

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：37111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893316

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイト前駆細胞と神経細胞間で構築されるシナプスの分子機構解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of synapse formed between neuron and oligodendrocyte precursor cell

研究代表者

渡辺 拓也(Watanabe, Takuya)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90509647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症患者脳では白質体積の変化が認められるが、その機序は明らかではない。白質は主にオリゴデンドロサイトで構成されているため、オリゴデンドロサイト前駆細胞のグルタミン酸受容体を介した分化機構に着目し、自閉症で変異が同定されているニューロリギン3の影響を検討した。オリゴデンドロサイト前駆細胞でのニューロリギン3発現とグルタミン酸刺激によるAMPA型グルタミン酸受容体応答が認められた。しかし、当細胞における遺伝子導入によるニューロリギン3発現調節が出来なかったため、本研究ではニューロリギン3の影響を解析できなかった。今後、実験条件の最適化が必要である。

研究成果の概要(英文)：Patients with autism spectrum disorder (ASD) demonstrate altered volume of white matter. But that mechanism is unknown. White matter is composed of oligodendrocytes. Therefore a function of neuroligin 3, which mutations of that gene is found in ASD, in differentiation of oligodendrocyte precursor cell (OPC) was examined. OPC expressed neuroligin 3 and responded to glutamate via AMPA type glutamate receptor. Function of neuroligin 3 in OPC differentiation because expression level of neuroligin 3 could not be regulated using gene transfection. We should modify experimental condition.

研究分野：神経薬理学

キーワード：neuroligin oligodendrocyte

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経軸索のミエリン形成はヒト脳では生後2年までの間に活発に行われ、低次から高次精神活動を司る脳部位へと順次進行することから、精神発達とミエリン形成は相関関係にあると考えられている。自閉症患者の脳では異常なミエリン形成と、ミエリンを多く含む白質の体積増加が認められている。これらの報告から、ミエリン形成異常による神経ネットワークの変化が自閉症病態の一つであると考えられている。しかし、その形成異常の機序は明らかではない。

(2) ミエリンはNG2細胞が成熟オリゴデンドロサイトに分化し、形成される。近年の電気生理学的手法を用いた研究により、NG2細胞は神経細胞から軸索投射を受け、神経細胞とNG2細胞間でシナプスを構築することが報告されている。このシナプスには、神経-神経細胞間のシナプスと同様に、グルタミン酸放出を介した興奮性シナプスとGABA放出を介した抑制性シナプスが存在する。NG2細胞は興奮性シナプス入力に依存して、ミエリン構成分子であるミエリン塩基性蛋白を発現し、成熟オリゴデンドロサイトへ分化する過程で興奮性シナプス応答が減少する。このことから、NG2細胞はシナプスを介して神経情報を受信し、周囲の細胞環境に応じてミエリン形成を起こすことが提案されている(図1)。すなわち、神経-NG2細胞間でのシナプス伝達障害はミエリン形成異常を導くことが示唆され、神経-NG2細胞間のシナプス伝達調節機構を明らかにすることは自閉症病態解明の手掛かりとなる。神経-神経細胞間のシナプスに関する研究は数多く行われており、シナプス関連蛋白の相互作用がシナプス伝達能を制御することが報告され、神経-神経細胞間シナプスの分子機構の全貌が解明されつつある。一方で、神経-NG2細胞間シナプスの分子機構は不明である。

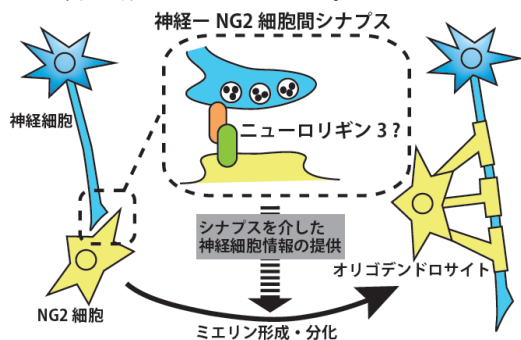


図1. 神経-NG2細胞間シナプス伝達によるオリゴデンドロサイトの分化調節
NG2細胞はシナプスを介して神経細胞の活性情報を受け取り、それに応じてミエリン構成蛋白を発現し、オリゴデンドロサイトへ分化する。本研究では自閉症患者で変異が認められたニューロリギン3のシナプス形成・機能への関与を検討する。

(3)ニューロリギンはシナプス後部に存在するシナプス関連蛋白であり、シナプス前部に存在するニューレキシンと結合し、シナプスの形成や伝達能を調節している。ニューロリギンは各アイソフォームで局在も異なり、ニューロリギン1は神経細胞の興奮性シナプスに、ニューロリギン2は神経細胞の抑制性シナプスに発現している。ニューロリギン3は神経細胞の興奮性と抑制性シナプスに加え、視神経のミエリンを形成するグリア細胞にも発現している。申請者はラット初代培養NG2細胞のニューロリギン3発現を示す予備実験結果を得ており、ニューロリギン3が神経-NG2細胞間のシナプス機能の調節に関与することが予想される。従って、自閉症患者での変異ニューロリギン3の同定は、変異ニューロリギン3による神経-NG2細胞間シナプスの伝達異常が自閉症の病態機構に関与することを想定させる。

2. 研究の目的

本研究では、自閉症の病態解明を目指し、神経-NG2細胞間のシナプス形成・伝達能におけるニューロリギン3の役割を追求するものである。

3. 研究の方法

(1)NG2細胞の同定

ラット新生児脳からミックスグリア細胞を採取し、10-14日間培養した後、振とうによりNG2細胞を単離した。NG2細胞はNG2用培養液 (Neurobasal medium、B27 supplement、Glutamax、10ng/ml bFGF、10ng/ml PDGF-AA) で培養し、OLGへ分化を誘導する際はOLG用培養液 (DMEM、10%FBS、30nM Triiodothyronine (T3)) で培養した。細胞からタンパクを抽出し、western blot法によりNG2とmyelin basic protein (MBP)の検出を行った。

(2)NG2細胞におけるシナプス関連タンパクの発現解析

NG2細胞からmRNAを抽出し、RT-PCRを行い、ニューロリギン3、postsynaptic density protein 95 (PSD-95)、SH3 and multiple Ankyrin repeat domain 3 (Shank3)、GluR1、GluR3のmRNAの発現を解析した。また、NG2細胞からタンパクを抽出し、western blotを行い、ニューロリギン3の発現を解析した。

(3)NG2細胞におけるグルタミン酸受容体反応の解析

NG2細胞に電極を接触させ、ホールセルを作製し、100μM cyclothiazideを前処置し、100μMグルタミン酸を処置した際の応答を解析した。また、cyclothiazideと同時に10μM NBQXを前処置した時の応答も解析した。

(4)ニューロリギン3の発現調節

ラット新生児脳からニューロリギン3配列を

クローニングし、pCAGIG ベクターへ組み込んだ。また、ニューロリギン 3 を標的とした shRNA 配列を pLB2_CAG_P2Gm ベクターへ組み込んだ。HEK 細胞にこれらのベクターを Lipofectamine2000 を用いて導入し、western blot 法により発現を解析した。

(5) 脊髄後根神経節 (Dorsal root ganglion: DRG) と NG2 細胞の共培養
 ラット新生児から DRG を採取し、9-14 日培養した後、NG2 細胞を播種した。

4. 研究成果

(1) Oligodendrocyte precursor cell (OPC) と神経細胞間で構築されるシナプスの分子機構を解明するため、まずラット新生児脳から単離培養した OPC の同定を行った。単離培養した OPC は OPC のマーカー蛋白質の一つである NG2 を発現していた。また、OPC に T3 を処置して、oligodendrocyte (OLG) への分化を誘導させると、分化誘導前では発現が認められなかった MBP (OLG のマーカー蛋白質の一つ) の発現が認められ、一方で NG2 の発現は認められなくなった (図 2)。これらのことから、単離培養した細胞は OLG へ分化可能な OPC であると確認できた。

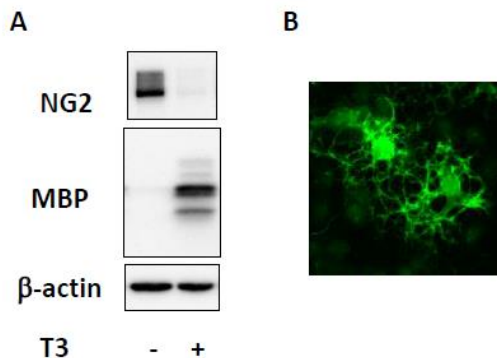


図 2. OPC の同定

(A) T3 処置による OPC から OLG への分化。OPC に T3 を 48 時間処置した。NG2: OPC のマーカータンパク、MBP: OLG のマーカータンパク (B) T3 処置した OPC の MBP 免疫染色画像。OPC は OLG の形態をていた。

(2) 神経細胞で認められるシナプス関連タンパクを OPC が発現しているか検討するため、mRNA 発現量を解析した。OPC では、ニューロリギン 3 に加え、足場タンパクである PSD-95 や Shank3、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットである GluR1 や GluR3 の mRNA 発現が認められた。以上のことから、単離した OPC は AMPA 型グルタミン酸受容体を発現していることが示唆された。

(3) OPC で発現する AMPA 型グルタミン酸受容

体の機能を検討するために、パッチクランプ法を用いて OPC におけるグルタミン酸刺激による電流応答を解析した。グルタミン酸刺激のみでは、その電流応答を取得することが出来なかった。そこで、AMPA 型グルタミン酸受容体の脱感作阻害剤である cyclothiazide を前処置するとグルタミン酸刺激による電流応答を取得することができた。さらに、AMPA 型グルタミン酸受容体アンタゴニストである NBQX を cyclothiazide と共に前処置するとグルタミン酸刺激による電流応答は認められなくなった (図 3)。以上のことから、OPC は AMPA 型グルタミン酸受容体応答を示すことが明らかとなり、シナプス形成能を有することが示唆された。

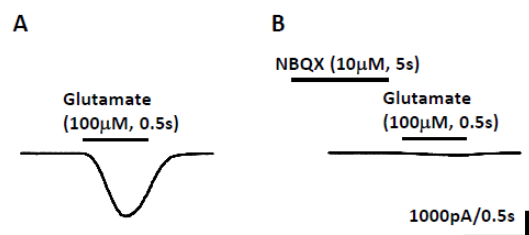


図 3. OPC のグルタミン酸受容体刺激における応答

(A) グルタミン酸刺激をうけた OPC の電流応答。(B) NBQX 前処置による OPC の電流応答の減弱。

(4) OPC と神経細胞間で構築されるシナプスでのニューロリギン 3 の役割を解明するため、OPC 上のニューロリギン 3 発現調節の方策を検討した。ニューロリギン 3 には 4 つのサブライスバリエント (A1A2、A1、A2、delta) が存在することが報告されており、申請者はラット脳から 2 種のサブライスバリエント (A2、delta) をクローニングした。また、ニューロリギン 3 を標的とする shRNA (ニュー

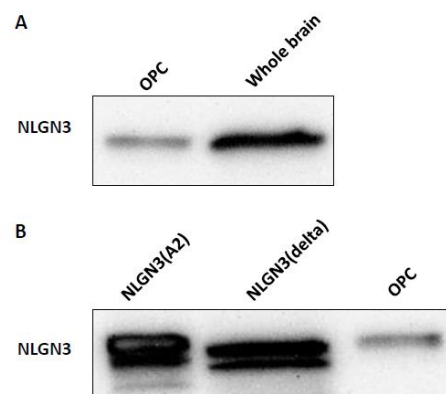


図 4. OPC におけるニューロリギン 3 (NLGN3) の発現

(A) OPC とラット全脳に発現する NLGN3。(B) HEK 細胞に過剰発現させた NLGN3 スプライスバリエント (A2、delta) と OPC の NLGN3。

ニューロリジン 3-shRNA) の作製を行った。HEK 細胞にニューロリジン 3 プラスミド (A2 ならびに delta) を導入し、また、ニューロリジン 3A2 プラスミドとニューロリジン 3-shRNA を同時に導入し、western blot 法にてニューロリジン 3 発現を解析した。ニューロリジン 3 A2 とニューロリジン 3 delta は共に想定 の分子量の位置に発現し、ニューロリジン 3-shRNA はその発現量を減少させた。また、 OPC から抽出したタンパクを同時に western blot した際にニューロリジン 3 A2 と同程度 の位置にバンドが検出されたことから、OPC にはニューロリジン 3 A2 もしくは A1 が優位 に発現していることが示唆された (図 4、5)。

(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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 拓也 (WATANABE, Takuya)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90509647

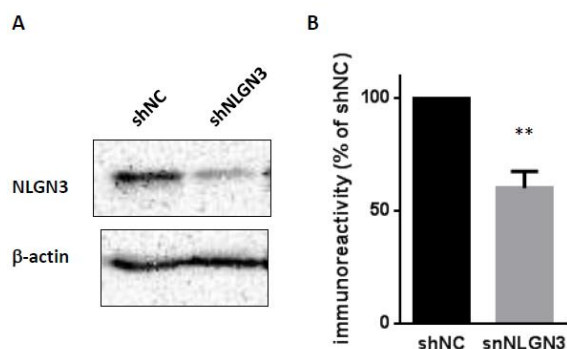


図 5. HEK 細胞に強制発現されたニューロリジン 3 (NLGN3) の shRNA による knockdown (A) western blot 画像 (B) 定量化グラフ

OPC へ上記プラスミドの導入を行った。プラスミドには GFP が組み込まれているため、GFP 発現で導入効率を評価した。Lipofectamine2000 ならびに 3000 での導入では、全く蛍光を発する OPC は観察されなかった。次に電ポレーションによる導入を行った結果、蛍光を発する OPC がわずかに認められた。OPC への遺伝子導入条件の最適化が今後の検討課題である。

(5) OPC と神経細胞間のシナプス形成を検討するため、脳由来の神経細胞と OPC の共培養を試みたが、シナプス構築の評価は困難であった。そこで、脊髄後根神経節と OPC の共培養を検討した。OPC は脊髄後根神経節との共培養下で分化様の形態変化が認められた。

以上、本研究では OPC におけるニューロリジン 3 の発現が明らかとなった。また、OPC におけるグルタミン酸受容体応答の検出の確立を行った。OPC におけるニューロリジン 3 の発現調節と OPC と神経細胞との共培養系によるシナプス構築を試みたが、遺伝子導入効率は低く、シナプス構築は困難であった。今後、最適な条件を検討する必要がある。当初の研究計画を完遂できなかったが、今後の研究に有益な結果を得たと考える。

5. 主な発表論文等