

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07105

研究課題名(和文)細胞外マトリックス分子ビトロネクチンによる小脳顆粒前駆細胞の軸索決定制御

研究課題名(英文) Regulation of axon specification by an extracellular matrix protein, vitronectin in cerebellar granule cell precursors

研究代表者

宮本 泰則 (MIYAMOTO, YASUNORI)

お茶の水女子大学・ヒューマンライフイノベーション研究所・准教授

研究者番号：50272737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞は、たがいに軸索を伸ばし、神経回路を形成している。この神経回路が、動物の高度な活動を支えている。この軸索が形成される過程において、最初複数の未熟な突起が形成され、その中から1本か2本の軸索が決定される。申請者は、この軸索決定がどのような機構で行われるかに着目した。特に細胞外マトリックス分子である、ビトロネクチンの効果に着目した。その解析の結果、ビトロネクチンは、受容体である $\alpha 5$ インテグリンを介し、PI3キナーゼ、GSK3 の経路により、軸索を決定することを明らかにした。さらに、軸索決定に関わる細胞極性についてもビトロネクチンが関係していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軸索決定は、軸索再生にも関わる現象で、多くの研究者が関心を持っている現象である。これまで、海馬神経細胞を使って細胞内のシグナル経路に関して明らかにされてきたが、この細胞内経路を刺激する細胞外シグナルについて未知であった。この細胞外シグナルを明らかにすることにより、神経細胞の軸索決定を細胞外から制御可能になる意義は高い。このことは、損傷等により失われた神経を再生する際の軸索決定にも貢献でき、これまで直すことができなかった神経損傷への治療の一步となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Nerve cells extend their axons to form neural circuits. This neural circuit supports the high activity of animals. In the process of formation of the axon, multiple immature processes are first formed, and one or two axons are determined from them. The applicant focused on the mechanism by which this axon specification is made. Especially, we focused the role of an extracellular matrix molecule, vitronectin. As a result of the analysis, it was revealed that vitronectin promotes the specification of axons via the pathway of PI3 kinase - GSK3beta, mediated by its receptor, $\alpha 5$ integrin. Furthermore, it was clarified that vitronectin is involved in cell polarity involved in axon specification.

研究分野：神経生物学

キーワード：ビトロネクチン 軸索決定 小脳顆粒細胞 インテグリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

小脳を構成している神経細胞の大多数を占める顆粒細胞の増殖分化、細胞移動、軸索形成の制御は、小脳形成において重要な要因である。細胞外マトリックスも小脳顆粒前駆細胞の制御因子として研究が進められていた。特にビトロネクチンは、顆粒前駆細胞の増殖抑制、分化促進、また突起伸長機能が国内外で報告されていた（Murase, S. and Hayashi, Y., 1998; Pons, S., *et al.*, 2001）。申請者も小脳顆粒前駆細胞の初期分化の進行をビトロネクチンが進行をすることを明らかにしていたが（Hashimoto, K., *et al.*, 2016）、初期分化進行がどのような意義があるのかについて不明であった。

また、軸索決定についても、細胞内シグナル経路として、CRMP2 が軸索決定を担っていることが明らかにされている（Inagakaki, N., *et al.*, 2001）。しかし、細胞外のどのような刺激が細胞内の CRMP2 の活性を制御するのが不明であった。

2. 研究の目的

軸索決定は、神経細胞の軸索形成の最初の段階に深くかかわっている。最初、未熟な突起が多数生じるが、その中から 1 本か 2 本の軸索が決定される。この過程は、軸索形成において重要な過程であることからその制御機構解明は必須な事項である。申請者は、この軸索決定を細胞外マトリックス分子ビトロネクチンが制御するのではないかと仮説を立て、この仮説を検証すること、そしてビトロネクチンの受容体及び制御する細胞内シグナル経路の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ビトロネクチンノックアウト (KO) マウス及びビトロネクチン添加による軸索本数への影響

軸索決定をもしビトロネクチンが制御しているのであれば、ビトロネクチンを KO したとき軸索の本数が減少し、またビトロネクチンを添加した時、軸索の本数が増えると判断した。生後 6 日目の野生型マウス及びビトロネクチン KO マウスから小脳顆粒前駆細胞の培養系で、軸索マーカー Tau 1 で染色することにより軸索を同定し、軸索の本数を解析した。

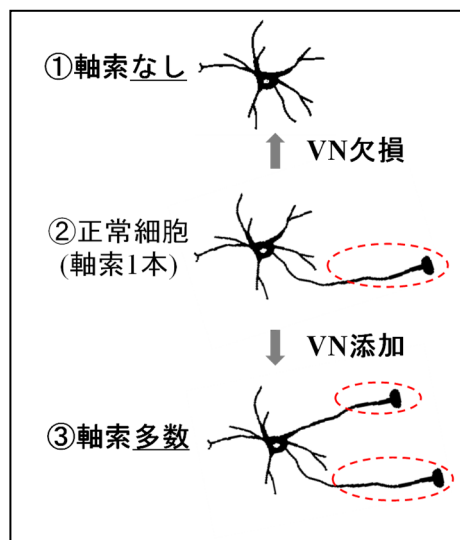


図 1 ビトロネクチン (VN) による軸索本数への影響

(2) レンチウイルスを用いた $\beta 5$ インテグリンのノックダウン (KD) 及び過剰発現

小脳顆粒前駆細胞の培養系において、 $\beta 5$ インテグリンのノックダウン (KD) や過剰発現を行うためには、shRNA 発現や $\beta 5$ インテグリン発現レンチウイルスを用いて行う。レンチウイルスは、非分裂細胞においても目的の遺伝子や shRNA を発現させることができ、神経細胞での発現に優れている。

① $\beta 5$ インテグリンによる軸索本数への影響 (軸索マーカー Tau1 染色)

軸索決定が進めば、軸索になる本数の増大や軸索長の伸長が見られると思われるし、逆に軸

索決定が阻害されれば本数減少や軸索長の退縮が推察される。軸索マーカーTau1 に対する蛍光染色した CGCP の画像から、軸索本数や長さを ImageJ などの画像解析などを使い計測していく。その際に、感染した細胞を特定するために、レンチウイルスには、蛍光タンパク質 GFP の遺伝子あるいは Myc タグが組み込まれており、これらの蛍光染色により感染細胞を特定する。

(3) ビトロネクチンから受容体を介した軸索決定は、どのシグナル経路により担われているのか？

① 阻害剤を用いたシグナル経路の検討

これまでの海馬の神経細胞を用いた研究の報告では、PI3K-Akt 経路が軸索決定に関わっていることが知られている。この経路の各因子に対する特異的な阻害剤による軸索決定への影響を解析する。

② Neuro2a 細胞再構成系によるシグナル経路の検証

小脳顆粒前駆細胞において、ビトロネクチンからのシグナルが上記経路を活性化していることを各種因子のリン酸化レベル変化で追いたいところであるが、顆粒前駆細胞の培養系では、様々な分化段階の細胞が混在している点、また初代培養のため細胞をシグナル経路解析に安定的に使うことが、難しいと予想される。そのため、神経芽腫細胞株 Neuro2a 細胞に・5 インテグリンを過剰発現させ、その細胞にビトロネクチンを添加し、Akt や GSK3 β のリン酸化レベルをウエスタンブロットを用い検証していく。

(4) ビトロネクチンによる神経芽腫 Neuro2a 細胞における多極性—双極性遷移の促進

神経芽腫細胞株 Neuro2a 細胞は、レチノイン酸により多極性から総教区性に形態が遷移し、神経様の突起を形成する。この系において、ビトロネクチンを添加し、携帯への影響を調べ。さらに極性関連因子 Par との関連をも調べる。

4. 研究成果

(1) ビトロネクチンノックアウト (KO) マウス及びビトロネクチン添加による軸索本数への影響

ビトロネクチン (VN) KO マウス (-/-) 由来の小脳顆粒前駆細胞は、野生型のマウス (+/+) と比較して、No axon の割合が多く、Single axon の割合が低かった (図2)。また、野生型の小脳顆粒前駆細胞に対して、VN 添加をした時も、多数の突起を持つ細胞が増えるなどの有意な効果が見られた (図2)。これらの結果は、ビトロネクチンが軸索決定を促進することを示している。

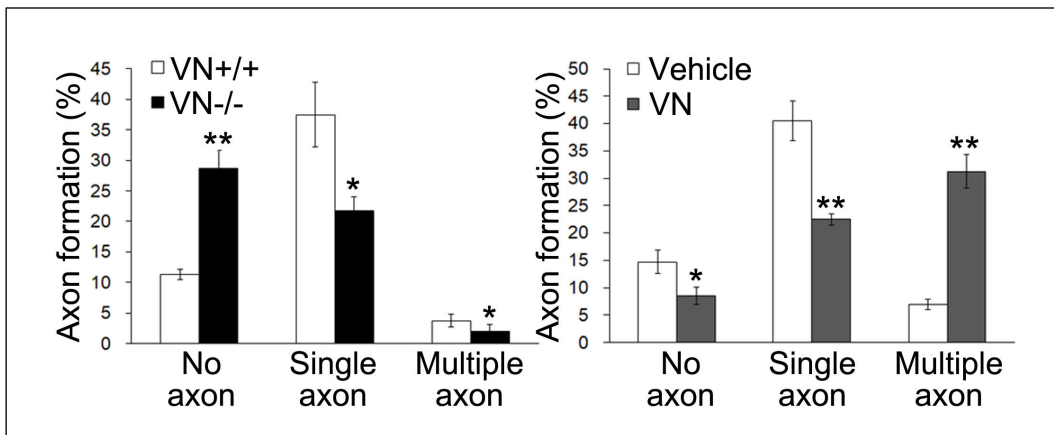


図2 ビトロネクチン (VN) による軸索本数への効果

(2) レンチウイルスを用いたβ5 インテグリンのノックダウン (KD) 及び過剰発現

β5 インテグリンの shRNA 発現レンチウイルスを小脳顆粒前駆細胞に添加し、その効果を見た。その結果、β5 インテグリンの KD により軸索のない細胞の割合が顕著に増大した。また、VN 添加による軸索本数増大の効果は、β5 インテグリンのノックダウンによりその効果が消失することが明らかにされた (図3)。さらに β5 インテグリンを過剰発現するレンチウイルスを添加したところ、複数の軸索を持つ細胞の割合の増大が見られた。β5 インテグリンを過剰発現している細胞においてビトロネクチンを添加すると相乗的に軸索の本数が増えていった (図3)。

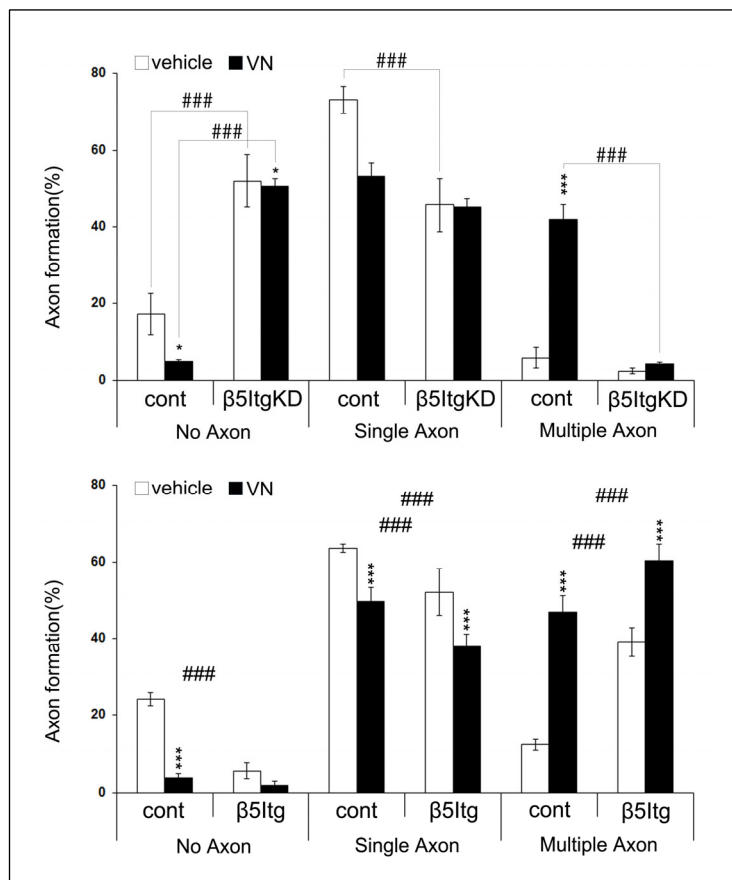


図3 β5 インテグリンによる軸索本数への効果

(3) ビトロネクチンから受容体を介した軸索決定に関わるシグナル経路の解析

軸索決定のシグナル経路について、阻害剤を用いて解析を行った。

まず、PI3 キナーゼの阻害剤である Wortmannin を添加したところ、軸索の形成が顕著に阻害された(図4)。また、GSK3 β の阻害剤である LiCl の添加により軸索の本数の増大が観察され、PI3 キナーゼ-GSK3 β の経路が関与していることが示された。

神経芽腫 Neuro2a を使って、ビトロネクチンから GSK3 β までの経路を確認したところ、この経路が有効であることを確認した。

(4) 多極性から双極性遷移に対するビトロネクチンの効果

ロネクチンの効果

神経芽腫にレチノイン酸を添加することにより、多極性から双極性の形態へと遷移することが知られているが、この形態変化へのビトロネクチンの効果を見たところ、有意な促進効果が見られた (Sugahara, M., *et al.*, 2019)。

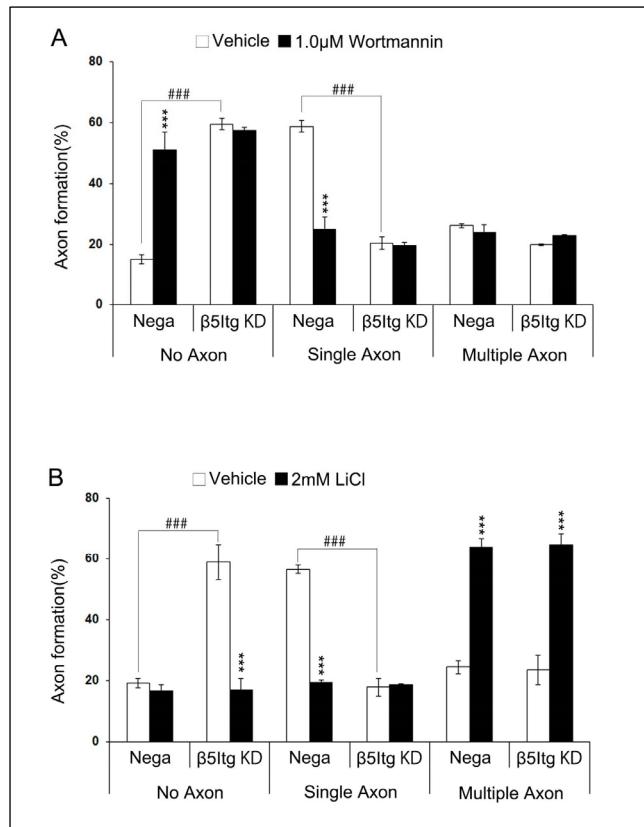


図4 各種阻害剤の軸索決定への効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Kei HASHIMOTO, Mari NAKASHIMA, Ayana HAMANO, Mari GOTOH, Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Kimiko MURAKAMI-MUROFUSHI, Yasunori MIYAMOTO	4. 巻 8
2. 論文標題 2-carba cyclic phosphatidic acid suppresses inflammation via regulation of microglial polarization in the stab-wounded mouse cerebral cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-018-27990-1	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 Kasumi Higashine, Kei Hashimoto, Emi Tsujimoto, Yuko Oishi, Yokichi Hayashi, Yasunori Miyamoto.	4. 巻 686
2. 論文標題 Promotion of differentiation in developing mouse cerebellar granule cells by a cell adhesion molecule BT-IgSF	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience letters	6. 最初と最後の頁 87-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.049	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 Momoka Hayashida*, Kei Hashimoto*, Tomoko Ishikawa, Yasunori Miyamoto	4. 巻 100
2. 論文標題 Vitronectin deficiency attenuates hepatic fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis-induced mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Experimental Pathology	6. 最初と最後の頁 72 ~ 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1111/iep.12306	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 Miyaka Sugahara, Yuri Nakaoki, Ayano Yamaguchi, Kei Hashimoto, and Yasunori Miyamoto	4. 巻 44
2. 論文標題 Vitronectin is involved in the morphological transition of neurites in retinoic acid-induced neurogenesis in the neuroblastoma cell line Neuro2a	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 1621 ~ 1635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s11064-019-02787-4	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 Hashimoto Kei, Kajitani Naoyo, Miyamoto Yasunori, Matsumoto Ken-ichi	4. 巻 363
2. 論文標題 Wound healing-related properties detected in an experimental model with a collagen gel contraction assay are affected in the absence of tenascin-X	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 102 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.12.025	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 Hashimoto Kei, Ikeda Natsumi, Nakashima Mari, Ikeshima-Kataoka Hiroko, Miyamoto Yasunori	4. 巻 34
2. 論文標題 Vitronectin Regulates the Fibrinolytic System during the Repair of Cerebral Cortex in Stab-Wounded Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 3183 ~ 3191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1089/neu.2017.5008	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 Abe Ayaka, Hashimoto Kei, Akiyama Ayumi, Iida Momoe, Ikeda Natsumi, Hamano Ayana, Watanabe Riho, Hayashi Yokichi, Miyamoto Yasunori	4. 巻
2. 論文標題 v 5 integrin mediates the effect of vitronectin on the initial stage of differentiation in mouse cerebellar granule cell precursors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain 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) https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.025	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14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大石佑子、橋本恵、阿部彩香、黒田真帆、宮本泰則
2. 発表標題 Vitronectin deficiency attenuates hepatic fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis-induced mouse model
3. 学会等名 アメリカ細胞生物学会大会 (ASCB EMB02019 meeting)、ウォルターE ワシントンコンベンションセンター、2019/12
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島麻里、橋本恵、濱野文菜、池島宏子、後藤真里、室伏きみ子、宮本泰則
2. 発表標題 2-carba cyclic phosphatidic acid contributes to the repair of stab-wounded cerebral cortex via regulation of microglial and astrocyte cells
3. 学会等名 アメリカ細胞生物学会大会 (ASCB EMB02019 meeting)、ウォルターE ワシントンコンベンションセンター、2019/12
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石佑子、橋本恵、阿部彩香、黒田真帆、宮本泰則
2. 発表標題 Vitronectin promotes the axon specification of cerebellar granule cells via the PI3-kinase/GSK3beta pathway
3. 学会等名 Neuro2019、2019/7
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島麻里、橋本恵、濱野文菜、池島宏子、後藤真里、室伏きみ子、宮本泰則
2. 発表標題 2-carba cyclic phosphatidic acid suppresses the activation of astrocytes in the stab-wounded mouse cerebral cortex
3. 学会等名 Neuro2019、2019/7
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本泰則、大石佑子、橋本恵、阿部彩香、黒田真帆
2. 発表標題 マウス小脳顆粒前駆細胞の軸索決定におけるピトロネクチンの役割
3. 学会等名 第51回 日本結合組織学会、2019/5-6
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林田桃香、橋本恵、石川朋子、宮本泰則
2. 発表標題 Vitronectin deficiency attenuates hepatic fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis-induced mouse mode
3. 学会等名 アメリカ細胞生物学会大会 (ASCB EMB02018 meeting)、2018/12
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島麻里、橋本恵、濱野文菜、池島(片岡)宏子、後藤真里、室伏きみ子、宮本泰則
2. 発表標題 2-carba cyclic phosphatidic acid contributes to the repair of stab-wounded cerebral cortex via regulation of microglial and astrocyte cells
3. 学会等名 アメリカ細胞生物学会大会 (ASCB EMB02018 meeting)、2018/12
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本恵、田邊昌子、池田夏実、中島麻里、池島(片岡)宏子、宮本泰則
2. 発表標題 穿刺性マウス大脳皮質損傷時におけるビトロネクチンのアストロサイト活性制御
3. 学会等名 第50回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林田桃香、橋本恵、石川朋子、宮本泰則
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎による肝臓の線維化と炎症に対するビトロネクチンの機能
3. 学会等名 第50回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石佑子、橋本恵、阿部彩香、宮本泰則
2. 発表標題 β5インテグリンは v 5インテグリンを介して小脳顆粒神経細胞の軸索決定に関与する
3. 学会等名 第5回 Matricell フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島麻里、橋本恵、濱野文菜、池島(片岡)宏子、後藤真里、室伏きみ子、宮本泰則
2. 発表標題 The effect of carba-derivative of cyclic phosphatidic acid on the repair of a stab-wounded cerebral cortex
3. 学会等名 第61回 日本神経化学学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mari Nakashima, Kei Hashimoto, Ayana Hamano, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Mari Gotoh, Kimiko Murakami-Murofushi, Yasunori Miyamoto
2. 発表標題 2-carba cyclic phosphatidic acid contributes to the repair of stab-wounded cerebral cortex via regulation of microglial and astrocyte cells
3. 学会等名 2019 annual meeting, American Society for Cell Biology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayaka Abe, Kei Hashimoto, Yokichi Hayashi, Yasunori Miyamoto
2. 発表標題 “ The role of alpha v beta5 integrin in axon specification of cerebellar granule cell precursors ”
3. 学会等名 第60回 日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ayaka Abe, Kei Hashimoto, Ayumi Akiyama, Yokichi Hayashi, Yasunori Miyamoto
2. 発表標題 The role of avb5 integrin in axon specification of cerebellar granule cell precursors
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2017 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

お茶の水女子大学理学部生物学科宮本研究室HP http://www-p.sci.ocha.ac.jp/bio-miyamoto-lab/ お茶の水女子大学研究者情報 http://researchers2.ao.ocha.ac.jp/html/100000927_ja.html Research map 宮本泰則 https://researchmap.jp/read0073205/

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