

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640021

研究課題名(和文) 中枢神経系における経軸索性細胞間相互認識に関する研究

研究課題名(英文) Research on trans-axonic intercell-recognition in the central nervous system

研究代表者

佐藤 康二 (SATO, KOHJI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：80235340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系における骨形成因子シグナル系の経軸索性細胞間相互認識への関与をについて検討を加え、骨形成因子シグナル分子、また、その受容体そして、阻害蛋白ともに、細胞質に加えて、樹状突起、軸索、さらには、細胞外にも豊富に発現していることを明らかとすることができた。このことは、骨形成因子シグナル系が投射ニューロンとそれを受容するニューロン間で経軸索性細胞間相互認識に関与していることが考察できる。今後、実際にこの相互認識がどのような情報を伝えているかを明らかとしていきたい。

研究成果の概要(英文)：We studied whether BMP signaling pathways are involved in trans-axonal intercell-recognition in the central nervous system. And we found that BMPs, their receptors and their antagonists were abundantly expressed in cell bodies, dendrites, axons and extracellular space. This means that BMP signaling pathways are involved in trans-axonal intercell-recognition between projecting neurons and their receiving neurons. In future, we want to reveal which kinds of information are transmitted by this system.

研究分野：神経解剖学

キーワード：骨形成因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系における局所での回路形成やシナプス形成においてどのような細胞間シグナルが働いているのかは、研究開始当初、ほとんど明らかとなっていなかった。その後の解析で、我々は、我々がクローニングした BMP 阻害タンパクであるニューロジェネシンが胎生期ラットの知覚神経上行路において、growth associated protein (GAP-43) と共存して発現することを発見していた。

(2) GAP-43 は軸索伸張時やシナプス形成時に特異的に発現する蛋白であり、ニューロジェネシンも同様の現象に関与しているとのことが示唆された。また、我々は様々な軸索に BMP シグナリング系が発現していることを明らかにしてきた。このことは、BMP シグナリング系が経軸索性ニューロン相互認識メカニズムに関与することが強く示唆された。

## 2. 研究の目的

(1) 位置的にも入り乱れた中枢神経系の複雑な回路を形成・維持するには、経軸索性ニューロン相互認識メカニズムが不可欠である。我々の cloning した骨形成因子のアンタゴニストであるニューロジェネシンは、知覚性上行路に特化して発現しており、知覚神経回路の経軸索性ニューロン相互認識メカニズムに、骨形成因子シグナル系が関与することを強く示唆していた。

(2) 本研究では、主に、神経解剖学的・神経生理学的手法を用いて、骨形成因子シグナル系の経軸索性ニューロン相互認識メカニズムへの関与を研究することとした。また、我々は、骨形成因子シグナル系が、局所での合目的なシナプス形成に重要なはたらきをしているという仮説に立ってそれを証明していくことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 骨形成因子(BMP)シグナリング系関連蛋白の詳細な発現動態を in situ hybridization 法、免疫組織化学法によって詳細に調べる。さらに、免疫電顕法を用いて、BMP シグナリング系関連蛋白の細胞内、細胞外の局在を詳細に検討した。また、後根神経節細胞を始めとする初代培養において、培地内に各種

BMP 蛋白や BMP アンタゴニストを加え、それらのニューロンの軸索伸展様式について検討を加えた。

(2) 各種遺伝子導入法を用いて、BMP 蛋白や BMP アンタゴニストの遺伝子、あるいはニューロジェネシンの dominant negative 蛋白をマウス胚の様々な神経系の回路形成領域に強制発現させ、その後の回路形成、シナプス形成について検討を加えた。ニューロジェネシンノックアウトマウスを始めとした、骨形成因子シグナリング系関連蛋白遺伝子改変動物を用いての研究を行った。

## 4. 研究成果

(1) BMP シグナリング系関連蛋白の回路発生に伴う発現の形態学的解析: 中枢神経系においては、感覚性上行路、運動性下行路、及び、連合線維、交連線維、モノアミン系、アセチルコリン系、あるいは投射ニューロンやインターニューロンなど、様々な回路が時間的にも、空間的にも入り乱れて発達していく。そこで、BMP シグナリング系が様々な回路形成に与える影響を調べる第一段階として、BMP シグナリング系関連蛋白、すなわちリガンド、アンタゴニスト、受容体の詳細な発現動態の解析が必須となる。BMP2-15、また、既知の BMP アンタゴニストである noggin, chordin, そしてニューロジェネシンの遺伝子、さらには受容体として BMPRIA, BMPRII, BMPRI、さらにはアクチビン受容体等の蛋白の発現の発生に伴う発現変化を、胎仔と種々の生後齢のラットにおいて、in situ hybridization 法、免疫組織化学法によって詳細に調べた。さらに、様々な回路に特異的なマーカーを用いて、各々の神経回路形成における BMP シグナリング系関連蛋白の時間的・空間的関与についての情報を得た。

(2) アンタゴニストである chordin は、中枢神経に広く発現しており、大脳皮質、海馬、視床、視床下部、嗅球、大脳基底核、脳幹、小脳等において、強い発現が見られた。また、さらに詳細に観察すると、大脳皮質の錐体細胞の起始部に強い発現が見られるなど多くの興味深い所見が得られた(図 1 参照)。このことは、錐体細胞の起始部において BMP シグナリングが強い影響力を持っていることを端的に示していた。

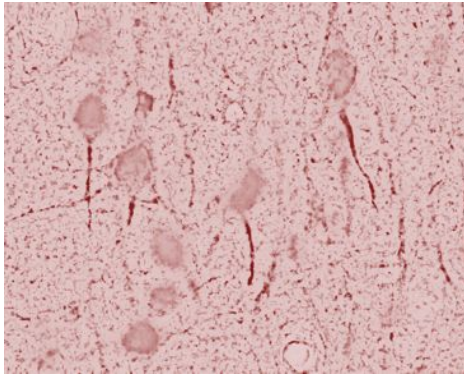


図 1. 大脳皮質第五層における chordin の発現

(3) BMP シグナリング系関連蛋白のうち分泌蛋白であるリガンド、アンタゴニストについて細胞内、細胞外の局在を、免疫電顕法を用いて、詳細に検討した。これまでの、我々の研究で、BMP2, BMP4, ニューロジェネシン、noggin 等の蛋白が、dendrite や axon から分泌され、シナプス間隙に豊富に発現している所見が得られていた。さらに、大脳皮質第三層の錐体細胞の apical dendrite で、BMPRIA, BMPRIB の二つの受容体蛋白が多様性を持って存在することが観察されており、このことは、BMP シグナリング系の違いにより apical dendrite に接着するプレシナプスが規定され得る可能性を示唆している。そこで、プレシナプスのマーカーと、ポストシナプスのマーカーを組み合わせることにより、どのシナプスの近傍に、どの BMP シグナリング系が働いているかの情報を得ることができ、シナプス形成に於ける BMP シグナリング系の関与を明らかとした。

(4) 各種遺伝子導入法を用いて、BMP 蛋白や BMP アンタゴニストの遺伝子、あるいはニューロジェネシンの dominant negative 蛋白をマウス胚の様々な神経系の回路形成領域に強制発現させ、その後の回路形成、シナプス形成について免疫組織化学法、免疫電顕法などを用いて検討を加えた。さらに、知覚性上行路においては、後根神経節に存在する一次知覚ニューロンが、二次ニューロンとの回路形成において、骨形成因子シグナリング系関連蛋白がその投射先である上位ニューロンを規定する可能性を調べるために、tracer 法を用いて、targeting の乱れについて検討した。さらには、モノアミン系を始め様々な神経回路について、同様の実験を行った。

(5) 各種遺伝子改変動物に対する検討：各種遺伝子改変動物の神経系を中心にそのマクロな表現系を解析した。更に、免疫組織化学法、免疫電顕法をもちいて、神経系の微細構造の変化について観察した。更には、逆行性、あるいは順行性 tracer を用いて、様々な神経回路の targeting の異常について詳細に検討した。更に、各種遺伝子改変動物について、知覚や運動、行動の異常の有無を検討した。また、ノックアウトマウスから、各種ニューロンの初代培養やスライス培養を調整し、BMP シグナル関連蛋白を培地に加えたときの軸策伸張の様子を、ワイルドタイプマウスと比較した。

(6) 以上の検討から、BMP シグナリング系関連蛋白が多様性を持って経軸索性ニューロン相互認識メカニズムに関与していることが明らかとなった。

## 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 8 件)

(1) T. Sasaki, Y. Kawabata, N. Suzuki, H. Tanaka, M. Sano, S. Kato, A. Takemura, N. Unno, T. Kojima, Kohji Sato. The Decrease in D2-40 Immunoreactivity of Stored Paraffin Sections and Preservation Methods to Keep the D2-40 Immunoreactivity. *Biotechnic and Histochemistry*. 査読有、2013.

(2) Kohji Sato. Why does serotonergic activity drastically decrease during REM sleep? *Medical Hypotheses*. 査読有、Vol.81, No.4, 2013, pp.734-737.  
DOI : 10.1016/j.mehy.2013.07.041.

(3) Kohji Sato. Minimum dynamic core in consciousness. *Journal of Theoretical Biology*. 査読有、Vol.343, 2014, pp.208-210.  
DOI : 10.1016/j.jtbi.2013.09.034.

(4) S. Mikawa, Kohji Sato. Chordin expression in the adult rat brain. *Neuroscience*. 査読有、Vol.258, 2014, pp.16-33.  
DOI :10.1016/j.neuroscience.2013.11.006.

(5) Kohji Sato. Placenta-derived hyper-serotonin situations in the developing forebrain cause autism. Journal of Brain Science. 査読有、Vol.43, 2014, pp.24-42.

(6) M. Sano, T. Sasaki, S. Hirakawa, J. Sakabe, M. Ogawa, S. Baba, N. Zaima, H. Tanaka, K. Inuzuka, N. Yamamoto, M. Setou, Kohji Sato, H. Konno, N. Unno. Lymphangiogenesis and angiogenesis in abdominal aortic aneurysm. PLoS One. 査読有、Vol.9, No.3, 2014, pp. e89830.

DOI:10.1371/journal.pone.0089830. eCollection 2014.

(7) Y. Kusakawa, S. Mikawa, Kohji Sato. BMP5 expression in the adult rat brain. Neuroscience. 査読有、Vol.284, 2015, pp.972-987.

DOI : 10.1016/j.neuroscience.2014.07.057.

(8) S. Yamagishi, K. Yamada, M. Sawada, S. Nakano, N. Mori, K. Sawamoto, Kohji Sato. Netrin-5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain.

Frontiers in Cellular Neuroscience. In press  
査読有。

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 康二 (SATO KOHJI)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80235340

### (2)研究分担者

三河 須美子 (MIKAWA SUMIKO)  
浜松医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70359743