

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07000

研究課題名(和文) 大脳皮質層形成における Rhoファミリー低分子量Gタンパク質の役割の解明

研究課題名(英文) Role of Rho family small GTPases in cerebral cortical development

研究代表者

片山 圭一 (Katayama, Kei-ichi)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20391914

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)：本研究ではRhoファミリー低分子量Gタンパク質の神経細胞移動および大脳皮質層形成における役割について解析を行った。子宮内胎児脳電気穿孔法を用いてRac1、RhoAおよびCdc42を大脳皮質神経細胞で欠損させても神経細胞の移動や最終的な配置に大きな変化は見られなかった。それに対して、Rac1とRac3を大脳皮質の神経細胞で共に欠損させると、出生直後の大脳皮質はほぼ正常であるが、その後神経細胞がアポトーシスによって死んでいくことを発見した。以上より、Rhoファミリー低分子量Gタンパク質は神経細胞の移動には必須ではないが、Racは神経細胞の生存に重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではRacを欠損させると神経細胞がアポトーシスによって死んでいくことを発見した。アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患における神経細胞死にRhoファミリー低分子量Gタンパク質の発現異常が認められるという報告も多数存在しているため、これらの病態を含めた、様々な病的・生理的な神経細胞死にRhoファミリー低分子量Gタンパク質が関与している可能性は非常に高いと考えられる。本研究で開発した実験系は神経細胞死のメカニズムの研究や、神経変性疾患における神経細胞死を抑制する方法を探索するモデルとして非常に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I explored the roles of Rho family small GTPases in neuronal migration and cerebral cortical development. I deleted Rac1, RhoA and Cdc42 in cerebral cortical neurons using in utero electroporation, but I couldn't find obvious abnormalities in neurons lacking Rho family small GTPases. I also deleted both Rac1 and Rac3 in the developing cerebral cortex. At birth, overall morphology of the Rac1/Rac3-deleted cerebral cortex was almost normal. However, soon after birth, cortical neurons lacking both Rac1 and Rac3 began to die by apoptosis. These results suggest that Rho family small GTPases are dispensable for neuronal migration but indispensable for the survival of neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：Rhoファミリー低分子量Gタンパク質 大脳皮質神経細胞 神経細胞死 神経細胞移動

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の神経細胞は、早生まれの神経細胞ほど深層に、遅生まれの神経細胞ほど浅層に局在するという“inside-out 様式”の6層構造を形成している。神経組織が正常に機能するためには各構成細胞が必要数産生された上で、それらが正しい位置に配置され、正しく相互にネットワークを形成する必要がある。これらの過程に必須の分子として Rho ファミリー低分子量 G タンパク質が挙げられる。細胞骨格の制御因子である Rho ファミリー低分子量 G タンパク質についてはこれまで多くの研究者により様々な研究がなされており、神経系においても細胞移動、軸索誘導、樹状突起形成、シナプス形成など多種多様な現象に関与していると考えられている。しかしながら、これらの知見のほとんどは培養細胞を用いた *in vitro* の実験系から導かれたもので、そのような実験で得られた結果は *in vivo* の生理的な条件で行われた実験の結果と一致しないことも多く、生理的環境下での Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の機能については未だ不明な点が多く残されている。Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は神経細胞の移動と大脳皮質層形成に必要な様々な分子の下流で働き、細胞骨格を制御することで神経細胞の移動を制御しているという報告は無数に存在している。従って、その機能を明らかにすることは神経細胞の移動および大脳皮質層形成の機構を理解する上で必要不可欠な重要課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は神経細胞の移動および大脳皮質層形成における Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の役割を解明することである。

3. 研究の方法

本研究では、RhoA, Cdc42 および Rac1 の flox マウスの神経細胞に子宮内胎児脳電気穿孔法を用いて Cre 遺伝子の発現ベクターを導入して遺伝子を欠損させる。遺伝子欠損細胞の移動の様子や最終的な層配置および細胞の形態等を観察することで、神経細胞の移動および大脳皮質層形成における Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の役割を明らかにする。

4. 研究成果

Rac1 の優勢阻害型変異体 (Rac1DN) を子宮内胎児脳電気穿孔法により胎児の神経細胞に強制発現すると、神経細胞の移動が著しく障害されることから、Rac1 は大脳皮質神経細胞の移動に重要な役割を持っていると考えられてきた (図 1)。一方で、Rac1 の大脳特異的ノックアウトマウスでは大脳皮質の層構造には大きな異常は見られないとの報告もあり、まずは Rac1 の神経細胞移動および大脳皮質層形成における役割を明確にする必要があると思われる。

Rac1 の flox マウスに Dcx-Cre ベクターを子宮内胎児脳電気穿孔法を用いて導入し、移動神経細胞で Rac1 を欠損させ、Rac1 欠損細胞の移動の様子を観察したが、移動に大きな障害は認められなかった。Rac1 のホモログの Rac3 が Rac1 欠損細胞でその機能を代償している可能性を排除するため、Rac1 と Rac3 の複合変異マウスで同様の実験を行ったが、神経細胞の移動に大きな障害は認められなかった (図 2)。

Rac1 ノックアウトマウスにおける神経細胞の移動の動態を再検討するため、Rac1 の脳特異的ノックアウトマウスの神経細胞に子宮内胎児脳電気穿孔法を用いて EGFP の発現ベクターを導入し、神経細胞の移動の様子を詳細に解析した。Nestin-Cre と GFAP-Cre の2種類の Cre 発現マウスを用いて Rac1 を欠損させたが、いずれのノックアウトマウスでも神経細胞の移動には軽微な障害しか認められなかった。

RhoA と Cdc42 についても同様の解析を行ったが、Rac と同様に神経細胞の移動に大きな異常は認められなかった。以上の結果から、神経細胞の移動に Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は必須ではないと考えられた。

先の解析で GFAP-Cre マウスを用いて脳特異的な Rac1 ノックアウトマウスを作製し、大脳皮質層形成に関する検索を行った際に、Rac3 が Rac1 の機能を代償する可能性を考え、Rac3 ノックアウトのバックグラウンドで Rac1 を欠損させることも行った。このマウスはほぼ正常に生まれ、

図 1

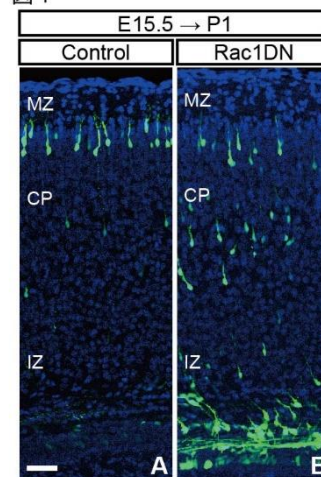
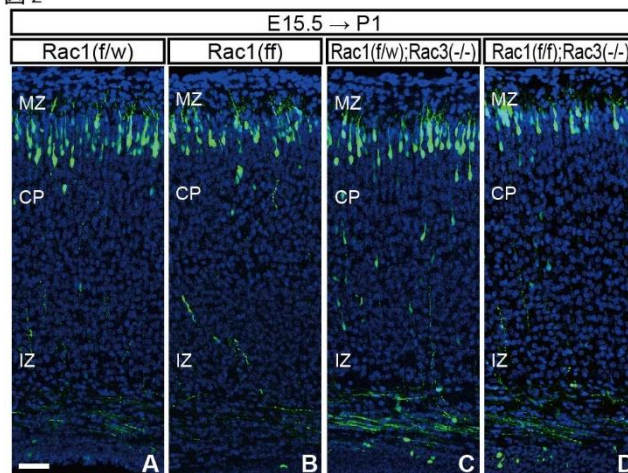
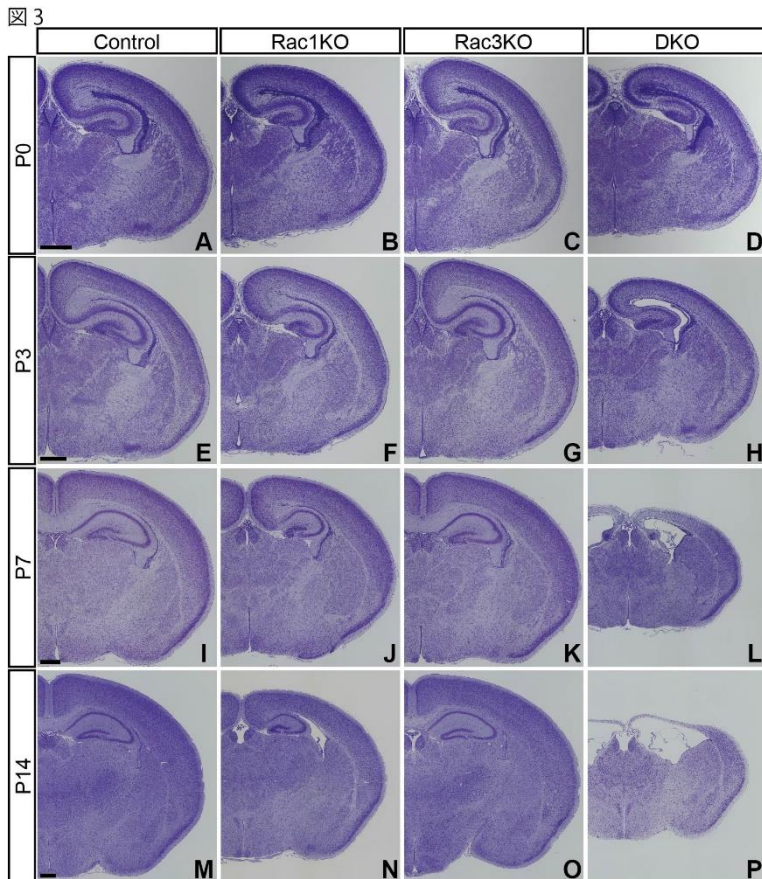


図 2

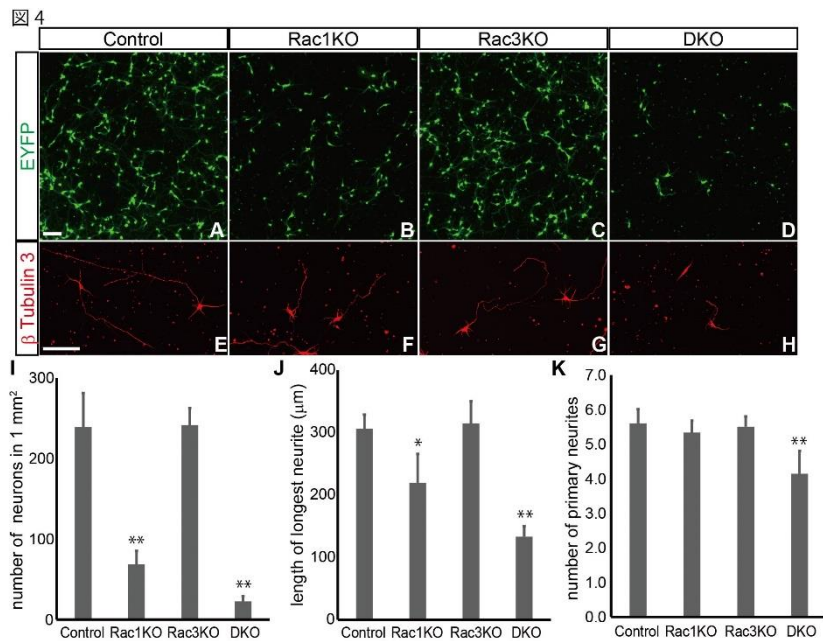


大脳皮質はやや低形成ではあったが、6層構造は構成されていた。しかしながら、生後直後から大脳皮質の神経細胞がアポトーシスによって死に始め、3週齢に達する前にマウス自体も死んでしまった。2週齢時には、Rac1とRac3を共に欠損した大脳皮質(DKO)にはほとんど生存した神経細胞が存在しなかった(図3)。神経細胞死はRac1またはRac3が1アレルでも存在していればほとんど起こらなかった。以上の結果から、Racは神経細胞の生存に重要な役割を果たしていることが分かった。

次に、Racの欠損によって引き起こされる神経細胞死の分子メカニズムを解明するため、大脳皮質神経細胞のRNAシーケンス解析を行った。Racを欠損した大脳皮質神経細胞ではNtf3, Nrtn, Egr3などの神経成長因子の発現が減少していた。また、AP-1複合体を構成するFosとJunや、pro-apoptoticなBcl-2ファミリーメンバーであるBcl2a1bおよびHrkの発現が増加していた。FosとJunの発現を活性化すると考えられている、Mapキナーゼに関する検索を行ったところ、リン酸化ErkについてはコントロールとRac欠損マウスで大きな違いはなかったが、リン酸化p38はRac欠損マウスで減少し、リン酸化Jnkは軽度に増加していた。以上の結果から、Rac1とRac3が共に欠損することで、Jnkがリン酸化され、それによってFosとJunの発現が増加し、AP-1複合体を形成してpro-apoptoticなBcl-2ファミリーメンバー(Bcl2a1b, Hrk)の発現を活性化して、神経細胞にアポトーシスを誘発する可能性が示唆された。



次に、初代培養の実験系を用いて、Racの大脳皮質神経細胞における役割を解析した。初代培養でもRac1とRac3を共に欠損した神経細胞(DKO)は生存数が著しく減少し、神経突起の長さや数も減少していた。また、Rac1のみを欠損した神経細胞も生存数が有意に減少していた(図4)。初代培養においても、in vivoの実験系と同様の結果を再現することができた。



本研究でRac1を欠損させるために用いたGFAP-Creマウスは大脳皮質の神経細胞だけではなく、小脳の顆粒細胞においてもRac1を欠損させることができる。そこで小脳でも神経細胞死に関する解析を行った。小脳顆粒細胞ではRac1のみの欠損でも顆粒細胞が生後にアポトーシスによって脱落していったが、Rac1に加えてRac3も欠損させると神経細胞死はより顕著になった。以上の結果よりRacは大脳皮質神経細胞のみでなく、小脳の顆粒細胞でもその生存に重要な役

割を果たしているものと考えられた。

本研究の結果では、Rac, Cdc42 および RhoA を大脳皮質神経細胞で欠損しても、神経細胞の移動に障害はみられなかったことから、神経細胞の移動に Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は必須ではないと考えられた。しかしながら、この結果は過去の研究の知見とは大きく異なるものであり、結論を導き出すには異なったアプローチによるさらに詳細な解析結果を統合する必要があると考えられる。一方で、本研究では Rac1 と Rac3 を共に欠損させると大脳皮質神経細胞がアポトーシスによって死んでいくことも発見した。アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経変性疾患における神経細胞死に Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の発現異常が認められるという報告も多数存在しているため、これらの病態を含めた、様々な病的・生理的な神経変成・神経細胞死に Rho ファミリー低分子量 G タンパク質が関与している可能性は非常に高く、本研究で開発した実験系は神経細胞死のメカニズム研究に利用できると考えられる。また、*in vivo* の実験系のみならず、初代培養の実験系でも同様の結果が再現できたことから、様々な薬物を培養液中に添加して、神経細胞に対する影響を評価することが容易である。従って、神経変性疾患における神経変成・神経細胞死を抑制する方法を探索するモデルとしての有効性も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 片山圭一、Zheng Yi
2. 発表標題 Racは大脳皮質神経細胞の生存に必要である
3. 学会等名 第41回日本神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei-ichi Katayama, Yi Zheng
2. 発表標題 Rac is required for the survival of cortical neurons
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山圭一、Zheng Yi、坂口和成
2. 発表標題 Rac1は大脳皮質神経細胞の放射状移動に必要か？
3. 学会等名 第40回日本神経科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 片山圭一、Zheng Yi、井上徳光
2. 発表標題 Balanced activity of small Rho GTPase members is important for the survival of neurons
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----