

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870538

研究課題名(和文) 海馬形成における、神経栄養因子としてのDraxinの機能解析

研究課題名(英文) Roles of draxin in hippocampal development as a neurotrophic factor

研究代表者

俵山 寛司 (Tawarayama, Hiroshi)

東北大学・生命科学研究科・教育研究支援者

研究者番号：20402414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：海馬は記憶や空間認知を司る重要な脳組織であるが、歯状回顆粒細胞がこれらの高次脳機能を担っている。以前我々は、軸索ガイダンス分子であるドラキシンを同定し、海馬形成に必須であることを明らかにした。ドラキシン遺伝子破壊マウスでは、死細胞が増加するとともに海馬が萎縮し、海馬機能にも異常をきたす。今回我々は、海馬神経新生におけるドラキシンの役割について解明を試み、以下の結論を得た。(1)ドラキシンはその受容体であるDCCを介し、新生神経細胞の分化の過程で起こり得る細胞死を抑制する、(2)強力な分化誘導能を有するWntの活性を減弱し、神経細胞の分化が適切な速度で進行するよう調節する。

研究成果の概要(英文)： Granule cell production in the hippocampus dentate gyrus is fundamental to brain functions such as learning and memory. Although the previous study revealed that loss of draxin, which we previously identified as a neural repellent, leads to reduction in number of granule cells and hippocampal volume, little is known about the mechanisms in which draxin regulates the hippocampal development. In this study, we report the dual role of draxin in hippocampal neurogenesis: (1) Draxin prevents the DCC-induced apoptosis of differentiating neurons by acting as a ligand for the dependence receptor, and promote neuronal survival through the receptors DCC and neogenin. (2) Draxin modulates differentiation of neuronal progenitors by attenuating the neuronal-differentiation-promoting activity of canonical Wnts. The draxin-mediated modulation would be useful for preventing depletion of progenitors, which vigorously proliferate, due to too rapid differentiation.

研究分野：神経発生科学

キーワード：海馬 神経新生 ドラキシン 軸索ガイダンス因子 神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の海馬は、記憶の形成や空間把握、情動調節など、高次脳機能を司る重要な脳器官であるが、これらの機能は歯状回の顆粒細胞によって担われている。歯状回顆粒細胞は、齧歯類では、胎生期後期あたりから生み出され、新生児期、幼若期、成熟期と、長期にわたって新たな神経細胞が産生される。この間、神経新生のニッチは、海馬采と歯状回の境界部分である歯状回切痕(dentate notch)、歯状回門、そして顆粒細胞下帯に順次移り変わる。海馬神経新生に重要な役割を担う分子として、canonical Wnt ファミリーが挙げられる。Canonical Wnt のシグナルは、LRP と frizzles の複合体によって受容され、 β -カテニンを介して各種遺伝子発現を活性化し、神経分化を誘導する。現在までに、Wnt を含め、海馬新生神経に参与する多くの外因性・内因性因子が報告されているが、神経新生のニッチにおいて、新たな神経細胞を生み出す過程に関わる分子及びその作用機序に関しては、なお不明な点も多い。

分泌型タンパクである draxin は、熊本大学の故・田中英明先生らのグループによって同定された新規反発性軸索ガイダンス因子であり、そのノックアウト(KO)マウスの表現型解析の結果から、大脳交連神経の形成に必要不可欠であることが明らかとなっている (Islam et al., 2009)。また、同グループにより draxin 受容体の探索が行われ、draxin は既知の netrin 受容体である Unc5 ファミリー、DCC、neogenin、DSCAM に対して結合能を示すものの (Ahmed et al., 2011)、現在のところ、受容体としての機能が確認されているのは DCC のみである (Ahmed et al., 2011)。前述のように、Draxin は軸索ガイダンスに関連する分子として同定された経緯があるが、その後の研究から、海馬形成においても必須であることが示された (Zhang et al., 2010)。Draxin KO マウスの成体では、歯状回の顆粒細胞数が減少するとともに、海馬全体が萎縮する。また、胎児期においては、海馬での死細胞が著しく増加する。これらの知見から、draxin が海馬での神経新生に参与していることが示唆されている。

2. 研究の目的

Draxin は海馬における神経新生に重要な役割を担っていると考えられるが、その作用機序に関しては不明のままである。本研究では、KO マウスにおける表現型を詳細に解析することで、海馬神経新生における draxin の役割を明らかにする一方、*in vitro* レベルの解析により、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

KO マウスの表現型解析は、主に各種抗体を用いた免疫組織学的手法により行った。新生神経細胞の分化過程を追跡する実験では、タモキシフェン投与により、nestin を発現する神経幹/前駆体細胞を時期特異的に蛍光標識可能なトランスジェニック・マウス (Nestin-CreERT2; Rosa-stop-YFP) を用いた。*In vitro* レベルでの draxin の機能解析実験では、ラット成体海馬由来の神経幹/前駆体細胞を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 海馬歯状回における draxin 発現細胞の同定

Draxin は神経新生の盛んな領域に強く発現しているが、その細胞の正体については明らかになっていない。そこで、グリア細胞や顆粒細胞系譜の異なる分化段階の細胞を特異的に認識する抗体を用いて免疫組織染色を行い、歯状回における draxin 発現細胞の同定を試みた。その結果、draxin はアストロサイトには発現しておらず、顆粒細胞系譜に属する神経前駆体細胞の一部及び神経芽細胞に特異的に発現していることが判明した。また、新生児期、幼若期、成熟期のそれぞれにおいて draxin の発現パターンが一致していることから、海馬神経新生における draxin の役割は、発達段階に関わらず共通していることが示唆された。

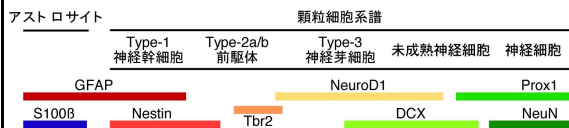


図 1. 顆粒細胞系譜及びアストロサイトにおける各種発現マーカーと draxin の発現。

(2) 歯状回の萎縮とアポトーシスの増加

以前の研究では、draxin KO マウスの成体における海馬の萎縮と胎生期におけるアポトーシス細胞の増加について報告されたが、発達に伴う、これら表現型の変遷に対しては、関心が向けられていなかった (Zhang et al., 2010)。今回我々は、draxin KO マウスにおける歯状回の面積及び死細胞数に関して、発達段階を追って解析を行った。その結果、(a) 歯状回の萎縮は生後直後から顕著になり、幼若期、成熟期にかけて重篤になっていくこと、(b) 以前の報告とは異なり、歯状回におけるアポトーシス細胞数は、胎生期では野生型、KO 間で差はなく、生後から KO マウスにおいて著しく増加すること、が明らかになった。以上の結果から、歯状回の萎縮とアポトーシスの増加には何らかの因果関係が示唆され、おそらく前者は後者に起因すると考えられる。

(3) アポトーシス細胞の同定

KO マウスの歯状回では、アポトーシス細胞が

有意に増加するが、その正体については明らかになっていない。そこで様々な発現マーカーを用いて死細胞の同定を試みたところ、K0 マウスでは、細胞死を被る神経芽細胞の数が劇的に増加することが明らかになった。これを支持するように、K0 マウスでは神経芽細胞数が有意に減少していることを確認した。神経幹細胞については、野生型、K0 とともに、その数に差は認められなかったが、面白いことに、細胞死の亢進が認められない神経前駆体細胞の数も有意に減少していた。

(4) Draxin とその受容体による抗アポトーシス活性

K0 マウスではアポトーシスが亢進することから、draxin が抗アポトーシス活性を有することが示唆される。この可能性について検討するため、ラット成体海馬から樹立した神経幹/前駆体細胞を用い、*in vitro* レベルで draxin の機能解析を行った。神経幹/前駆体細胞の分化を促すため、分化誘導剤であるレチノイン酸とフォルスコリンを含む培地中で数日培養し、その後、様々な濃度の外因性 draxin タンパクを添加した。その結果、draxin は同細胞に起こりうるアポトーシスを濃度依存的に抑制することが明らかになった。また、draxin による抗アポトーシス効果は、draxin の機能的受容体として知られている DCC (Deleted in Colorectal Cancer) をノックダウンすることで減弱し、さらに DCC 類似タンパクである neogenin とのダブルノックダウンにより、さらなる減弱が認められた。他方、同細胞に DCC を強制発現させたところ、draxin の存在下では抗アポトーシス効果が増強され、非存在下ではむしろアポトーシスを増加させた。DCC は「依存性受容体」に属する膜タンパクであり、過去の研究から、リガンド存在下においては、その発現細胞に細胞死を引き起こすことが知られている。従って以上の知見から、DCC が分化中の神経幹/前駆体細胞において依存受容体としての性質を示し、DCC 誘導性のアポトーシスはそのリガンドである draxin の存在下では抑制されるということが判明した。なお、分化中の神経幹/前駆体細胞における DCC の発現は、western blotting 法によって確認済みである。

(5) K0 マウスにおける神経分化の促進

(3) で述べたように、K0 マウスでは神経芽細胞におけるアポトーシスが亢進し、その数が減少する。一方で、過剰なアポトーシスを被っていない神経前駆体細胞の数も有意に減少していた。その理由を明らかにするため、K0 マウスにおける神経幹/前駆体細胞の分化過程を詳細に追跡した。Draxin ノックアウトあるいは野生型のバックグラウンドの Nestin-CreER^{T2}; Rosa-stop-EFP トランスジェニック・マウスにタモキシフェンを注入し、Nestin を発現する神経幹/前駆体細胞を YFP で蛍光標識した後、これらの細胞の分化過程

を経時的に解析した。その結果、K0 マウスでは蛍光標識された神経幹/前駆体細胞の分化が促進され、野生型マウスに比べて早く成熟顆粒細胞に分化することが明らかになった。以上のことから、K0 マウスにおける神経前駆体細胞の減少は、その分化速度が促進されたことに起因すると考えられた。

(6) 分化調節因子としての draxin の機能

ゼブラフィッシュを用いた以前の研究では、draxin が canonical Wnt の受容体コンポーネントである LRP に結合し、Wnt シグナルのアンタゴニストとして機能することが報告されている (Miyake et al., 2009)。Wnt は、海馬において新生神経細胞の分化に参与していることから、K0 マウスにおける神経細胞の分化異常は、Wnt アンタゴニストとしての draxin の機能を失ったことに起因しているのではないかと考えた。そこで、*in vitro* の実験系を用い、draxin が Wnt の分化誘導活性に何らかの影響を与えるかどうか検討を行った。Wnt を添加した培地中で前述のラット海馬由来神経幹/前駆体細胞を培養したところ、Tuj-1 陽性神経細胞への分化が顕著に促進された。次に、その培地中に Wnt の 100 倍量の外因性 draxin タンパクを加えたところ、Wnt による分化誘導活性が有意に減弱した。以上のことから、Draxin が Wnt アンタゴニストとして機能し、Wnt による神経分化誘導能を調節している可能性が示唆された。興味深いことに、draxin タンパクは単独でも分化誘導活性が認められたが、その活性は Wnt に比べると非常に微弱であり (1/100 以下)、 β -catenin を介さないという点で、Wnt の作用機序と全く異なるものであると考えられた。

(7) まとめ

Draxin は以前、前脳交連神経形成に必須の軸索ガイダンス因子として同定された分子であるが、本研究では、draxin の海馬神経新生における役割について研究し、以下のような知見・考察を得た (次ページの図も参照のこと)。

Draxin は、新生神経細胞に対して抗アポトーシス活性、生存促進活性を示し、その活性は DCC 及び neogenin に依存する。依存性受容体としての性質を有する DCC は、リガンド非存在下において、その発現細胞に細胞死を引き起こすことから、draxin は DCC を発現する新生神経細胞の分化の過程で起こり得る細胞死を抑制しているものと考えられる。

Draxin は Wnt アンタゴニストとして機能し、その分化誘導活性を減弱させる。このメカニズムの存在意義として、以下のことが考えられる。神経前駆体細胞は旺盛な分裂能を有し、盛んに細胞分裂を繰り返すことが知られて

いる。神経前駆体細胞数の減少は神経系を構成する神経細胞総数の減少につながることから、draxinがWntのアンタゴニストとして機能することで、その強力な分化誘導活性を減弱している。一方、draxinは自身の分化促進活性により、神経前駆体細胞の分化をマイルドに促進している。

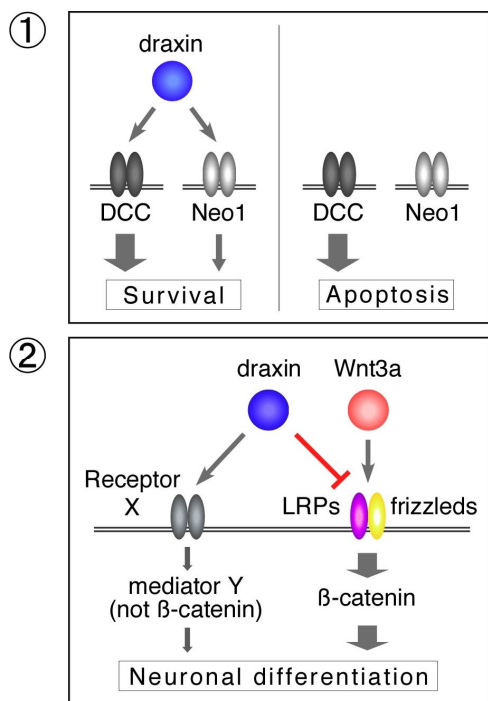


図2.海馬神経新生における draxin の役割とその分子学的作用機序. Neo1:neogenin

<引用文献>

Ahmed G, Shinmyo Y, Ohta K, Islam SM, Hossain M, Naser IB, Riyadh MA, Su Y, Zhang S, Tessier-Lavigne M, Tanaka H (2011) Draxin inhibits axonal outgrowth through the netrin receptor DCC. *J Neurosci* 31:14018–14023.

Islam SM, Shinmyo Y, Okafuji T, Su Y, Naser IB, Ahmed G, Zhang S, Chen S, Ohta K, Kiyonari H, Abe T, Tanaka S, Nishinakamura R, Terashima T, Kitamura T, Tanaka H (2009) Draxin, a repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. *Science* 323:388–393.

Miyake A, Takahashi Y, Miwa H, Shimada A, Konishi M, Itoh N (2009) Neucrin is a novel neural-specific secreted antagonist to canonical Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1051–1055.

Zhang S, Su Y, Shinmyo Y, Islam SM, Naser IB, Ahmed G, Tamamaki N, Tanaka H (2010) Draxin, a repulsive axon guidance protein, is involved in hippocampal development. *Neurosci Res* 66:53–61.

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)

[学会発表](計 2件)

Hiroshi Tawarayama, Hirohisa Yamada, Yohei Shinmyo, Hideaki Tanaka “Draxin, a repulsive axon guidance molecule, functions as a neural survival-promoting factor in the developing hippocampus” Neurogenesis in Matsushima, 2013年10月16-18日, ホテル松島大観荘(宮城県宮城野郡・松島町)

俵山寛司, 山田博久, 井川俊太郎, 新明洋平, 田中英明「軸索ガイダンス因子ドラキシンはWntシグナリングを調節することにより海馬神経新生を制御する」第37回日本分子生物学会, 2014年11月25-27日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

俵山 寛司 (TAWARAYAMA, Hiroshi)
東北大学大学院・生命科学研究科・
教育研究支援者
研究者番号: 20402414