

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06230

研究課題名(和文) 神経系における細胞接着分子プロトカドヘリン1の作用機構の解明

研究課題名(英文) A Study on function of protocadherin 1 cell adhesion molecule in the nervous system.

研究代表者

平野 伸二 (HIRANIO, Shinji)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80222248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではプロトカドヘリン1(Pcdh1)などの解析を行った。Pcdh1については、発現パターンを調べ、ノックアウトマウスの一部の行動異常を明らかにした。Pcdh9については、K0マウスのスパインの減少と情動行動の変化を観察するとともに、扁桃体での恐怖情動と関連する細胞での発現を明らかにした。これらの結果から、Pcdh9が扁桃体や海馬において不安などの情動形成に関わっている可能性が考えられた。また、細胞外基質と古典的カドヘリンとの関係についての解析も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は研究が遅れているプロトカドヘリン分子群の機能と役割を明らかにしようとするものであり、Pcdh1およびPcdh9の発現解析とそれらのノックアウトマウスの解析から、これらの分子の基本的な発現部位、および行動異常を明らかにした。その結果はそれらの機能と役割を細胞レベルで示唆するものであり、細胞接着分子や神経回路形成の基礎研究分野に貢献するものである。さらに、プロトカドヘリン分子群は精神疾患の関連遺伝子として知られており、本研究による結果が精神疾患の発症メカニズムの理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)： We analyzed various cadherin molecules. Regarding protocadherin 1(Pcdh1), we examined the expression pattern and behavior in the knock-out mice. Regarding Pcdh9, we observed a reduction of spine density and abnormal behaviors, and its expression in the fear-related neurons in the amygdala, suggesting the possibility that Pcdh9 is involved in the formation of fear and emotion via the amygdala and hippocampus. In addition, we analyzed the relationship between matrix molecules and classic cadherins.

研究分野：神経発生学、細胞生物学

キーワード：細胞接着分子 プロトカドヘリン カドヘリン 情動 扁桃体 不安 行動解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロトカドヘリン分子群は、カドヘリン超分子群の中でも最も数が多い多様な細胞接着分子群である。それらのほとんどが神経系に特異的に発現しており、神経回路形成やシナプス機能などに関わっていると考えられている。近年、プロトカドヘリンのいくつかは、自閉症の関連遺伝子や統合失調症の関連遺伝子として同定されるなど、プロトカドヘリン分子群が精神疾患と密接に結びついていることが注目されている。報告者のグループではこれまで Pcdh10 および Pcdh9 の研究に着手し解析を進めてきたが、さらにこれまで神経系で研究が遅れている Pcdh1 の解析を始めることにした。

2. 研究の目的

多様なプロトカドヘリン分子群が高次脳機能や精神疾患にどのように関与しているのかということ明らかにすることはこの分野の大きな課題である。本研究では Pcdh1 や Pcdh9 などのプロトカドヘリン分子群がニューロンでどのような機能を持ち、神経系でどのような働きをしているかを分子、細胞、組織レベルで明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

精神疾患との関連を探るために、各種プロトカドヘリンのノックアウトマウスを用いて、理化学研究所 BRC マウスクリニックにて標準化された一連の行動解析(明暗往来試験、オープンフィールドテスト、社会性行動テスト、ホームケージテスト、Y-迷路、恐怖条件付け試験、プレパルスインヒビションテスト)を行った。さらに、ビー玉隠しテスト、社会性記憶テストを行った。ノックアウトマウスの形態的な表現型の解析については、各種組織化学的手法を用いた。スパインの観察には脳スライスによるゴルジ染色や Thy-1 GFP をレポーターとしたトランスジェニックマウスの脳スライスを蛍光顕微鏡で観察した。神経回路の解析には凍結切片による DAPI や抗ニューロフィラメント抗体による染色などを行った。また、脳室の測定には CT を用いた。さらに、発現部位や発現細胞の同定およびタンパク質の局在の解明をするために、切片による *in situ* ハイブリダイゼーション(RNAscope)と切片や培養細胞での各種マーカー抗体を用いた免疫組織化学法を用いた。

4. 研究成果

(1) 細胞接着分子のプロトカドヘリン 1 (Pcdh1) を中心に、関連する Pcdh9 などの解析を進めた。Pcdh1 については、まず Pcdh1 遺伝子のプロモーター下流に lacZ 遺伝子の挿入されたノックインマウス(ヘテロ接合体)の脳スライスを用いて発現の解析を行った。その結果、成体の脳では海馬や扁桃体などに強く発現し、大脳皮質などにも弱く発現していることがわかった。この結果と Pcdh1 ノックアウトマウスの行動解析の結果(ノックアウトマウスにおいて社会性行動が亢進されるなど)について、北米神経科学会 Neuroscience 2018 にて発表を行った。Pcdh1 の細胞内領域に対するモノクローナル抗体を試みたが、いずれも組織染色に用いることのできる優れた抗体は得られなかった。

(2) Pcdh9 のノックアウトマウスの表現型の解析については、まず CT を用いた解析を行い、脳室が大きくなることを明らかにした。しかし、隣接する脳領域での細胞死の亢進は特に見られなかった。次に、このノックアウトマウスについては以前によって新奇物体を避けることがわかっていたため、情動に関連した行動解析を進めた。オープンフィールドテスト、ビー玉隠しテスト、社会性記憶テストを行ったところ、オープンフィールドテストでは、中心での滞在時間が低下する傾向がみられることが再現され、不安情動が高まっている可能性が確認された。しかし、ビー玉隠しテストでは、野生型との差はなく、単純な不安の亢進ではないことがわかった。また、社会性記憶テストを行ったところ、ノックアウトマウスでは一部の指標に低下が見られ、物体の認識や記憶に何らかの異常がある可能性が示唆された。以上のことからこのマウスでは視覚による認識を介した情動の惹起の過程に何らかの異常があることが示唆された。

ノックアウトマウスの行動異常の原因を探るために、脳組織や細胞レベルでの解析を試みた。まず、海馬のニューロンの培養を行い、グルタミン酸受容体などのシナプスマーカーを用いて Pcdh9 の局在を調べると、点状する Pcdh9 の一部は興奮性のシナプスに共局在していることがわかった。また、従来法であるゴルジ染色法および Thy-1-GFP トランスジェニックマウスと Pcdh9 ノックアウトマウスと交配したマウスを用いた蛍光観察によって、大脳皮質や海馬のニューロンの形態を観察した。その結果、ノックアウトマウスの海馬の CA1 ニューロンではスパインが減少していることが観察された(図1)。しかし、大脳皮質の錐体ニューロンではスパインの数に変化は見られなかった。

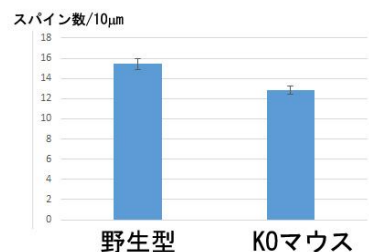


図1 Pcdh9 KOマウスの海馬ではスパイン密度が低下する。

次に、扁桃体における Pcdh9 の細胞レベルでの発現を in situ ハイブリダイゼーションを用いて調べた。その結果 Pcdh9 は、扁桃体では BLAp で特異的に発現しており、恐怖情動に関係すると報告されているエストロゲン受容体陽性細胞には発現が見られなかったが、恐怖情動を抑制する細胞として知られている Ppp1r1b 陽性細胞で発現していることが明らかになった(図2)。この結果から Pcdh9 は BLAp で不安などの情動形成に関わっている可能性が考えられた。

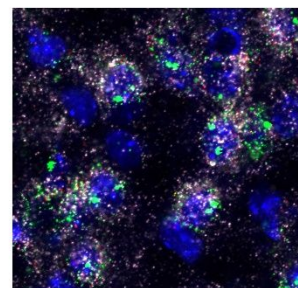


図2 Pcdh9 (緑)は、Ppp1r1b 陽性細胞(赤)で発現が見られる。CamKII (白)は興奮性ニューロンを示す。

これらの結果の一部は2019年の日本分子生物学会年会で発表を行った。研究期間を過ぎてしまったが、現在論文の準備中である。

(3) また、細胞外基質による上皮形成への影響と古典的カドヘリンとの関係について解析を行い、特定の細胞外基質が上皮の基本構造を誘導し、カドヘリンが上皮構造の安定化と促進をする可能性を示した。

以上の成果は、細胞接着分子研究ならびに神経機能研究分野において重要な知見を提供することになると考えられるが、まだメインの Pcdh1 および Pcdh9 に関する研究成果が学会発表のみで論文発表されていないため評価はこれからである。本研究テーマはこれで終わりではなく、Pcdh9 については早急に論文にまとめるとともに、Pcdh1 など他のプロトカドヘリンについても今後継続して研究行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Panzai SK, Luo Y, Vibulyaseck S, Sarpong GA, Nguyen-Minh VT, Nedelescu H, Hirano S, Sugihara I.	4. 巻 1
2. 論文標題 Reorganization of longitudinal compartments in the laterally protruding paraflocculus of the postnatal mouse cerebellum.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Comp Neurol.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.24849.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sarpong GA, Vibulyaseck S, Luo Y, Biswas MS, Fujita H, Hirano S, Sugihara I	4. 巻 526
2. 論文標題 Cerebellar modules in the olivo-cortico-nuclear loop demarcated by pcdh10 expression in the adult mouse.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Comp Neurol.	6. 最初と最後の頁 2406-2427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.24499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shintaro T Suzuki, Shuichi Obata, Miwako Fujiwara, Jun-Ichi Fujisawa, Shinji Hirano	4. 巻 -
2. 論文標題 Specific substrates composed of collagen and fibronectin support the formation of epithelial cell sheets by MDCK cells lacking β -catenin or classical cadherins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-021-03448-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 上村 允人、古瀬 民生、山田 郁子、岡野 圭子、田村 勝、平野 伸二
2. 発表標題 情動系神経回路における自閉症関連遺伝子 Pcdh9 の機能
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji Hirano, Tamio Furuse, Shungo Hayashizaki, Keiko Okano-Imai, Shigeharu Wakana
2. 発表標題 Deficiency of Protocadherin 1 cell adhesion molecule enhances social behavior in mice.
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (Annual meeting of Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 G. A. SARPONG, S. VIBULYASECK, Y. LUO, M. S. BISWAS, H. FUJITA, S. HIRANO, I. SUGIHARA
2. 発表標題 Cerebellar modules in the olivo-cortico-nuclear loop labeled by pcdh10 expression in the adult mouse
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (Annual meeting of Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古瀬 民生 (FURUSE Tamio) (60392106)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・開発研究員 (82401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 信太郎 (SUZUKI T. Shintaro)	関西医科大学・医学部・非常勤講師 (34417)	
連携研究者	上村 允人 (UEMURA Masato) (00525371)	関西医科大学・医学部・助教 (34417)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	佐藤 泰史 (SATO Yasufumi) (50381570)	関西医科大学・医学部・助教 (34417)	
連携研究者	岡野（今井） 圭子 (OKANO IMAI Keiko) (90454610)	関西医科大学・医学部・講師 (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関