

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830028

研究課題名(和文)チロシン脱リン酸化酵素SHP-1を介した軸索再生阻害と刈り込みのバランス制御

研究課題名(英文)Functional analysis of SHP-1 in the central nervous systems

研究代表者

藤田 幸(Fujita, Yuki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60631215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに申請者はチロシン脱リン酸化酵素SHP-1を阻害することにより、中枢神経損傷後に起こる運動機能の自然回復が促されることが報告されている。本研究では、中枢神経系におけるSHP-1の機能を明らかにすることを目的とした。SHP-1の発現量が増加することにより、細胞骨格系を制御するFilaminAを介して神経細胞死が増加した。以上の結果はSHP-1を介した細胞内シグナル伝達経路を阻害することで神経保護作用を導ける可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Protein tyrosine phosphatases regulate various signaling mechanisms in the central nervous system (CNS). Src homology 2-containing phosphatase (SHP)-1 is the classical non-receptor protein tyrosine phosphatase (PTP), and involved in axon growth inhibition and neuronal apoptosis. The longer isoform of SHP-1, SHP-1L has also been identified but its role in the CNS remains to be unclear. In this study, we show that overexpression of SHP-1L as well as SHP-1 increases neuronal apoptosis. However, overexpression of SHP-1 or SHP-1L in mouse cortical neurons does not affect neurite length. Filamin A (FLNa), which is an actin-binding cytoskeletal protein, inhibits apoptosis induced by SHP-1 and SHP-1L. Co-expression of SHP-1 along with FLNa increases cytoplasmic localization of SHP-1. Our results suggest that SHP-1 and SHP-1L negatively regulates neuronal survival via FLNa.

研究分野：分子神経科学

キーワード：中枢神経 SHP-1

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞や脊髄損傷などの障害により、中枢神経が障害されると、神経細胞の死や脱落によって神経回路網が破綻し、機能が失われる。その一方で、傷害を免れた軸索が新たな代償性の神経回路を形成することにより、ある程度の自然回復を示すことがある。申請者は、これまでの研究で、チロシン脱リン酸化酵素 SHP-1 を阻害することにより、大脳皮質運動野の損傷後に起こる運動機能の自然回復が促されることを見いだした。SHP-1 欠損マウスでは損傷後に残存した軸索から、側枝形成が顕著に促された (Tanaka, Fujita et al., *Cell Death Dis.*, 2013)。また、SHP-1 を介した軸索伸長阻害の分子機構を明らかにした (Fujita et al., *EMBO J.*, 2011; Fujita et al., *Cell Death Dis.*, 2011; 特願 2010-41180)。このようにして、SHP-1 が神経回路の再構築を妨げることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

これまでに申請者はチロシン脱リン酸化酵素 SHP-1 を阻害することにより、中枢神経損傷後に起こる運動機能の自然回復が促されることを見いだした。また、SHP-1 を介して軸索伸長が阻害される分子メカニズムを解明した。SHP-1 は、軸索伸展を促進する TrkB 受容体を脱リン酸化することで不活性化し、軸索再生を阻害することが明らかになった。これらの知見は、SHP-1 が神経回路の再構築を妨げること示唆している。このことから、SHP-1 を抑制する手法が中枢神経再生治療に貢献する可能性が推察されたが、SHP-1 は全身に発現するため、SHP-1 阻害薬を用いることは副作用を生じる可能性が高い。SHP-1 には、C 末端領域の異なるアイソフォーム SHP-1L が存在するが、その機能は明らかになっていない。本研究では、SHP-1、SHP-1L の両アイソフォームの神経細胞に対する作用を明らかにし、SHP-1、SHP-1L の下流因子が治療標的となる可能性について検証することを目的とした。

(1) 神経細胞におけるチロシン脱リン酸化酵素 SHP-1、SHP-1L それぞれの機能を明らかにする。特に、神経細胞死や軸索伸長に対する影響について検証する。

(2) SHP-1、SHP-1L の新規結合因子を同定する。

(3) SHP-1、SHP-1L による新規結合因子の作用機序を明らかにし、上記(1)の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) マウス胎児大脳皮質より神経細胞を単離し、Nucleofector を用いて SHP-1、SHP-1L の発現ベクターを遺伝子導入する。

培養後、Tuj1 抗体による免疫染色を行い、突起伸長に対する SHP-1、SHP-1L の影響を検証する。

(2) (1)と同様に神経細胞の培養を行い、細胞死マーカーとして用いられる Cleaved caspase 3 抗体による免疫染色を行う。

(3) SHP-1 の結合因子候補として FilaminA が報告されている。SHP-1、SHP-1L と同時に FilaminA の発現ベクターを細胞に導入し、両者の関係を検証する。

4. 研究成果

(1) SHP-1、SHP-1L 強制発現による神経突起伸長への影響

これまでの研究から、中枢神経損傷モデル動物において、SHP-1 の発現を抑制すると軸索の再伸長が促されることがわかった。SHP-1、SHP-1L の発現増加が、軸索伸長に対してどのような影響を及ぼすか、マウス大脳皮質神経細胞を用いて検証した。その結果、SHP-1、SHP-1L を強制発現させた神経細胞と、コントロールベクター (GFP) を発現させた神経細胞の突起伸長に有為な差は認められなかった (図 1)。また、SHP-1 のチロシン脱リン酸化酵素活性が失われた変異体 (SHP-1 ΔP) を発現させた場合にも、同様の結果が得られた。

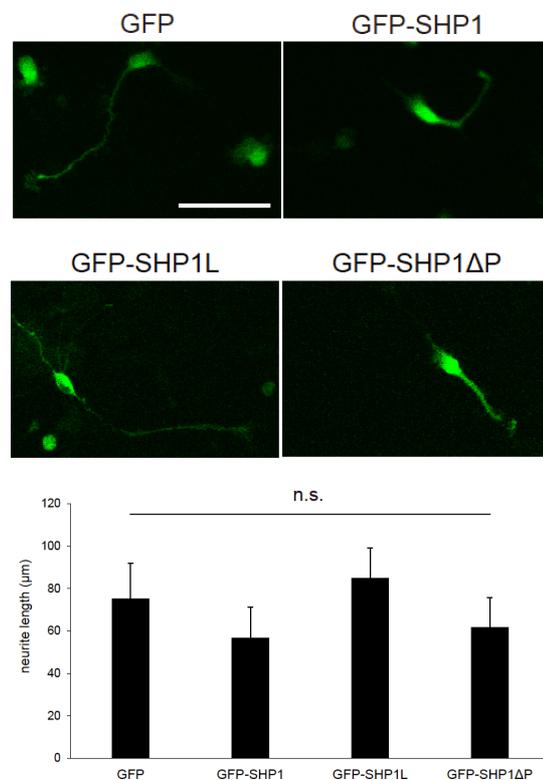


図 1. SHP-1、SHP-1L 強制発現により、神経突起伸長に対して有為な差は認められなかった。

(2) SHP-1、SHP-1L 強制発現による細胞死へ

の影響

SHP-1 のチロシン脱リン酸化酵素活性は、神経細胞死の誘導に必要であることが報告されている。そこで、SHP-1、SHP-1L を強制発現させた際の細胞死への影響を調べた。SHP-1、SHP-1L それぞれをマウス大脳皮質神経細胞に導入し、72 時間後の神経細胞死の影響を Cleaved caspase3 抗体による免疫染色を行い検証した。その結果、SHP-1、SHP-1L を導入した細胞のそれぞれにおいて、コントロール (GFP) と比較し、有為に Cleaved caspase3 陽性細胞が増加していることがわかった。この結果は、SHP-1、SHP-1L の発現増加により、細胞死が誘導されることを示している。一方、SHP-1 のチロシン脱リン酸化酵素活性が失われた変異体 (SHP-1 ΔP) を発現させた場合には、コントロールと比較して細胞死の増加は認められなかった (図 2)。

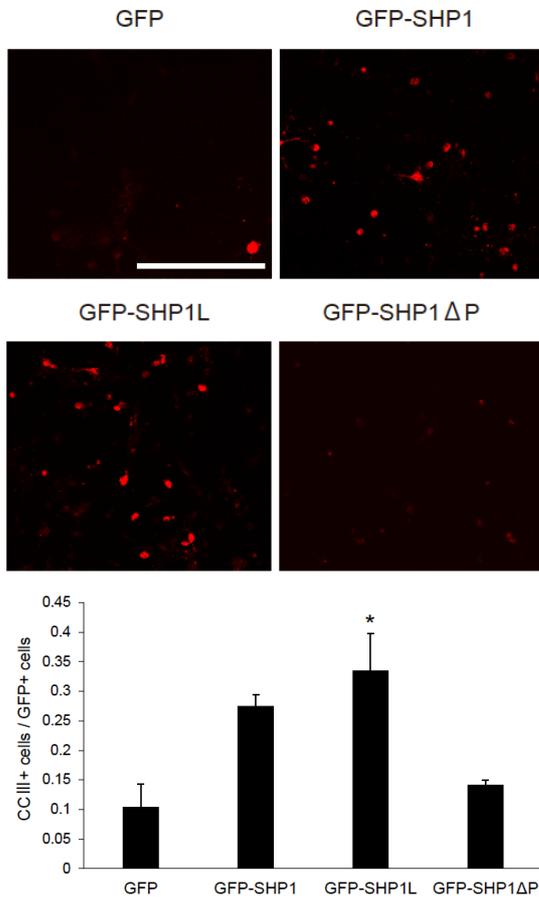


図 2. SHP-1、SHP-1L の強制発現により、細胞死が増加した。赤: anti-Cleaved caspase 3。

(3) SHP-1、SHP-1L に対する FilaminA の影響

これまでに、細胞骨格を制御するアクチン結合蛋白質 FilamineA が SHP-1 の結合因子候補として報告されている。そこで、SHP-1、SHP-1L の強制発現による細胞死の増加が、FilaminA を介して生じる可能性について検証した。マウス神経細胞に SHP-1 または

SHP-1L と同時に、FilaminA を発現させた。その結果、FilaminA と共発現させた群においては、SHP-1、SHP-1L による細胞死の増加が抑制された (図 3)。

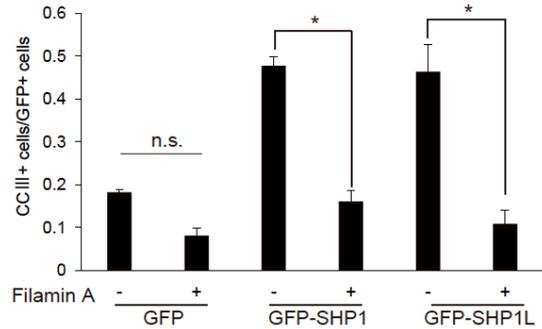


図 3 FilaminA により、SHP-1、SHP-1L 強制発現による細胞死の増加が抑制される。

(4) FilaminA による SHP-1 の細胞内局在の変化

FilaminA がどのようにして SHP-1 誘導性の細胞死を抑制するのか検証した。SHP-1 には nuclear localization signal (NLS) が存在する。N1E-115 細胞では、通常、SHP-1 が核内および細胞質に局在している。一方、SHP-1 と FilaminA を共発現させた場合、SHP-1 の核内局在は減少し、細胞質局在を示す細胞が増加した。FilaminA は SHP-1 の細胞内局在を制御する可能性がある。これらの結果は、FilaminA による SHP-1 の細胞内局在の変化が、SHP-1 誘導性の細胞死を抑制することを示唆している。

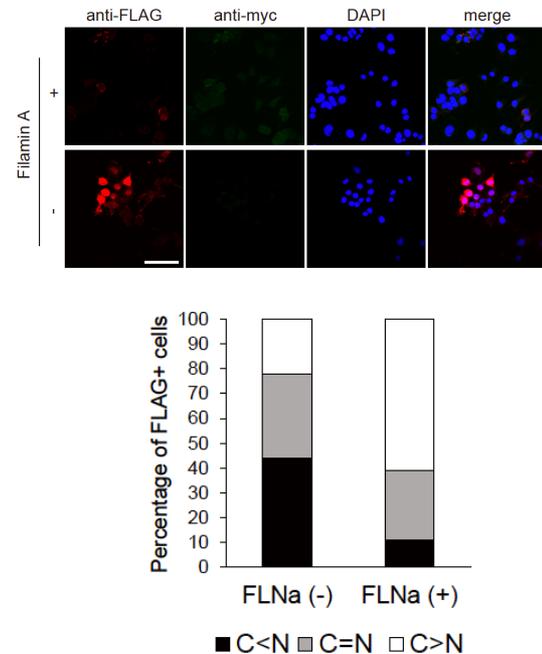


図 4. FilaminA により、SHP-1 の細胞質局在が増加した。赤: FLAG-SHP-1、緑: myc-FilaminA、青: DAPI。

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 2 件)

1. van Erp, S., van den Heuvel, D.M.A., Fujita, Y., Robinson, R.A., Hellemons, A.J., Adolfs, Y., Van Battum, E.Y., Blokhuis, A.M., Kuijpers, M., Demmers, J., Hedman, H., Hoogenraad, C.C., Siebold, C., Yamashita, T. and Pasterkamp, R.J. Lrig2 negatively regulates ectodomain shedding of axon guidance receptors by ADAM proteases. *Dev. Cell* 査読有り 35, (2015) 537-552.

doi: 10.1016/j.devcel.2015.11.008.

2. Fujita, Y., Fujiwara, K., Zenitani, S. and Yamashita, T. Acetylation of NDPK-D regulates its subcellular localization and cell survival. *PLoS ONE* 査読有り 10, (2015) e0139616.

doi: 10.1371/journal.pone.0139616.

[学会発表] (計 1 件)

(1) 杉本彩乃、藤田幸、木村百合子、山下俊英(2015)SHP-1 新規結合因子の同定、第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回 日本生理学会大会 MD 研究者育成プログラム合同企画 (2015.3.21) 兵庫県 神戸市 神戸国際会議場・展示場

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molneu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 幸 (Yuki Fujita)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60631215