

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590236

研究課題名(和文) 神経回路形成におけるセマフォリンの機能

研究課題名(英文) The function of semaphorin in the formation of neural network.

研究代表者

谷口 雅彦 (TANIGUCHI, MASAHIKO)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70260346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：複雑な脳神経系において脳が脳として機能するためには神経回路形成が正確に行われることが必須である。この形成過程には軸索ガイダンス分子が関与しており、セマフォリンはその中でも1番多い分子である。今回の研究では神経回路形成におけるセマフォリンの機能解析を行った。新規のセマフォリンを同定し、これらのセマフォリンは反発性の軸索ガイダンス分子として機能している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：During embryogenesis, axons reach their specific targets correctly to form the complex neural network found in the mature functional nervous system. Several groups of axon guidance molecules such as semaphorins, ephrins, netrins, and Slits have been reported to repel or attract growing axons that express their cognate receptors. Herein, I report the cloning and characterization of novel semaphorin genes. These semaphorin genes might repel axons of the specific types during development.

研究分野：神経科学

キーワード：神経発生 軸索ガイダンス 脳神経 ノックアウトマウス 高次脳機能

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳は数百億～一千億個の細胞より形成されていると言われている。このような複雑な脳神経系において機能的な神経回路が形成されるためには、標的細胞への神経軸索の正確な投射が必須である。この正確な軸索投射を制御する分子として軸索ガイダンス分子が存在し、誘引分子と反発分子がある。軸索ガイダンス分子としては、スリット、エフリン、ネトリン、セマフォリン等が報告されている。現在までに軸索ガイダンス分子は多数同定されてきたが、これらの分子がどのように神経回路形成過程を制御しているかという分子メカニズムはまだあまり研究が進んでいない。私は主として反発性軸索ガイダンス分子として機能するセマフォリンに注目して研究を進めている。

(2) セマフォリンは神経系だけでなく、血管形成、免疫系、癌発生、肺形成、骨形成などにも関与していることが明らかにされているので、セマフォリンを研究している研究者は国内外問わず(特に国外)多数いる。研究対象動物(センチュウ、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウス、サルなど)、研究内容、研究方法はセマフォリンの様々な機能から多様であるが、私のようにノックアウトマウスを作成して生体内での神経回路形成過程におけるセマフォリンの機能を形態学的に解析している研究者は少数である。神経系における研究に関しては最近セマフォリンのシグナル伝達を解析している研究者の数が多く、研究が進んでいるように思われる。また、神経培養系や細胞株を用いた解析も進んでいる。しかし、医学・生物学分野において重要なのは、その遺伝子の生体内での生物学的機能の解析だと考える。このためにはノックアウトマウスの形態学的解析は重要である。

2. 研究の目的

(1) 私は軸索ガイダンス分子のセマフォリンに注目して研究を進めている。本研究の最大の目的は、生体内における神経回路形成及び高次脳機能における分子メカニズムを様々なセマフォリンを指標にして解明することである。さらに、中枢神経系の再生医療においても軸索ガイダンス分子の研究は重要である。脊髄損傷後の領域においてセマフォリンなどの反発性軸索ガイダンス分子の発現が上昇するという報告がある。中枢神経系の神経再生の分子メカニズムとしては、NogoやMAGなどのミエリン由来の神経再生阻害因子が良く研究されているが、軸索ガイダンス分子の観点から研究している人はほとんどいない。私は今までに共同研究によりセマフォリンの1つであるセマフォリン3A(Sema3A)が脊髄損傷後の神経再生過程において機能していることを明らかにした。脊髄損傷後の神経再生過程におけるセマフォリ

ンの詳細な機能解析も本研究の目的の1つである。

(2) セマフォリンは現在までに約30種類報告されていて、ウイルスからヒトに至るまで存在して分泌型と細胞膜結合型に分けられる。構造により7つのクラスとウイルスに分けられ、脊椎動物のセマフォリンはクラス3～7である。セマフォリンは神経発生以外でも、肺形成、骨形成、血管形成、免疫系、癌発生などに関与していることが報告されている。Sema3Aは現在までに軸索の反発性軸索ガイド分子であることが解明されている分子である。私がノックアウトマウスを作成するまでは神経回路形成における機能はほとんど分かっていなかった。Sema3Aノックアウトマウスの解析において、初期発生中の末梢神経系の神経回路形成に異常が認められることを解明した。Sema3Aの機能的なレセプターがニューロピリン-1であることを共同研究により明らかにした。Sema3Aとニューロピリン-1により、末梢神経系の初期発生において軸索投射が正確に起こるという分子メカニズムを世界で初めて解明した。また、Sema3Aの発現は成体の嗅球や小脳のプルキンエ細胞層を含む中枢神経系においても特異的に認められる。嗅覚系の神経回路形成に軸索ガイダンス分子が関与している報告はほとんどなかった。嗅覚系において嗅球の糸球体の空間配置は嗅球における嗅覚系感覚地図、いわゆる「匂い地図」を形成する。正確な匂い地図形成の分子メカニズムはほとんど分かっていなかったが、Sema3Aが匂い地図形成に必須であることを明らかにした。

(3) 最近、マウスにおいて2種類の新規セマフォリン分子(Sema3GとSema6D)のクローニングに成功した。発現解析を行った結果、Sema6Dは脳に特異的に発現が認められた。Sema3Gは成体脳において小脳の顆粒細胞層だけに発現していて、生後発現してくることにより、顆粒細胞の移動に関与している可能性が高い。これらのセマフォリンは神経軸索に対して反発活性があることをすでに明らかにしている。これら新規セマフォリンの生体内における機能解析が本研究課題における最大の目的である。生体内での機能解析のためにノックアウトマウスを作成して、生体内での機能解析を行う計画である。発現様式等よりこれらの新規セマフォリンは今までにクローニングされたセマフォリンよりも興味深く、解析により新しい機能の情報が得られると考えられる。

(4) さらに、モデル動物としてマウスだけでなく、ゼブラフィッシュにも注目をしている。ゼブラフィッシュは初期発生中の回路形成解析には非常に有益である。現在までに、ゼブラフィッシュの新規セマフォリンを3種類クローニングすることに成功した

(Sema6D, Sema6E, Sema6F)。Sema6E と Sema6F はゼブラフィッシュ特異的なセマフォリンである。これらは発現解析により、神経系特異的に発現していることが明らかとなった。今後は、Morpholino oligo を用いたノックダウン法により生体内での機能を解析する計画である。実際に生体内でどのように機能しているか、ということに特に注目している。

(5) 私は基礎研究だけでなく、臨床系の研究室との共同研究によりセマフォリンの機能解析を行い、論文発表を行ってきた。脊髄損傷後の部位に Sema3A の阻害剤を投与すると神経再生が促進し、運動機能も回復することを明らかにした。心臓への交感神経の投射において Sema3A が必須であること、Sema3A が正常に働かないと不整脈様症状を示すことを解明した。このように臨床応用を考えた研究も進めている。

本研究課題により、神経回路形成及び高次脳機能におけるセマフォリンの機能が明らかとなり、神経疾患や中枢神経系の再生医療に役立つことも期待している。

3. 研究の方法

研究目的を達成するために、新規セマフォリンのノックアウトマウスの作成及び解析、ゼブラフィッシュを用いた解析においてはノックダウン法を使用した解析を行い、生体内での機能解析を行うことを主に計画している。さらに、脊髄損傷後の再生過程におけるセマフォリンの解析も行う。

(1) 新規セマフォリンのクローニングを試みた結果、マウスにおいて2種類の新規セマフォリン(Sema3G と Sema6D)のクローニングに成功した。Sema6D は胎児発生中も同様だが、成体のマウス脳においてかなり高い発現が認められる。Sema3G は成体脳においては小脳の顆粒細胞層だけに発現が認められるという非常に興味深い発現様式をしている。Sema3G と Sema6D は神経軸索に対する反発活性を持っていることも明らかにした。さらに詳細な発現解析のために、*in situ* hybridization やポリクローナル抗体作製の準備を進めている。一番重要な解析である生体内での機能解析を行うために、ノックアウトマウスを作成する。また、Sema3G に関しては発現様式から小脳の顆粒細胞の移動に関与している可能性が高いので、小脳顆粒細胞層の培養により、*in vitro* での Sema3G の小脳顆粒細胞移動における機能解析も行う計画である。さらに、これらセマフォリンのレセプターの同定を試みる。今までの報告などから、ニューロピリンかプレキシンだと考えている。ニューロピリンでもプレキシンでもなければ、発現クローニング法によりレセプターを同定する。

(2) ゼブラフィッシュセマフォリンの

Sema6D, Sema6E, Sema6F に関してはクローニングが終わったところである。ゼブラフィッシュを用いる利点は、卵が透明で観察しやすい、多産、成長が早い、Morpholino oligo で生体内での機能解析ができるなどがある。現在予備的であるが発現解析を *in situ* hybridization 法で進めていて、神経系特異的な発現をしているという結果を得ている。今後各発生時期における詳細な発現解析を行う。また、神経培養系を用いた反発活性の解析、生体内での機能解析のための Morpholino oligo の準備を進めている。生体内での神経回路形成解析には、神経系で GFP を発現しているトランスジェニックゼブラフィッシュや抗チューブリン抗体による全胚免疫染色法を使用する。特に Sema6E と Sema6F はマウスやヒトに存在しないゼブラフィッシュ特異的なセマフォリンなので、その結果に注目している。

ゼブラフィッシュセマフォリンのレセプターの同定も試みる。クラス6のセマフォリンレセプターとしてはプレキシンが知られているので、プレキシンが第1の候補だと考えられる。そこで、ゼブラフィッシュプレキシン(マウスで9種類なのでおそらく9種類)をクローニングして結合や機能を解析する。プレキシンがレセプターでなければ、発現クローニング法を行い同定する。レセプターが同定できれば、レセプターについても発現解析及び Morpholino oligo による生体内での機能解析を行う。生体内での機能解析が最大の目的なので、Morpholino oligo による生体内での機能解析は詳細に行いたい。すでに報告されている有用なトランスジェニックゼブラフィッシュも解析領域によって多種類使用していきたい。

(3) Sema3A ノックアウトマウスに関しては、小脳ではプルキンエ細胞層だけに発現が認められるので、軸索投射を見るために Dil などのトレーサーを使用した解析や小脳特異的な抗体染色(VGluT1 や VGluT2 抗体などを使用)による形態学的解析を行う。脊髄損傷後の神経再生過程における Sema3A の機能解析をさらに進める。Sema3A ノックアウトマウスの脊髄を損傷させ、その再生過程において今までに知られている神経再生を促進する分子を与えるなどして、再生効率を上昇させる方法を見出したい。

4. 研究成果

(1) 新規セマフォリン(Sema3G と Sema6D)のノックアウトマウスの作成を行っている。どちらのノックアウトマウスの作成も苦労している。Sema3G に関しては苦労したがノックアウトマウスの作成に成功したところである。このマウスは *LacZ* の発現により Sema3G の発現も解析できるマウスである。Sema3G 抗体も作成したので、これらを使用して Sema3G の発現を詳細に解析しているところである。

その後、Sema3G の神経回路形成における機能解析を行う計画である。また、Sema3G に関して神経培養系の解析も同時に行っているが、神経系に関しては明らかな機能はまだ見出していない。血管系に関しては見出している。形態学的解析と同時に高次脳機能解析のための行動解析の準備も進めている。

さらに Sema3G のレセプターの同定を行い、ニューロピリン-2 がレセプターだと考えられた。ニューロピリン-2 の解析も行う計画である。また、Sema6D に関しては努力しているがノックアウトマウスがまだ作成できていない。相同組換え体の ES 細胞が得られていない。引き続き作成しているところである。Sema6D 抗体の作成には成功した。Sema6D のレセプターの同定を行い、プレキシン-A1 がレセプターだと考えられた。

(2) ゼブラフィッシュにおけるセマフォリンの解析に関しては、発現解析を行った。Sema6D は初期発生中において菱脳やレンズなどで、成体脳においては小脳に発現している。Sema6E は初期発生中においては菱脳やレンズなどで、成体脳では縦隆起に発現している。Sema6D、Sema6E ともに神経軸索に対する反発活性が認められた。これらのことより、Sema6D と Sema6E は初期発生中の神経回路形成に関与している可能性がある。Sema6F に関しては現在解析中である。今後は生体内での機能解析を進めていく計画である。また、Sema6D と Sema6E のレセプターの同定を行い、どちらもプレキシン-A1 がレセプターだと考えられた。ゼブラフィッシュの Sema6D はマウスと同様の結果であり、脊椎動物ではシグナル伝達機構が保存されていることが示唆された。

(3) Sema3A ノックアウトマウスの小脳における解析に関しては、様々な抗体を使用した免疫染色やトレーサーを使用した解析を行っているが、現在の所は明らかな表現型の違いを見出していない。今後は海馬も含めて解析を行う計画である。神経再生の研究に関しては現在検討中である。

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8件)

Tomoyuki Masuda, Masahiko Taniguchi. Congenital diseases and semaphorin signaling: Overview to date of the evidence linking them. *Cong. Anom.*, 55, 26-30, 2015. 査読有

DOI: 10.1111/cga.12095.

Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Hiroyuki

Yaginuma, Masahiko Taniguchi. Attractive and permissive activities of semaphorin 5A toward dorsal root ganglion axons in higher vertebrate embryos. *Cell Adh. Migr.*, 8, 603-606, 2014. 査読有

DOI: 10.4161/19336918.2014.972770.

Anjana Shrestha, Kyaw Moe, Keijo Luukko, Masahiko Taniguchi, Paivi Kettunen. Sema3A chemorepellant regulates the timing and patterning of dental nerves during development of incisor tooth germ. *Cell Tissue Res.*, 357, 15-29, 2014. 査読有

DOI: 10.1007/s00441-014-1839-3.

Paolo Giacobini, Jyoti Parkash, Céline Campagne, Andrea Messina, Filippo Casoni, Charlotte Vanacker, Fanny Langlet, Barbara Hobo, Gabriella Cagnoni, Sarah Gallet, Naresh Kumar Hanchate, Danièle Mazur, Masahiko Taniguchi, Massimiliano Mazzone, Joost Verhaagen, Philippe Ciofi, Sébastien G. Bouret, Luca Tamagnone, Vincent Prevot. Brain Endothelial Cells Control Fertility through Ovarian-Steroid-Dependent Release of Semaphorin 3A. *PLoS Biol.*, 12, e1001808, 2014. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pbio.1001808.

Naoya Yamashita, Hiroshi Usui, Fumio Nakamura, Sandy Chen, Yukio Sasaki, Tomonobu Hida, Fumikazu Suto, Masahiko Taniguchi, Kohtaro Takei, Yoshio Goshima. PlexinA4-dependent retrograde Semaphorin3A signalling regulates the dendritic localisation of GluA2-containing AMPA receptors. *Nature Commun.*, 5, 3424, 2014. 査読有

DOI: 10.1038/ncomms4424.

Tomoyuki Masuda, Masahiko Taniguchi, Chie Sakuma, Toshiyuki Yamagishi,

Shuichi Ueda, Masahumi Kawaguchi, Hiroyuki Yaginuma. Development of the dorsal ramus of the spinal nerve in the mouse embryo: Involvement of semaphorin 3A in dorsal muscle innervation. *Cong. Anom.* 53, 122-126, 2013. 査読有
DOI: 10.1111/cga.12019.

Kyaw Moe, Angelina C Sijaona, Anjana Shrestha, Paivi Kettunen, Masahiko Taniguchi, Keijo Luukko. Semaphorin 3A controls timing and patterning of the dental pulp innervation. *Differentiation*, 84, 371-379, 2012. 査読有
DOI: 10.1016/j.diff.2012.09.003

Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Masahiko Taniguchi, Ayae Kanemoto, Madoka Yoshizawa, Kaishi Satomi, Hideaki Tanaka, Kosei Takeuchi, Shuichi Ueda, Hiroyuki Yaginuma, Takashi Shiga. Development of the dorsal ramus of the spinal nerve in the chick embryo: A close relationship between development and expression of guidance cues. *Brain Res.*, 1480, 30-40, 2012. 査読有
DOI: 10.1016/j.brainres.2012.08.055.

〔学会発表〕(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 雅彦 (TANIGUCHI, Masahiko)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70260346

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：