

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年8月23日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650174

研究課題名（和文） 中枢神経系における非接触性細胞間相互認識に関する研究

研究課題名（英文） Research on indirect intercell-recognition in the central nervous system

研究代表者

佐藤 康二 (SATO KOHJI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：80235340

研究成果の概要（和文）：中枢神経系における骨形成因子シグナル系の非接触性細胞間相互認識への関与をについて検討を加え、骨形成因子シグナル分子、また、その受容体そして、阻害蛋白ともに、細胞質に加えて、樹状突起、軸索、さらには、細胞外にも豊富に発現していることを明らかとすることができた。このことは、骨形成因子シグナル系が投射ニューロンとそれを受容するニューロン間で非接触性細胞間相互認識に関与していることが考察できる。今後、実際にこの相互認識がどのような情報を伝えているかを明らかとしていきたい。

研究成果の概要（英文）：We studied whether BMP signaling pathways are involved in indirect intercell-recognition in the central nervous system. And we found that BMPs, their receptors and their antagonists were abundantly expressed in cell bodies, dendrites, axons and extracellular space. This means that BMP signaling pathways are involved in indirect intercell-recognition between projecting neurons and their receiving neurons. In future, we want to reveal which kinds of information are transmitted by this system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路網

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系における局所での回路形成やシナプス形成においてどのような細胞間シグナルが働いているかの詳細は明らかとなっていなかった。その後の解析で、我々は、我々が、発見したBMP阻害タンパクであるニューロジェネシンが胎生期ラットの知覚神経上行路において、growth associated protein (GAP-43)と同期して発現することを発見していた。

(2) GAP-43は軸索伸張時、シナプス形成時に特異的に発現する蛋白であり、ニューロジェネシンも同様の現象に関与していることが示唆された。このことは、ニューロジェネシンが知覚性上行路に特化して神経回路形成に関与することを示唆していた。また、ニューロジェネシンは、後根神経節細胞に一樣ではなく、様々なレベルで発現しており、BMPシグナリング系が各々のニューロンの体性知覚の空間配置を規定している可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) 中枢神経系の複雑な回路を形成・維持するには、細胞間の微細な非接触性相互認識メカニズムが不可欠である。我々のcloningした骨形成因子のアンタゴニストであるニューロジェネシンは、知覚性上行路に特化して発現しており、知覚神経回路の非接触性細胞間の相互認識に、骨形成因子シグナル系が関与することを強く示唆していた。

(2) 本研究では、主に、神経解剖学的・神経生理学的手法を用いて、骨形成因子シグナル系の非接触性細胞間相互認識への関与を研究する。また、我々は、骨形成因子シグナル系が、局所での合目的なシナプス形成に重要なはたらきをしているという仮説に立ってそれを証明していくことを目的としていた。

3. 研究の方法

(1) 骨形成因子(BMP)シグナリング系関連蛋白、すなわちリガンド、アンタゴニスト、受容体の詳細な発現動態を *in situ hybridization* 法、免疫組織化学法によって詳細に調べる。さらに、免疫電顕法を用いて、BMP シグナリング系関連蛋白の細胞内、細胞外の局在を詳細に検討した。また、後根神経節細胞を始めとする初代培養において、培地内に各種 BMP 蛋白や BMP アンタゴニストを加え、それらのニューロンの軸索伸展様式について検討を加えた。

(2) RCAS retrovirus system を用いて、各種 BMP 蛋白や BMP アンタゴニストの遺伝子、あるいはニューロジェネシンの dominant negative 蛋白をマウス胚の様々な神経系の回路形成領域に強制発現させ、その後の回路形成、シナプス形成について検討を加える。ニューロジェネシンノックアウトマウスを始めとした、骨形成因子シグナリング系関連蛋白遺伝子改変動物を用いての研究を行った。

4. 研究成果

(1) BMP シグナリング系関連蛋白の回路発

生に伴う発現の形態学的解析: 中枢神経系においては、感覚性上行路、運動性下行路、及び、連合線維、交連線維、モノアミン系、アセチルコリン系、あるいは投射ニューロンやインターニューロンなど、様々な回路が時間的にも、空間的にも入り乱れて発達していく。そこで、BMP シグナリング系が様々な回路形成に与える影響を調べる第一段階として、BMP シグナリング系関連蛋白、すなわちリガンド、アンタゴニスト、受容体の詳細な発現動態の解析が必須となる。BMP2-15、また、既知の BMP アンタゴニストである *noggin*, *chordin*, そしてニューロジェネシンの遺伝子、さらには受容体として *BMPRIA*, *BMPRIIB*, *BMPRI*、さらにはアクチビン受容体等の蛋白の発現の発生に伴う発現変化を、胎仔と種々の生後齢のラットにおいて、*in situ hybridization* 法、免疫組織化学法によって詳細に調べた。さらに、様々な回路に特異的なマーカーを用いて、各々の神経回路形成における BMP シグナリング系関連蛋白の時間的・空間的関与についての情報を得た。

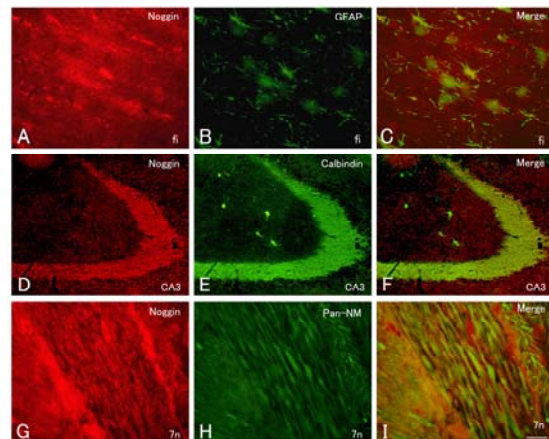


図 Noggin のアストロサイト、海馬苔状線維、顔面神経における発現

(2) 免疫電顕法を用いて、BMP シグナリング系関連蛋白のうち分泌蛋白であるリガンド、アンタゴニストについて細胞内、細胞外の局在を詳細に検討した。これまでの、我々の研究で、BMP2, BMP4, ニューロジェネシン、*noggin* 等の蛋白が、dendrite や axon から分泌され、シナプス間隙に豊富に発現している所見が得られていた。さらに、大脳皮質第五

層の錐体細胞の apical dendrite で、BMPRIA, BMPRIB の二つの受容体蛋白が多様性を持って存在することが観察されており、このことは、BMP シグナリング系の違いにより apical dendrite に接着するプレシナプスが規定され得る可能性を示唆している。そこで、プレシナプスのマーカーと、ポストシナプスのマーカーを組み合わせることにより、どのシナプスの近傍に、どの BMP シグナリング系が働いているかの情報を得ることができ、シナプス形成に於ける BMP シグナリング系の関与を明らかとした。

(3) RCAS retrovirus system を用いて、各種 BMP 蛋白や BMP アンタゴニストの遺伝子、あるいはニューロジェネシンの dominant negative 蛋白をマウス胚の様々な神経系の回路形成領域に強制発現させ、その後の回路形成、シナプス形成について免疫組織化学法、免疫電顕法などを用いて検討を加えた。さらに、知覚性上行路においては、後根神経節に存在する一次知覚ニューロンが、二次ニューロンとの回路形成において、骨形成因子シグナリング系関連蛋白がその投射先である上位ニューロンを規定する可能性を調べるために、tracer 法を用いて、targeting の乱れについて検討した。さらには、モノアミン系を始め様々な神経回路について、同様の実験を行った。

(4) 各種遺伝子改変動物に対する検討：各種遺伝子改変動物の神経系を中心にそのマクロな表現系を解析した。更に、免疫組織化学法、免疫電顕法を用いて、神経系の微細構造の変化について観察した。更には、逆行性、あるいは順行性 tracer を用いて、様々な神経回路の targeting の異常について詳細に検討した。更に、各種遺伝子改変動物について、知覚や運動、行動の異常の有無を検討した。また、ノックアウトマウスから、各種ニューロンの初代培養やスライス培養を調整し、BMP シグナル関連蛋白を培地に加えたときの軸索伸張の様子を、ワイルドタイプマウスと比較した。

(5) 以上の検討から、BMP シグナリング系

関連蛋白が多様性を持って非接触性細胞間の相互認識に関与していることが明らかとなった。

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 9 件)

(1) Kohji. Sato. Disruption of spine homeostasis causes depression. Med Hypotheses. 査読有、pii: S0306-9877(13)00144-8, 2013. DOI : 10.1016/j.mehy.2013.03.025.

(2) H. Tanaka, N. Zaima, T. Sasaki, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, K. Onoue, K. Ikegami, Y. Morita, N. Yamamoto, Y. Mano, M. Sano, T. Saito, Kohji. Sato, H. Konno, M. Setou, N. Unno. Adventitial vasa vasorum arteriosclerosis in abdominal aortic aneurysm. PLSO ONE. 査読有、Vol.8, No.2, 2013, e57398. DOI : 10.1371/journal.pone.0057398.

(3) T. Sasaki, K. Nakamura, K. Sasada, S. Okada, XW. Cheng, T. Suzuki, T. Murohara, Kohji. Sato, M. Kuzuya. Matrix Metalloproteinase-2 Deficiency Impairs Aortic Atherosclerotic Calcification in ApoE-Deficient Mice. Atherosclerosis. 査読有、Vol. 227, No.1, 2013, pp.43-50. DOI : 10.1016/j.atherosclerosis.2012.12.008.

(4) Kohji Sato. Placenta-derived hypo-serotonin situations in the developing forebrain cause autism. Medical Hypotheses. 査読有、Vol.80, No.4, 2013, pp.368-372. DOI : 10.1016/j.mehy.2013.01.002.

(5) B. Wei, T. Kumada, T. Furukawa, K. Inoue, M. Watanabe, Kohji Sato, A. Fukuda. Pre- and post-synaptic switches of GABA actions associated with Cl⁻ homeostatic changes are induced in the spinal nucleus of the trigeminal nerve in a rat model of trigeminal neuropathic pain. Neurosci. 査読有、Vol.228, 2012, pp.334-348. DOI : 10.1016/j.neuroscience.2012.10.043.

(6) S. Yamagishi, S. Mikawa, H. Furukawa, T. Sasaki, T. Ito, T. Ueki, Kohji Sato. Spine homeostasis as a novel therapeutic target for schizophrenia. Journal of Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics. 査読有、2012, S1-001.

(7) Kohji Sato. Disruption of spine homeostasis causes dopaminergic compensatory up-regulation,

resulting in schizophrenia. Medical Hypotheses. 査読有、Vol.79, No.3, 2012, pp.304-307.
DOI : 10.1016/j.mehy.2012.05.015.

(8) K. Miyazaki, K. Ohno, N. Tamura, T. Sasaki, Kohji Sato. CLP36 and RIL recruit alpha-actinin-1 to stress fibers and differentially regulate stress fiber dynamics in F2408 fibroblasts. Experimental Cell Research. 査読有、Vol.318, No.14, 2012, pp.1716-1725.
DOI : 10.1016/j.yexcr.2012.05.006.

(9) M. Miyagi, S. Mikawa, T. Sato, T. Hasegawa, S. Kobayashi, Y. Matsuyama, Kohji Sato. BMP2, BMP4, noggin, BMPRIA, BMPRIB, and BMPRII are differentially expressed in the adult rat spinal cord. Neuroscience. 査読有、Vol.203, 2012, pp.12-26.
DOI : 10.1016/j.neuroscience.2011.12.022.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 康二 (SATO KOHJI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 80235340

(2) 研究分担者

三河 須美子 (MIKAWA SUMIKO)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 70359743