

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07051

研究課題名(和文) 大脳皮質における時空間特異的なリーリン作用機構と意義の解明

研究課題名(英文) Mechanisms and significance of spatiotemporal specific Reelin function in the cerebral cortex

研究代表者

河野 孝夫 (Takao, Kohno)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授

研究者番号：70581742

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)：リーリンは、神経細胞の配置や形態を制御する分泌タンパク質であり、大脳皮質形成において必須の役割を持つ。近年、リーリンの機能低下が、精神神経疾患発症の一因となることがわかってきた。しかしリーリンが、いつどこで具体的に何を制御するのかは未解明である。本研究では、時空間的なリーリンの作用機序、およびその意義の解明を試み、新規リーリン受容体Nrp1が大脳皮質浅層神経細胞の樹状突起発達を制御すること、cofilinを介したリーリンシグナルが、海馬の遅生まれ神経細胞の配置を制御すること、生後脳へのリーリンの局所投与は、リーリン欠損により引き起こされる運動異常を一部回復することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質の正常な形成は脳機能に必須であり、その破綻は精神神経疾患の発症にかかわると考えられている。しかし、大脳皮質形成のメカニズムの詳細は未解明である。本研究では、特定の神経細胞の突起形成や配置を制御する、リーリンの新規作用を明らかにした。また、リーリンタンパク質の脳への局所投与が、脳機能異常の一部を回復することもわかった。これらは、脳が正常に形作られるメカニズム、ひいては脳構造異常を伴う病態の理解やその新規治療法に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Reelin is a secreted protein that regulates neuronal migration and morphology, and plays an essential role in cortical formation. Recently, the hypofunction of Reelin has been implicated in the pathogenesis of neuropsychiatric disorders. However, when, where, and what Reelin regulates remain unclear. Here, we tried to elucidate the importance and significance of the spatio-temporal Reelin functions in the cerebral cortex. We found that the novel Reelin receptor Nrp1 regulates dendrite development in superficial neocortical neurons, that Reelin signaling via cofilin controls the positioning of late-born hippocampal neurons, and that local administration of Reelin protein in the postnatal brain can partially rescue the motor abnormalities caused by Reelin deficiency.

研究分野：分子神経科学

キーワード：樹状突起 大脳皮質 リーリン ニューロピリン1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の大脳皮質は6層からなり、その破綻は統合失調症、読字障害などの発症に深く関与する。リーリンは、神経細胞の配置や形態を制御する分泌タンパク質である。近年、リーリンの機能低下が、精神疾患発症の一因となることがわかってきた。したがって、リーリンの機能制御機構を明らかにすることは、脳の形成や機能発現機構を理解し、それら破綻により生じる疾患を理解する上で極めて重要である。

リーリンは、神経細胞膜上の受容体 (VLDLR と ApoER2) と結合し、細胞内タンパク質 Dab1 をリン酸化する (図 1A)。このシグナルが大脳皮質形成に必要であることが、リーリンや Dab1 の欠損マウスの解析により明らかにされてきた。しかし、これらマウスでは、胎生初期から脳構造に大きな異常が見られるため、個々の細胞に対するリーリンの役割を明らかにすることは非常に難しかった。申請者は、種を超えて高度に保存されたリーリンの C 末端領域 (CTR: 図 1A) に着目し、以下の知見を得た。

- CTR を欠くノックイン (Δ C-KI) マウスでは、胎生期の神経細胞の配置は正常であるが、生後に浅層神経細胞の樹状突起発達が異常となる (図 1B; Kohno et al., 2015)。
- Δ C-KI マウスは精神疾患様の行動異常を示す (図 1B; Sakai et al., 2016)。

以上は、CTR に依存したリーリンの機能が時空間的に制御されており、これが正常な脳機能を発揮する上で重要であることを示唆する。申請者は、これまでに基盤研究 (C) 17K08281 の支援を受け、リーリン CTR に結合する新規膜タンパク質ニューロピリン 1 (Nrp1) を同定し、リーリンと Nrp1 との結合が CTR 内部の切断により制御されること、Nrp1 は既知リーリン受容体と複合体を形成すること、リーリン-Nrp1 の結合が浅層神経細胞の樹状突起発達に必要であることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

「時空間的なリーリンの作用は、どのように制御されているのか？またその意義は何か？」という問いを明らかにする。特に、以下の2点を明らかにする。

- Nrp1 を介したリーリンのシグナル伝達機構、およびその脳形成における重要性の解明
- 時空間的なリーリンタンパク質の投与が、脳構造および脳機能に与える影響の解明

3. 研究の方法

(1) 新規リーリン受容体 Nrp1 を介したリーリンシグナル伝達機構

これまでの検討より、Nrp1 はリーリンと VLDLR の結合を強めることを見出した。Nrp1 が共受容体として働くかをより明確にするために、COS-7 細胞に様々な組み合わせで各種リーリン受容体を発現させ、アルカリフォスファターゼ (AP) 融合リーリンとの結合性を定量的に解析する。また、培養神経細胞において Nrp1 をノックダウンし、リーリンとの結合性および下流シグナル伝達に与える影響を解析する。

(2) 海馬形成におけるリーリンおよび Nrp1 の重要性

Δ C-KI マウスの海馬は正常に形成されない。妊娠 Δ C-KI マウスにブロモデオキシウリジン (BrdU) を投与し、誕生日ごとに神経細胞をラベリングする。これにより、いつ生まれの神経細胞の移動に異常が見られるかを調べる。Nrp1 は海馬に高発現するため、海馬形成においても Nrp1 が関与する可能性がある。そこで子宮内電気穿孔法を用いて、Nrp1 ノックダウンベクターを海馬神経細胞に導入し、細胞配置や細胞形態を解析する。

(3) リーリン欠損マウスへの、時空間的なリーリンタンパク質の投与

Expi293 細胞に PA タグ付きリーリンを発現させ、多量のリコンビナントリーリンを回収した後、抗 PA 抗体を用いてこれを精製する。様々な時期のリーリン欠損マウス脳内に、精製リーリンを投与し脳構造の異常や行動に対する回復効果を調べる。

4. 研究成果

(1) AP 融合リーリンを用いた定量的解析から、切断を受けていない完全長 CTR を持つリーリンは、VLDLR 単独とは結合しにくい、Nrp1 と VLDLR を共発現する細胞に対しては強く結合できることがわかった。この結果から、Nrp1 は完全長 CTR を持つリーリンと VLDLR との結合を高める共受容体として働くことが強く示唆された。また、Nrp1 ノックダウン神経細胞にリーリンを添加し、下流シグナル分子 Dab1 のリン酸化誘導を調べたが、コントロール細胞との間に有意な差を見出すことができなかった。以上の結果と、申請者がこれまでに得たデータをまとめ、

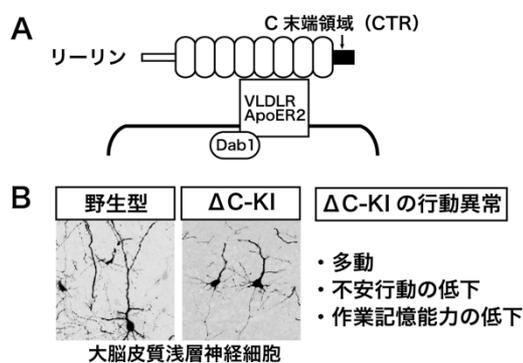


図 1. リーリンの作用機構と C 末端領域の意義

A. リーリンは神経細胞膜上のリーリン受容体 (VLDLR, ApoER2) に結合し、細胞内タンパク質 Dab1 をリン酸化する

B. CTR を欠くノックインマウス (Δ C-KI) では、浅層神経細胞の樹状突起が正常に発達せず、精神疾患様行動をしめす

J. Neurosci. 誌に発表した (Kohno et al., 2020)。本論文において、1) リーリンの CTR 内の切断により、リーリンと Nrp1 との結合が制御されること、2) 大脳皮質浅層に Nrp1 と VLDLR が共発現すること、3) Nrp1 はリーリンと VLDLR との結合を増強し、共受容体として機能すること、4) 大脳皮質の浅層神経細胞において、リーリン-Nrp1 結合が樹状突起発達に必要であること、を示した。以上から、Nrp1 を介したリーリンの新規作用が、浅層神経細胞の樹状突起発達を制御することが明らかとなった。

浅層神経細胞における樹状突起形成機構をより理解するため、BioID 法を用いた解析により、浅層神経細胞の膜直下に豊富に発現するタンパク質を複数同定した。このうち、ミオシン Va (Myo5a) に着目し研究を行った。Myo5a はアクチン上を移動するモータータンパク質の一つであり、その変異は精神発達遅滞やてんかんを呈するグリセリ症候群を引き起こす。培養神経細胞に Myo5a のドミナントネガティブ変異体 (DN-Myo5a) を過剰発現させたところ、神経突起の発達が著しく悪く、樹状突起の長さが短くなることがわかった。また、大脳皮質浅層神経細胞に DN-Myo5a を発現させると、その最終配置が異常となることもわかった。これらの結果から、Myo5a は浅層神経細胞の形態や移動に重要な役割を持つことが示唆された。今後、リーリン受容体を含めた種々の膜分子の局在決定における、Myo5a の重要性を調べる予定である。

(2) BrdU ラベリング解析の結果、 ΔC -KI マウスの海馬では、早生まれの神経細胞は概ね正常に配置される一方、遅生まれの神経細胞の移動が異常となり、脳室側に異所的に配置されることがわかった (図 2)。遅生まれ神経細胞において Nrp1 のノックダウンを行ったところ、樹状突起の長さは短くなるが、配置には影響を与えなかった。これらのことから、リーリン CTR を介したシグナルは、海馬において遅生まれ神経細胞の配置を制御すること、これに Nrp1 は関与しないことが明らかとなった。

ΔC -KI マウスの海馬では、アクチン骨格制御タンパク質である cofilin のリン酸化量が顕著に低下していた。子宮内電気穿孔法により擬似リン酸化 cofilin を ΔC -KI マウスに過剰発現させたところ、神経細胞の配置異常が一部回復した (図 2)。以上から、リーリンは cofilin のリン酸化を介した細胞骨格制御により、遅生まれの神経細胞の移動を制御することが示唆された。以上のデータをまとめ、Mol. Cell. Neurosci. 誌に発表した (Ishii et al., 2023a)。

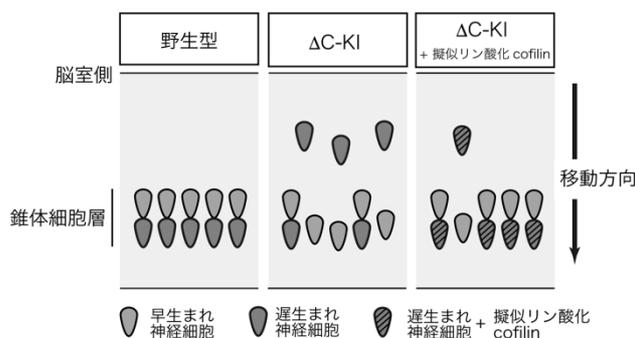


図 2. ΔC -KI マウス海馬における神経細胞異常配置と、擬似リン酸化 cofilin 過剰発現によるその回復

(3) 発生後期から生後初期のリーリン欠損マウス大脳皮質に、リーリンタンパク質を投与したが、いずれの場合においても脳構造異常の回復は観察されなかった。この検討の過程で、リーリン欠損マウスの生後小脳へリーリンを投与すると、前足の協調性運動が改善されることを見出した。さらに、小脳切片の組織免疫染色から、リーリン投与によりプルキンエ細胞の一部が層状に並ぶこともわかった。これらの知見から、リーリン欠損マウスの小脳プルキンエ細胞は、生後においてもリーリンに反応する能力を持つことが示唆された。これら成果は、Neurosci. Res. 誌に発表した (Ishii et al., 2023b)。

5. 引用文献

Ishii, K., Kohno, T., Sakai, K., and Hattori, M. (2023a). Reelin regulates the migration of late-born hippocampal CA1 neurons via cofilin phosphorylation. **Mol. Cell. Neurosci.** 124, 103794.

Ishii, K., Kohno, T., and Hattori, M. (2023b). Postnatal injection of Reelin protein into the cerebellum ameliorates the motor functions in reeler mouse. **Neurosci. Res.** In press

Kohno, T., Honda, T., Kubo, K. I., Nakano, Y., Tsuchiya, A., Murakami, T., Banno, H., Nakajima, K., and Hattori, M. (2015). Importance of reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis. **J. Neurosci.** 35, 4776-4787.

Kohno, T., Ishii, K., Hirota, Y., Honda, T., Makino, M., Kawasaki, T., Nakajima, K., and Hattori, M. (2020). Reelin-Nrp1 interaction regulates neocortical dendrite development in a context-specific manner. **J. Neurosci.** 40, 8248-8261.

Sakai, K., Shoji, H., Kohno, T., Miyakawa, T., and Hattori, M. (2016). Mice that lack the C-Terminal region of Reelin exhibit behavioral abnormalities related to neuropsychiatric disorders. **Sci. Rep.** 6, 28636.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishii Keisuke, Kohno Takao, Sakai Kaori, Hattori Mitsuharu	4. 巻 124
2. 論文標題 Reelin regulates the migration of late-born hippocampal CA1 neurons via cofilin phosphorylation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103794 ~ 103794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcn.2022.103794	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 Nakao Yousuke, Yokawa Satoru, Kohno Takao, Suzuki Takahiro, Hattori Mitsuharu	4. 巻 171
2. 論文標題 Visualization of Reelin Secretion from Primary Cultured Neurons by Bioluminescence Imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 591 ~ 598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac019	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 Sawahata Masahito, Asano Hiroki, Nagai Taku, Ito Norimichi, Kohno Takao, Nabeshima Toshitaka, Hattori Mitsuharu, Yamada Kiyofumi	4. 巻 173
2. 論文標題 Microinjection of Reelin into the mPFC prevents MK-801-induced recognition memory impairment in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacological Research	6. 最初と最後の頁 105832 ~ 105832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phrs.2021.105832	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 Okugawa Eisuke, Ogino Himari, Shigenobu Tomofumi, Yamakage Yuko, Tsuiji Hitomi, Oishi Hisashi, Kohno Takao, Hattori Mitsuharu	4. 巻 10
2. 論文標題 Physiological significance of proteolytic processing of Reelin revealed by cleavage-resistant Reelin knock-in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-020-61380-w	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 Ibi Daisuke, Nakasai Genki, Koide Nayu, Sawahata Masahito, Kohno Takao, Takaba Rika, Nagai Taku, Hattori Mitsuharu, Nabeshima Toshitaka, Yamada Kiyofumi, Hiramatsu Masayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Reelin Supplementation Into the Hippocampus Rescues Abnormal Behavior in a Mouse Model of Neurodevelopmental Disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	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) 10.3389/fncel.2020.00285	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 Kohno Takao, Ishii Keisuke, Hirota Yuki, Honda Takao, Makino Makoto, Kawasaki Takahiko, Nakajima Kazunori, Hattori Mitsuharu	4. 巻 40
2. 論文標題 Reelin-Nrp1 Interaction Regulates Neocortical Dendrite Development in a Context-Specific Manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8248 ~ 8261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1907-20.2020	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 Nagae Masamichi, Suzuki Kei, Yasui Norihisa, Nogi Terukazu, Kohno Takao, Hattori Mitsuharu, Takagi Junichi	4. 巻 169
2. 論文標題 Structural studies of reelin N-terminal region provides insights into a unique structural arrangement and functional multimerization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 555 ~ 564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa144	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 Tsuneura Yumi, Sawahata Masahito, Itoh Norimichi, Miyajima Ryoya, Mori Daisuke, Kohno Takao, Hattori Mitsuharu, Sobue Akira, Nagai Taku, Mizoguchi Hiroyuki, Nabeshima Toshitaka, Ozaki Norio, Yamada Kiyofumi	4. 巻 144
2. 論文標題 Analysis of Reelin signaling and neurodevelopmental trajectory in primary cultured cortical neurons with RELN deletion identified in schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104954 ~ 104954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104954	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 Hattori Mitsuharu, Kohno Takao	4. 巻 169
2. 論文標題 Regulation of Reelin functions by specific proteolytic processing in the brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 511 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab015	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18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梅村悠太、大嶋智葉、中島鼓美、松田拓与、川瀬宗之、徳永柊、大石久史、築地仁美、河野孝夫、服部光治
2. 発表標題 脳におけるリン脂質フリッパーゼの機能解明
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹腰祐斗、安藤飛悠吾、河野孝夫、有田誠、服部光治
2. 発表標題 分泌タンパク質リーリンの 神経細胞の膜脂質組成に与える影響の解明
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原光輝、河野孝夫、石井圭介、服部光治
2. 発表標題 脳の発生と機能に必須の細胞内タンパク質Dab1の新規リン酸化メカニズム
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹腰祐斗、安藤飛悠吾、河野孝夫、有田誠、服部光治
2. 発表標題 分泌タンパク質リーリンは神経細胞膜の脂質組成制御に関わる
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅村悠太、中島鼓美、松田拓与、川瀬宗之、徳永柊、河野孝夫、大石久史、服部光治
2. 発表標題 酸性リン脂質フリッパーゼ欠損による神経変性疾患の発症機構と、その治療法に関する研究
3. 学会等名 第21回次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷口愛理、伊東里彩、方衛、河野孝夫、服部光治
2. 発表標題 なぜヒトのリーリンはマウスのリーリンほど分泌されないのか？
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹腰祐斗、安藤飛悠吾、河野孝夫、有田誠、服部光治
2. 発表標題 神経細胞膜の脂質組成に対するリーリンシグナルの影響
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井圭介、河野孝夫、酒井かおり、服部光治
2. 発表標題 リーリンはコフィリンのリン酸化を介して発生後期に産生された海馬CA1神経細胞の移動を制御する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原光輝、河野孝夫、大澤匡弘、服部光治
2. 発表標題 分泌タンパク質リーリンの特異的分解の生理的意義の解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 常浦 祐未、澤幡 雅仁、伊藤 教道、宮島 遼也、森 大輔、河野 孝夫、服部 光治、松木 亨、中山 敦雄、祖父江 顕、永井 拓、溝口 博之、鍋島 俊隆、尾崎 紀夫、山田 清文
2. 発表標題 RELN遺伝子欠失を有するマウスの大脳皮質由来初代培養細胞におけるReelinシグナルの解析とADAMTS-3ノックダウンの効果
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅村 悠太、大嶋 智葉、中島 鼓美、大石 久史、築地 仁美、河野 孝夫、服部 光治
2. 発表標題 脳におけるリン脂質フリッパーゼの機能解明
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井 圭介、河野 孝夫、服部 光治
2. 発表標題 出生後におけるリーリントンパク質脳内投与は、リーリン遺伝子の欠損を補えるか？
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅村 悠太、大嶋 智葉、中島 鼓美、川瀬 宗之、大石 久史、築地 仁美、河野 孝夫、服部 光治
2. 発表標題 脳におけるリン脂質フリッパーゼの機能の解明
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井 圭介、河野 孝夫、服部 光治
2. 発表標題 出生後におけるリーリントンパク質脳内投与は、リーリン遺伝子の欠損を補えるか？
3. 学会等名 第20回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原 光輝、河野 孝夫、石井 圭介、服部 光治
2. 発表標題 脳の層構造の形成に必須であるDab1の新規リン酸化メカニズム
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹腰 祐斗、安藤 飛悠吾、河野 孝夫、有田 誠、服部 光治
2. 発表標題 神経細胞膜の脂質組成に対するリーリンの影響の解明
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾洋介、横川慧、河野孝夫、鈴木崇弘、服部光治
2. 発表標題 生物発光イメージングを用いたリーリン分泌の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重信奉文、奥川英介、大石久史、河野孝夫、服部光治
2. 発表標題 分解抵抗性リーリンノックインマウスを用いた、海馬におけるリーリン分解の生理的
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>神経細胞が正しく突起を発達させる新たなメカニズムを発見 https://www.nagoya-cu.ac.jp/media/20201012_1.pdf</p> <p>Reelin-Nrp1 interaction regulates neocortical dendrite development https://www.eurekalert.org/pub_releases/2020-10/ncu-ri101520.php</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------