

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月27日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500323

研究課題名（和文）コンドロイチン硫酸プロテオグリカンによる脳の臨界期決定機構

研究課題名（英文）Mechanism for determination of synaptic critical period in brains

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（和文）：コンドロイチン硫酸プロテオグリカンによる脳の臨界期決定機構
コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPGs)は、脳における主要な細胞外マトリックスであり、神経系の可塑性に深く関わっていると考えられる。本研究では、tPA-Plasminogenシステムが、バソプレッシン神経系のCSPGsを分解することでシナプスの再構築に関与することを動物レベルで明らかにした。さらに、培養海馬神経細胞を用いて、CSPGsを分解するコンドロイチナーゼABC処理により、シナプス部位におけるGAP-43発現が顕著に増大することが明らかになった。よって、CSPGsはシナプス形成に阻害的に作用するが、CSPGsの分解はシナプス形成を促進することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Mechanism for determination of synaptic critical period in brains
Chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) are main components of extracellular matrix in the mammalian brains and possibly concerned with synaptic plasticity. The present study reveals that tPA-plasminogen system is responsible for synaptic plasticity in the hypothalamic vasopressinergic neurons *in vivo*. Moreover, it is shown that CSPG-degrading enzyme Chase increases the expression of a synaptic plasticity marker GAP-43 in cultured hippocampal neurons *in vitro*. Thus, the present results demonstrates that CSPGs are crucial role in synaptic plasticity by regulating their expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：プロテオグリカン、臨界期、脳、可塑性、シナプス

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、脳

における主要な細胞外マトリックスであり、神経系発生に深く関わっていることが知られている。つまり、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、軸索伸長に対して阻害的に働くことで、軸索伸長過程を制御し、パターン形成に関与する。一方、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、脳の成熟過程で、特定の神経細胞周囲に蓄積する。Pizzorussoらは、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを分解する酵素コンドロイチナーゼABCにより、神経系の可塑性が回復することを報告している。よって、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、シナプスにおいても重要な役割を担っていることが考えられるが、その直接的証明はない。

2. 研究の目的

コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、脳の成熟に伴い神経細胞周辺に蓄積することで神経系の可塑性を消失させる。しかし、脳の特定部位では、神経活動に依存して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、可塑性を回復させると推測される。

そこで、本研究においては、動物レベルならびに培養神経細胞レベルで、細胞外マトリックスであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの分解が、シナプス形成に関与することを明らかにすることを目的にしている。

- (1)コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの分解を分解する Tissue Plasminogen Activator (tPA)-Plasminogen 系の脳内における局在を明らかにする。
- (2)神経活動に依存したコンドロイチン硫酸プロテオグリカン分解と神経構造の変化を調べる。
- (3)培養神経細胞をコンドロイチン硫酸プロテオグリカン分解酵素であるコンドロイチナーゼABC処理を行うことで、シナプスの Dynamics を観察する。

3. 研究の方法

- (1)脳内の tPA-Plasminogen 局在について、コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いた光学顕微鏡レベルでの免疫組織化学および免疫電子顕微鏡観察により明らかにする。
- (2)浸透圧負荷を与え、バソプレッシン神経の神経活動を増加させた時に、tPA-Plasminogen 発現変化やコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの分解を調べ神経系のシナプス構造変化との関連性を動物レベルで明らかにする。
- (3)培養海馬神経細胞を用いて、コンドロイチナーゼABC処理によるシナプス構造を変化を、シナプシン、シナプトタグミン、

GAP-43 の免疫細胞化学や Western blotting にて明らかにする。

4. 研究成果

- (1)膜貫通型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンRPTP ζ の脱リン酸化による神経細胞樹状突起形成
RPTP ζ には全長型と短縮スプライシング型の2つのアイソフォームがあり、細胞内 Phosphatase活性により樹状突起の長さや分岐において独立的に制御していることが明らかになった (Neuroscience, Vol. 164, 2009)。
- (2)コンドロイチン硫酸プロテオグリカン
大脳体性感覚野のバレル領域におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン発現
コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現は脳の発生過程においてバレル構造に対応したパターンで発現する。しかし、空間的・時間的に異なる種類のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが発現していた (Brain Res., 2009)。
- (3)脳内におけるtPA-Plasminogenシステムの発現を視床下部を中心に調べたところ、終板器官、脳弓下器官、正中隆起などの脳室周囲器官および室傍核や視索上核に強い発現が認められた。これらの神経核では、神経新生が盛んに生じている部位であり、細胞の移動や新規シナプス形成などが生じている。tPA-Plasminogenシステムは、細胞外マトリックスを分解することで可塑性を生じている可能性がある (Cell & Tissue Res, 2011)。
さらに、Plasminogenの発現は神経前駆細胞に特異的に存在することも明らかになった。
- (4)バソプレッシンを分泌する下垂体後葉神経系におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現変化バソプレッシン神経の活動増加は、細胞外マトリックスである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神経回路の可塑性を誘導することを証明した (Neuroscience, 2010)。
- (5)バソプレッシンを分泌する下垂体後葉神経系におけるtPA-Plasminogenの発現変化
細胞外マトリックスであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの分解は、セリンプロテアーゼであるtPAならびに Plasminogenによることが明らかになった (J. Neurosci. Res., 2010)。
- (6)培養海馬神経細胞を用いて、細胞外マトリックス分解の影響を調べた。CSPGsを分解する、コンドロイチナーゼABC処理を施すと、

シナプス部位におけるGAP-43発現が顕著に増大することが、Western blottingと定量的免疫細胞化学法により明らかになった。GAP-43は未熟シナプスに発現することがシナプス小胞タンパクであるsynapsinやsynaptotagminの発現と同時に解析することで明らかになっている。よって、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンがシナプス形成に阻害的に作用するが、酵素による分解はシナプス形成を促進することが明らかになった。

以上のように、in vivoおよびin vitro両方において、細胞外マトリックスコンドロイチン硫酸プロテオグリカンがシナプス可塑性に重要な作用を持っていることを証明することができた。

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 13 件)

1) Morita S, Ukai, S., Miyata S.

European Journal of Neuroscience

([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1460-9568](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1460-9568); in press) 査読あり

2) Morita S, Miyata S.

Different vascular permeability between the sensory and secretory circumventricular organs of adult mouse brain

Cell and Tissue Research

(<http://www.springer.com/biomed/human+genetics/journal/441>; in press) 査読あり

3) Sugimoto C, Morita S, Miyata S.

Overexpression of IgLON cell adhesion molecules changes proliferation and cell size of cortical astrocytes.

Cell Biochemistry and Function

([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1099-0844](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1099-0844); in press) 査読あり

4) Asai H, Morita S, Miyata S.

Effect of pleiotrophin on glutamate-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons.

Cell Biochemistry and Function, 29:660-665

(<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/>

[ISSN\)1099-0844](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1099-0844); 査読あり

5) Miyata S., Morita S.

A new method for visualization of endothelial cells and extravascular leakage in adult mouse brain using fluorescein isothiocyanate.

Journal of Neuroscience Methods, 202,9-16

(<http://www.journals.elsevier.com/journal-of-neuroscience-methods/>; 2011). 査読あり

6) Nikaido, Y., Miyata, S., Nakashima, T.

Mixture of cis-3-hexanol and trans-2-hexanol attenuates behavioral and stress responses induced by

2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline and electric footshock stress in rats.

Physiology & Behavior 103:547-556

(<http://www.journals.elsevier.com/physiology-and-behavior/>; 2011) 査読あり

7) Taniguchi, Y., Inoue, N., Morita, S., Nikaido,

Y., Nakashima, T., Nagai, N., Okada, K.,

Matsuo, O., Miyata, S. Localization of

plasminogen in mouse hippocampus, cerebral cortex, and hypothalamus.

Cell and Tissue Research 343:303-317

(<http://www.springer.com/biomed/human+genetics/journal/441>; 2011) 査読あり

8) Morita, S., Oohira, A., Miyata, S.

Activity-dependent remodeling of chondroitin sulfate proteoglycan extracellular matrix in the hypothalamo-neurohypophysial system.

Neuroscience 166:1068-1082

(<http://ees.elsevier.com/nsc/>; 2010) 査読あり

9) Imamura, Y., Morita, S., Nakatani, N., Okada,

K., Ueshima, S., Matsuo, O., Miyata, S.

Tissue plasminogen activator and plasminogen are critical for osmotic homeostasis by regulating vasopressin secretion.

Journal of Neuroscience Research

88:1995-2006

(<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/>

[ISSN1097-4547](#); 2010) 査読あり

- 10) Sugimoto, C., Maekawa, S., **Miyata, S.**
OBCAM, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule, regulates morphology and proliferation of cerebral astrocytes
Journal of Neurochemistry 112:818-828
(http://www.blackwellpublishing.com/jnc_enhanced/; 2010) 査読あり
- 11) Asai, H., Yokoyama, S., Morita, S., Maeda, N., **Miyata, S.**
Functional difference of receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta/beta isoforms in neurogenesis of hippocampal neurons.
Neuroscience 164:1020-30
(<http://ees.elsevier.com/nsc/>; 2009). 査読あり
- 12) Hashimoto, T., Maekawa, S., **Miyata, S.**
IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons.
Cell Biochemistry and Function 27:496-498
([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1099-084](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1099-084); 2009). 査読あり
- 13) Nakamura, M., Nakano, K., Morita, S., Nakashima, T., Oohira, A., **Miyata, S.**
Expression of chondroitin sulfate proteoglycan in barrel fields of rodents.
Brain Research 1252:117-129
(<http://ees.elsevier.com/bres/>; 2009). 査読あり

[学会発表] (計 24 件)

- 1) Morita S, **Miyata S.** Continuous angiogenesis in the circumventricular organs of the adult brain. Neurogenesis 2011, Kobe (2011)
- 2) 森田晶子・蓬萊敦・鶴飼真璃・奥田 洋明・辰巳 晃子・和中明生・**宮田清司**. 浸透圧刺激による脳室周囲器官の血管構築変化. 第 87 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 大阪 (2011)
- 3) 森田晶子・**宮田清司**. 脳室周囲器官の血管新生は血液情報感知とペプチド分泌に関与する. 第 38 回日本神経内分泌学会学術集会 (内分泌学ウィーク 2011)、東京 (2011)
- 4) 蓬萊敦・森田晶子・**宮田清司**. 末梢血液情報の変化による脳室周囲器官の血管再構築. 第 34 回日本神経科学大会. 横浜 (2011)
- 5) 鶴飼真璃・飯森菜月・森田晶子・**宮田清司**. 脳室周囲器官における神経ならびに血管新生の環境因子. 第 34 回日本神経科学大会、横浜市、(2011)
- 6) 森田晶子・萬成哲也・**宮田清司**. 成体脳室周囲器官における血管再構築機序の解析. 第 34 回日本神経科学大会、横浜市、(2011)
- 7) 森田晶子・中島敏博・**宮田清司**. 脳室周囲器官では持続的に血管新生が起きている. 第 88 回日本生理学会大会第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、横浜 (2011)
- 8) **宮田清司**・杉本千明・森田晶子. 免疫グロブリンスーパーファミリー接着因子 OBCAM によるアストロサイトの増殖制御. 第 86 回日本解剖学会近畿支部学術集会、泉佐野市 (2010)
- 9) 森田晶子・**宮田清司**. 脳室周囲器官における血管系の Dynamics. 第 86 回日本解剖学会近畿支部学術集会、泉佐野市 (2010)
- 10) **宮田清司**・井上直子・森田晶子・蓬萊敦. 中枢神経細胞における tPA ならびに Plasminogen の小胞における局在. Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会 第 53 回日本神経化学学会大会 第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会. 神戸市 (2010)
- 11) 谷口由樹・森田晶子・井上直子・**宮田清司**. 視床下部における tPA ならびに plasminogen の局在解析. Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会 第 53 回日本神経化学学会大会 第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会)、神戸市、(2010)
- 12) 森田晶子・**宮田清司**. 脳室周囲器官における neurogenesis と angiogenesis. Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会 第 53 回日本神経化学学会大会 第 20 回日本神経回

- 路学会大会 合同大会)、神戸市 (2010)
- 13) Morita S, Miyata S. Expression of chondroitin sulfate proteoglycans in osmoregulatory brain regions. Official Satellite Symposium of the 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, (2010)
- 14) 森田晶子・宮田清司. 下垂体後葉神経系におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンと構造的可塑性. 第 85 回日本解剖学会近畿支部学術集会、橿原市、(2009)
- 15) 森田晶子・大平敦彦・宮田清司. 視床下部下垂体後葉系におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの神経活動依存的発現変化. 第 32 回日本神経科学大会、名古屋市、(2009)
- 16) 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 (大阪) (2009)
- 17) 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、東京 (2009)
- 18) 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、東京 (2009)
- 19) 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 回日本神経科学会横浜 (2009)
- 20) 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、横浜 (2009)
- 21) 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、横浜 (2009)
- 22) 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、横浜 (2009)

- 23) 橋本隆、山田真弓、前川昌平、宮田清司. 中枢神経系にける神経細胞接着因子 OBCAM と Kilon の機能解析. 第 112 回日本解剖学会、大阪 (2009)
- 24) 宮田清司、中谷佳弘、斉藤大輔、岡田清孝、松尾理. バソプレッシン分泌における tPA-plasmin システムの関与. 第 112 回日本解剖学会、大阪 (2009)

[その他]

<http://www.cis.kit.ac.jp/~smiyata/top.htm>

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：