

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890046

研究課題名（和文） 中枢神経系におけるペリオスチンの発現制御とその役割の解明

研究課題名（英文） Analysis of role of periostin in cerebral function

研究代表者

鯉淵 信孝 (KOIBUCHI NOBUTAKA)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30456131

研究成果の概要（和文）：

ペリオスチンは細胞外マトリックスの構成成分で、骨の分化・再生に関係することが知られている。しかし近年の研究により、ペリオスチンは梗塞などにより損傷を受けた細胞に対して強い増殖および保護作用を有していることが明らかにされてきている。そこで我々は、中枢神経系に対しても同様な保護作用があるのかを検討した。その結果ペリオスチンには、ある程度の神経保護作用があることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Periostin is an extracellular matrix protein that functions as a cell adhesion molecule for preosteoblasts and is thought to be involved in osteoblast recruitment, attachment and spreading. Recently, it was shown that periostin promotes cardiac repair and remodeling. However, it is unclear that periostin plays a role in improvement of cerebral function. Thus, we examined whether periostin promotes cerebral repair.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：ペリオスチン・脳梗塞・保護作用

1. 研究開始当初の背景

ペリオスチンはショウジョウバエの fascilin と相同性が高いドメインを有する分泌型の接着因子の一つであり、骨分化に影響を及ぼすことが知られている。しかし我々を含む内外のグループにより、ペリオスチンの発現が心筋梗塞における梗塞領域の線維芽細胞で急激に上昇することが明らかにされた。さらに、ペリオスチンは繊維芽細胞の増殖を誘導することにより梗塞によって疲弊した心臓の破裂を防ぐとともに、心筋細胞自体の細胞分裂を誘導し失われた心筋細胞の増殖を誘導していることが明らかになってきていた。しかしながら、中枢神経系に対する作用は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、中枢神経系におけるペリオスチンの発現制御とその役割の解明を行うことである。

(1) 中枢神経中でペリオスチンを発現している細胞及び、その標的細胞の同定

(2) バリエーションの同定

(3) 培養系を用いたペリオスチンの神経細胞に対する作用の検討

(4) 生体内におけるペリオスチンの作用及び治療効果の検討

3. 研究の方法

(1) ペリオスチンを発現している細胞及び、その標的細胞の同定

心筋梗塞においては、繊維芽細胞がペリオスチンを発現している。しかし、脳組織には髄膜を除いて繊維芽細胞は存在していないことから、心臓とは異なる細胞種がペリオスチンを発現していると考えられる。そこで、まず脳梗塞後にペリオスチンを強く発現し

始める細胞種を同定する。さらに、ペリオスチンの receptor の一つとして αv -integrin が既に明らかにされているので、 αv -integrin を発現している細胞を同定し、ペリオスチンの標的細胞を明らかにする。

(2) バリエーションの同定

ペリオスチンにはバリエーションが存在する。梗塞脳においては、どのバリエーションが強く発現しているかを同定する。

(3) 培養系を用いたペリオスチンの神経細胞に対する作用の検討

ペリオスチンの蛋白もしくはペリオスチンに対する中和抗体を添加した培養中で、神経細胞を含む脳組織を培養することによって、ペリオスチンの細胞レベルでの作用を検討する。特に神経細胞に注目し、神経突起伸張作用、神経保護作用などの有無を明らかにする。

(4) 生体内におけるペリオスチンの作用及び治療効果の検討

生体に、ペリオスチンもしくはペリオスチンの中和抗体を投与し、生体内におけるペリオスチンの作用及び治療効果を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 中枢神経中でペリオスチンを発現している細胞及び、その標的細胞の同定

中枢神経系の神経細胞におけるペリオスチンの発現の有無と役割は不明であった。そこでまず、我々はラットにおける中大脳動脈閉塞モデルを用いて脳梗塞を作成し、ペリオスチンの発現パターンを *in situ* hybridization で検討した。その結果、正常脳においては大脳皮質神経細胞に特異的にペリオスチンの発現が認められたが、梗塞後には虚血中心部と虚血周囲部における神経細胞におけるペリオスチンの発現が低下す

る一方、虚血周囲部においてペリオスチンの発現が徐々に上昇していた。本実験により、正常脳の大脳皮質神経細胞にペリオスチンが発現していることが明らかとなり、また、脳梗塞後では梗塞領域を中心にペリオスチンが強く発現していることが明らかとなった。

さらに *in situ hybridization* (ペリオスチンを検出) と各種の細胞分化マーカー抗体を用いた免疫染色との 2 重染色を行い、ペリオスチンを発現している細胞を同定する検討を試みた。その結果、マクロファージもしくはミクログリア細胞が脳梗塞後にペリオスチンを発現していると思われるデータを得た。

(2) バリエントの同定

realtime PCR 法でどのバリエントが正常および梗塞後の中枢神経系に発現しているのかを検討した。しかし、realtime PCR 法の条件設定が予想外に難航し、安定したデータは得られなかった。現在、詳細な条件検討を行っている。

(3) 培養系を用いたペリオスチンの神経細胞に対する作用の検討

妊娠ラットから胎生 17 日目の胎児を取り出した後、梗塞においてペリオスチンが強く発現している大脳皮質部分を切り出して酵素処理によって細胞をバラバラした後、培養を行った。その際シャーレには、何もコートなし、アルブミン (negative control)、ファイブネクチン (positive control)、ペリオスチンをそれぞれコートしておいた。細胞培養開始から 3 日後に固定し、MAP2 抗体で神経細胞を免疫染色し、NIH イメージで画像解析することによって、神経突起伸張作用への影響を検討した。その結果、ペリオスチンをコートしておいた神経細胞では、ある程度の神経突起伸張作用があることが確認できた。

(4) 生体内におけるペリオスチンの作用及び治療効果の検討

ラットの中大脳動脈閉塞モデルを用いて脳梗塞を作成し、ペリオスチン蛋白質もしくは

は、それに対する中和抗体の静脈投与または脳槽投与を行い、中枢神経に対する影響 (神経突起伸張作用及び神経保護作用) の検討を行った。しかしながら、投与量が当初予想していたよりも多量に必要であることなどが明らかになった。そこで遺伝子操作が簡単なアフリカツメガエルを用いて生体での神経突起伸張作用の検討を行うことにした。アフリカツメガエルのペリオスチン遺伝子をクローニングし、ペリオスチンの強発現胚を作製し、神経の形成を観察した。その結果、ある程度の神経の過形成が確認できた。

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 4 件)

1. Wakayama K, Shimamura M, Sata M, Koibuchi N, Sato N, Ogiwara T, Morishita R. A Model of Cerebrovascular Injury in Rats. *J. Neuroscience Methods*. 2008: 175: 187-195. 「査読有」
2. Sanada F, Taniyama Y, Azuma J, Iekushi K, Dosaka N, Yokoi T, Koibuchi N, Kusunoki H, Aizawa Y, Morishita R. Hepatocyte growth factor, but not vascular endothelial growth factor, attenuated angiotensin II-induced EPC senescence. *Hypertension* 2009: 53: 77-82. 「査読有」
3. Mori M, Nakagami H, Koibuchi N, Miura K, Takami Y, Koriyama H, Hayashi H, Sabe H, Mochizuki N, Morishita R, Kaneda Y. Zyxin mediates actin fiber reorganization in epithelial-mesenchymal transition and contributes to endocardial morphogenesis. *Mol. Biol. Cell*. 2009: 20: 3115-3124. 「査読有」
4. Sanada F, Taniyama Y, Iekushi K, Azuma J, Okayama K, Kusunoki H, Koibuchi N, Doi T, Aizawa Y, Morishita R. Negative Action of Hepatocyte Growth

Factor/c-Met System on Angiotensin II Signaling via Ligand-Dependent Epithelial Growth Factor Receptor Degradation Mechanism in Vascular Smooth Muscle Cells. Circ. Res. 2009; 105: 667-675. 「査読有」

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鯉渕 信孝 (KOIBUCHI NOBUTAKA)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：30456131

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし