

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18363

研究課題名(和文) マウス脳発生期における海馬CA1錐体細胞の放射状グリア線維を介した移動の解明

研究課題名(英文) The difference of the migratory capacity using the radial glial fiber between hippocampal CA1 and neocortical neurons during mouse brain development

研究代表者

北澤 彩子 (KITAZAWA, AYAKO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：10535298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス大脳新皮質と海馬CA1の錐体細胞は生まれた場所から放射状グリア線維に沿って移動する事が知られている。両者の移動機構においては多くの共通点が報告されているが、その移動形態を比較した結果、大きく異なる事を見いだした。形態が異なる原因を解明するために、異所的な移植実験や大脳新皮質で報告されている細胞移動関連分子の機能阻害実験を行った結果、大脳新皮質錐体細胞の移動に必須である細胞接着因子がCA1でも重要であることが明らかになった。一方、大脳新皮質へCA1錐体細胞を異所移植すると移植された場所に適応しないことから、大脳新皮質内の移動領域には特異的な環境が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pyramidal neurons in the neocortex and hippocampus are born near the ventricle and migrate to their destinations during brain development. It has been known that neocortical neurons migrate along with a single radial glial fiber (RGF) for long distances in the cortical plate (CP). On the other hand, the hippocampal CA1 neurons migrate slowly using multiple RGFs with multiple leading processes in the stratum pyramidale (SP).

We focused on the difference of the densities of cell bodies and RGFs at the SP and CP region. Because we assumed that the migrating mechanism of CA1 neurons used RGFs in the SP was similar to locomotion, ectopic transplantation were carried out to investigate whether CA1 neurons could migrate in the CP and change the shape of climbing mode. Unexpectedly, ectopically transplanted CA1 neurons could not migrate and these results suggest that the microenvironment in the CP might be specific to the neocortex.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳新皮質錐体細胞 海馬CA1錐体細胞 細胞移動 異所的移植 子宮内胎児脳電気穿孔法 Time-lapse imaging 電子顕微鏡観察

1. 研究開始当初の背景

マウス大脳新皮質の錐体細胞は脳室帯で生まれ、その後脳表面に向かって移動し最終的に6層からなる多層構造を形成する。細胞の移動方法には、脳室帯直上で行う多極性移動、放射状グリア線維（以下グリア線維と表記）を足場として登る locomotion、および脳表面に到達する直前の terminal translocation が知られている。一方、海馬CA1領域の錐体細胞も脳室帯で生まれ、グリア線維が張り巡らされた場所を移動することが知られていたが、詳しい機構は不明のままであった。以前研究代表者は、本所属研究室で開発された子宮内胎仔脳電気穿孔法（以下電気穿孔法と表記）を海馬に応用した手法を用いて（Tomita et al., Hum. Mol. Genet., 2011）、CA1錐体細胞が生まれる胎生12日から16日までの錐体細胞を各々標識し、錐体細胞層上部に到着するまでの細胞動態について解析した。その結果、脳室帯で生まれた錐体細胞はその直上で大脳新皮質と同様に、多極性移動を示すことを明らかにした。しかし、その後は大脳新皮質の locomotion とは異なり、同時に複数の先導突起を異なるグリア線維に伸長しつつゆっくりと、かつ細胞体の移動方向を何度も変えながら移動することを明らかにし、この新しい移動様式を climbing mode と命名した（Kitazawa et al., J. Neurosci., 2014）。Climbing mode で登る際の先導突起が、早生まれの細胞または張り巡らされたグリア線維の中をどのように伸長しているのか、また大脳新皮質に見られる移動形式との違いはどのようにして生じるのか等については未解明のままであった。

先行研究において、大脳新皮質の先導突起とグリア線維の接触部分では先導突起全体が1本のグリア線維に絡み付くように接触しており、その接着にはN-カドヘリンが必須である事が知られているが（Kawauchi et al., Neuron, 2010）、研究代表者がCA1錐体細胞を

観察した際、先導突起の varicosity 部分でグリア線維とわずかに接触している様子が得られていた。その接触面について詳しく検討するためには電子顕微鏡レベルでの解析が必要であるが、発生期の幼弱な組織を電子顕微鏡で観察することは困難であり、また移動中の細胞を他の細胞と区別することが難しいことから、研究開始当初はCA1領域の形態やグリア線維との接着部分を検討した報告はなされていなかった。そこで、特に錐体細胞移動時のグリア線維との接触部分を詳細に観察するために、通常の電子顕微鏡観察のみならず、3D画面を構築出来る serial block-face SEM (SBF-SEM) の使用に着目した。

先導突起の形状がCA1錐体細胞層の細胞密度の変化や発生時間の経過に従って複雑に変化する事が以前の研究により得られていたため、移動中の細胞形態の差異は移動する場の物理的な環境に依存していると仮定した。そこで、CA1錐体細胞を大脳新皮質に移植することでその動態に変化が起こるかどうか検討する着想を得た。

また、N-カドヘリン分子や皮質板上部の辺縁帯に存在するリーリントタンパク質、 β -カテニンが特に大脳新皮質錐体細胞における移動に重要であることが明らかになっているが（Sekine et al., Neuron, 2012）、海馬におけるそれらの機能はよく分かっていなかった。そこで、CA1錐体細胞の移動の違いが、上記のような大脳新皮質での移動関連分子機構の差異によるものではないかとも推測し、前述した移植実験及び電子顕微鏡観察とは別に、電気穿孔法を用いた機能阻害による検討の着想を得た。

2. 研究の目的

初めに、錐体細胞層部分のグリア線維との接着の有無、頻度等について、免疫蛍光染色による検討や電気穿孔法を組み合わせた免疫電顕観察、および電子顕微鏡観察により大脳新皮質とCA1領域の比較検討を行う。次に、CA1

錐体細胞を大脳新皮質へ移植する実験を試みることで、移動形態の違いが細胞ではなく、場の環境に依存するかどうかを検討する。さらに、大脳新皮質での移動関連分子について電気穿孔法を用いた機能阻害実験により、CA1錐体細胞の移動や形態に重要な分子を検討する。以上、研究代表者は、CA1錐体細胞の移動について主に顕微鏡観察、移植実験、移動関連分子解析といった多方面から検討し、且つ大脳新皮質と比較することでその動態の仕組みを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

移動時に先導突起が接触していると思われるグリア線維との接着面に注目して胎生期の電子顕微鏡観察を行った。さらに、電気穿孔法を用いて任意の細胞をラベルした免疫電顕や錐体細胞層のSBF-SEM画像構築を試みた。

次に、胎生14.5日目のマウスの大脳新皮質とCA1錐体細胞を電気穿孔法でそれぞれ色分けし、2-4日後に *in utero*での移植および slice培養において移植を行い、移植された細胞の形態や数、さらに移動方向の定量化等を行った。また、大脳新皮質の locomotion 移動に直接関係すると言われるN-カドヘリン、リーリン等について、電気穿孔法により機能阻害実験や異所移植実験を行った。

4. 研究成果

大脳新皮質とCA1領域を免疫蛍光染色、電子顕微鏡観察により詳細に観察した結果、大脳新皮質の locomotion ではおおそ1本の先導突起を1本のグリア線維に接着させるのに対し、CA1の先導突起は短時間で伸び縮みし、平均5本程度が複数のグリア線維と接触しながら移動する様子が観察された。しかし、先導突起を電子顕微鏡で観察すると、大脳新皮質同様その接触部分には接着結合様の接着が確認された。SBF-SEMによる varicosity の観察については、胎児脳を用いた免疫電子顕微鏡用の試料作製が困難である

事を予想したために試みる予定であったが、通常の免疫電子顕微鏡観察において細胞やその膜などを区別して再現よく得ることが出来たことから使用計画は見合わせた。さらに、皮質板とCA1錐体細胞層におけるグリア線維を免疫蛍光染色による観察で比較したところ、CA1では大脳新皮質より太く見えるが、大脳新皮質と同様に平行に整然と並ぶ様子が観察され、さらに、中間層と錐体細胞層の境からグリア線維の形状が変化する様子も観察された。以上の様に、それぞれの差異や共通点が得られた中で、研究代表者は錐体細胞層の細胞密度の違いに注目した。つまり、移動形態の違いが場の物理的な要因に依存するのではないかと考え、CA1錐体細胞を大脳新皮質に、大脳新皮質錐体細胞をCA1に異所移植した。 *In utero*における移植実験では、移動中の大脳新皮質由来細胞が大脳皮質で1-2本の先導突起を伸ばすのに対し、大脳新皮質に移植されたCA1細胞は、移植された場所であってもCA1で観察されたように多くの先導突起を伸ばしていた。さらに、CA1錐体細胞は移植されてから時間経過とともに脳室帯付近に凝集、あるいは細胞自体が確認出来なくなった。 *In utero*におけるCA1への移植は技術的に困難であることから検討せず、slice培養への移植実験で検討した。結果は同様に脳室帯から中間層にかけて異所移植された細胞は移動出来なかった。Time-lapseにより移動方向を検討した結果、CA1に移植された大脳新皮質細胞は大脳新皮質方向へ、大脳新皮質に移植されたCA1細胞はCA1方向へ移動する傾向があることを明らかにした。以上の結果から、大脳新皮質とCA1錐体細胞の移動には様々な共通点があるが、お互い異なる環境に移植された場合本来の場所での移動形態を維持し、移植された場所に適応しないという可能性が示唆された。

異所移植を行った場合に各細胞が移動しないという結果は予想外であったが、次に、両

者の移動の違いについてその分子メカニズムを解明することを目的として、大脳新皮質で知られている移動関連分子について解析を行った。初めに、接着分子であり、大脳新皮質錐体細胞とその足場に用いられるグリア線維に発現していることが知られているN-カドヘリンに着目した。電気穿孔法を用いてN-カドヘリン機能阻害実験を行った結果、錐体細胞の移動は阻害された。さらに先導突起を高倍率で観察した結果、正常とは異なりグリア線維との間に隙間が多数観察された。一方、レスキュー実験を行った結果、先導突起の異常な形状は正常に戻った。この形態変化は大脳新皮質では報告されていないことから、CA1錐体細胞の移動にもN-カドヘリンが重要であることを明らし、N-カドヘリンの発現量を変化させた時に大脳新皮質の場合と先導突起の形状が異なる事を明らかにした。次に、N-カドヘリンとの関与が既知のリーリンに着目した。リーリンはN-カドヘリンを介して細胞凝集を促進する事が知られていた。免疫蛍光染色による比較ではCA1領域の方が、リーリンが高濃度であることを明らかにした。リーリン欠損マウスより得られたCA1領域の錐体細胞を野生型マウスの大脳新皮質へ異所移植を行ったが、同様に適応出来ない事が明らかになった。このため、CA1領域の錐体細胞の特性が高いリーリン濃度によって生じるとの仮説は否定的であると考えられる。今後は、両者の移動の違いにはN-カドヘリンを始めとする接着関連因子が重要である可能性を想定して、さらに詳細な検証を行っていきたい。以上の結果は、共通点が多くあまり注目されていなかった大脳新皮質とCA1の発生時の細胞移動に焦点を当てたものであり、それらの移動が異なる事を見いだしたものであり、今後移動形態の違いを生み出す因子を明らかにする事が出来れば神経発生の更なる知見を得る事が出来ると考えられる。

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2件)

(1)Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, Ayako Kitazawa, and Kazunori Nakajima. Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. *Front. Neurosci.*, 9, Article 135 (2015)査読あり.

DOI: 10.3389/fnins.2015.00135

[学会発表](計18件)

(1)Satoshi Yoshinaga, Minkyun Shin, Ayako Kitazawa, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. FlashTag technology reveals areal differences in neuronal migration in the cerebral cortex of developing mice. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市)、2018年3月28-30日.

(2)Ayako Kitazawa, Minkyung Shin, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. Region-dependent differences in the migratory capacity of hippocampal CA1 and neocortical neurons during brain development. 次世代脳プロジェクト 2017年度冬のシンポジウム、一橋大学 一橋講堂 学術総合センター(東京都千代田区)、2017年12月20-23日.

(3)Satoshi Yoshinaga, Minkyun Shin, Ayako Kitazawa, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. Areal differences in neuronal migration in the developing cerebral cortex. 次世代脳プロジェクト 2017年度冬のシンポジウム、一橋大学 一橋講堂 学術総合センター(東京都千代田区)、2017年12月20-23日.

(4)吉永怜史、シンミンギョン、北澤彩子、久保健一郎、仲嶋一範. 種々の胎生時期と大脳皮質領域における神経細胞移動の可視化. 第52回 TOKYO ニューロサイエンス研究会、

慶應義塾大学信濃町キャンパス（東京都新宿区）2017年10月28日

(5) Ayako Kitazawa, Minkyung Shin, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. Region-dependent differences in the migratory capacity of hippocampal CA1 and neocortical neurons during brain development. 第60回日本神経化学会大会、仙台国際センター（宮城県仙台市）、2017年9月7-9日

(6) Minkyung Shin, Ayako Kitazawa, Yuki Matsunaga, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. Structural analyses of radial glial fibers in the developing reeler neocortex. 第40回日本神経科学大会、幕張メッセ（千葉県幕張市）、2017年7月20-23日

(7) Satoshi Yoshinaga, Minkyun Shin, Ayako Kitazawa, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. Areal differences in neuronal migration in the cerebral cortex of developing mice. Cortical Development Conference 2017, Mediterranean Agronomic Institute of Chania (MAICh), Chania, Crete (Greece), 2017年5月17-20日

(8) 吉永怜史、北澤彩子、シン ミンギョン、久保健一郎、仲嶋一範. 哺乳類大脳皮質発生における神経細胞移動の領野別検討. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、長崎大学坂本キャンパス、長崎市（長崎県）、2017年3月28-30日

(9) Minkyung Shin, Ayako Kitazawa, Yuki Matsunaga, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. 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、秋保リゾートホテルクレセント、仙台市（宮城県）

2017年3月10-11日

(10) Minkyung Shin, Ayako Kitazawa, Yuki Matsunaga, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. Morphological analyses of radial glial cells in the developing mouse neocortex. Society for Neuroscience, Neuroscience 2016 meeting, San Diego Convention Center, San Diego, U.S.A., 2016年11月12-16日

(11) Minkyung Shin, Ayako Kitazawa, Yuki Matsunaga, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. Morphological analyses of radial glial fibers in the developing reeler neocortex. 第51回慶應ニューロサイエンス研究会、慶應義塾大学信濃町キャンパス、新宿区（東京都）、2016年10月29日

(12) 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、慶應義塾大学日吉キャンパス、横浜、2015年11月7日

〔その他〕
研究業績ホームページ
<https://www.nakajimalab.com/news>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
北澤 彩子 (KITAZAWA, Ayako)
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教
研究者番号：10535298