

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06745

研究課題名(和文) 大脳新皮質層構造形成の礎となる脳表層下における神経細胞集積機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of Reelin-induced neuronal aggregation in the developing mouse cerebral cortex

研究代表者

林 周宏 (Hayashi, Kanehiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60373354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類発生期の脳新皮質は、興奮性ニューロンによって形成される6層構造を有しており、脳の高次活動を可能にしている。本研究は、分泌タンパク質Reelinによる層構造形成機構を解明することを目的として遂行した。本研究で、Reelinにより誘導される神経細胞凝集塊形成がN-cadherinによる接着力の亢進を媒介して起こること、および、このN-cadherinを介した細胞間接着増強が一過的であることを見出した。また、Nck2、p120catenin両分子が、このReelinによるN-cadherin依存性細胞接着制御機構に関与することも明らかにした。本研究の成果は国内外の学会および国際誌で発表した。

研究成果の概要(英文)：The mammalian neocortex has the six layered structure organized by excitatory neurons, which enables higher brain functions. A secretory molecule 'Reelin' is essential for the layer formation, but the molecular mechanism based on Reelin for the layer formation remains to be elucidated. The purpose of the current project is to clarify cellular and molecular mechanisms to form the layered structure based on Reelin during cortical development. In this study, we found that Reelin-inducible neuronal aggregate was mediated by N-cadherin-based cellular adhesion and that this promotion of cellular adhesion by Reelin was in a transient manner. Moreover, we revealed p120 catenin and Nck were involved in this N-cadherin-based cellular adhesion. These results were presented in several scientific meetings and published in an international journal.

研究分野：神経発生

キーワード：発生 大脳新皮質 層構造 細胞凝集 細胞接着 Reelin N-cadherin

1. 研究開始当初の背景

哺乳類大脳新皮質の神経細胞は、脳の表面に平行な6層構造を形成しており、同時期に誕生した神経細胞が同じ層に配置されている。同層内の神経細胞は形態、特性が同じであり、入力元や投射先領域が一樣であるため、大脳新皮質が効率的に機能するためには適切な層構造形成が重要と考えられる。しかしながら、層構造形成の仕組みはほとんど理解されていない。

大脳新皮質を構成する興奮性神経細胞は、脳室帯付近で誕生し、皮質内を脳表面に向かって放線状に移動する。この時、神経細胞は個々に移動し、移動中の神経細胞同士の凝集や相互作用は見られない。しかしながら、これらの神経細胞が脳辺縁帯直下まで達して移動を終了すると、誕生時期の同じ神経細胞同士がコンパクトに集積する。その後、これらの細胞は後から生まれた神経細胞に追い越され、新皮質の深部に位置するが、一度集まった細胞同士は一群のままである。このことから、層形成は神経細胞が脳辺縁帯下に到着後に互いに集積することに発端し、それ以降、神経細胞は層を形成するメンバーとして協調すると考えている。

大脳新皮質の層構造が乱れる変異マウスとして、Reelin 欠損マウス (リーラー) が知られている。この自然発症突然変異マウスの大脳新皮質では、神経細胞の位置関係が逆転し、同時期に誕生した神経細胞が、層を形成せず分散して存在する。このことから、Reelin は層形成に必須な分子と言える。Reelin は、大脳新皮質辺縁帯に位置するカハール・レチウス細胞から分泌される分泌性糖タンパク質であり、神経細胞が移動する時期にはすでに脳辺縁帯に存在する。Reelin がリーラーマウスの原因遺伝子として同定されたのが20年近く前である (D'Arcangelo *et al.*, Nature, 1995)。現在まで多くの研究者が、その機能を探究しているにもかかわらず、「Reelin がどのように作用して大脳新皮質の層構造が形成されるのか?」という本質的な問いに対する答えはまだ示されていない。

リーラーマウスでは辺縁帯下での細胞集積が起らない。一方で、申請者が所属する研究室は、皮質内で異所的に Reelin を発現させると神経細胞が凝集することを報告し、Reelin が細胞凝集を誘導することを示した (Kubo *et al.*, J. Neurosci., 2010)。以上のことから、個々に移動していた神経細胞が、脳皮質辺縁帯直下で Reelin を受容することにより、神経細胞の集積が始まり、層構造形成の礎となると考えている。さらに、予備実験により次のことを見出している。

(1) 子宮内胎仔脳電気穿孔法により野生型 N-cadherin を大脳新皮質神経細胞に導入し過剰発現させると、辺縁帯下で集積した細胞の密度が高くなり、形成される層の厚さもコンパクトになる。

(2) RNAi により N-cadherin を発現抑制すると、Reelin により誘導される神経細胞凝集塊の細胞密度が疎らになる。一方、野生型 N-cadherin の過剰発現は、同凝集塊の細胞密度を高くする。

これらの実験結果は、Reelin により誘導される細胞集積および層形成に、N-cadherin が関与することを示唆している。

2. 研究の目的

上述の背景、およびこれまでの研究結果から、大脳新皮質神経細胞が移動終了後に集積する現象が層形成の礎となると考え、この現象における Reelin およびその下流分子の作用機序、特に N-cadherin との関与を解明することを目的とする。この目的に対して、具体的に以下の5点の謎を解くことを目指す。

(1) Reelin 感受により、N-cadherin タンパク質がどのように変化し、細胞集積を担うか? (Reelin 刺激前後での N-cadherin の発現量、リン酸化レベル、細胞内局在変化等の評価)。

(2) 細胞集積において N-cadherin は必要十分な分子か? (細胞集積における N-cadherin の役割を検証)

(3) Reelin シグナルがどのように N-cadherin を制御するか? (Reelin と N-cadherin を結ぶシグナルカスケードの解明)

(4) Reelin は神経細胞の移動、停止、突起伸展も制御している。

移動 停止 突起伸展、細胞集積の順に現象が起こると考えているが、Reelin シグナルがこの連続的な事象をどのように制御しているのか? (Reelin シグナルの時系列制御機構の解析および、細胞集積と各現象との相互関係の検討)

(5) 大脳新皮質表層下での細胞集積は、本当に層形成の礎となるのか? (細胞集積を抑制した時に、層構造形成も抑制されるか否かを検証)。

3. 研究の方法

本研究では、発達期大脳新皮質層構造形成の発端となる、辺縁帯直下での神経細胞集積の制御メカニズムを解明することを目指し、Reelin、N-cadherin 両分子が細胞集積制御に果たす役割を明らかにすることを中心に以下の実験を計画した。

- (1) Reelin 感受による細胞の N-cadherin 発現量、リン酸化レベル、細胞内局在の変化の評価。
- (2) 細胞集積における N-cadherin の役割の解明。
- (3) 細胞集積制御において Reelin と N-cadherin を結ぶシグナルカスケードの解析。
- (4) 複数ある Reelin シグナルの時系列制御および、細胞集積と他現象との相互関係の解析。
- (5) N-cadherin を抑制または過剰発現した時に、層構造形成が異常をきたすか検証。

4. 研究成果

まず、培養神経細胞を Reelin 刺激することにより、細胞内の N-cadherin 分子の挙動が変化するか、免疫細胞染色法およびウェスタンブロットング法を用いて検討した。その結果、上記の方法では、Reelin 刺激前後による N-cadherin 自体の細胞内局在やタンパク質発現および修飾に変化は見られなかった。一方、*in vivo* において Reelin が発現する領域である辺縁帯付近での N-cadherin の局在を調べたところ、N-cadherin が神経細胞の突起部に集積しているのを見出した。また、Reelin により誘導される細胞凝集塊では、N-cadherin は神経細胞突起が集合している凝集塊中心に局在していることを見出した。

次に、Reelin によって誘導される細胞凝集塊に N-cadherin がどのように関与するか検証するために、子宮内胎仔脳電気穿孔法を用いて N-cadherin ノックダウンベクターを Reelin 発現ベクターと共にマウス胎仔大脳新皮質の神経細胞に導入し、その効果を解析したところ、通常ならば凝集塊の中心を向く神経細胞突起が凝集塊の外周に沿うように走行する異常が観察された。上記の結果より、Reelin 誘導による神経細胞凝集において、N-cadherin は突起部に局在し、突起同士の接着に関与していることが示唆された。

また、原子間力顕微鏡を用いた実験により、Reelin が N-cadherin を介した細胞接着力を一過性に亢進することを明らかにした。このことは、当初の仮説にはなかった現象であり大変興味深い結果である。さらに、子宮内胎仔脳電気穿孔法により、N-cadherin を神経細胞に強制発現させると層構造形成が乱れることから、N-cadherin の適量の発現が大脳新皮質の層構造形成に必須であることを見出した。

Reelin による N-cadherin 制御の分子メカニズムについては、原子間力顕微鏡を用いて、培養神経細胞上の N-cadherin を基盤とした細胞接着力を Reelin 添加有無で解析した。その結果、Reelin により、N-cadherin の細胞膜への輸送が増加し、また

N-cadherin 複合体が形成されることにより細胞接着が亢進することが示唆された。また、Nck2、p120catenin の各分子が、Reelin による N-cadherin 制御経路に関与することも明らかにした。

本研究は、Reelin による細胞接着制御機構を明らかにでき、Reelin 機能の新たな一面を発掘したのみならず、大脳新皮質層構造形成機構にも光を当てる結果であると思われる。本研究結果は、インパクトファクターの高い国際雑誌にも掲載されたことから、国内外において非常に影響力のある研究であると考えている。今後は、Reelin 感受により細胞上の N-cadherin が突起に集まる仕組みを解き、神経細胞の細胞体と突起で、Reelin に対する反応が異なるメカニズムを解明することを考えている。また、この現象が大脳新皮質層構造形成にどのように影響を与えるか解析する予定である。

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5件、全て査読あり)

1. Enhanced expression of Pafah1b1 causes over-migration of cerebral cortical neurons into the marginal zone. Katayama K, Hayashi K, Inoue S, Sakaguchi K, Nakajima K. *Brain Struct Funct.* 222(9):4283-4291 (2017).
2. The brain-specific RasGEF very-KIND is required for normal dendritic growth in cerebellar granule cells and proper motor coordination. Hayashi K, Furuya A, Sakamaki Y, Akagi T, Shinoda Y, Sadakata T, Hashikawa T, Shimizu K, Minami H, Sano Y, Nakayama M, Furuichi T. *PLoS One.* 12(3):e0173175 (2017), doi: 10.1371/journal.pone.0173175.
3. Reelin transiently promotes N-cadherin-dependent neuronal adhesion during mouse cortical development. Matsunaga Y, Noda M, Murakawa H, Hayashi K, Nagasaka A, Inoue S, Miyata T, Miura T, Kubo KI, Nakajima K. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(8): 2048-2053 (2017).
4. ADP Ribosylation Factor 6 Regulates Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex through FIP3/Arfophilin-1-dependent Endosomal Trafficking of N-cadherin. Hara Y, Fukaya M, Hayashi K, Kawachi T, Nakajima K, Sakagami H. *eNeuro.* 3(4) e0148-16.2016 1-20(2016), doi: 10.1523/ENEURO.0148-16.2016.

5. The COUP-TFII/Neuropilin-2 is a molecular switch steering diencephalon-derived GABAergic neurons in the developing mouse brain. Kanatani S, Honda T, Aramaki M, Hayashi K, Kubo K, Ishida M, Tanaka DH, Kawauchi T, Sekine K, Kusuzawa S, Kawasaki T, Hirata T, Tabata H, Uhlén P, Nakajima K. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(36), E4985-94 (2015).

〔学会発表〕（計 16 件）

1. 林周宏、井上聖香、久保健一郎、仲嶋一範 “マウス大脳新皮質形成における reelin-Nck2 シグナルの役割” 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年.

2. Seika Inoue, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima “Molecular mechanisms of Reelin-induced neuronal aggregation in the developing mouse neocortex”, 18th International Congress of Developmental Biology (ISDB), 2017 年

3. 北澤彩子、シン ミンギョン、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範.
“Region-dependent differences in the migratory capacity of hippocampal CA1 and neocortical neurons during brain development” (poster)
第 60 回日本神経化学学会大会, 2017 年.

4. 井上聖香、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範. “Molecular mechanisms of neuronal aggregation caused by Reelin in the developing mouse neocortex” 第 60 回日本神経化学学会大会, 2017 年.

5. 林周宏、井上聖香、久保健一郎、仲嶋一範. “The Role of Nck as a downstream effector of the Reelin signaling” 第 60 回日本神経化学学会大会, 2017 年.

6. Shin MK, Kitazawa A, Matsunaga Y, Hayashi K, Kubo KI, and Nakajima K. “Structural analyses of radial glial fibers in the developing reeler neocortex” 第 40 回日本神経科学大会, 2017 年.

7. Shin MK, Kitazawa A, Matsunaga Y, Hayashi K, Kubo KI, and Nakajima K. “Molecular and morphological analyses of radial glial fibers during mouse neocortical development (発生期のマウス大脳皮質における放射状グリア線維についての分子的・形態的解析)” 第 10 回神経発生討論会, 2017 年.

8. Inoue S, Hayashi K, Kubo KI, and Nakajima K. “Investigation of the molecular mechanisms underlying Reelin-induced neuronal aggregation in the mouse neocortex” 2016 The American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, 2016 年.

9. Katayama KI, Hayashi K, Sakaguchi K, and Nakajima K. “Enhanced expression of Pafah1b causes overmigration of cerebral cortical neurons into the marginal zone” 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年.

10. Shin MK, Kitazawa A, Matsunaga Y, Hayashi K, Kubo KI, and Nakajima K. “Morphological analyses of radial glial cells in the developing mouse neocortex” Society for Neuroscience, Neuroscience 2016 meeting, 2016 年.

11. 林周宏、井上聖香、久保健一郎、仲嶋一範. “Analysis of Reelin-Nck signaling in mouse neocortex” 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会, 2016 年.

12. 井上聖香、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範. “大脳新皮質においてリーリン分子により誘導される神経細胞凝集を担うシグナル伝達経路の探索” 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会, 2016 年.

13. 井上聖香、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範. “Investigation of the molecular mechanisms that regulate Reelin-induced neuronal aggregation in the mouse neocortex(大脳新皮質においてリーリン分子により引き起こされる神経細胞凝集のシグナル伝達経路の探索)” 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年.

14. 林周宏、井上聖香、久保健一郎、仲嶋一範. “Function of the Reelin-Nck signaling pathway during mouse neocortical development (マウス大脳新皮質発生における Reelin-Nck シグナル経路の役割)” 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年.

15. 井上聖香、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範. “Analysis of the molecular mechanisms that underlie Reelin-induced neuronal aggregation in the mouse neocortex)” 第 9 回神経発生討論会・難治疾患共同研究拠点共同開催学術集会, 2016 年.

16. 北澤彩子、シン ミンギョン、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範. “発生期のマウス海馬及び大脳新皮質における特異的な細胞移動様式についての解析” 日本解剖学会 関東支部 第 103 回学術集会 (大会長: 仲嶋一範), 2015 年.

〔図書〕 (計 1 件、査読あり)

・ ‘Reelin’ Hayashi K, Inoue S, Nakajima K. Encyclopedia of Signaling Molecules (2nd Edition). *Springer*, (2018) *in press*.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

林 周宏 (Hayashi, Kanehiro)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町) ・講師
研究者番号: 60373354

(4)研究協力者

井上 聖香 (Inoue, Seika)