

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500441

研究課題名(和文) シナプス後肥厚部に発現するLRP4の高次神経機能への関与

研究課題名(英文) Participation of LRP4 postsynaptic density protein in higher nerve function

研究代表者

棚橋 浩 (TANAHASHI, Hiroshi)

信州大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90236654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Lrp4 KOマウスは出生直後、呼吸不全で死亡し、合指・多指症を伴いE18.5において肺重量の減少、肺胞の発育不全が見られた。多くのKOマウスで両方/片方の腎臓欠損が見られE18.5 KO胎児では2.5倍の羊水過多が見られた。羊水は主に胎児尿が羊膜腔に排出されたものであるが両腎の欠損のある胎児でも羊水過多が見られた事からマウスとヒトでは羊水生産の様式が異なる事が示唆された。KOマウス胎児は呼吸様運動や嚥下ができない。卵膜、胎盤でアクアポリンの発現低下も見られ羊水の羊膜腔からの排出に異常を生じ羊水過多になったと考えられる。またアストロサイトでは活性化に伴いLRP4の発現誘導が起こる事が解った。

研究成果の概要(英文)：Lrp4 KO mice died at birth due to their inability to breathe. The mutant mice displayed syndactyly or polydactyly and 30% (29/97) bilateral and 53% (51/97) unilateral kidney agenesis. At E18.5 the mutant lungs were reduced in size (to 88%) compared with their wild type and heterozygote counterparts, and the mutant fetus had a 2.5-times greater volume of amniotic fluid than the controls. Although the major source of fluid entering the amniotic cavity is fetal urine, the polyhydramnios were observed in the mutant fetus with bilateral kidney agenesis. The system of amniotic fluid production may be different between human and mice. The two primary routes of amniotic fluid removal are fetal swallowing and absorption from the amniotic cavity into the fetal blood vessels of the chorionic plate. The mutant fetus displayed failure to swallow, and the expression of AQP9 and 1 were reduced in fetal membrane and placenta, respectively. We also observed Lrp4 was expressed in reactive astrocyte.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：神経可塑性 シナプス 合指多指症 歯数過剰 不正咬合 腎臓欠失 羊水過多 アクアポリン

## 1. 研究開始当初の背景

シナプスは神経伝達物質の放出に関わるシナプス前部と神経伝達物質を受け取った後の複雑な細胞内情報処理を効率的に行うシナプス後部に分かれる。PSDはシナプス後部膜の裏打ち構造を形成する膜蛋白と細胞質蛋白から構成される分子密度の高い分子複合体であり、短時間でもダイナミックな変化を起こす。PSDを構成する分子の働きによって正常なシナプス後部機能が発揮される。逆にそれらの分子の異常によりシナプス機能の破綻がもたらされ、その症状は精神・神経疾患となって現れる。

申請者の研究室ではこれまでに共同研究者と共に LRP4 の 3 種のリガンド (apoE、F-spondin、 agrin) を報告してきた。その過程で **1)** LRP4 はシナプス周囲を囲むアストロサイトから放出される apoE/cholesterol を受け取ってシナプスの構造や活性の維持に関わっている可能性がある (*Brain Res* 1177 [2007] 19)。 **2)** LRP4 はリガンドの F-spondin と共に胎生期の神経管で軸索伸長の進路決定に関わっている (*J Cell Biol* 178 [2007] 1237)。 **3)** LRP4 は神経・筋接合に必須であり、ポストシナプス筋終板で MuSK (muscle-specific kinase) と複合体を形成し、MuSK を活性化してアセチルコリンレセプターのクラスター化とそれに続くシナプス形成に必須の蛋白である事や、運動神経終末から分泌される糖蛋白 agrin と結合し、シナプス形成後の LRP4・MuSK 結合を増強してシナプス形成を保持する為に必須の蛋白である事 (*Neuron* 60 [2008] 285) を明らかにしてきた。本研究では LRP4 の主発現組織である脳中枢神経系での高次神経機能への関与を調べる為に KO マウスを作成し解析した。

## 2. 研究の目的

LRP4 は PSD に局在するレセプターで末梢神経系では神経・筋接合の形成と保持に必須の蛋白である。しかしながら LRP4 の主発現組織である脳中枢神経系での高次神経機能への関与については報告が無い。本研究では作製した Lrp4 ノックアウト (KO) マウス (conventional 及び条件付き) を用い、胎生期の脳、成体の脳の神経新生、シナプス新生への関与を調べると共に Lrp4 条件付き KO マウスの学習・行動・情動等の高次神経機能を解析することにより LRP4 の関与する脳発育、神経回路形成、神経可塑性獲得の仕組みを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) Lrp4 ノックアウト (KO) マウス (conventional 及び条件付き) の作成

C57BL/6J mouse ES cell line BRUCE-4 にターゲティングベクターを導入した ES cell を Balb/c 胚盤胞にインジェクションし、ICR を仮親マウスとしてキメラマウスを作製した。このキメラマウスを C57BL/6J と交配し

て F1 マウスを作製、Flp マウスと交配し、ネオマイシン陽性選択カセットを除き Flox マウスを作製した。この Flox マウスは Lrp4 転写開始点上流 1527 base、第一イントロン 122 base に loxP 部位を持つ。この Flox マウスから Lrp4 conventional KO マウス、神経幹細胞特異的 Nestin-Cre Lrp4 条件付き KO マウス、前脳特異的 CaMK2 $\alpha$ -Cre Lrp4 条件付き KO マウスを作製した。

### (2) 胎生期の Lrp4 KO マウス脳の層構造の解析

Lrp4 conventional KO マウスを用いて胎生期の脳の層構造の解析を行った。

### (3) 成体における神経新生、分化の解析

CaMK2 $\alpha$ -Cre Lrp4 条件付き KO マウスを用いた。4 週齢時に 8 時間ごと 3 回 BrdU を腹腔内投与し、最後の投与から 8 時間後、或は 4 週間後に脳を固定した。歯状回の BrdU 陽性細胞数を定量して増殖細胞数と 4 週間後の生存細胞数を調べた。また BrdU 陽性細胞が BrdU 投与 4 週間後に神経細胞に分化したかアストロサイトに分化したか NeuN、S100 $\beta$  抗体との共染色により調べた。

### (4) CaMK2 $\alpha$ -Cre Lrp4 条件付き KO マウスのシナプス機能の電気生理学的解析

海馬急性スライスを用いた CA1 神経細胞の NMDA/AMPA 応答比、paired-pulse ratio の測定、theta-burst stimulation によって誘導される LTP の解析を行った。

### (5) CaMKI2 $\alpha$ -Cre Lrp4 条件付き KO マウスの行動解析

自発活動性 open field locomotor activity test、学習記憶 contextual and cued fear conditioning test、平衡感覚、運動協調性 balance-beam test、抑うつ傾向 tail suspension test、薬物感作 sensitization to cocaine test を行った。

## 4. 研究成果

(1) 本研究において申請者は LRP4 の conventional KO マウス、前脳特異的 (CaMK2 $\alpha$ -Cre)、神経幹細胞特異的 (Nestin-Cre) Lrp4 条件付き KO マウスを作製した。Lrp4 conventional KO マウスは全て出生直後に呼吸ができずに死亡し、合指・多指症を呈し(図 1)、胎生 E18.5 において肺重量の減少 (12%)、肺泡の発育不全(図 2)が見られた。また多くの KO マウスに両方 (29 匹/97 匹) あるいは片方 (51 匹/97 匹) の腎臓の欠損が見られた(図 3)。予期しなかった表現型として E18.5 KO 胎児では 2.5 倍の羊水過多が見られた。面白い事にこれは両腎の欠損のある胎児においても見られた。そもそも羊水は主として胎児腎臓で作られた尿が羊膜腔に排出されたものである。胎児肺から分泌される肺液も成分となり、一部は胎盤卵膜においても

生産される。一方、羊水の羊膜腔からの排出は、胎児の呼吸様運動・嚥下による取り込みや卵膜からの吸収によっておこる。そこで Lrp4<sup>+/-</sup>♂と交配した妊娠 Lrp4<sup>+/-</sup>♀19dpc の子宮に墨汁を注入し 30 分後に胎児を取り出し固定後、胎児の肺、胃腸を調べたところ、コントロールとなる Lrp4<sup>+/+</sup>、Lrp4<sup>+/-</sup>胎児では墨汁の取り込みが見られたのに対し Lrp4<sup>-/-</sup>(KO) 胎児では墨汁の取り込みが見られなかった。また墨汁の取り込みは E17.5 より E18.5 の Lrp4<sup>+/+</sup>、Lrp4<sup>+/-</sup>胎児の方が活発だった。さらに胎児の呼吸様運動によって胎児の肺から分泌される肺サーファクタント蛋白 A を調べると E18.5 KO マウス胎児では殆ど検出されなかった。また KO 胎児に羊水過多の一因となる消化管閉塞は見られなかった。これらの事から KO マウス胎児は呼吸様運動・嚥下ができない事が解った。さらに羊膜腔からの水の取り込みに重要な卵膜上の aquaporin 9 遺伝子の発現低下も見られた。以上の結果から羊水の羊膜腔からの排出（嚥下、卵膜からの吸収）に異常を生じ、腎臓が無いにもかかわらず羊水過多になったと考えられる。羊水量の調節は生産だけでなく排出がいかに大事かを示す結果となった。また胎盤において aquaporin 1 遺伝子の発現低下も見られた。一方、マウスと異なってヒトでは両方の腎臓の機能不全により重度の羊水過少になり肺低形成も伴う。これは重篤でしばしば致死をおこす (Potter 症候群)。では両腎のないマウスの羊水はどこで生産されているのだろうか。本研究の結果から羊水生産の仕組みがマウスとヒトでは異なる可能性が示された(棚橋 投稿準備中)。

ところで aquaporin 1, 4, 9 は脳内でも発現している。aquaporin 1 は脈絡層上皮細胞に発現しており脳脊髄液生産に関与していると考えられている。脊髄後角、三叉神経感覚神経節、脳損傷後の中隔神経でも発現している。aquaporin 9 はアストロサイトでグリセロールチャンネルとしてエネルギー代謝に関与していると考えられている。カテコールアミン作動性ニューロン、軟膜下血管の内皮細胞でも発現している。では Lrp4 KO マウス脳における aquaporin の発現はどのようになっているか、今後の課題である。

一方、Nestin-Cre Lrp4 条件付き KO マウスもすべて出生直後に呼吸ができずに死亡したが、合指多指症、腎臓の欠損は見られなかった。CaMK2 $\alpha$ -Cre Lrp4 条件付き KO マウスは、同腹のマウスと同様に成長し、繁殖可能このマウスを用いて電気生理実験、行動科学実験を行った。



図 1. Lrp4 KO マウスでは合指・多指が見られる。前脚とその骨、軟骨の染色

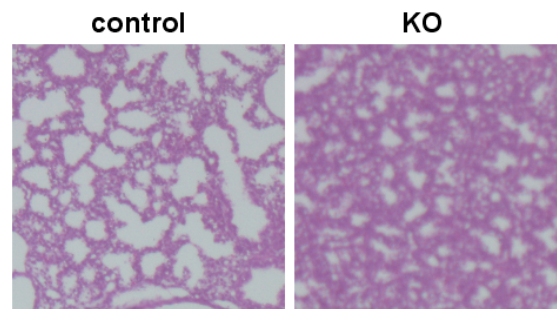


図 2. Lrp4 KO 胎生 E18.5 において肺胞の発育不全が見られた。

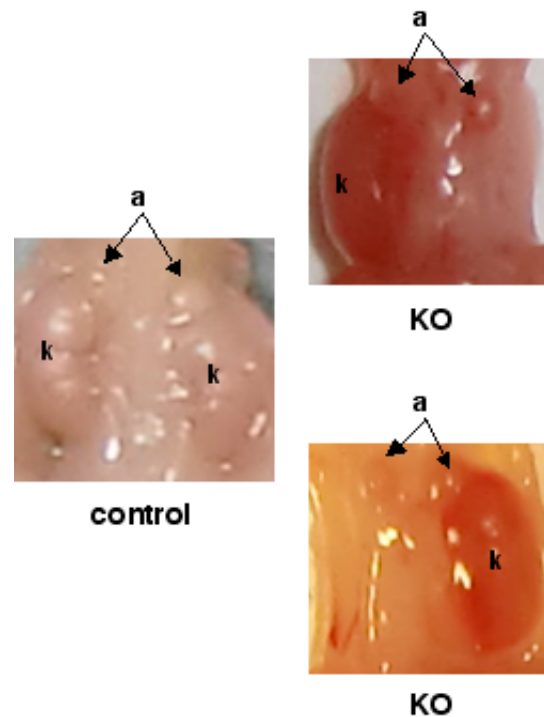


図 3. 多くの Lrp4 KO マウスに両方(29 匹 / 97 匹)あるいは片方(51 匹 / 97 匹)の腎臓の欠損が見られた。a: 副腎、k: 腎臓

(2) Lrp4 conventional KO マウスを用いて胎生期の脳の層構造を解析したが、同腹のコントロールマウスと差が見られなかった。

(3) 成体 (4 週齢時) の CaMK2  $\alpha$ -Cre Lrp4 前脳特異的 KO マウスを BrdU 処理し、海馬歯状回の BrdU 陽性細胞新生と BrdU 処理 4 週間後 (8 週齢時) の BrdU 陽性新生細胞の生存数を解析したが、同腹のコントロールマウスと差が見られなかった (図 4)。

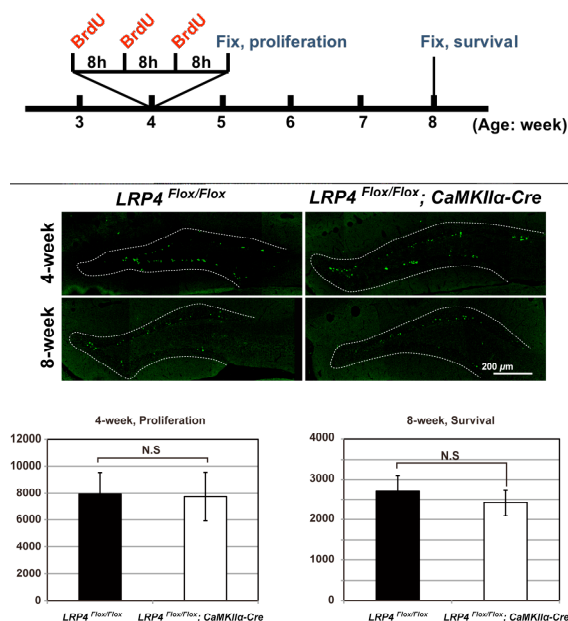


図 4. 前脳特異的 Lrp4 KO マウスの成体 (4 週齢時) 海馬歯状回における新生細胞数と新生細胞の 4 週間後 (8 週齢時) の生存数

またこの 4 週齢時の BrdU 陽性新生細胞が 4 週間後 (8 週齢時) に神経細胞、アストロサイト、いずれに分化したかを解析したが、同腹のコントロールマウスと差が見られなかった (図 5)。

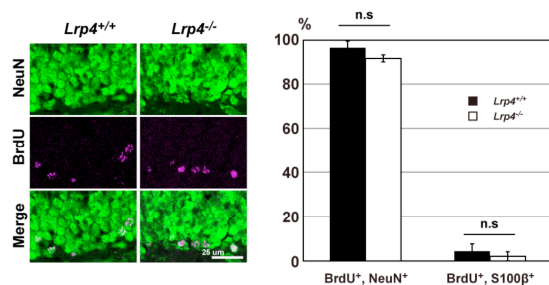


図 5. 前脳特異的 Lrp4 KO マウスを 4 週齢時に BrdU 処理し、海馬歯状回において新生した細胞 (BrdU 陽性細胞) が 4 週間後 (8 週齢時) に神経細胞 (NeuN)、アストロサイト (S100 $\beta$ )、いずれに分化したかを解析

(4). (5) 予備的な結果だが CaMK2  $\alpha$ -Cre Lrp4 条件付き KO マウスのシナプス機能の電気生理学的解析、行動解析において条件付き KO マウスとコントロールマウスに若干の差が見られたが、まだ病理学的な裏付けがなく現在、詳細な解析を行っている。

#### その他 計画外の事

アストロサイトの活性化に伴い LRP4 の発現誘導が起こる事が解った。MuSK はアストロサイトでも発現が見られ、脳損傷部のアストロサイトでも agrin の発現が見られる。アストロサイトで agrin や MuSK によるアセチルコリンのクラスター化がおこるわけではない。神経・筋接合におけるシグナルとは異なった経路が存在するものと思われる。アストロサイトで LRP4 が agrin や MuSK を介したシグナルへ関与しているか、全く異なったシグナル経路をとるのか、またアストロサイト LRP4 の神経細胞への影響を明らかにする事が今後の課題である。

5. 主な発表論文等  
[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

(その他)

① 棚橋 浩、原芳信、Wei-Dong Yao、阪上洋行、鈴木龍雄、シナプス後肥厚部に発現する LRP4 (LDL-receptor-related protein 4) の高次神経機能への関与、冲中記念成人病研究所年報、38、2012、pp. 58-59.

② 棚橋 浩、脳で働く分子を探る、第 2 回疾患予防医科学キックオフセミナー、日本科学未来館 (東京)、11 月 18 日 2012 年

③ 棚橋 浩、シナプス後肥厚部に発現する LRP4 (LDL-receptor-related protein 4) の高次神経機能への関与、第 37 回冲中記念成人用研究所 研究報告会、虎ノ門病院 (東京)、3 月 3 日 2012 年

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

棚橋 浩 (TANAHASHI, Hiroshi)  
信州大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：90236654

(2) 研究分担者

鈴木 龍雄 (SUZUKI, Tatsuo)  
信州大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：80162965

(3) 連携研究者

阪上 洋行 (SAKAGAMI, Hiroyuki)  
北里大学・医学部・教授

研究者番号 : 90261528

原 芳信 (HARA, Yoshinobu)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号 : 40558467