcription on neuro-progenitor cells were clearly promoted rescue on cell cycle and neuronal stretched shapes. It may have been involving survival response in neuro progenitor cell that was expressing the receptor of neuronal growth factors and that shown responsible for several environment cues. Interestingly, neuronal injured adult rat brain indicated similar morphological alteration that has promoted the autocrine-like and diacrine-like formation at pre- and post- synaptic membrane during a non-excitabile condition.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：神経科学、細胞生物学、先天異常学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：ニューラルネットワーク、アルコール曝露動物、幹細胞性の保持、神経変性疾患、環境要因、迷走神経

1. 研究開始当初の背景

申請者は従来、「下垂体分化誘導遺伝子に対するアルコール作用点の決定」文部科学省補助金(課題番号14770572)の助成を受け、異な

るマウス系統(遺伝的要因)とアルコール曝露(環境要因)の影響解析に従事してきた。アルコールに対して抵抗性を有した遺伝的背景には、細胞膜表面レベルにおけるアルコール

作用として血管新生過程に関わる血小板由来成長因子受容体(PDGFR)発現量の変化として報告され(Luo J et al.1997,1999)、グリア由来細胞と神経由来細胞でアルコール曝露量の違いと異なる反応性について報告された。培養条件下におけるアルコール曝露の影響は、濃度依存的にグリア由来細胞でPDGFR- α 発現に作用し、神経由来細胞ではPDGFR- β 発現に作用する事から、生体内グリア細胞と神経細胞に及ぼす影響の評価法確立に貢献できると考えた。そこで、グリア細胞や神経細胞への環境要因(アルコール曝露等)と遺伝要因(神経成長因子やその受容体発現)の相関解析を通し、細胞内シグナルの混乱とニューラルネットワークに機能的障害の作用機序を解明できると考えた。

2. 研究の目的

これまでの研究成果は、以下の(1)～(3)に整理し、研究の着想と方向性を記す。

(1) 神経分化における PDGFR 発現

神経幹細胞性の保持に関わる細胞内シグナルの変動は、PDGFR プロモーターとエンハンサーの解析を通し、ニューロblastoma細胞におけるGATA-2, Ets-1 転写因子の相乗的な作用として評価し、細胞死を回避した神経細胞において軸索伸長が促進されると考えた(Kaneko M, Matsumoto Y et al, 2006)。これらの結果を元に、生体組織において神経回路網の形成は、機能的分化時期もしくは、機能的確立前に、細胞内シグナルが形態変化を誘導する可能性を考えた。

(2) 関連遺伝子発現と転写制御

神経幹細胞性の保持と受容体型チロシンキナーゼの機能抑制を考えた場合には、神経細胞の恒常性維持機能が破綻し細胞死を回避できなくなると考えられ、PDGFR プロモーターの上流領域における p53 や p73 による遺伝子発現調節について解析した。その結果、少なくとも、p53 は PDGFR プロモーター上流領域に結合し、発現抑制にかかわることが明らかとなった。これらのことから、アルコール曝露の影響は細胞内に局在する GATA, Ets, p53, p73 などの転写因子の化学的修飾を促進し、修飾された転写因子が受容体遺伝子上流に直接作用を及ぼし、発現調節が混乱すると考える。虚血による細胞死とアルコール曝露が同様の細胞死メカニズムを誘導するかは不明であるが、PDGFR を含む受容体型チロシンキナーゼ活性の細胞死保護や神経細胞死の回避の発現パターンや、発達障害の発症機序とアルコール曝露の作用点解は重要な研究テーマになりうると考えた(Yang et al. 2008, Muna et al. 2007)。

(3) 受傷部位と受容体発現の相関解析

PDGFR などの受容体型チロシンキナーゼによる機能は、脳由来成長因子(BDNF)などのニューロトロフィンにより相乗的効果を受けることが知られているが、アルコールに曝露された脳において両者の相関を示し、臨床応用できる情報を提供できるほどの実験系が確立していない。

3. 研究の方法

(1) モデル動物を用いた解析

ラットの脳発達が生後においても進行に着眼した本研究は、妊娠ヒト胎児の脳発達に照らし合わせた解析ができ、応用研究として各種発達障害モデル動物の作成や、脳発達障害発症メカニズムに関する遺伝情報を得ることができる。本研究で用いる出生後ラット脳の発達は、ラット脳発達トリメスターとし、出生 0 日齢(PND 0, Postnatal day0)から 15 日齢(PND 15)前後を 3 期に区分し、さらに離乳(PND 21)までの期間を加え 1)PND0-4, 2)PND 5-9, 3)PND 10-15, 4)PND 16-21 の 4 期に区分することができ、脳発達障害の分子基盤を詳細に解析し、生後早期の養育環境の重要性を転写因子や受容体発現レベルで評価を行った。

(2) 神経変性を守る受容体型チロシンキナーゼの同定

大脳組織において、カルシウム結合タンパク質のひとつであるカルビンディン陽性細胞は、神経変性に対する強い抵抗性を保持していると報告されている。また、BDNF 受容体として知られる Trk B 発現細胞は、未分化細胞性を有すると考えられている。発達障害を明確に表現するために小脳に対するアルコール曝露は、Trk B 発現には大きな影響を及ぼさず、カルビンディン陽性細胞が脱落する神経変性をもたらした。アルコール曝露によるブルキンエ細胞欠落を組織レベルで証明し、成体における脳や下垂体の形態異常を定義する。

(3) シナプス小胞の機能的抑制とニューラルネットワーク形成

PDGFR 受容体機能は、シナプス膜に集合シリンヒビターとして知られる Imatinib (STI157)に曝露された神経幹細胞は、神経分化が阻害され、シナプスの機能的抑制が生じていると考えた。そこで、次の実験を立案し、解析を行った。アミロイド原生タンパクを沈着する神経細胞体では、Rab3A 発現が特異的に減少する予備実験成果が得られた事から、ニューラルネットワーク形成における軸索輸送やシナプス小胞のドッキングに重要な Rab3A の機能的役割が存在する事を明らかにした。Rab3A 発現を直接的に抑制できる特異

的配列 (siRNA) を迷走神経に注入し、その形態的变化について解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞間タンパク輸送による神経機能

神経機能は神経回路網のシナプス伝達により形成されることは良く知られている。一方、最も初期の時点では神経機能はまだ働いておらず、単純な細胞同士の接合と考えられる。この時期にはシナプス小胞はみられず、当然シナプス伝達理論も成立しないと考えられる。興奮性神経伝達による神経機能が働くようになって初めて小胞性シナプス伝達は成立するものであり、それまではタンパク輸送が主体であると考えられる。このことは、タンパク輸送が神経細胞の成長、修復および機能維持に重要な役割を果たしていることを示唆し、小胞性シナプス輸送とは独立した機能であるとの考えに至った。このような考えは従来少なからずみられたが、その証明は短時間の現象を捉えねばならず、非常に困難なものであるため、タンパクの細胞間輸送に関する研究分野は未だ端緒の域にある。

(2) 神経機能障害に対する細胞間タンパク輸送

神経細胞に沈着し機能障害を発症させる特殊有害タンパクであるアミロイド β ($A\beta$) に関して、上記で証明された細胞間タンパク輸送の理論を適用して、アルツハイマー病の疾患に対する研究対策をたてられるのではないかという発想により、以下の実験を行い非常に興味ある結果を得ている。この研究においては HRP (40-kDa) と強い結合能を有する糖結合型タンパクである WGA (22-kDa) が重要な役割を担っている。WGA は細胞膜にそのレセプターが豊富に存在するため、以前から神経トレーサーとして使用されていたものである。一方、今回研究対象としている $A\beta$ は約 5-kDa の分子量であり、HRP より遥かに小さいタンパクであるため輸送の点から言えば HRP より容易になされると考えられる。本申請では分子生物学的特徴を有した WGA と $A\beta$ の輸送メカニズム解明にも繋がる。

①WGA 結合 $A\beta$ の形成に関しては、蛍光 WGA と蛍光 $A\beta$ を同時に迷走神経に注入すると、神経節細胞の細胞体、軸索、および神経終末がある孤束核領域で WGA 結合 $A\beta$ を確認できた。

②蛍光 WGA を一側の総頸動脈に、蛍光 $A\beta$ を迷走神経に注入した場合、同様、WGA 結合 $A\beta$ の存在が認められた。

③WGA と Rab3A-siRNA を迷走神経に同時注入した場合、WGA の軸索輸送は遅延した。

この *in vivo* における実験結果は、同時注入のみならず血管からの取り込みも含めて WGA が $A\beta$ と特異的に結合することを証明す

るものであって、この結合タンパクは軸索輸送をへて神経終末まで輸送されることを示している。また、この輸送は Rab3A タンパク発現が抑制されると障害を受けることも明らかになった。国・内外の研究では WGA は、アルツハイマー病の原因物質として神経細胞内に沈着している $A\beta$ と結合し、その分解に働いているとの報告がある。この点において、本研究ではさらに進めて軸索輸送の存在と神経終末での細胞間輸送の示唆を行っている。アルツハイマー病は難治性神経疾患であり治療法の確立は非常に困難とされている。その一方で、隣接する神経細胞間の膜が周囲の環境適応する際において、タンパク輸送を利用している存という新しい理論的根拠に基づいた考察を加えた場合、従来にない全く新しい観点からアルツハイマー病に対する治療戦略を確立できると考えられ、大変興味深い。

(3) 核内受容体機能の解析

ニワトリからクローニングされた TLX 遺伝子は、ビタミン A に代表されるレチノイン酸やビタミン D などにより発現制御され、オーファンレセプターに分類されている。これまでの報告では、TLX を欠損したマウスの情動行動は正常機能から逸脱し、攻撃的な行動を呈することから、神経系で作用する核内受容体は、神経系の分化や幹細胞性の保持に関わるとされ、神経細胞の機能保持に重要である可能性が示唆されていた。本研究では、グリア細胞や神経幹細胞を用いて、ウイルスベクターに組み込んだ TLX を強制発現した結果、初期の神経分化において、神経伸長を誘導するメカニズムの同定に繋がった (Elmi M*, Matsumoto Y*, MCN 2011)。この結果は、ニューロblastoma細胞への PDGFR 遺伝子のトランスフェクトが神経伸長を促す結果と同様であった (Kaneko M, Matsumoto Y et al, ECR 2006)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

①Jun-Qian Liu, Takanori Miki, Katsuhiko Warita, Ken-ichi Ohta, Tomiko Yakura, Yoshiki Matsumoto, Yoshiki Takeuchi Reevaluation of neuronal contacts with pituicytes in the rat posterior pituitary *Current Neurobiology* 2, 1-4, 2011 (査読有)

②Chavali PL, Saini RK, Matsumoto Y, Agren H, Funa K., Nuclear Orphan Receptor TLX Induces Oct-3/4 for the Survival and Maintenance of Adult Hippocampal Progenitors upon Hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9393-404, 2011 (査読有).

③ Matsumoto Y

Modulation of the hypothalamopituitary axis in Mini rat: Further studies with hypophysiotropic somatostatin and gonadotroph cells. *Current Neurobiology* 1, 103-108 (2010) (査読有)

④ Elmi M*, Matsumoto Y*, Zeng ZJ, Chavali PL, Yang W, Uemura A, Nishikawa S, Moshiri A, Tajima N, Agren H, Funa K.

*Sharing first authorship.

TLX activates MASH1 for induction of neuronal lineage commitment of adult hippocampal neuroprogenitors. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 45, 121-131 (2010) (査読有)

⑤ Wang ZY, Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Kusaka T, Sumitani K, Warita K, Matsumoto Y, Yakura T, Hosomi N, Ameno K, Bedi KS, Takeuchi Y. Short-term exposure to ethanol causes a differential response between nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor ligand/receptor systems in the mouse cerebellum. *Neuroscience* 165, 485-491 (2010) (査読有)

⑥ Miki T, Kuma H, Yokoyama T, Sumitani K, Matsumoto Y, Kusaka T, Warita K, Wang ZY, Hosomi N, Imagawa T, S Bedi K, Itoh S, Nakamura Y, Takeuchi Y.

Early postnatal ethanol exposure induces fluctuation in the expression of BDNF mRNA in the developing rat hippocampus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68, 484-93 (2010) (査読有)

⑦ Ueno T, Miki T, Wang ZY, Yokoyama T, Lee KY, Kusaka T, Warita K, Sumitani K, Matsumoto Y, Yakura T, Liu JQ, Bedi KS, Takeuchi Y. Effects of short-term ethanol ingestion on the expression of neurotrophins and their receptors: No changes in the expression of the glial-derived neurotrophic factor in the mouse hippocampus. *Current Neurobiology* 1, 40-45 (2010) (査読有)

⑧ Fusumada K, Yokoyama T, Miki T, Matsumoto Y, Warita K, Wang ZY, Yakura T, Liu JQ, Takeuchi Y. GABA expression in c-Fos immunoreactive neurons of the rat periaqueductal gray induced by electroacupuncture at the point of Zusanli. *Current Neurobiology* 1, 10-13 (2010) (査読有)

⑨ Wang ZY, Ding Y, Miki T, Warita K, Matsumoto Y, Takeuchi Y, Wang SJ, Feng JG, Liu W, Wang YD, Wang XL, Wang YH, Liu Y, Shan BE. Nerve growth factor and receptors are significantly affected by histamine stimulus through H1 receptor in pancreatic carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports* 3, 103-109 (2010) (査読有)

⑩ Takeuchi Y, Matsumoto Y, Miki T, Yokoyama T, Warita K, Wang ZY, Ueno T, Yakura T, Fujita M., Anterograde synaptic transport of neuronal tracer enzyme (WGA-HRP): Further studies with Rab3A-siRNA in rats., *Biomedical Research*, 20, 149-15 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

① Takeuchi Y, Miki T, Warita K, Ohta K, Yakura T, Liu JQ, Matsumoto Y, Synaptic transcytosis of HRP-labeled marker proteins. The Japanese Society of Microscopy 2011.05.16 ~ 18 (Invited speaker) 福岡市・福岡国際会議場

② Matsumoto Y, Takeuchi Y, Yamauchi KE. Morphometric aspects of villous membrane structure in animal science. The Japanese Society of Microscopy 2011.05.16 ~ 18 (Invited speaker) 福岡市・福岡国際会議場

③ 松本由樹、山内高圓
体温調節能確立直後における寒冷刺激もたらす消化吸収機能への影響
日本家禽学会 2011 年度春季学会(震災特例として誌上発表)

④ Matsumoto Y, Liu JQ, Miki T, Warita K, Ohta K, Yakura T, Takeuchi Y. Neuronal transcytosis of WGA-amyloid beta complex in the rat. The 166th Annual meeting of the Japanese Association of Anatomists 2011.03 (震災特例として誌上発表)

⑤ Matsumoto Y, Miki T, Warita K, Yakura T, Liu JQ, Takeuchi Y., An approach for decrease of β -amyloid deposits in neuron. 第 50 回日本先天異常学会学術集会 2010.07.08~10 淡路市・淡路夢舞台国際会議場

⑥ Matsumoto Y, Miki T, Warita K, Takeuchi Y, Neuronal transcytosis of protein: application for Amyloid- β in vivo, 日本神経科学会 2010, 09.02~04 神戸市・国際会議場

⑦Takeuchi Y, Matsumoto Y, Miki T, Warita K, Liu JQ. A protein conjugation of WGA essential for transsynaptic tracer in neuronal system: application for Amyloid- β in vivo. The International Symposium on Early Detection and Rehabilitation Technology of Dementia, 2009. 12. 11~12 岡山市・岡山大学

⑧Matsumoto Y, Miki T, Tukamoto Y, Warita K, Wang ZY, Yakura T, Ågren N, Karasawa S, Ueda S, Takeuchi Y., Modulation of the hypothalamopituitary axis in Mini rat: Further studies with hypophysiotropic somatostatin and gonadotroph cells. 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones, 北九州市・国際会議場 2009. 09. 04~08

[図書] (計1件)

①Takeuchi Y, Matsumoto Y, Miki T, Warita K, Liu JQ. Early Detection and Rehabilitation Technologies for Dementia: Neuroscience and Biomedical Applications, Chapter 21 th, Neuronal transcytosis of WGA conjugated protein: a new approach to Amyloid- β in vivo, IGI-global press, 162-166, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本由樹 (MATSUMOTO YOSHIKI)
香川大学・農学部・助教
研究者番号：90335844