

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460073

研究課題名(和文) 巨大分泌タンパク質リーリンの新規情報伝達機構と、その病態との関連

研究課題名(英文) Novel mechanism of Reelin signaling and its relationship with neuropsychiatric disorders

研究代表者

服部 光治 (Hattori, Mitsuharu)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60272481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リーリンは脳の形成と機能に必須の巨大分泌蛋白質であり、その機能低下が精神神経疾患の発症や増悪化に寄与する。我々はリーリンのC末端領域(CTR)が効率的なDab1リン酸化に必須であることを見出した。リーリンCTRだけを欠損するノックインマウスを作製した。このマウス脳で生後大脳の樹状突起構造に異常が生じるとともに統合失調症様の症状を示した。さらに我々はリーリンがプロテアーゼADAMTS-3によって不活化されることを見出した。ADAMTS-3欠損マウス脳ではリーリン分解が著減し、下流シグナルは亢進していた。すなわちADAMTS-3の阻害はリーリンの量と機能を上昇させることが証明された。

研究成果の概要(英文)：The secreted glycoprotein Reelin is believed to play critical roles in the pathogenesis of several neuropsychiatric disorders. The highly basic C-terminal region (CTR) of Reelin is necessary for efficient activation of its downstream signaling. We found that CTR-dependent Reelin functions are required for some specific normal brain functions and that mice lacking the CTR recapitulate some aspects of neuropsychiatric disorders. We also identified ADAMTS-3 as the protease that cleaves and inactivates Reelin in the cerebral cortex and hippocampus. Cleavage by ADAMTS-3 is the major contributor of Reelin inactivation in vivo. Dendritic branching and elongation was increased in ADAMTS-3-deficient mice. Therefore, inhibition of ADAMTS-3 upregulates Reelin activity and may be a potential therapeutic strategy for the prevention or treatment of neuropsychiatric and neurodegenerative disorders.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：脳 リーリン 遺伝子改変マウス プロテアーゼ 精神神経疾患

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の脳では機能や構造が類似した神経細胞が美しい層(レイヤー)構造を成して存在している。この構造は神経ネットワークの形成と機能を効率化するために重要であり、その破綻は多くの精神神経疾患の原因またはリスクと考えられている。層構造の形成及び維持機構を解明することは、脳の働きと疾患を理解するために極めて重要である。

リーリン(Reelin)は脊椎動物だけに存在する巨大分泌タンパク質であり、胎生期の層構造形成を最上位で司る。その受容体はアポリポ蛋白質 E 受容体 2(ApoER2)と超低密度リポ蛋白質受容体(VLDLR)であり、リーリンがこれらに結合すると細胞内蛋白質 Dab1 のリン酸化が誘導される。この下流で生じる現象の詳細は未だ不明である。近年、リーリンの「機能低下」が精神神経疾患発症に関与することが次々と明らかになってきた。主なものは以下である。

1. リーリンは NMDA 受容体の量や機能を上昇させる (Neuron 47, 567 (2005)、J. Neurosci. 26, 12943 (2006)、J. Neurosci. 27, 10165 (2007)、他多数)。

2. アミロイド のシナプス毒性に対しリーリンが拮抗作用を表す (PNAS 106, 15938 (2009))。

3. リーリンをヘテロ欠損したアルツハイマー病モデルマウスでは、アミロイド の蓄積やプラーク化が早く進行する (J. Neurosci. 30, 9228 (2010))。

4. マウス脳室へのリーリン直接注入により、シナプス密度や記憶力が上昇する (Learn. Mem. 18, 558 (2011)、J. Psychopharmacol. 27, 386 (2013))。

5. 成体脳においてリーリンは神経新生・樹状突起発達・シナプス形成・記憶依存的行動を正に制御する (J. Neurosci. 32, 12051 (2012)、J. Neurosci. 33, 15652 (2013)、他)。

6. アルツハイマー病患者の脳脊髄液では、リーリン量が低下し、その分解産物量が上昇する (PNAS 103, 5573 (2006)、他数報)。  
すなわち、リーリンの機能低下は悪であり、これを改善すれば精神神経疾患の根本的改善につながることを示唆している。しかし、マウス個体でリーリンの「機能低下」を再現した例はなく、これが病態発症につながるメカニズムの詳細は解析されてこなかった。また、リーリン機能を「増強」するための具体的な方策やアイデアも存在しなかった。

## 2. 研究の目的

生後脳の構造形成やその維持、および高次機能発現におけるリーリンの機能とその分子メカニズムを理解することを目的とする。特に、精神神経疾患に対する新規治療法開発を念頭におき、以下の を解明する。

新規リーリン共受容体によるリーリンの情報伝達機構の解明

リーリンの「機能低下」による層構造異

常の発症機構と、その脳機能への影響解明  
分解阻害によるリーリン機能増強効果の解明

## 3. 研究の方法

リーリン C 末端領域だけを欠損するノックイン(C-KI)マウスを作製し、その脳を抗体染色等により詳細に調べた。また、C-KIマウスの網羅的行動解析を行った。また、リーリン分解活性を精製することにより、これを担う酵素を同定した。さらに、そのノックアウトマウスを作製、解析した。

## 4. 研究成果

C-KI マウス脳では、リーリンシグナルが減弱していることが確認された。すなわち、リーリンの C 末端領域は何らかの情報伝達機構に関与することが証明された。C-KIマウスでは、胎生期の層構造形成は正常であったが、生後になり大脳の樹状突起構造に異常が観察された(J. Neurosci. 2015)。また、

C-KI マウスは、多動・不安様行動の減少・作業記憶能力の低下など、統合失調症様の症状を示し、リーリン機能低下によるヒトの疾患の一部を再現していることが判った(Sci. Rep. 2016)。以上のことから、リーリン C 末端領域はリーリンの機能の重要な一部分を担い、それは精神疾患の発症にも関与していることが示唆された。

リーリン C 末端領域に結合する分子として、今までリーリンシグナルとの関わりが知られていないの膜貫通タンパク質を同定した。この分子はセマフォリンや VEGF の共受容体としても働くことが知られており、脳においても重要な機能を担っている。細胞レベルおよびタンパク質レベルでの相互作用は詳細に解析したので、現在、生体レベルでの結合の意義を解析している。

リーリンはリピート 3 内で特異的な分解を受け、これにより不活化されることを見いだした(JBC 2014)。この酵素の実体は不明であったが、我々は培養神経細胞培養上清から精製を行い、分泌型プロテアーゼ ADAMTS-3 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3) であると同定した(J. Neurosci. 2017)。ADAMTS-3 欠損マウス脳ではリーリン分解が著減し、下流シグナルは亢進していた(J. Neurosci. 2017)。ADAMTS-3 完全欠損マウスはそのほとんどが生後すぐに死亡することから、生後脳の解析は難しい。そこで、ADAMTS-3 flox マウスと Emx1-Cre マウスを交配し、前脳興奮細胞特異的に ADAMTS-3 を欠損するマウスを作製した。このマウスの生後脳を解析した結果、通常マウスに比べて大脳皮質神経細胞の樹状突起の分岐や伸長が増えていた。これはリーリンの機能が上昇したことを意味している。すなわち ADAMTS-3 の阻害はリーリンの量と機能を上昇させることが証明された。ADAMTS-3 阻害剤は、精神疾患やアルツハイマー病を改善す

ることが期待される。

#### 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)

- Koie, M., Okumura, K., Hisanaga, A., Kamei, T., Sasaki, K., Deng, M., Baba, A., Kohno, T., and Hattori, M. Cleavage within Reelin repeat 3 regulates the duration and range of signaling activity of Reelin. **J. Biol. Chem.** 289, 12922-12930 (2014)
- Onoue, A., Takeuchi, M., Kohno, T., and Hattori, M. Aberrant fragment of Dab1 protein is present in yotari mouse. **Neurosci. Res.** 88, 23-27 (2014)
- Kohno, T., Honda, T., Kubo, K., Nakano, Y., Tsuchiya, A., Murakami, T., Banno, H., Nakajima, K., and Hattori, M. Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis. **J. Neurosci.** 35, 4776-87 (2015)
- Sato, Y., Kobayashi, D., Kohno, T., Kidani, Y., Prox, J., Becker-Pauly, C., and Hattori, M. Determination of cleavage site of Reelin between its sixth and seventh repeat and contribution of meprin metalloproteases to the cleavage. **J. Biochem.** 159, 305-312 (2016)
- Mizukami, T., Kohno, T., and Hattori, M. CUB and Sushi multiple domains 3 regulates dendrite development. **Neurosci. Res.** 110, 11-17 (2016)
- Sakai, K., Shoji, H., Kohno, T., Miyakawa, T., and Hattori, M. Mice that lack the C-terminal region of Reelin exhibit behavioral abnormalities related to neuropsychiatric disorders. **Sci. Rep.** 6, 28636 (2016)
- Nakamura, K., Beppu, M., Sakai, K., Yagyū, H., Matsumaru, S., Kohno, T., and Hattori, M. The C-terminal region of Reelin is necessary for proper positioning of a subset of Purkinje cells in the postnatal cerebellum. **Neuroscience** 336, 20-29 (2016)
- Ogino, H., Hisanaga, A., Kohno, T., Kondo, Y., Okumura, K., Kamei, T., Sato, T., Asahara, H., Tsuiji, H., Fukata, M., and Hattori, M. Secreted metalloproteinase ADAMTS-3 inactivates Reelin. **J. Neurosci.** 37, 3181-3191 (2017)

[学会発表](計 45 件)

- Kyoko Okumura, Mari Koie, Arisa Hisanaga, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori. Specific proteolytic cleavage of Reelin regulates duration and range of its signaling. 第 37 回日本神経科学学会 (横浜) 2014 年 9 月 13 日
- Kaori Sakai, Takao Kohno, Hayata Yagyū, and Mitsuharu Hattori. The significance of the highly basic C-terminal region of Reelin in developing hippocampus. 第 37 回日本神経科学学会 (横浜) 2014 年 9 月 11 日
- 荻野ひまり、久永有紗、近藤佑多、奥村恭子、深田正紀、河野孝夫、服部光治 脳の形成と機能に重要な分泌タンパク質リーリンの不活化を担うプロテアーゼ ADAMTS-3 に関する研究 第 87 回日本生化学会大会 (京都) 2014 年 10 月 16 日
- 高嶋悠、牧野誠、山田梨絵、河野孝夫、服部光治 難読症関連遺伝子産物 mKIAA 0319 による神経細胞形態制御の分子機構の解明 87 回日本生化学会大会 (京都) 2014 年 10 月 16 日
- Tomoharu Mizukami, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori. Effect of CSMD3, a candidate gene of neuropsychiatric disorders, on neuronal morphology. Neuroscience 2014. (Washington D.C., U.S.A.) 2014 年 11 月 15 日
- Kyoko Okumura, Arisa Hisanaga, Mari Koie, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori. Specific proteolytic cleavage of Reelin regulates duration and range of its Signaling. Neuroscience 2014. (Washington D.C., U.S.A.) 2014 年 11 月 16 日
- Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima and Mitsuharu Hattori. The novel function of Reelin in the dendrite development and layer formation in the postnatal brain. Neuroscience 2014. (Washington D.C., U.S.A.) 2014 年 11 月 16 日
- 佐藤嘉高, 小林大地, 河野孝夫, 服部光治 脳形成に必須な分泌タンパク質リーリンの C-t site 切断プロテアーゼに関する解析 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2014 (静岡) 2014 年 11 月 9 日
- 奥村恭子、鯉江真利、久永有紗、荻野ひまり、河野孝夫、服部光治 リーリンの特異的切断による不活化の分子機構と生理的意義の解明 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015 年 3 月 27 日
- 河野孝夫、本田岳夫、久保健一郎、中野良美、土屋綾香、村上達郎、阪野英幸、仲嶋一範、服部光治 巨大分泌蛋白質リーリンの C 末端領域を介した大脳皮質形成

- 機構 第 61 回日本薬学会東海支部大会 (名古屋) 2015 年 7 月 4 日  
 奥村恭子、鯉江真利、河野孝夫、服部光治 リーリンの特異的切断の生理的意義の解明 第 61 回日本薬学会東海支部大会(名古屋) 2015 年 7 月 4 日  
 亀井隆奈、本郷彩、久永有紗、築地仁美、河野孝夫、服部光治 リーリンの特異的切断に関するプロテアーゼの解析 第 61 回日本薬学会東海支部大会(名古屋) 2015 年 7 月 4 日  
 水上智晴、河野孝夫、服部光治 精神疾患関連遺伝子 CSMD3 の神経細胞における機能の解明 第 61 回日本薬学会東海支部大会(名古屋) 2015 年 7 月 4 日  
 牧野誠、山田梨絵、河野孝夫、服部光治 難読症関連遺伝子が神経形態に与える影響の解明 第 61 回日本薬学会東海支部大会(名古屋) 2015 年 7 月 4 日  
 別府茉莉子、中村晃太、河野孝夫、服部光治 リーリン C 末端領域欠損マウスにおけるブルキン細胞の異常配置に関する解析 第 61 回日本薬学会東海支部大会(名古屋) 2015 年 7 月 4 日  
 Himari Ogino, Arisa Hisanaga, Yuta Kondo, Hitomi Tsuiji, Takao Kohno, and Mitsuharu Hattori. ADAMTS-3 is the major protease that inactivates Reelin in brain. 第 38 回日本神経科学大会(神戸) 2015 年 7 月 28 日  
 Kaori Sakai, Hirotaka Shoji, Takao Kohno, Tsuyoshi Miyakawa, and Mitsuharu Hattori. The significance of highly basic C-terminal region of Reelin for behavior. 第 38 回日本神経科学大会(神戸) 2015 年 7 月 29 日  
 Tomoharu Mizukami, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori. Effect of CSMD3, a candidate gene of neuropsychiatric disorders, on neuronal morphology. 第 38 回日本神経科学大会(神戸) 2015 年 7 月 29 日  
 酒井かおり、昌子浩孝、河野孝夫、宮川剛、服部光治 リーリン機能低下が脳高次機能に及ぼす影響の解析 第 14 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム(千葉) 2015 年 9 月 11 日  
 荻野ひまり、久永有紗、近藤佑多、築地仁美、河野孝夫、服部光治 生体におけるリーリン切断酵素の同定とその生理的意義の解明 第 14 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム(千葉) 2015 年 9 月 11 日  
 Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori. Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis. Neuroscience 2015. (Chicago, U.S.A.) 2015 年 10 月 19 日  
 Himari Ogino, Arisa Hisanaga, Yuta Kondo, Hitomi Tsuiji, Takao Kohno, and Mitsuharu Hattori. ADAMTS-3 is the major protease that inactivates Reelin in brain. Neuroscience 2015. (Chicago, U.S.A.) 2015 年 10 月 21 日  
 Kaori Sakai, Hirotaka Shoji, Takao Kohno, Tsuyoshi Miyakawa, and Mitsuharu Hattori. The significance of the highly basic C-terminal region of Reelin for behavior. Neuroscience 2015. (Chicago, U.S.A.) 2015 年 10 月 21 日  
 柳生隼太、河野孝夫、服部光治 脳形成に必須な分泌蛋白質リーリンの C 末端領域を介した機能制御機構の解明 日本薬学会東海支部会(名古屋) 2015 年 11 月 1 日  
 加藤路尚、荻野ひまり、河野孝夫、服部光治 リーリン特異的分解酵素 ADAMTS-3 の欠損は、リーリン C 末端領域欠損マウスの脳構造異常を改善するか? BMB2015(神戸) 2015 年 12 月 3 日  
 奥村恭子、鯉江真利、河野孝夫、服部光治 リーリンの N-t site 切断はシグナルの持続性と範囲を制御している BMB2015(神戸) 2015 年 12 月 3 日  
 Zuben P Brown, Yu Kitago, Kyoko Matoba, 岩崎憲治、服部光治、高木淳一 recombinant production of intact full-length Reelin protein allowed visualization of its multimer by negative-stain electron microscopy. BMB2015(神戸) 2015 年 12 月 1 日  
 Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori. C-terminal region of Reelin is required for development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its functions are regulated by specific proteolysis. 「Neocortical Organization III」(東京) 2016 年 2 月 11 日  
 水上智晴、河野孝夫、服部光治 精神疾患関連遺伝子 CSMD3 は神経細胞の樹状突起形成に寄与する。日本生化学会中部支部会(三重) 2016 年 5 月 21 日  
 山影祐子、河野孝夫、服部光治 アミロイドペプチドが分泌タンパク質リーリンに及ぼす影響の解明。日本生化学会中部支部会(三重) 2016 年 5 月 21 日  
 荻野ひまり、久永有紗、近藤佑多、築地仁美、河野孝夫、服部光治 ADAMTS-3 は脳でリーリン不活化を担う主要なプロテアーゼである。日本生化学会中部支部会(三重) 2016 年 5 月 21 日

Himari Ogino, Arisa Hisanaga, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori. Reelin is inactivated by a secreted metalloproteinase ADAMTS-3 in embryonic cerebral cortex. FENS 2016(コペンハーゲン) 2016年7月3日  
河野孝夫 巨大分泌蛋白質リーリンの機能制御機構と、その生理的意義の解明 日本薬学会東海支部会(名古屋)2016年7月9日  
酒井かおり、昌子浩孝、河野孝夫、宮川剛、服部光治 リーリン機能低下が脳高次機能に及ぼす影響の解析 日本薬学会東海支部会(名古屋)2016年7月9日  
Kaori Sakai, Hirotaka Shoji, Takao Kohno, Tsuyoshi Miyakawa, and Mitsuharu Hattori. Mice that lack the C-terminal region of Reelin exhibit behavioral abnormalities related to neuropsychiatric disorders. Gordon Research Conference, Neurobiology of Brain Disorders. (ジローナ、スペイン) 2016年8月8日-9日  
Himari Ogino, Arisa Hisanaga, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori. Reelin is cleaved and inactivated by a secreted metalloproteinase ADAMTS-3 in the brain. Gordon Research Conference, Neurobiology of Brain Disorders. (ジローナ、スペイン) 2016年8月8日-9日  
酒井かおり、昌子浩孝、河野孝夫、宮川剛、服部光治 リーリン機能低下が脳高次機能に及ぼす影響の解析 第15回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2016(大阪)2016年9月10日  
山影祐子、荻野ひまり、河野孝夫、服部光治 リーリンの切断抑制によるアルツハイマー病治療効果の解明 日本生化学会大会(仙台)2016年9月25日  
荻野ひまり、久永有紗、近藤佑多、築地仁美、河野孝夫、服部光治 ADAMTS-3は大脳皮質と海馬におけるリーリン機能を負に制御する 日本生化学会大会(仙台)2016年9月25日  
Yuko Yamakage, Himari Ogino, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori. Does inhibition of Reelin processing ameliorate Alzheimer's disease? Neuroscience2016 (San Diego, CA) 2016年11月15日  
Kaori Sakai, Hirotaka Shoji, Takao Kohno, Tsuyoshi Miyakawa, and Mitsuharu Hattori. Mice that lack the C-terminal region of Reelin exhibit behavioral abnormalities related to neuropsychiatric disorders. Neuroscience2016 (San Diego, CA) 2016年11月15日  
水上智晴、周春雨、池田和貴、嶋中雄太、新井洋由、有田誠、服部光治 脳構造形成に必須な分泌タンパク質リーリンの脳内

脂質に対する機能の解明 第39回日本分子生物学会年会(横浜)2016年11月30日  
加藤路尚、宮本智美、河野孝夫、服部光治 成体脳における、分泌タンパク質リーリンの不活性化を担うADAMTSプロテアーゼ群に関する解析 第39回日本分子生物学会年会(横浜)2016年12月2日  
河野孝夫、荻野ひまり、久永有紗、近藤佑多、築地仁美、服部光治 巨大分泌タンパク質リーリンの機能は、ADAMTS-3による特異的切断により制御される 日本薬学会第137年会(仙台)  
加藤路尚、宮本智美、河野孝夫、服部光治 成体脳における、分泌タンパク質リーリンの不活性化を担うADAMTSプロテアーゼに関する解析 2017年3月26日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称: ADAMTS-3を用いたリーリン分解  
発明者: 服部光治、河野孝夫、久永有紗、鯉江真利、鈴木健太  
権利者: 名古屋市立大学  
種類: 特許  
番号: 特開2014-36607A  
取得年月日: 2015年11月20日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/bsk/indexj1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部光治 (HATTORI MITSUHARU)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号: 60272481