

平成21年 5月25日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500293
 研究課題名(和文) tPAによる細胞外マトリックスプロテオグリカンの分解と神経回路の可塑性
 研究課題名(英文) tPA-dependent degradation of extracellular proteoglycan matrix and plasticity of neuronal networks
 研究代表者
 宮田 清司(MIYATA SEIJI)
 京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授
 研究者番号：30243124

研究成果の概要：

成体においては、幼児期の臨界期と異なり構造レベルでの変化(可塑性)を消失し神経構造は安定している。しかし、外因性のコンドロイチナーゼ酵素を脳内に注入すると、成体脳においても神経回路の可塑性が回復することが大脳視覚野で報告されている(Pizzorusso et al., 2002; Fox and Caterson, 2002)。このことは、細胞外マトリックス環境が神経回路の可塑性と密接な関係にあることを示している。申請者は、神経活動依存的にコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが分解されることをバソプレッシン神経系で報告している(Miyata et al., 2004)。よって、バソプレッシン神経においては、神経活動増加により分泌された内因性の分解酵素が、細胞外マトリックス環境を変化させることで、神経回路可塑性を誘発している可能性がある。

本研究においては、細胞外マトリックスを分解する酵素系である tPA ならびに plasminogen に着目し研究を行った。tPA ノックアウトマウスは、浸透圧刺激を与えてもバソプレッシン放出が野生型に比べ有意に低く、慢性的浸透圧刺激を与えると顕著な浸透圧上昇により、短期間で死に至ることが分かった。一方、リコンビナント tPA を、摘出下垂体後葉に作用させると有意にバソプレッシン分泌を促進した。さらに、慢性浸透圧負荷を課すことで tPA-Plasminogen システムを介して血管細胞外マトリックス laminin が分解されることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経解剖学・神経病理学

キーワード：(1) 細胞外マトリクス (2) プロテオグリカン (3) プロテアーゼ (4) 脳
(5) 可塑性

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、硫酸化糖鎖がコアタンパクに結合した糖タンパクであり末梢では腱や軟骨の構成成分として知られているが、脳においては主要な細胞外マトリクス構成成分である。コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、神経軸索伸長の阻害作用を持つことから、発生過程における軸索ガイダンスの機能が考えられている。一方、成熟した adult 脳においては、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンはヒアウロン酸と複合体を形成し神経周辺に蓄積することで特殊な細胞外マトリクス構造(Perineuronal nets)を形成しているがその機能についてはまったく不明であった。しかし、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを分解するコンドロイチナーゼ酵素を adult 脳の脳視覚野に注入すると、神経回路の可塑性が回復することが最近報告された (Pizzorusso et al., Science, 2002)。この研究結果は、adult 脳では、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを細胞外マトリクスとして働くことで、シナプス構造などを安定させ神経回路を固定化しているが、外因性のコンドロイチナーゼ酵素処理により細胞外マトリクスが分解され、神経回路の自由度が増し可塑性が生じたものと推測される。

一方、このようなコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの神経回路の固定化作用に反し、脳の特定部位においては、神経活動に応じて新規シナプス形成などの可塑的な構造変化を生じる。しかし、成熟した adult 脳において内因性の分解酵素によるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの分解と神

経回路の可塑性との関係を明らかにした研究は国内外において報告がない。そこで、本申請においては、adult 脳を用いて神経活動増加による分解酵素 (Tissue plasminogen activator; tPA) 分泌が、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを分解することで、新規シナプス形成を生じやすい細胞外マトリクス環境を作り出し、構造レベルでの可塑性を生じることを検証する。

この研究目的を実証するために、本研究においては、視床下部バソプレッシン神経を実験モデル系として用いた。バソプレッシン神経は、脱水などの浸透圧刺激により、バソプレッシンを放出し体内の水分ホメオスタシス維持に関わるペプチド神経である。申請者は、これまでに、バソプレッシン神経が、脱水などの慢性浸透圧刺激により、海馬神経と同様に新規シナプス形成などの劇的な構造的可塑性を示すことを明らかにしており、バソプレッシン神経が構造的可塑性の優れたモデルシステムであることを報告している (Miyata et al., J. Comp. Neurol., 2001; Miyata et al., Neuroscience, 2003)。さらに、申請者は、これらの研究過程においてバソプレッシン神経のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを、神経活動増加に依存して分解されること (Miyata et al., Brain Res. 2004)。さらに、tPA がバソプレッシン神経に存在し、神経活動増加により分泌されることを報告している (Miyata et al., Brain Res. 2005)。tPA は、Plasminogen を Plasmin に活性化するセリンプロテアーゼで、Plasmin は、数種類のコンドロイチン硫酸プロテオ

グリカン、laminin, collagen などの細胞外マトリクスを基質として分解することができる。

2. 研究の目的

申請者は、視床下部バソプレッシン神経が、神経活動増加によりシナプスレベルの劇的な構造変化を生じること、そして、この構造変化と並行してコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの分解が生じることを既に報告している。しかし、細胞外マトリクスの神経活動依存的分解メカニズムについては明らかになっていない。そこで、本研究においては内因性分解酵素である tPA に着目し、神経活動増加により分泌された tPA が、細胞外マトリクスを分解し構造的可塑性に関与することを成熟した adult 個体で証明することである。実験は、tPA ならびに Plasminogen ノックアウトマウスを用いて、浸透圧刺激を与えてバソプレッシン神経を活性化した場合に、1) コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの分解、2) シナプス形成などの構造的可塑性の有無、3) 出力であるバソプレッシン分泌を調べた。

3. 研究の方法

＜実験動物＞ 実験動物としてマウスを用いた。また tPA と Plasminogen の機能解析のためにノックアウトマウスを用いた。

＜定量的免疫組織化学＞ プロテオグリカン特異的抗体を用いて、プロテオグリカンを検出する。定量化は、レーザー顕微鏡に付属したソフトを用いて画像解析する。

＜免疫電子顕微鏡＞ preembedding ならびに postembedding 法を用いて tPA と plasminogen の局在を調べる。さらに、バソプレッシン神経の微細構造レベルでの変化も解析する。

＜ウエスタンブロッティング＞ プロテオグリカン特異的抗体を用いて、電気泳動後 AEC 法にて検出する。各バンドは画像解析により解析し定量化する。

＜RT-PCR＞ tPA と plasminogen の mRNA 発現変

化の解析。

＜RIA＞ 血液並びに下垂体後葉におけるバソプレッシン濃度を測定する。

4. 研究成果

Fig. 1 下垂体後葉における tPA の局在

下垂体後葉における tPA の局在を免疫組織化学で調べたところ、バソプレッシン神経終末部に特異的であることが明らかになった（緑; tPA, 赤; バソプレッシン）

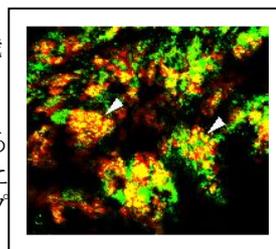


Fig. 2 免疫電子顕微鏡による tPA の局在

下垂体後葉における tPA の電子顕微鏡レベルにおける局在を調べたところ神経分泌顆粒に内在していることが明らかになった。

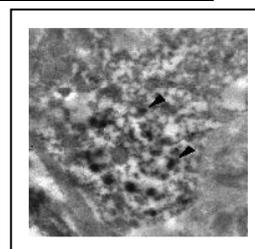


Fig. 3 神経活動依存的 tPA の発現量低下

下垂体後葉における tPA 発現量低下をウエスタンならびに Zymography にて調べた。その結果、浸透圧負荷による生理的刺激により tPA 発現量が顕著に減少していることが明らかになった。この結果は神経活動依存的に tPA がバソプレッシン神経終末部より放出された結果減少したことを意味する。

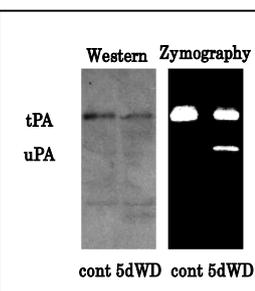


Fig. 4 tPA KO マウスにおける浸透圧調節異常

tPA KO マウスに慢性浸透圧負荷を課すと tPA KO マウスは野生型に比べて顕著な浸透圧上昇が観察された。この結果は tPA 遺伝子の欠損が個体レベルでの浸透圧調節異常を引き起こすことを示している。

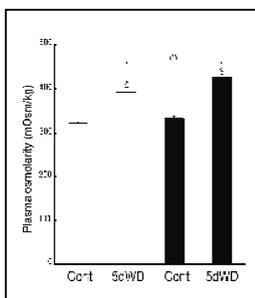
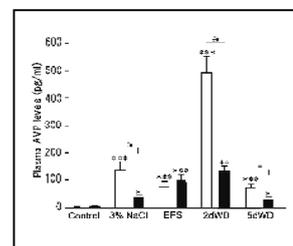


Fig. 5 tPA KO マウスにおけるバソプレッシン分泌異常

tPA KO マウスに浸透圧負荷を課し血液内バソプレッシン濃度



をRIAで測定したところ、急性・慢性いずれの浸透圧刺激において野生型に比べて有意に低い値であった。

Fig. 6 plasminogen KO マウスにおける浸透圧調節異常

plasminogen KO マウスにおいても tPA と同様に慢性浸透圧負荷を課すと野生型に比べて有意に高い血液浸透圧上昇を示した。さらに、血液内バソプレッシン濃度を測定したところ慢性浸透圧負荷を課すと野生型に比べて有意な低下が認められた。

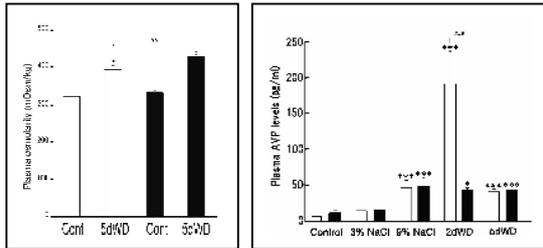


Fig. 7 リコンビナント tPA による下垂体後葉からのバソプレッシン放出

リコンビナント tPA を抽出下垂体後葉に作用させると 33 mM KCl 相当のバソプレッシンを放出させることが分かった。

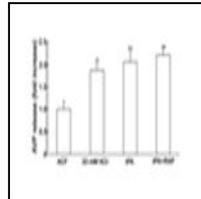
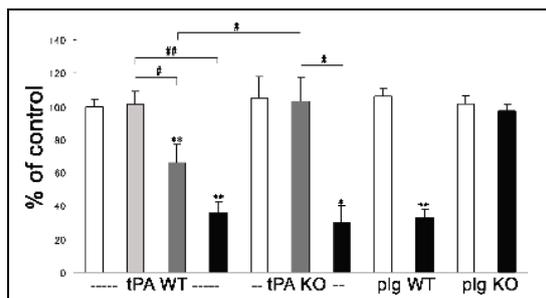


Fig. 8 慢性浸透圧負荷による下垂体後葉の laminin 細胞外マトリクスの分解

慢性浸透圧負荷を課すと下垂体後葉の laminin 細胞外マトリクスが顕著に減少することが明らかになった。しかし、tPA KO マウスでは laminin 分解が遅れること、さらに Plasminogen KO では全く分解が生じないことが分かった。この結果は、tPA-Plasminogen システムによる laminin 分解がバソプレッシン透過性を制御している可能性がある。



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 7 件)

1) Expression of chondroitin sulfate proteoglycan in barrel fields of rodents.

Brain Research 1252: 117-129 (2009).

Nakamura, M., Nakano, K., Morita, S., Nakashima, T., Oohira, A., Miyata, S. (査読有)

2) IgLON cell adhesion molecule Kilon is a crucial modulator for synapse number in hippocampal neurons.

Brain Research 1224:1-11 (2008).

Hashimoto, T., Yamada, M., Maekawa, S., Nakashima, T., Miyata, S. (査読有)

3) Duplicated alkaline phosphatase genes in the wild silkworm *Bombyx mandarina* inhabiting Japan: phylogenetic relationship to the orthologs in *Bombyx mori*.

Journal of Insect Biotechnology and Sericulture 77:71-77 (2008).

Itoh, M., Nishimura, M., Yukuhiro, K., Yoshioka, Y., Miyata, S., Yamaguchi, M. (査読有)

4) DACS, novel matrix structure composed of chondroitin sulfate proteoglycan in the brain

Biochemical and Biophysical Research Communications

364:410-5 (2007).

Hayashi, No., Tatsumi, K., Okuda, H., Yoshikawa, M., Ishizaka, S., Miyata, S., Manabe, T., Wanaka, A. (査読有)

5) Synaptic adhesion molecule OBCAM; synaptogenesis and dynamic internalization.

Brain Research 1165:5-14 (2007).

Yamada, M., Hashimoto, T., Hayashi, N., Higuchi, M., Murakami, A., Nakashima, T., Maekawa, S., Miyata, S. (査読有)

6) Perineuronal nets protect against amyloid β -protein neurotoxicity in cultured cortical neurons.

Brain Research 1150:200-206 (2007).

Miyata, S., Nishimura, Y., Nakashima, T.
(査読有)

7) Myelin protein zero is one of the components of the detergent-resistant membrane microdomain fraction prepared from rat pituitary.

Journal of Molecular Histochemistry
38:79-85 (2007)

Taguchi, K., Kumanogoh, H., Nakamura, S.,
Miyata, S., Maekawa, S. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. 宮田清司、今村友樹、井上直子、岡田清隆、松尾理

tPA-plasmin システムによるバソプレッ
シン分泌調節に関する研究
第 31 回日本止血血栓学会 (2008-10-21
大阪)

2. 中野恵子、宮田清司
神経培養系を用いた Perineuronal nets
の機能解析
第 31 回日本神経科学会 (2008-7-10 東京)

3. 今村友樹、井上直子、松尾理、宮田清司
tPA-plasmin システムによるバソプレッ
シン分泌調節に関する研究
第 31 回日本神経科学会 (2008-7-10 東京)

4. 宮田清司、今村友樹、松尾理
tPA-plasmin システムによる細胞外マト
リクス分解とバソプレッシン神経の構
造的可塑性
第 30 回日本神経科学会 (2007-9-11 横浜)

5. 横山彰太、前田信明、宮田清司
神経細胞における受容体型タンパクチロ
シンフォスファターゼ β アイソフォーム
の機能
第 30 回日本神経科学会 (2007-9-11 横浜)

6. 中村充、中野恵子、宮田清司
Perineuronal nets の神経保護作用と可
塑性に関する研究

第 30 回日本神経科学会 (2007-9-11 横浜)

7. 橋本隆、前川昌平、宮田清司
IgLON 接着因子の海馬神経シナプス形成
における役割

第 30 回日本神経科学会 (2007-9-11 横浜)

シンポジウム

8. 「体内環境を維持する諸機構の統合的理解
をめざして」オーガナイザー 野田昌晴

宮田清司：グリア細胞と細胞外マトリクス
によるバソプレッシン分泌機構
平成 20 年度 基礎生物学研究所研究会
(2008-10-10 岡崎)

9. 「神経系におけるプロテオグリカン研究の
新展開」

オーガナイザー 和中明生・宮田清司
宮田清司：プロテオグリカン細胞外マトリ
クスより構成される Perineuronal nets
第 51 回日本神経化学会 (2008-9-12 富山)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 清司 (MIYATA SEIJI)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・
准教授
研究者番号：30243124

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

松尾 理 (近畿大学・医学部・教授)

前川 昌平 (神戸大学・理学部・教授)

岡田 清隆 (近畿大学・医学部・准教授)

堀井 謹子 (奈良県立医科大学・医学部・
助教)

山田 真弓 (京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生)

西村 洋介 (京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生)

橋本 隆 (京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生)

水崎 真紀 (京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生)

中谷 佳宏（京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生）

横山 彰太（京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生）

中村 充（京都工芸繊維大学・工芸科学研
究科・大学院生）

中野 恵子（京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生）

今村 友樹（京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生）

森田 晶子（京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生）

浅井 仁美（京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生）

杉本 千明（京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生）

井上 直子（京都工芸繊維大学・工芸科学
研究科・大学院生）