

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22390035

研究課題名（和文）

神経損傷誘導性プロテアーゼ“ダイン”による新たな神経終末形成メカニズムの解析

研究課題名（英文）An involvement of damage induced neuronal endopeptidase DINE in construction of neuro-muscular junction.

研究代表者

木山 博資 (KIYAMA HIROSHI)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00192021

研究成果の概要（和文）：

これまでの研究で神経損傷に鋭敏に発現応答し神経細胞特異的に発現する Damage induced neuronal endopeptidase (DINE)を同定した。DINEのノックアウトマウス(KO)は、生直後に呼吸不全で死に至った。この原因として横隔膜の神経筋接合部の形成が著しく減少していることが明らかになった。KOでは、神経軸索とシュワン細胞(SC)との接着性が低下したこと、また DINE KOの後根神経節細胞と SCとの共培養では、野生型 SCの分化が正常に起きないことが明らかになった。軸索終末と SC間の DINEを介したインターアクションが SCの分化に影響し、神経筋接合部形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We have identified nerve injury induced neuronal endopeptidase (DINE) using peripheral nerve injury model. DINE is induced in both CNS and PNS neuronal cells in response to nerve injury. To reveal a function of this peptidase, we have made DINE knockout mice. These mice were lethal immediately after birth due to respiration problem. We identified that DINE-deficient mice exhibited the poor innervation of final branching of nerve and only a few neuromuscular junctions (NMJ), suggesting that DINE is a crucial molecule in distal axon arborization into muscle to establish NMJ. To reveal mechanisms underlying the phenotypes, we co-cultured DINE-deficient neurons and Schwann cells, and found that DINE-deficiency affected on axon-Schwann interaction and Schwann maturation. These data suggests that DINE is implicated in maturation of Schwann cells as well as proper construction of NMJ.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 5,700,000 | 1,710,000 | 7,410,000 |
| 2011年度 | 4,300,000 | 1,290,000 | 5,590,000 |
| 2012年度 | 4,300,000 | 1,290,000 | 5,590,000 |
| 総計 | 14,300,000 | 4,290,000 | 18,590,000 |

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：脳・神経、プロテアーゼ、神経筋接合部、末梢神経

1. 研究開始当初の背景

| 私たちは神経再生の分子メカニズムを解明

するため、神経損傷後の運動神経核組織を用いて、各種の網羅的解析を行ってきた。その過程で、神経特異的かつ軸索損傷応答的に発現する膜型メタロプロテアーゼ Damage Induced Neuronal Endopeptidase (DINE) を新規に同定した (PNAS 2000)。DINE の発現応答は中枢・末梢神経にかかわらず、神経損傷にきわめて鋭敏に応答することから、その発現制御の分子メカニズムは神経再生研究を推進するうえで大変興味深い (J Neurosci 2003)。DINE プロモーター解析を行ったところ、DINE のプロモーターの主要な制御メカニズムとして ATF3 と cJun がヘテロダイマーを構築し、それに STAT3 が加わることで相乗的な強い誘導がかかることが明らかになった。さらに、転写因子の Sp1 をプラットフォームとして、それに ATF3, cJun, STAT3 の3つの転写因子が結合し、大きな複合体を形成していることも明らかになった (JBC 2008)。また、このような複合体は DINE だけでなく、他の神経損傷関連分子の発現にも機能していることが明らかになった。例えば、軸索損傷後に発生する酸化ストレスに対して、活性酸素を消去し神経保護に作用するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の遺伝子も同様の発現制御を受けていることが明らかになった。DINE の転写制御の研究から、神経再生を起動する転写因子複合体のはじめの発見につながった。一方、DINE のプロテアーゼとしての基質や、発生や神経再生における DINE の機能解明に関しては、様々な試みにも関わらず本研究開始時点では不明のままであった。

2. 研究の目的

DINE の機能解析の一端として進めていた DINE ノックアウトマウスが本研究を開始する直前に完成した。残念ながら、このマウスは生直後に死に至り、神経再生研究への適用が難しい。そこで本研究では、この DINE 欠損マウスが死に至る分子メカニズムを明らかにし、神経軸索再生や発生の過程で重要な役割を演じると予想される DINE の機能解明を行い、神経軸索再生や発生の新たな分子メカニズムの確立をめざす。生後に呼吸不全で死にいたる DINE ノックアウトマウスでは、呼吸運動に必要な横隔膜に異常が認められ、神経筋接合部の形成異常も認められた。このマウスの観察から、以下のような疑問点が生じた。

(1) なぜ運動神経の最終的な分岐や神経投射がうまく行かないのか。(2) 運動神経の筋内侵入・分岐を阻害する因子は神経以外の筋あるいはシュワン細胞に存在するのか。(3) DINE ノックアウトマウスに見られる表現型には DINE のプロテアーゼとしての機能が必要か。これらの問題を解決するために、

培養系を用いて後根神経節や運動神経と、シュワン細胞や骨格筋とのインターアクションを解析し、細胞間相互作用の有無を検討する。また、DINE 欠損動物を生存させるため、横隔膜などの骨格筋のみでフェノタイプをレスキューすることをめざし、各種トランスジェニック (Tg) マウスの作成と交配を試みる。また、プロテアーゼ機能を持たない酵素活性欠損型である変異型 DINE を発現させることによりノックアウトマウスの表現型がレスキューできるかどうかを解析し、プロテアーゼ活性の必要性を実験動物レベルで検討する。

3. 研究の方法

培養実験:

胎生後期の DINE ノックアウトマウスから後根神経節あるいは脊髄前角の神経細胞を取り出し培養する。同時に野生型マウスから得られる骨格筋やシュワン細胞を共培養し、シュワン細胞や骨格筋細胞の運動動態や軸索との接着の状態をタイムラプスにより解析する。また、シュワン細胞の各種分化マーカーの遺伝子発現や髄鞘形成についても検討する。

Tg マウスの作成:

骨格筋に特異的に発現し、プレシナプスの分岐を促進すると同時に神経筋終板の形成を促進する Dok-7 トランスジェニック (Tg) 動物と掛け合わせたマウスを解析する。運動ニューロン特異的に DINE を発現させるため、Choline Acetyl Transferase (ChAT) のプロモーター下で、DINE の野生型あるいは酵素活性ドメインを欠損する変異型を発現する BAC Tg マウスを作成する。また、BAC 以外に Hb9 のプロモーターを用いたプラスミドベースの Tg マウスの作成も試みる。得られたそれぞれの Tg マウスは DINE ノックアウトマウスと交配し、その表現型を検討する。

4. 研究成果

通常野生型の後根神経節細胞とシュワン細胞を共培養すると、シュワン細胞は軸索に沿って紡錘状に接着する形態をとるものが多い。一方、DINE ノックアウトマウスの後根神経節細胞と野生型のシュワン細胞の共培養実験では、シュワン細胞が軸索に接着する時間が短く紡錘状に接着するものが少なかった。このことから、DINE 欠損によりシュワン細胞と軸索間のなんらかのインターアクションが阻害されていることが明らかになった。この傾向は脊髄前角の運動ニューロンを用いても同様であった。同様の培養系でシュワン細胞の分化マーカーの発現を検討したところ、シュワン細胞が未分化な状態を維持していることが明らかになった。DINE ノックアウト動物の脊髄神経での観察でも同様

にシュワン細胞が未分化であることが確認された。以上のことから DINE の欠損により、軸索終末とシュワン細胞との接着や分化に異常が生じ、これが神経筋接合部形成不全の原因である可能性が示唆された。

一方、Tg マウスの作成については、はじめに DINE 欠損による呼吸不全をレスキューするために Doc-7 Tg マウスとの掛け合わせ実験を行なった。DINE ノックアウトマウスと Doc-7 Tg マウスの交配では遺伝子型を有するマウスは生まれてこなかった。Doc-7 Tg マウスにより個体死は回避できなかったと考えられた。また、骨格筋に発現し神経筋接合部形成に関与することが明らかになっている分子の発現は、DINE 欠損動物で特に発現変化は見られなかった。次に DINE の野生型あるいは酵素活性のない変異型をコリナージックニューロン特異的に発現させるトランスジェニックマウスの作成を新たにめざした。アセチルコリンニューロンのマーカーである ChAT のプロモーター下で DINE の野生型あるいは酵素活性のない変異型 DINE を発現する BAC トランスジェニックベクターを構築し、受精卵に遺伝子導入を行なった。BAC Tg マウスのラインは少数得られたが、それらのマウスでの遺伝子発現は不十分であり、目的を達成できなかった。そこで、Tg マウスのプロモーターやベクターを換えて再度 Tg マウスの作成を試みた。運動ニューロンに胎生期から幼若な時期に発現する約 9kb の Hb9 のプロモーターを用いたプラスミドベースの Tg マウスの作成を試みた。その結果現在までに運動ニューロンで野生型の DINE と変異型 DINE を発現する複数のマウスが得られた。これにより、生直後の呼吸不全による個体死を回避することが可能になった。また、酵素活性の必要性を検討する上でのツールを新たに手に入れることができた。

以上、本研究により、DINE は神経軸索が骨格筋に投射し神経筋接合部を形成する時にシュワン細胞の成熟を促進し、神経筋接合部の適切な形成に機能する分子であることが示唆された。シュワン細胞の異常により、骨格筋内の軸索伸展が妨げられ、神経の分岐異常が生じている可能性が高い。今後は、DINE が何らかのペプチドを実際にプロセッシングし、それにより放出されたペプチド分子がシュワン細胞に影響を与えているのか、あるいは接着因子様にシュワン細胞上の何らかの分子と直接インターアクションすることによりシュワン細胞の分化を促進するのかを明らかにする必要がある。いずれにしろ、DINE の基質分子の解明が今後の課題として位置づけられる。また、本研究により胎生期から幼若期に DINE を運動ニューロンで特異的に発現させることができる Tg マウスが得

られた。これを用いることにより、生直後の致死性をレスキューできると考えられ、DINE の中枢での機能解明の研究において、貴重なツールを手に入れることができたと考えられる。また、酵素活性欠損 DINE の Tg マウスもライン化できつつあり、これを用いて DINE の酵素活性の必要性に関して個体レベルで結論を出す道筋が見えて来た。

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 6 件)

1. Konishi H, Matsumoto S, Namikawa K, Kiyama H, (2013) N-terminal Cleaved Pancreatitis-Associated Protein-III (PAP-III) Serves as a Scaffold for Neurites and Promotes Neurite Outgrowth, *J Biol Chem*, 288 (15):10205-10213 査読有
2. 木山博資, 損傷神経の生存と軸索再生の分子基盤, (2013) 日本精神神経薬理学会誌, Vol. 33(1): 11-16. 査読無
3. Kawahara S, Konishi H, Morino M, Ohata K, Kiyama H (2011) Pancreatitis-associated protein-I and pancreatitis associated protein-III expression in a rat model of kainic acid-induced seizure, *Neuroscience* 175:273-80 査読有
4. Matsumoto S, Konishi H, Maeda R, Kiryu-Seo S, Kiyama H (2011) Analysis on expression of the regenerating gene (Reg) family members Reg-IIIb and Reg-IIIg in the mouse during development, *J Comp Neurol* 520(3):479-494. 査読有
5. Kiryu-Seo S and Kiyama H (2011) The nuclear events guiding successful nerve regeneration, *Front. Mol. Neurosci.* 4:53. 査読有
6. Nagata K, Kiryu-Seo S, Maeda M, Yoshida K, Morita T, Kiyama H (2010) Damage-induced neuronal endopeptidase is critical for presynaptic formation of neuro-muscular junctions. *J Neurosci* 30(20):6954-6962 査読有

[学会発表] (計6件)

1. 桐生寿美子、木山博資 「損傷神経細胞の再生能力に関わる分子メカニズム」(シンポジウム)、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013年3月28日～30日 かがわ国際会議場、高松
2. S Kiryu-Seq, S Matsumoto and H Kiyama、DINE deficiency affects axon-Schwann cell interactions, leading to abnormal axon terminal arborization. Neuroscience2012 (The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society), September 18-21, 2012, Nagoya
3. Kiyama H, Nerve injury induced motor neuron death with reference to neuron-glia interaction, in Symposium of 'Neuronal Death', 26th March 第117回日本解剖学会、2012年3月26日～28日 山梨大学甲府キャンパス、甲府
4. 小西博之、松本早紀子、木山博資、PAP-III(Reg-III γ)はN末端切断により線維状構造を形成し軸索伸長の足場となる、第54回日本神経化学大会、2011年9月26日～28日、山代温泉 瑠璃光、石川
5. 木山博資、軸索再生の分子メカニズム、(シンポジウム 2、神経再生の最前線) 第26回神経組織の成長・再生・移植研究会、2011年6月25日、東京医科大学、東京
6. 松本早紀子、小西博之、前田理亜、木山博資、マウス個体発生におけるレクチン様タンパク Reg-III β と Reg-III γ の発現解析、第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国集会合同大会、2011年3月28-30日、パシフィコ横浜、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Anatomy2/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木山 博資 (KIYAMA HIROSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00192021

(2) 研究分担者

桐生寿美子 (KIRYU SUMIKO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70311529

小西 博之 (KONISHI HIROYUKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90448746

(3) 連携研究者

なし