

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22122006

研究課題名（和文）細胞外基質とその受容体による血管-神経相互作用の制御

研究課題名（英文）Regulation of neuro-vascular interaction by extracellular matrix and their receptors

研究代表者

関口 清俊（Sekiguchi, Kiyotoshi）

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：50187845

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 85,000,000 円

研究成果の概要（和文）：細胞外基質による血管-神経相互作用の制御機構を明らかにするため、(1) 血液脳関門の形成に重要な V α 8 インテグリンの特異的リガンド探索、および (2) 神経幹細胞ニッチとされている基底膜構造“フラクトン”の機能解析を行った。その結果、(1) TGF- β 1 が V α 8 の特異的リガンドであること、(2) フラクトンは神経幹細胞によって産生される基底膜構造であること、を見出した。これらの結果は、血管-神経相互作用を制御する細胞接着メカニズムの解明につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanisms by which extracellular matrices regulate neuro-vascular interactions, we conducted (1) comprehensive identification of the specific ligand(s) for V α 8 integrin, which play an important role in the formation of blood-brain barrier; and (2) functional characterization of a specialized basement membrane “fractone” in neural stem cell niche. We found that (1) TGF- β 1 is the specific ligand for V α 8 integrin, and (2) fractones are produced by neural stem cells. These results will unravel the cell-adhesive machinery that regulates the neuro-vascular interactions.

研究分野：生物学

キーワード：細胞外マトリックス 基底膜 インテグリン 血管 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

動物の器官形成は、異なる組織間の相互誘導作用により進行する。この相互作用の“場”となるのは、基底膜と呼ばれる細胞外マトリックスである。血管と神経のクロストークにおいても、両者の間には基底膜が介在している。中枢神経系では neurovascular unit と呼ばれる構造が血管-神経相互作用の場となっているが、基底膜はその重要な構成要素である。また、成体脳では毛細血管から脳室下帯に突き出した“フラクトン(fractone)”と呼ばれる細網構造が神経幹細胞の足場(ニッチ)と考えられているが、フラクトンの実体は基底膜である。しかし、このような血管-神経クロストークの場となる基底膜がどのような分子で構築されており、それらが血管-神経相互作用をどのように制御しているかは、これまでほとんど調べられていなかった。

2. 研究の目的

血管-神経相互作用を理解する上で、神経細胞、血管内皮細胞の周囲に存在する基底膜が各々の細胞挙動を決定する分子メカニズムを解明することが必須である。本研究は、血管と神経の相互作用部位である基底膜の分子実体解明と基底膜分子による血管-神経相互作用の制御機構の解明を目指した。具体的には、中枢神経系における血管-神経相互作用の場となる neurovascular unit (NVU) とフラクトンに着目し、(1) NVU の形成に必須である $\alpha V\beta 8$ インテグリンの特異的リガンド探索、(2) NVU とフラクトンを構築する基底膜分子のプロファイリング、(3) フラクトンの生理機能解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) $\alpha V\beta 8$ インテグリンとそのリガンド候補蛋白質の分子間相互作用解析: 蛋白質配列情報データベース UniProt に登録されている蛋白質の中から、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を有しており、細胞外に分泌され、かつ RGD 配列が動物種を超えて保存されている蛋白質 (29 種類) を選別した。これらを組換え蛋白質として発現させ、精製に成功した 25 種類の蛋白質を $\alpha V\beta 8$ のリガンド候補分子とした。インテグリンとリガンド候補との結合は、固相結合アッセイ法により定量した。

(2) 脳室下帯ホールマウント染色法: フラクトンの全体構造を三次元的に可視化するため、マウス脳室下帯のホールマウント染色をおこなった。生後 0 日~15 週齢までのマウス脳を摘出し、実体顕微鏡下で側脳室を露出、脳室下帯を回収した。脳室下帯は固定後、一次抗体、蛍光標識二次抗体を順次反応させ、透明化試薬 (BABB 溶液; ベンジルアルコール/安息香酸ベンジル 2:1 混合物) による透明化を施した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(3) 部位特異的にラミニン (LN) $\alpha 5$ 鎖を欠失できる flox マウス、および LN のインテグリン

結合能を不活化できる LN $\gamma 1$ 鎖 EQ 変異導入 flox マウスの作製: LN $\alpha 5$ 鎖の flox マウス (Lama5^{fl} マウス) を作製するため、LN $\alpha 5$ 鎖をコードする Lama5 遺伝子の 3 番目のエクソンを loxP 配列で挟んだターゲティングベクターを作製し、マウス ES 細胞に導入、相同組換えを生じた ES 細胞を選別した。LN $\gamma 1$ 鎖 EQ 変異導入 flox マウス (Lamc1^{fl(EQ)} マウス) は、LN $\gamma 1$ をコードする Lamc1 遺伝子の 28 番エクソンを loxP 配列で挟み、その 3'側に E1605Q 変異を導入した変異型 28 番エクソンを挿入したターゲティングベクターを作製し、このベクターをマウス ES 細胞に導入後、相同組換えを生じた ES 細胞を選別した。上記 ES 細胞を胚盤胞内に注入し、代理母子宮内に移植、産仔を交配することで、それぞれ Lama5^{fl} マウス、Lamc1^{fl(EQ)} マウスを樹立した。

4. 研究成果

(1) $\alpha V\beta 8$ インテグリンの特異的リガンド探索とその分子認識機構の解明: RGD 配列を認識するインテグリンの一つである $\alpha V\beta 8$ インテグリンのリガンド結合特異性を、精製インテグリン $\alpha V\beta 8$ と 25 種類の RGD 配列含有リガンド候補蛋白質を用いて精査し、インテグリン $\alpha V\beta 8$ が TGF- $\beta 1$ に対して高い特異性を有することを明らかにした。また、この特異性を発揮する分子メカニズムを種々の TGF- $\beta 1$ 変異体を用いて検証したところ、TGF- $\beta 1$ の RGD 配列直後に位置する Leu-247 が $\alpha V\beta 8$ との高親和性結合に必須であること (図 1)、 $\beta 8$ 鎖の I-like ドメインがその認識に関わっていることが明らかとなった。これらの結果は、 $\alpha V\beta 8$ による TGF- $\beta 1$ の活性化が NVU の機能維持に必要であるとする McCarty らのモデルを支持している (McCarty JH., Cell Adh. Migr., 3:211-215, 2009)。また、 αV インテグリンのリガンド結合特異性は、複合体を形成する β 鎖に依存して発揮されることを強く示唆している。

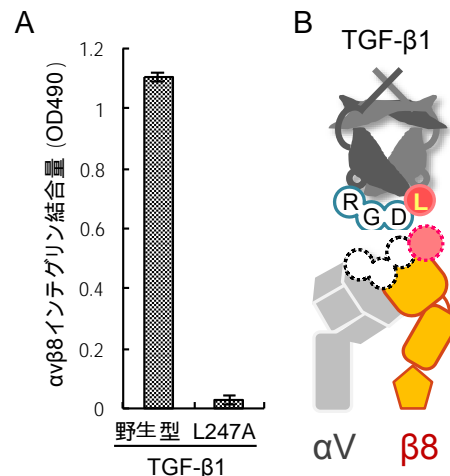


図1 $\alpha V\beta 8$ -TGF- $\beta 1$ 間の相互作用には Leu-247が必須である。
(A) 野生型TGF- $\beta 1$ およびLeu247をAlaに置換した変異体 (247A) の $\alpha V\beta 8$ 結合活性
(B) $\alpha V\beta 8$ -TGF- $\beta 1$ 結合のモデル図

(2) NVUとフラク톤を構築する基底膜分子のプロファイリング

薄切切片を用いた NVU とフラク톤を構成する基底膜分子のプロファイリング：我々が構築した基底膜構成分子の 90% をカバーする免疫組織染色適合抗体ライブラリを用いて、NVU とフラク톤を構成する基底膜分子組成を解析した。その結果、NVU だけに存在する蛋白質としてラミニン (LN)- α 2, α 4, WARP, endoGlyx-1, leprecan を、フラク톤だけに存在する蛋白質として LN- α 3 を見いだした(図 2; 和文総説)。これまでフラク톤は血管基底膜から延伸した細網構造であると報告されてきた。しかしながら、その分子組成が異なるという結果はフラク톤を産生する細胞が血管内皮細胞ではないということを示唆するものである。

血管基底膜	共通	フラク톤
LN α 2, α 4 WARP endoGlyx-1 leprecan	LN α 5, β 1, β 2, γ 1 Type IV collagen (α 1, 2) Type VI collagen perlecan agrin nidogen-1 nidogen-2	LN α 3 SMOC-1 SMOC-2 netrin-4

図2 血管基底膜およびフラク톤を構成する基底膜蛋白質

脳室下帯ホールマウント染色法を用いたフラク톤の全体構造解析：フラク톤の全体構造やその神経幹細胞との位置関係をより詳細に解析するためには、薄切組織切片を用いた従来の組織染色では限界がある。そこで、脳室下帯組織片を用いたホールマウント染色法を適用することで、この問題を解決することを試みた。抗 LN 抗体を用いて脳室下帯のホールマウント染色をおこなったところ、脳室下帯の表面に斑点状の基底膜構造が存在することが確認された(図 3 A)。種々の基底膜分子に対する抗体を用いてホールマウント染色を行い、この斑点状基底膜の分子組成を精査したところ、フラク톤の分子組成と完全に一致したことから、斑点状基底膜とフラク톤は同一構造物であると考えられる。過去の報告では、フラク톤は血管基底膜から延伸した細網構造であるとされていた。しかしながら、ホールマウント染色の結果を見る限り斑点状基底膜が血管と接している像はほとんど観察されない(図 3 B)。この結果はフラク톤が血管とは独立した

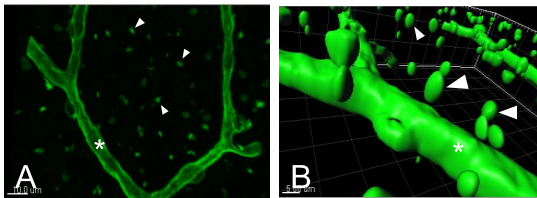


図3 脳室下帯ホールマウント染色による基底膜の観察

- 抗LN抗体による染色像。血管基底膜(*)に加えて、斑点状基底膜(▲)が観察される。
- 表面レンダリング法による斑点状基底膜の構造。斑点状基底膜は血管と連結していない。

構造体である可能性を強く支持しているものであり、血管基底膜と組成が異なるという前述の結果とも一致する。

(3) フラク톤の生理機能解析

フラク톤が形成される時期と場所の解析：フラク톤の生理機能を理解するためには、フラク톤がいつ形成されるのか、およびどの細胞種と接しているのかを明確にすることが不可欠である。フラク톤の形成時期を明らかにするために、生後 0 日~21 日目のマウス脳室下帯を単離し、ホールマウント染色によってフラク톤形成の有無を精査した。その結果、生後 5~10 日目に産生されはじめ、生後 21 日目までには脳室下帯表面全体に分布するようになることがわかった。生後 5~10 日目は胎児神経幹細胞である放射グリアが消失し、上衣細胞やグリア線維酸性蛋白質 (GFAP) を発現する成体神経幹細胞/アストロサイトが出現する時期であることから、この結果はフラク톤がこれらの細胞の最終分化に呼応して形成される構造体である可能性を示唆している。また、フラク톤と接する細胞種を明らかにするために、 β -カテニン (上衣細胞/神経幹細胞)、GFAP (神経幹細胞/アストロサイト)、doublecortin (神経芽細胞) との共染色を行ったところ、フラク톤はこれら全ての細胞と接していることがわかった。この結果は、フラク톤が脳室下帯を構成する様々な細胞種の足場として機能している可能性を示唆している。

フラク톤を産生する細胞種の同定：フラク톤の生理機能を解明するためには、フラク톤を産生する細胞種を同定する必要がある。フラク톤に存在する LN α 5 鎖を細胞種特異的に欠失できる Lama5^{fl} マウスと、種々の Cre リコンビナーゼ発現マウスを掛け合わせることで、この細胞種の同定を試みた。血管内皮細胞特異的に Cre を発現する Tie2-Cre マウスを用いたところ、血管基底膜における LN α 5 鎖の蓄積が著しく減少したものの、フラク톤での LN α 5 鎖の蓄積には変化がなかった。一方で、神経幹細胞/アストロサイト特異的に Cre を発現する Gfap-Cre マウスを用いたところ、フラク톤での LN α 5 鎖の蓄積が有意に減少した。以上の結果は、フラク톤を産生する細胞が血管内皮細胞ではなく神経幹細胞/アストロサイトであることを強く示唆している。

フラク톤特異的にラミニンのインテグリン結合活性を不活化したマウスの表現型

解析：フラク톤の機能を欠失した時に生じる表現型を明らかにするため、部位特異的に LN のインテグリン結合活性を不活化できる Lamc1^{fl(EQ)} マウスを Gfap-Cre マウスと交配し、作出したマウスの脳室下帯を調査した。その結果、このマウスはフラク톤の数が著しく減少しており、形成されたフラク톤のサイズも非常に小さいことが分かった。また、その結果として、神経幹細胞/アストロサイトのフラク톤に対する接着が有意に減弱し

ていた。これらの結果は、フラクTONの形成にLN-インテグリン間の相互作用が関わっていることを示している。

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19件)

Kiyozumi, D., Sato-Nishiuchi, R. and Sekiguchi, K. (2014) In situ detection of integrin ligands. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 1:65:10.19.1-10.19.17.

doi: 10.1002/0471143030.cb1019s65.

(査読有)

Yoshino, T., Satio, D., Atsuta, Y., Uchiyama, C., Ueda, S., Sekiguchi, K. and Takahashi, Y. (2014) Interepithelial signaling with nephric duct is required for the formation of overlaying coelomic epithelial cell sheet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111(18):6660-5

doi: 10.1073/pnas.1316728111.

(査読有)

Doi, D., Samata, B., Katsukawa, M., Kikuchi, T., Morizane, A., Ono, Y., Sekiguchi, K., Nakagawa, M., Parmar, M. and Takahashi, J., (2014) Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports.*, 2(3):337-50.

doi: 10.1016/j.stemcr.2014.01.013.

(査読有)

Yamada, M. and Sekiguchi, K. (2013) Disease-associated single amino acid mutation in the calf-1 domain of integrin $\alpha 3$ leads to defects in its processing and cell surface expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 441(4):988-93.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.003.

(査読有)

Sato, Y., Shimono, C., Li, S., Nakano, I., Norioka, N., Sugiura, N., Kimata, K., Yamada, M. and Sekiguchi, K. (2013) Nephronectin binds to heparin sulfate proteoglycans via its MAM domain. *Matrix Biol.*, 32(3-4):188-95.

doi: 10.1016/j.matbio.2013.01.005.

(査読有)

Song, X., Sato, Y., Sekiguchi, K., Tanaka, H. and Ohta, K. (2013) Equarin is involved in cell adhesion by means of heparan sulfate proteoglycan during lens development. *Dev. Dyn.*, 242(1):23-9

doi: 10.1002/dvdy.23902.

(査読有)

Nasu, M., Takata, N., Danjo, T., Sakaguchi, H., Kadoshima, T., Futaki, S., Sekiguchi, K., Eiraku, M. and Sasai, Y.

(2012) Robust formation and maintenance of continuous stratified cortical neuroepithelium by laminin-containing matrix in mouse ES cell culture. *PLoS One*, 7(12):e53024.

doi: 10.1371/journal.pone.0053024.

(査読有)

Kiyozumi, D., Takeichi, M., Nakano, I., Sato, Y., Fukuda, T. and Sekiguchi, K. (2012) Basement membrane assembly of the integrin $\alpha 8 \beta 1$ ligand nephronectin requires Fraser syndrome-associated proteins. *J. Cell Biol.*, 197(5):677-89.

doi: 10.1083/jcb.201203065.

(査読有)

Kiyozumi, D., Nakano, I., Takahashi, K.L., Hojo, H., Aoyama, H. and Sekiguchi, K. (2011) Fused pulmonary lobes is a rat model of human Fraser syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 411(2):440-4.

doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.174.

(査読有)

Fujiwara, H., Ferreira, M., Donati, G., Marciano, DK., Linton, JM., Sato, Y., Hartner, A., Sekiguchi, K., Reichardt, LF. and Watt, FM. (2011) The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell*, 144(4):577-89.

doi: 10.1016/j.cell.2011.01.014.

(査読有)

Li, S., Shimono, C., Norioka, N., Nakano, I., Okubo, T., Yagi, Y., Hayashi, M., Sato, Y., Fujisaki, H., Hattori, S., Sugiura, N., Kimata, K. and Sekiguchi, K. (2011) Activin A binds to perlecan through its pro-region that has heparin/heparin sulfate binding activity. *J. Biol. Chem.*, 285(47):36645-55.

doi: 10.1074/jbc.M110.177865.

(査読有)

和文総説(計1件)

佐藤祐哉、関口清俊(2013) 神経-血管相互作用と細胞外マトリックス 血管医学 14(3):51-8

(査読無)

[学会発表](計26件)

Morooka N., Sekiguchi, K., (他3名) Polydom is an extracellular matrix protein involved in lymphatic vessel remodeling, 2nd Neuro- Vascular Wiring Symposium, 2015年1月28日、京都

Sato Y. Sekiguchi, K., (他5名) Characterization of speckled basement membranes in adult neural stem cell niche, 2nd Neuro- Vascular Wiring Symposium, 2015年1月28日、京都

関口清俊、側脳室外側壁に局在する斑点状基底膜の分子実体とその意義、第36

回日本生物学的精神医学会、第 57 回日本神経化学会、2014 年 10 月 1 日、奈良

佐藤祐哉、関口清俊、他 5 名、成体神経幹細胞ニッチとしての斑点状基底膜の機能、第 36 回日本生物学的精神医学会、第 57 回日本神経化学会、2014 年 9 月 30 日、奈良

浄住大慈、関口清俊、他 7 名、Laminins function as an ECM niche for trophoblast stem cells. 第 47 回日本発生生物学会、2014 年 5 月 27 日、名古屋

Morooka, N., Sekiguchi, K., (他 3 名) Polydom is an extracellular matrix protein involved in lymphatic vessel remodeling. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014 年 4 月 13 日、Kyoto

関口清俊、Untangling the complexity of the extracellular matrix: From the matrixome database to the innovation of stem cell technology、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、横浜

小澤明央、関口清俊、他 5 名、V 8 インテグリンは TGF- β 1 を特異的に認識する、第 85 回日本生化学会、2012 年 12 月 15 日、福岡

佐藤祐哉、関口清俊、他 7 名、組換えインテグリンをプローブとしたインテグリンリガンドの in situ 検出法の確立と神経幹細胞ニッチ解析への応用、第 85 回日本生化学会、2012 年 12 月 15 日、福岡

Morooka, N. Sekiguchi, K., (他 3 名) Polydom is a novel extracellular matrix protein involved in lymphatic vessel development, The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012 年 12 月 5 日、Tokushima

Sekiguchi K., (他 4 名) Polydom is a novel integrin α 9 β 1 ligand involved in lymphangiogenesis. International Symposium on Neuro-Vascular Wiring, 2012 年 11 月 13 日、Nara

関口清俊、Basement membranes and integrins in neurovascular interactions. 第 35 回日本神経科学大会シンポジウム、2012 年 9 月 21 日、名古屋

浄住大慈、関口清俊、(他 1 名) ラミニン-インテグリン相互作用の新規 in vivo 解析法、第 44 回日本結合組織学会学術大会/第 59 回マトリックス研究会大会 合同学術集会、2012 年 6 月 8 日、東京

佐藤(西内)涼子、関口清俊、(他 8 名) Polydom/SVEP1 はインテグリン α 9 β 1 の新規高親和性リガンドである、第 44 回日本結合組織学会学術大会/第 59 回マトリックス研究会大会 合同学術集会、2012 年 6 月 7 日、東京

Sekiguchi, K., Synthetic basement membrane for regenerative medicine, 9th World Biomaterials Congress, 2012 年 6 月 5 日、Chengdu, China

Kiyozumi D., Sekiguchi, K., (他 1 名) A

novel approach to investigate laminin-integrin interaction in vivo、第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会、2012 年 5 月 30 日、神戸

Sekiguchi, K. Molecular basis of the interaction between basement membranes and the transforming growth factor-beta superfamily. 7th International Conference on Proteoglycans, 2011 年 10 月 17 日、Sydney, Australia

佐藤祐哉、関口清俊、(他 9 名) ネフロンネクチンは MAM ドメインを介してヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合する、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸

Sekiguchi, K. Activin A binds to perlecan through its pro-region that has heparin/heparan sulfate-binding activity. Biennial Meeting of the American Society for Matrix Biology, 2010 年 10 月 26 日、Charleston, SC, USA

Kiyozumi, D., Sekiguchi, K., (他 3 名) Impaired integrin α 8 β 1 binding to basement membranes in Fraser syndrome model mice. Biennial Meeting of the American Society for Matrix Biology, 2010 年 10 月 25 日、Charleston, SC, USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/chemistry/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関口清俊 (SEKIGUCHI KIYOTOSHI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：50187845