

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 6月17日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010-2011

課題番号：22790992

研究課題名（和文） ニューロトロフィン受容体が伝達する多様なシグナルの大脳皮質発達における意義

研究課題名（英文） Functional roles of low affinity neurotrophin receptor on the development of the cerebral cortex.

研究代表者

福光 秀文（FUKUMITSU HIDEFUMI）

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00308280

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ニューロトロフィン（NTs）低親和性受容体 p75^{LNTR} のシグナル伝達不全が大脳皮質神経回路の形成に及ぼす影響を調べた。

ソーチリン/p75^{LNTR} の変異型を発現させた PC12 細胞では、NTs 添加時におこる ERK1/2 のリン酸化が抑制された。子宮内エレクトロポレーション法にて、これらの変異体が大脳皮質前駆細胞に導入し、その後の影響を観察した結果、組織構築には顕著な変化なかったが、軸索投射やスパイン形成に影響がみられた。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we examined the possible involvement of p75^{LNTR} signaling during the development of cerebral cortex.

In PC12 cells, over-expression of the deletion mutant of p75^{LNTR} or sortilin suppressed phosphorylation of ERK1/2 induced by NGF treatment. By using in utero electroporation techniques, we revealed that these mutants did not influence the cell fate specification or cell migration of cortical progenitors, but affect the axonal projection or synapse formation of cortical neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：神経栄養因子、大脳皮質神経回路、発達障害、ニューロトロフィン、p75^{LNTR}、ソーチリン

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害者では様々な認知機能の失調が見られる。認知機能は大脳皮質領域間の神経連絡により営まれており、患者脳ではその機能的な連絡不全が起こって

いる¹。

大脳皮質神経回路は、a.細胞組織としての構築、b.局所回路と遠位回路の形成、c.過剰な神経連絡の淘汰、というステップが連続的に滞りなく実行されて形成される。この発達

過程における何らかの障害が病態脳の形成に関わると考えられている。しかし、それぞれのステップを制御する分子メカニズムの詳細は不明であり、病態解明や治療法開発の障壁となっている。

申請者が独自に明らかにした「a.大脳皮質の組織構築」における機能を含め²⁻⁴、NTsはそれぞれのステップで重要な役割を持つ。このNTsのシグナル伝達の鍵を握る分子が受容体 p75^{LNTR} である。一方、p75^{LNTR} はNTs 以外の様々な分子と異なる組み合わせで結合することで、NTs との結合の場合とは時に相反する多彩な作用 1) 神経細胞の細胞死、2) 神経突起の退縮、3) シナプス形成の抑制、を發揮することが中枢神経組織の損傷修復のメカニズムとして明らかにされつつある。このことは、大脳皮質神経回路の形成過程においても、p75^{LNTR} を基軸とした多彩なシグナルのバランス調節によって、回路素子(神経細胞)、その接続(シナプス結合)のレベルで神経回路の取舍選択が可能になることを示唆している。そこで本研究では、それぞれの機能分子が p75^{LNTR} と結合することにより伝達するシグナルの大脳皮質発達過程における意義を明らかにする。

1. Courchesne E and Pierce K (2005) *Cur Opin Neurol* 15 225-230.
2. Ohtsuka M, Fukumitsu H, Furukawa S (2009) *J Neurosci Res* 87: 301-306.
3. Ohtsuka M, Fukumitsu H, Furukawa S (2008) *Biochem Biophys Res Commun* 369: 1144-1149.
4. Fukumitsu H, Ohtsuka M, Murai R, Nakamura H, Itoh K, Furukawa S (2006) *J Neurosci* 26:13218-13230.

2. 研究の目的

知覚、認知を営む大脳皮質の正常機能には、神経連絡が質、量ともに確保されることが重要である。この発達過程での異状が自閉症スペクトラムの病因になる可能性が示唆されている。

<全体構想> 神経回路発達の鍵を握るニューロトロフィン (NTs) シグナルの大脳皮質発達における生物学的意義を明らかにすることで、病態解明あるいは治療法確立のための基礎知見を得る。

<本研究の目的> NTs 受容体 p75^{LNTR} はNTs 以外の様々な分子とも結合し、多彩なシグナルを伝達する(シグナル : プロトオンコジーン *trk* と p75^{LNTR} 複合型受容体に成熟型の NT が結合して伝達、シグナル : ソーチリンと p75^{LNTR} 複合型受容体に NT 前駆体 (pro-NT) が結合して伝達、シグナル : Nogo 受容体、Lingo-1 および p75^{LNTR} 複合型受容体に Nogo や MAG などが結合し

て伝達)。そこで、本研究では、の p75^{LNTR} /ソーチリンシグナルの大脳皮質の神経解剖学的発達における意義を明らかにし、そのバランス不全による発達障害を考察する。

3. 研究の方法

完全型および部分欠損型の p75^{LNTR} およびソーチリンタンパク質を発現するベクターを作成した。それぞれのタンパク質の発現を追跡するために、p75^{LNTR} には V5、ソーチリンには FLAG のタグが付いたタンパク質が発現するようにした。

< COS 細胞を用いた遺伝子発現の確認 >

それぞれの発現ベクターからのタンパク質発現を確認するためにリポフェクトアミン法を用いて COS7 細胞に遺伝子導入し、FLAG, V5 タグを特異的に認識する抗体を用いて、ウエスタンブロット法により確認した。

< PC12 細胞への遺伝子導入と ERK1/2 リン酸化に及ぼす影響 >

シグナルのシグナルに及ぼす影響を調べるために、それぞれの発現を確認するためにリポフェクトアミン法を用いてラット副腎髄質由来褐色細胞腫 (PC12) に遺伝子導入し、NGF 添加後の ERK1/2 リン酸化に及ぼす影響を調べた。

< 子宮内エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入 >

それぞれの成熟型あるいは部分欠損タンパク質を発現する発現ベクターを蛍光緑色タンパク質 (GFP) を発現するベクターとともに胎生 15.5 日胚の側脳室にガラスキャピラリーを用いて注入し、子宮内エレクトロポレーション法を用いて脳室帯の皮質前駆細胞に遺伝子導入した。その後 6 日、生後 20 日まで通常飼育し、ペントバルビタール過麻酔にてマウスを屠殺し、4%PFA を用いて経心的に灌流固定した。その後、脳を摘出し、薄切片を作成、GFP を特異的に認識する抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

< COS 細胞を用いた遺伝子発現の確認 >

完全型および部分欠損型いずれのタンパク質もその分子サイズから予想された位置にバンドが認められた。ソーチリン全長型では予想された全長型の 91.3kDa のバンドのほかに 5.5kDa にも弱いシグナルが認められた。細胞内で部分的に切断された ソーチリンタンパク質の C 末端部分であると考えられた。

< PC12 細胞への遺伝子導入と ERK1/2 リン酸化に及ぼす影響 >

p75^{L^{NTR}} およびソーチリンの全長型タンパク質を発現させた PC12 細胞では NGF 添加時における ERK1/2 のリン酸化が増強され、それぞれの部分欠損型を発現させた場合には ERK1/2 のリン酸化が抑制された (いずれも定量的なデータを解析中であるため、結果は示さず)。

< 子宮内エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入 >

E15.5 に GFP 遺伝子を導入された皮質前駆細胞は神経細胞に分化し、生後 6 日には大脳皮質内の最終定着位置である皮質 11/111 層に分布する。それぞれの完全型、部分欠損型タンパク質を発現させた神経細胞はいずれも第 11/111 層の神経細胞層に分布しており、GFP のみを発現させた細胞と大きな違いは認められなかった。

一方、20 日齢における神経突起の進展の様子を観察したところ、p75^{L^{NTR}} および ソーチリンの完全型を発現した神経細胞では明確な変化は認められなかったが、それぞれの部分欠損型の神経投射およびスパインの形成パターンは類似していることが明らかになった。現在、定量的な解析を実施中である。

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 8 件)

1. Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa S. (2011) Prenatal immune challenge compromises the normal course of neurogenesis during development of the mouse cerebral cortex. *J Neurosci Res*. 89:1575-1585.
2. Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa S. (2011) Prenatal immune challenge compromises development of upper-layer but not deeper-layer neurons of the mouse cerebral cortex. *J Neurosci Res* 89:1342-1350.
3. Kasai M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa S. (2011) Caffeic acid phenethyl ester reduces spinal cord injury-evoked locomotor dysfunction. *Biomed Res*. 32: 1-7.
4. Makino A, Iinuma M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa Y, Furukawa S. (2010) 2-Decenoic acid ethyl ester possesses neurotrophin-like activities to facilitate intracellular signals and

increase synapse-specific proteins in neurons cultured from embryonic rat brain. *Biomed Res*. 31:379-386.

5. Furukawa-Hibi Y, Nitta A, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa S, Nabeshima T, Yamada K. (2010) Overexpression of piccolo C2A domain induces depression-like behavior in mice. *Neuroreport* 21:1177-1181.
6. Kasai M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa S. (2011) Ethanol extract of chinese propolis facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury. *Evid Based Complement Alternat Med*;2011. pii: 749627.
7. Hirakawa A, Shimizu K, Fukumitsu H, Soumiya H, Iinuma M, Furukawa S. (2010) 2-Decenoic acid ethyl ester, a derivative of unsaturated medium-chain fatty acids, facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury. *Neuroscience* 171:1377-1385.
8. Kasai M, Jikoh T, Fukumitsu H, Furukawa S. (2010) FGF-2-responsive and spinal cord-resident cells improve locomotor function after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2010 Mar 3. [Epub ahead of print] DOI 20199141.

[学会発表](計 6 件)

1. 森慎吾、福光秀文、宗宮仁美、古川昭栄：体性感覚情報の脳内プロセッシングに関する研究、第 56 回日本薬学会東海支部大会、2010.7 岐阜
2. 福光秀文：大脳皮質神経層構築に対する神経栄養因子の作用、第 56 回日本薬学会東海支部大会、2010.7 岐阜 (学術奨励賞受賞講演)
3. 虎谷厚志、福光秀文、宗宮仁美、古川昭栄：Pyloro quinolone quinone (PQQ) による脳内マップキナーゼ活性化作用と抗うつ効果に関する研究、第 84 回日本生化学大会、2011. 9 京都
4. 森慎吾、福光秀文、宗宮仁美、古川昭栄：体性感覚情報に基づく課題の学習過程におけるリン酸化 ERK1/2 の脳内分布の変化、第 84 回日本生化学大会、2011. 9 京

都

5. 樹下洋輔、宗宮仁美、福光秀文、古川昭栄：大豆成分ソヤサボニンの腹腔内投与による脊髄損傷修復、第84回日本生化学大会、2011.9 京都
6. 後大輔、福光秀文、宗宮仁美、古川昭栄：2-デセン酸誘導体による脊髄損傷修復身について、日本薬学会第132年会、2012.3 札幌

〔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

福光 秀文 (FUKUMITSU HIDEFUMI)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00308280