

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28日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21590309

研究課題名（和文） 海馬歯状回顆粒細胞の神経回路形成における
スフィンゴシンキナーゼの機能研究課題名（英文） The role of sphingosine kinases on the formation of neural
network in dentate granule cells of hippocampus

研究代表者

岡田 太郎 (OKADA TARO)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80304088

研究成果の概要（和文）：記憶・学習に深く関与することが知られている海馬CA3領域での長期増強（LTP）が、スフィンゴシンキナーゼ1（SPHK1）ノックアウトマウスにおいては認められないこと、それに伴い空間学習能力が低下していることを見いだした。また、海馬神経細胞初代培養を用いた検討により、SPHK1をノックダウンすることによりシナプス形成が減弱することも見いだした。以上の結果は、SPHK1-S1P受容体系に作用する薬物により大脳機能を調節できる可能性を示唆するものであり、今後の応用という点で極めて重要である。

研究成果の概要（英文）：It was shown that the long-term potentiation (LTP) which is known to be involved in the memory and learning is not observed in sphingosine kinase 1 (SPHK1)-knockout mice. As a consequence the spatial learning ability of the knock out mice was impaired. We also showed that SPHK1 knock down by siRNA diminished the synapse formation in primary hippocampal cells. These results are very important in the sense that the function of hippocampus might be regulated by the medicines which act on the SPHK1-S1P axis. Since over-activation of hippocampal neuron is considered to be involved in the onset of some kind of epilepsy, our finding may provide new treatment strategy of the epilepsy.

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：生化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：スフィンゴシンキナーゼ、スフィンゴ脂質

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は細胞の分化、増殖、走化性、アポトーシス、炎症などに関わる重要な脂質メディエーターであり、細胞表面の S1P 受容体に結合して生理機能を発揮する。

我々は最近の研究において、S1P を産生する酵素であるスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) が海馬歯状回顆粒細胞の軸索である苔状線維のシナプス前終末に局在していることを見いだした。更に、この SPHK1 によって産生された S1P がシナプス前終末上の S1P 受容体をオートクライン的に活性化することが、神経伝達物質放出において重要であることを発見し、報告した。

SPHK-S1P 系による神経伝達物質放出制御は様々な神経系で認められる普遍的な現象であり、神経ネットワークの形成において重要な機能を担っているものと考えられる。興味深いことに成体マウスの脳においては、SPHK1 は海馬歯状回顆粒細胞に限局して高発現しているが、この細胞は神経細胞としては例外的に成体になってからも細胞新生が継続しており、新たな神経ネットワークが日々構築され続けているというユニークな性質を持つ。すなわち、この神経細胞が特徴的に示す高度な可塑性において、SPHK1-S1P 系が重要な役割を担っている可能性が極めて高い。

2. 研究の目的

以上の背景より、海馬神経細胞 (歯状回顆粒細胞) 苔状線維シナプス前終末において、スフィンゴシンキナーゼ (SPHK) によって産生したスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) が、オートクライン的に S1P 受容体を活性化して神経伝達物質放出を促進するという、新規のオートシナプス性増強機構を我々は最近見いだした。本研究ではこの現象の生理的役割、特にシナプス形成における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) シナプス前終末における S1P 受容体の局在解析

(2) S1P 刺激によりシナプス前終末において発動する細胞内情報伝達機構の解析

(3) SPHK1 のカルモジュリン結合による制御による神経伝達物質放出に対する影響の解析

(4) シナプス形成における SPHK1-S1P 系の役割を明らかにする

SPHK-S1P 系による「オートシナプス増強」の生理的役割として考えられることは、いわゆる長期増強 (LTP) における関与であり、現在、神経電気生理を専門とするグループとの共同研究が進行中である。一方、SPHK-S1P 系の役割として考えられるもう一つの可能性は、シナプス形成における役割である。SPHK1 が高発現している海馬苔状線維は神経細胞の中でも例外的に、成体になった後も神経の新生とシナプス形成が継続しているという事実は興味深く、このシナプス形成における SPHK1-S1P システムの関与を検討する。

1) 初代培養海馬神経細胞および海馬スライス培養における神経突起の伸長を可視化・定量する系を確立し、レンチウイルスにて導入した cDNA (変異 SPHK1) や shRNA の効果を検討する。同時に、S1P 受容体アゴニスト・アンタゴニストの効果についても検討する。

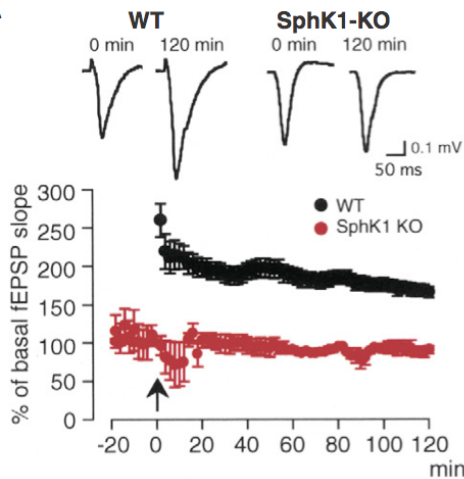
2) SPHK1 ノックアウトマウスの海馬スライス培養における神経突起の伸長と、シナプス形成について観察、定量する。

3) SPHK1, SPHK2 ダブルノックアウトマウス由来の胎児細胞から、神経細胞を *in vitro* で誘導し、シナプス形成を評価する。

シナプス形成の実験においては、SPHK1 ノックアウトマウスの脳を用いた実験も行うが、いわゆるリダンダンシーが問題となる可能性も十分にあるため、ウイルスベクターを用いた shRNA の導入など、多方面から実験を行う予定である。また、S1P 受容体アゴニスト・アンタゴニストによる効果が確認され次第、マウス個体を用いた *in vivo* での効果を確認する。

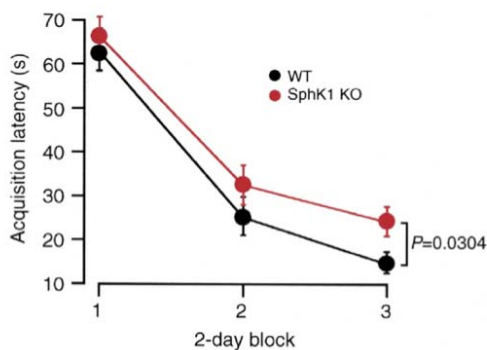
4. 研究成果

本研究ではこれまでに研究代表者らによって見いだされている知見に、*in vivo*での検証を加えることができた。すなわち、SPHK1ノックアウトマウスの海馬スライス培養を用いた電気生理学的な解析により、記憶・学習に深く関与することが知られている海馬CA3領域での長期増強(LTP)が、SPHK1ノックアウトマウスにおいては認められないことを見いだした。



上図はマウス海馬スライスを用いた電気生理学的解析の結果である。正常マウス(WT)にて認められるLTPがSPHK1ノックアウトマウス(SphK1 KO)では認められない。

さらに、それに伴いSPHK1ノックアウトマウスにおいては、その空間学習能力が低下していることを見いだした。



上図はモリス水迷路を用いたマウスの空間学習に関するデータである。正常(WT)マウスでは安全な台に至る経路を学習することにより、台にたどり着くまでの時間が徐々に短縮する。SPHK1ノックアウトマウス(SphK1 KO)では、この空間学習機能が障害されているため、台にたどり着くまでの時間は正常マ

ウスよりも長く、両者の差は統計学的に有意であった。

また、海馬神経細胞初代培養系を用いてそのシナプス形成を*in vitro*で検討したところ、siRNAを用いてSPHK1をノックダウンすることにより、プレシナプスとポストシナプスによるシナプス形成が減弱することも見いだした。

中枢神経系にはSPHKおよびS1P受容体の高レベルでの発現が認められることから、何らかの働きが予想されていた。本研究結果により、これまで不明であった中枢神経系でのSPHK-S1P系の生理的役割について、初めて明らかとなった。本研究結果はまた、SPHK1-S1P受容体系に作用する薬物を用いることにより、記憶や学習といった大脳機能を調節できる可能性を示唆するものであり、今後の応用という点で極めて重要である。

また、海馬神経細胞の興奮状態は側頭葉てんかんの発症にも深く関与するとされている。興味深いことに、多くの細胞系で抑制性の作用を示すS1P受容体であるS1P受容体タイプ2のノックアウトマウスにおいては、てんかんを自然発症することが報告されている。すなわち側頭葉てんかんの発症メカニズムにSPHK-S1P受容体系が関与している可能性が高く、今後の研究が必要である。

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5件)

① Regulation of synaptic strength by sphingosine 1-phosphate in the hippocampus.

Kanno T, Nishizaki T, Proia RL, Kajimoto T, Jahangeer S, Okada T, Nakamura S. *Neuroscience*. 2010, 29, 973-80.

② Sphingosine kinase 1 regulates mucin production via ERK phosphorylation.

Kono Y, Nishiuma T, Okada T, Kobayashi K, Funada Y, Kotani Y, Jahangeer S, Nakamura S, Nishimura Y. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010, 23, 36-42.

③ Roles of extracellular and intracellular sphingosine 1-phosphate in cell migration.

Yu H, Okada T, Kobayashi M, Abo-Elmatty DM, Jahangeer S, Nakamura S. *Genes Cells*. 2009, 14, 597-605.

④ CtBP1/BARS is an activator of phospholipase D1 necessary for agonist-induced macropinocytosis.
Haga Y, Miwa N, Jahangeer S, Okada T, Nakamura S.
EMBO J. 2009, 28, 1197-207.

⑤ Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signalling in central nervous system.
Okada T, Kajimoto T, Jahangeer S, Nakamura S.
Cell Signal. 2009, 21, 7-13.

[学会発表] (計1件)

① Sphingosine 1-phosphate in physiology and pathology in the brain.
Nakamura, S. and Okada, T. (Symposium, Invited speaker)
9th International Congress of the Polish Neuroscience Society in Warsaw, Poland, September 9-12, (2009)

[図書] (計1件)

① 岡田太郎、中村俊一
「細胞内外で機能するスフィンゴシン1リン酸 (S1P) の役割」
生化学、84巻、92-101, 2012

[その他]

ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/biochemistry/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 太郎 (OKADA TARO)
神戸大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：80304088

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし