

成長因子によるシナプスの発達調節と脳機能獲得 Growth Factor Regulation of Synaptic Development and its Function in the Brain

(研究プロジェクト番号 : JSPS-RFTF 96L00203)

プロジェクトリーダー

那波 宏之 新潟大学脳研究所・教授

コアメンバー

山田 光則 新潟大学脳研究所・助教授

武井 延之 新潟大学脳研究所・助教授

斎藤 真子 新潟大学脳研究所・助手

永野 隆 新潟大学脳研究所・助手

大津 洋 新潟大学脳研究所・助手



1. 研究目的

本研究プロジェクトでは、成長因子に代表される細胞間因子が脳内シナプス発達を制御する機能分子であるという仮説に基づき、(1)細胞、(2)分子、(3)個体の3レベルより、脳シナプスの分化、発達、成熟過程を定量的、定性的に分析することで脳神経の成長因子の生理活性を明らかにし、脳機能の発達にどのように貢献しているかを解明することを目標とした。

2. 研究成果概要

2-1 細胞レベル ; 培養脳神経細胞のシナプスの分化、発達、成熟に対する神経栄養因子と細胞外基質蛋白の影響の解析とその評価

脳神経細胞は、最終細胞分裂を終えて誕生した時には、シナプスはもとより神経伝達物質やその受容体などその機能を担う分子を、まだ、発現していない。動植物の個体成長と同様に、その細胞発達を促す栄養因子がそこには機能していると考えられている。特に本プロジェクトでは、脳由来成長因子(BDNF)とよばれる蛋白因子に着目してその関与を評価した。まだ未分化な大脳皮質の神経細胞を培養して、この因子のシナプス伝達関連分子への効果を解析したところ、後シナプス分子の発達獲得に強い影響を及ぼしていることが判明した。なかでも、神経可塑性に関連するといわれている一酸化窒素合成酵素や AMPA 型グルタミン酸受容体、その局在と安定化に働く PSD 蛋白分子の発現を上昇されることが図1の様になった。

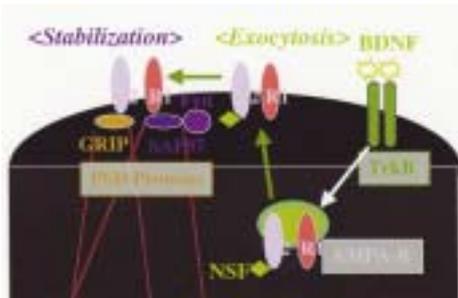


図1 BDNF によ PSD 蛋白を介したグルタミン酸受容体の発現と安定化

BDNF の属するニューロトロフィン類は、いずれも脳神経細胞の分化、発達に促進的に作用するので

あるが、これら成長因子と拮抗してシナプスの化学的発達を阻害する一群の分子が発見された。これは上皮成長因子(EGF)と呼ばれる分子群で、未熟な脳神経細胞に作用して、AMPA 型グルタミン酸受容体、その局在と安定化に働く PSD 蛋白分子の発現を低下されることが明らかになった。

実際にこれらシナプス発達促進因子、阻害因子が、シナプス伝達に及ぼす作用も検討した。慢性的に BDNF を培養皮質神経細胞に作用させると抑制性神経細胞を中心として、図2のように AMPA 型グルタミン酸受容体の感受性が亢進させることが判明した。実際に BDNF のノックアウトマウスの大脳皮質のシナプスでもこの現象が確認されている。また、逆に EGF を作用させるとその感受性が低下した。これらの事実は、シナプス後部の分子発達が、相拮抗する分子群により両方向に調節させていることを示している。

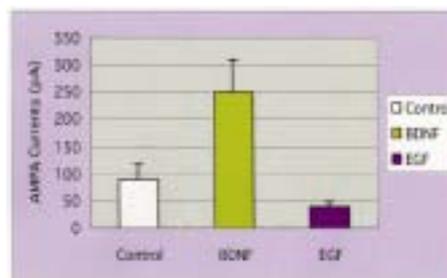


図2 大脳皮質神経細胞の AMPA 電流変化

2-2 分子レベル ; 細胞間活性蛋白分子により誘導されるシナプス現象に対する分子メカニズムの解明

新規シナプス関連分子を遺伝子クローニング法で分離し、成長因子との関連性を探索した。単離された cDNA 数十種類のうち、4つが新規の遺伝子で、脳内グルタチオン代謝酵素、新規スプライシング因子、E3 ユビキチンリガーゼ 2 種であった。現在、これらの分子の詳細な機能を解析するべく、神経細胞内での過剰発現を以下のように試みている。これまで、神経細胞で外来性の遺伝子を大量に強制発現させる技術には、問題が多かった。そこで我々は、神経細胞を宿主としているシンドビスウイルスをベクターに応用することで、90%以上の神経細胞にトランスフェクションできるベクター系を開発した。

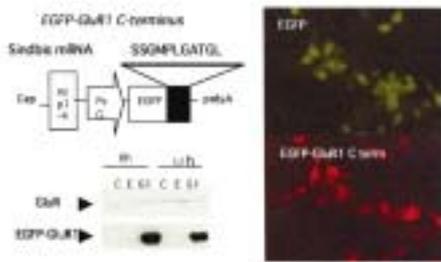


図3 シンドビスベクターによるEGFPの発現

このベクター系は引き合いが多く、現在、全世界の数十の研究室で利用されている。

(1)の細胞レベルで明らかにできた成長因子活性に対して、更にその細胞内情報伝達系を解析した。これまでニューロトロフィンの受容体からは、ホスホリパーゼ、Shc、rasなどの分子が会合し、そのシグナルを伝達していることが明らかにされていた。しかし、BDNFによるAMPA型グルタミン酸受容体の発現上昇には、SRCファミリーの非受容体型リン酸化酵素と膜輸送に働くNSF分子が関与することが新たに本研究で明らかになった。

2-3 個体レベル；これら因子のシナプス可塑性に及ぼす影響の評価とヒトをふくむ動物脳機能への影響の解析

脳内において神経細胞の成長を調節するこれら因子は、実際の脳機能の発達にどのような影響を及ぼすのだろうか。この点を明らかにするために、成長因子やその関連分子のノックアウトマウスにおける脳機能や、成長因子とヒトの神経精神疾患との関連性を探求した。

我々の開発した成長因子微量測定法を用いて、アルツハイマー病、癲癇、精神分裂病などの剖検脳中のニューロトロフィンや上皮成長因子群を定量したところ、いずれの疾患においても、疾患特異的な脳部位で有意な変動が観察された。また、精神分裂病前頭前野のRNA発現プロファイリングを三千の遺伝子について実施したところ、図4のように成長因子を中心とする遺伝子群の発現量変化が際立っていることが判明した。

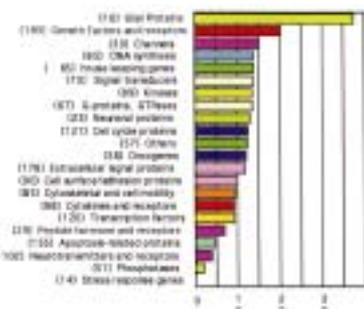


図4 分裂病前頭前野でのRNA発現プロファイル

このように神経細胞やそのシナプス発達を著節している促進成長因子や阻害成長因子のバランスが崩れることと、精神疾患との間には重大な関連性

があることが判明した。これらの事実は、今後、まだ不明な点の多い精神疾患の病態、病因の解明につながるものである。

3. 結論

今回これら成長因子が、脳神経細胞のシナプス伝達に必須な神経伝達物質受容体の発現や細胞内分布を変化させることで、脳神経機能の発達/可塑性に重要な役割を果たしていることを報告することができた。これまでの研究では神経発達には正方向の発達促進因子の存在だけが着目されていたが、本研究の成果により、それらの因子に拮抗する阻害的な因子も存在することが明らかになった。実際、これら成長因子シグナルが各種精神疾患脳において異常を呈していることは、「成長因子が精神機能の発達と関連する」という仮説を提示している。今後、これらの成果が、様々な精神疾患を含む脳発達障害の原因究明につながることを期待するものである。

主な発表論文

- (1) Narisawa-Saito M, Silva AJ, Yamaguchi T, Hayashi T, Yamamoto T, Nawa H: Growth factor-mediated Fyn signaling regulates alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor expression in rodent neocortical neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 2;96(5):2461-2466
- (2) Xiong H, Yamada K, Jourdi H, Kawamura M, Takei N, Han D, Nabeshima T, Nawa H: Regulation of nerve growth factor release by nitric oxide through cyclic GMP pathway in cortical glial cells. Mol Pharmacol. 1999 Aug;56(2):339-347.
- (3) Takahashi M, Shirakawa O, Toyooka K, Kitamura N, Hashimoto T, Maeda K, Koizumi S, Wakabayashi K, Takahashi H, Someya T, Nawa H: Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. Mol Psychiatry. 2000 May;5(3):293-300.
- (4) Takei N, Kawamura M, Hara K, Yonezawa K, Nawa H: Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes: comparison with the effects of insulin. J Biol Chem. 2001 Nov 16;276(46):42818-42825.
- (5) Iwakura Y, Nagano T, Kawamura M, Horikawa H, Ibaraki K, Takei N, Nawa H: N-methyl-D-aspartate-induced alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor down-regulation involves interaction of the carboxyl terminus of GluR2/3 with Pick1. Ligand-binding studies using Sindbis vectors carrying AMPA receptor decoys. J Biol Chem. 2001 Oct 26;276(43):40025-40032.
- (6) Futamura T, Toyooka K, Iritani S, Niizato K, Nakamura R, Tsuchiya K, Someya T, Kakita A, Takahashi H, Nawa H: Abnormal expression of epidermal growth factor and its receptor in the forebrain and serum of schizophrenic patients. Molecular Psychiatry 2002 in press