

令和元年6月17日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08478

研究課題名(和文) 脳梁発達初期のパイオニア軸索の伸長と道標形成におけるPlexinA1受容体の役割

研究課題名(英文) The role of PlexinA1 receptor in the extension of pioneer axons and guidepost formation during the early phase of corpus callosum development

研究代表者

湯川 和典 (Yukawa, Kazunori)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：20301434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類では、大脳半球間をつなぐ神経線維(軸索)が集まり太い束となった脳梁が発達する。脳梁発達初期に、セマフォリンが軸索のニューロピリン1受容体に作用し軸索の伸長方向を導く。脳梁を形成する軸索が大脳正中線を交差する時にセマフォリンの信号をニューロピリン1から軸索内に伝えるプレキシンは不明である。胎生17.5日齢の軸索路の追跡では、プレキシナ1欠損軸索の正中線交差頻度は、野生型と比べ有意に低かった。さらに生後0.5日齢プレキシナ1欠損マウスでは、脳梁前半部欠損の頻度が有意に高かった。そのため、BALB/cAJマウスの脳梁発達初期の軸索の正中線交差におけるプレキシナ1の重要な役割が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梁は、左右大脳半球の相同な大脳皮質領域を連絡する軸索が多数集まり形成された巨大な束で、大脳半球間の情報を交換し、認知や感覚情報の統合に関わる。そのため、脳梁形成に関わる分子とその役割を解明することは、高次中枢機能の基盤をなす神経回路形成メカニズムの解明への寄与が期待できる。ヒトで脳梁が形成されない(脳梁欠損症)場合は、水頭症や癲癇の他、身体、感覚、発達、運動面において種々の困難を伴うことが多く、さらには精神疾患の合併も多い。そのため、脳梁欠損症に関連する病態の理解を深め病態に対応した新規治療法を開発していくためには、第一に脳梁形成メカニズムを分子と細胞のレベルで解明することが必要である。

研究成果の概要(英文)：The corpus callosum (CC) develops in the mammalian brain as the structure composed of bundles of axons that links cerebral hemispheres. Both semaphorins guiding neurons toward the proper direction of axonal elongation and Neuropilin-1 localized on axons play a crucial role in CC formation. However, it remains unclear which type of Plexin transduces semaphorin signal by the association with Neuropilin-1 during the midline crossing of callosal axons. As a result of axonal tracing to examine the role of PlexinA1, callosal axons in the PlexinA1-deficient (KO) brains had a significantly lower incidence of midline crossing at embryonic day 17.5 compared with the wild-type (WT) brains. Furthermore, the incidence of agenesis in the anterior half of the CC was significantly higher in the PlexinA1 KO mice at postnatal day 0.5 as compared with the WT. These results indicate the crucial involvement of PlexinA1 in the midline crossing of callosal axons during CC development in BALB/cAJ mice.

研究分野：解剖学・生理学 組織形成における軸索ガイダンス因子の働きと、その異常による疾患発症機構の解明

キーワード：脳梁 脳梁欠損 軸索ガイダンス 正中線交差 ニューロピリン1 プレキシナ1 セマフォリン BALB/cAJマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトを含む哺乳類の中樞神経系発達において、脳・脊髄の左右の同等領域をつなぐために、ニューロンの軸索は、それぞれ反対側の標的ニューロンに向かい伸長を続ける。やがて、軸索は正中線を越えて対側に到達し、多くの神経軸索が集まる太い束となり、前交連や脳梁などの交連が形成される。左右の大脳半球間を結び付ける脳梁は、左右半球間の情報を交換し、感覚や認知を統合する。胎生期に脳梁が形成される正中線において、軸索が標的に向かい伸長していくためのガイドとなる道標が形成される。これらの道標には、軸索の伸長方向を導くセマフォリンなどの軸索ガイダンス因子が発現している。軸索は、軸索ガイダンス因子に対する受容体を発現し、軸索伸長の誘引、あるいは反発性を示す軸索ガイダンス因子の作用を受けて伸長方向を定める。その結果、神経軸索は正中線を交差し、対側の標的ニューロンに到達する。

(2) マウスでは胎生 15.5 日に、帯状回皮質からパイオニア軸索が正中線への伸長を開始し、後に正中線に到達する新皮質からの軸索の足場を提供する。正中線腹側の subcallosal sling という道標には、セマフォリン 3C (以下、Sema3C) が発現している。Sema3C は、その受容体のニューロピリン 1 (以下、Npn1) を発現するパイオニア軸索の伸長を正中線側に誘引する (PLOS Biol., 7, e1000230, 2009)。セマフォリンの Npn1 への結合後、細胞内への信号伝達は、PlexinA サブファミリー (PlexinA1, A2, A3, A4 の 4 種) を介して行われるとされる。私共の解析では、PlexinA1 欠損マウス (BALB/c 系統) において、脳梁の完全欠損が高頻度に観察された。さらに、胎生 15.5 日齢の PlexinA1 欠損マウスの Npn1 陽性パイオニア軸索では、正中線で Sema3C を発現する道標の subcallosal sling 側への伸長が阻止されていることが示唆された。従って、パイオニア軸索先端部の Npn1 に結合した Sema3C が、PlexinA1 を介してニューロン内に信号を伝達し、パイオニア軸索を正中線側に誘引することで、脳梁形成が進行すると理解できる。

(3) しかし、PlexinA1 の信号伝達阻害実験にて脳梁軸索の投射異常 (Sci Signal., 7, ra81, 2014) が生じるが、脳梁の完全な欠損には至らない。さらに、Sema3C の欠損や Npn1 のセマフォリン結合部位の欠損マウスにおける脳梁の完全な欠損の頻度は、私共の PlexinA1 欠損マウスと比べて著しく低い (PLOS Biol., 7, e1000230, 2009; Dev Cell., 5, 45, 2003)。そのため、PlexinA1 欠損型パイオニア軸索の Sema3C への応答不全に加えて、別の要因の関与が示唆される。最近、脳梁などの神経回路形成や、介在ニューロンの移動や脳内配置におけるミクログリアの道標機能が示唆された (Eur J Neurosci., 39, 1551, 2014; Cell Rep., 8, 1271, 2014)。炎症応答や細胞死誘導における PlexinA1 欠損ミクログリアの機能不全を私共は確認している (Soc of Neurosci, 663.05/A80, 2015)。また PlexinA1 欠損マウスでは、胎生期介在ニューロン前駆細胞の増殖低下の報告がある (J Comp Neurol., 524, 518, 2016)。脳梁形成領域正中線の道標は、主に放射状グリアなどのグリア集団から構成されるが、介在ニューロンや一過性に出現する特殊ニューロン集団も含む。従って、PlexinA1 欠損マウスでは、ミクログリアの道標機能や介在ニューロンの異常により、正中線領域の道標形成が障害され、軸索ガイダンス因子の産生が低下する可能性がある。その結果、PlexinA1 欠損型パイオニア軸索の伸長異常が増強し、脳梁の完全欠損が生じた可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、脳梁発達における PlexinA1 分子の機能について未解明の研究を完成し、脳梁欠損症及び精神疾患の病因解明の基盤となる基礎的知見を得るために、以下の目的を設定した。

- (1) マウスの脳梁発達におけるセマフォリン分子と受容体タンパクの局在を解明し、脳梁形成に働くパイオニア軸索と道標の位置関係をタンパクレベルで知るための局在マップを作る。
- (2) 脳梁発達における PlexinA1 欠損パイオニア軸索の伸長方向の異常を実証し、Sema3C によるパイオニア軸索の正中線側への伸長の誘引における PlexinA1 介在性を解明する。
- (3) PlexinA1 欠損マウスの正中線領域道標内における介在ニューロン数の減少及び軸索ガイダンス因子発現の異常を実証し、正中線道標の形成における PlexinA1 の新規役割を解明する。
- (4) 野生型と PlexinA1 欠損脳のスライス培養間で帯状回皮質を交換移植し、パイオニア軸索の伸長方向を追跡する。その結果、PlexinA1 欠損パイオニア軸索の Sema3C への応答不全と、道標形成不全のどちらが、脳梁欠損の発生に寄与するかを解明する。

3. 研究の方法

(1) 脳梁発達におけるセマフォリンと受容体の局在マップ作り

帯状回皮質起始のパイオニア軸索の伸長方向を追跡する指標として、BALB/cAJ 系統マウスの脳梁形成の各段階におけるセマフォリンと受容体タンパク発現の局在マップを作る。

セマフォリンのタンパク局在の解明

抗 Sema3C 抗体を用いる免疫組織化学において、BALB/c 系統マウスの胎生 15.5 日 (E15.5)

以降の大脳正中線領域における Sema3C とその他のセマフォリンの局在を解明する。

セマフォリン受容体のタンパク局在の解明

BALB/c 系統マウスの E15.5 以降のパイオニア軸索において、Npn1 と PlexinA1 受容体が共局在するかどうか解明する。

セマフォリンと受容体の局在マップ作り

の結果をもとに、E15.5 以降の大脳正中線領域における Npn1 陽性、PlexinA1 陽性パイオニア軸索と正中線側道標に局在する Sema3C、Sema3A 等のセマフォリンとの相対的位置関係を示すため、セマフォリンと受容体の局在マップを作製する。

(2) パイオニア軸索の伸長方向の追跡

(1)の局在マップを基に、PlexinA1 欠損マウスの Npn1 陽性パイオニア軸索の投射異常を検出する。また、神経トレーサーでパイオニア軸索を標識し PlexinA1 欠損パイオニア軸索の伸長方向の異常を証明する。さらに、野生型及び PlexinA1 欠損帯状回皮質外移植片に各種セマフォリンを作用させ、PlexinA1 欠損により Sema3C 側への軸索伸長の阻害が起こることを示す。

免疫組織化学によるパイオニア軸索の伸長方向の解析

E16.5 及び E17.5 の野生型と PlexinA1 欠損マウス大脳冠状断組織を用いて Npn1 と Sema3C の免疫組織化学を行い、PlexinA1 欠損パイオニア軸索の先端部分が伸長停止や旋回などの投射異常を示すかどうか検討を行う。

カルボシアニン蛍光色素注入によるパイオニア軸索路の追跡

の免疫組織化学で示唆された PlexinA1 欠損パイオニア軸索の投射異常を確認するために、神経トレーサーのカルボシアニン蛍光色素 (dil) を帯状回皮質に注入し順行性にパイオニア軸索の投射を追跡する。E15.5 及び E16.5 の野生型と PlexinA1 欠損脳をパラホルムアルデヒド固定し、帯状回皮質に dil を注入する。脳を暗所保存した後、冠状断スライスを作製する。

帯状回外移植片の軸索伸長に及ぼす Sema3C 作用の解析

Sema3C の PlexinA1 依存性軸索伸長促進作用を証明する実験の準備として、Sema3A や Sema3C 等のセマフォリンを分泌する細胞株を作成する。セマフォリンの発現ベクターをヒト胎児性腎細胞株 (HEK293T) に遺伝子導入し、セマフォリン分泌性細胞株を樹立する。E14.5 及び E15.5 の野生型と PlexinA1 欠損帯状回外移植片を、セマフォリン分泌性細胞株と共培養を行う。共培養 48 時間後に野生型帯状回皮質外移植片からの軸索伸長を Sema3C が誘引することを確認する。次に、Sema3C の誘引活性が PlexinA1 欠損帯状回外移植片では消失するかどうかを解析する。

(3) 正中線道標の形成における PlexinA1 の役割の解析

道標形成の評価

PlexinA1 欠損による正中線道標の異常発達有無の検討のため、E15.5、E16.5、E17.5 の野生型と PlexinA1 欠損脳組織を、グリア線維性タンパク (GFAP)、カルレチニン (以下、CR) に対する抗体で免疫組織化学を行う。GFAP の染色パターンの異常の有無を検討する。また、CR 陽性ニューロン数の比較を行う。

道標内の介在ニューロンの比較

PlexinA1 欠損が脳梁形成予定領域の GABA 陽性介在ニューロンの発達に影響するかどうか確かめるために、E15.5、E16.5、E17.5 の野生型と PlexinA1 欠損脳の正中線道標内の GABA 陽性介在ニューロン数の比較を行う。

道標内の Sema3C 等軸索ガイダンス因子の発現レベルの比較

CR 陽性ニューロンには Sema3C が発現している (PLoS Biol., 7, e1000230, 2009)。E15.5、E16.5、E17.5 の野生型と PlexinA1 欠損脳組織について、CR と Sema3C の免疫組織化学を行い、PlexinA1 欠損により Sema3C を発現する CR 陽性ニューロン数が減少するかどうかを検討する。また Sema3C 免疫陽性強度の減少の有無を検討する。野生型と PlexinA1 欠損マウスの脳梁形成予定領域のタンパク抽出物をウェスタンブロット解析し、PlexinA1 欠損による Sema3C 発現レベルの減少の有無を解析する。その他のセマフォリンや軸索ガイダンス因子について、同様の解析を行う。

野生型と PlexinA1 欠損マウスの帯状回皮質の交換移植実験

PlexinA1 欠損の道標が、パイオニア軸索の伸長方向決定に及ぼす影響を調べるため、胎生 15.5 日齢脳スライス培養から野生型と PlexinA1 欠損帯状回皮質を摘出し、野生型移植片は胎生 16.5 日齢 PlexinA1 欠損脳スライス培養の帯状回領域に移植する。PlexinA1 欠損移植片は胎生 16.5 日齢野生型脳スライス培養の帯状回領域に移植する。両移植片中に dil を注入し、56 時間後にパイオニア軸索の伸長方向を解析し、正中線を越えず異常な投射をする軸索の割合を求め、この割合を野生型移植片の野生型脳スライス培養への移植で正中線を越えない軸索の割合と比較する。

4. 研究成果

(1) 発達期大脳皮質正中線 developing cortical midline における PlexinA1 の発現：

PlexinA1 は Npn1 と L1CAM とともに、E15.5-17.5 の C57BL/6J マウスの帯状回パイオニアニューロンに発現している []。Sema3A や Sema3C などの Class3 semaphorins (Semas) もま

た、C57BL/6J マウスの発達期大脳皮質正中線 developing cortical midline に発現している[]。E15.5-17.5 の BALB/cAJ マウスの発達期大脳皮質正中線における PlexinA1 と Npn1、および PlexinA1 と Npn1 に対する幾つかのリガンドの局在確認のため、免疫組織化学と western blotting を用いて PlexinA1, Npn1, Sem3A, Sem3C と Slit2 の発現解析を行った。その結果、E16.5 および E17.5 の野生型 (WT) の cortical midline の免疫組織化学解析では、PlexinA1 は帯状回皮質に接する中間帯 intermediate zone の背側に発現しており、septum にも発現していた。さらに、E17.5 の WT では、正中線を横断中の脳梁軸索の背側部に発現していた。一方、PlexinA1 knockout (PlexinA1 KO) 脳のどの場所にも PlexinA1 の発現は検出されなかった。E16.5 および E17.5 の WT と PlexinA1 KO マウスの cortical midline 由来の抽出タンパク質を用いた western blotting において、WT 特異的に PlexinA1 タンパクが検出され PlexinA1 KO では検出されなかった。Npn1 の発現は E15.5, E16.5, E17.5 の WT と PlexinA1 KO の両方の皮質正中線領域において確認することができた。Npn1 タンパクが帯状回ニューロンの軸索に発現するという報告[]と一致して、Npn1 は、両遺伝子型の帯状回皮質に接する中間帯背側サイドに発現していた。そして、ほとんどの E17.5 の WT マウスにおいて、Npn1 陽性軸索が正中線を交差していた。一方、ほとんどの E17.5 の PlexinA1 KO マウスでは、Npn1 陽性軸索は正中線交差の直前で伸長が停止していた。帯状回皮質のパイオニア軸索に発現する Npn1 と同じ領域に PlexinA1 が局在するかどうかを調べるために、Npn1 と PlexinA1 に対する抗体が共にヤギ由来であったので、最初に PlexinA1 と DCC (Deleted in Colorectal Cancer) の二重免疫を行った。その結果、E16.5 において、PlexinA1 は帯状回パイオニア軸索に発現する DCC との重なりは無く、DCC 陽性軸索に接するようにその背側に帯状に局在していた。次に、Npn1 と DCC の二重免疫において、E16.5 の WT と PlexinA1 KO における Npn1 の局在は、DCC 陽性領域内の背側に DCC と一致した局在を示した。ウサギ由来の抗 Npn1 抗体と抗 PlexinA1 抗体の二重染色の結果においても、PlexinA1 は Npn1 陽性領域に接するようにその背側に帯状に局在するが重なる部位は無かった。そのため、パイオニア軸索が未だ正中線を交差していない E16.5 においては、PlexinA1 タンパクは Npn1 陽性帯状回パイオニア軸索には局在しないことが判り、以前の報告[]を支持しないような結果となった。脊髄の交連線維が正中線を交差する前に軸索で PlexinA1 がカルパイン介在性の分解を受け PlexinA1 の発現が抑制されるとの報告がある[]。脳梁形成過程でも同様のメカニズムが働くのか、PlexinA1 陽性領域が軸索なのか神経細胞体なのかどうかは、今後の検討課題である。脳梁軸索が正中線を交差した後の E17.5 では、脳梁正中部背側の脳梁軸索は、PlexinA1 と Npn1 を共に発現していることが確認された。今後は、パイオニア軸索が正中線を交差する段階で PlexinA1 が作用する可能性を探るために、脳梁軸索が正中線に近接し正中線を越える直前の段階において、Npn1 陽性帯状回パイオニア軸索に PlexinA1 が発現しているかどうかを確認することが重要である。

(2) 発達期大脳皮質正中線における PlexinA1 のリガンドの発現：

Npn1-PlexinA1 受容体複合体のリガンドの一つである Sem3A の発現は、免疫組織化学と western blotting により WT と KO の大脳皮質正中線において確認することができた。Piper らの報告[]に一致して、E16.5 の WT と KO の帯状回皮質領域において、新皮質と中間帯に Sem3A の発現を認めた。E17.5 の WT では、脳梁形成に必要な indusium griseum と subcallosal sling に一致する領域において発現が顕著になった。E17.5 の KO においても、indusium griseum と subcallosal sling に一致する領域での Sem3A の発現が検出された。そして、E16.5 および E17.5 の WT と PlexinA1 KO マウスの cortical midline 由来抽出タンパク質を用いた western blotting において、Sem3A の発現レベルは両 genotype 間に有意差は無かった。

Npn1-PlexinA1 受容体複合体のリガンドで化学誘引活性を有する Sem3C の発現は、免疫組織化学と western blotting により WT と KO の cortical midline において確認できた。Piper らの報告[]に一致し、E16.5 の WT と KO の帯状回皮質領域において、新皮質と中間帯に Sem3C の発現を認めた。E17.5 の WT と KO において、indusium griseum と subcallosal sling に一致する領域に発現が確認された。そして、E16.5 および E17.5 の WT と PlexinA1 KO の cortical midline 由来の抽出タンパク質を用いた western blotting において、Sem3C の発現レベルは両 genotype 間に有意差は無かった。また、脳梁形成期の正中線に一過性に出現するカルレチニン (CR) 陽性グルタミン酸作動性ニューロンは Sem3C を分泌し脳梁軸索を正中線に誘引するとされている[]。CR の発現は E17.5 の WT と PlexinA1 KO でともに確認することができた。CR は両 genotype の正中線延長線上に存在する indusium griseum と Subcallosal sling、と中間帯に発現しており、発現パターンは両 genotype 間において類似していた。また CR と Sem3C の二重免疫により、特に indusium griseum と Subcallosal sling、と中間帯における CR と Sem3C の共同在を確認した。CR 陽性細胞が Sem3C を発現してパイオニア軸索の道標となるという以前の研究結果[]を支持する結果を得た。CR 陽性道標に対する Npn1 陽性軸索の伸長を WT と KO で調べるために Npn1 と CR の二重免疫を行った。その結果、E17.5 の WT Npn1 陽性軸索と PlexinA1 KO Npn1 陽性軸索の両方が、正中線の CR 陽性細胞に向かって伸長していることが分かった。しかし、WT の Npn1 陽性軸索のほとんどが正中線を越えていたのに反し、PlexinA1 欠損 Npn1 陽性軸索は正中線の手前で停止しているものが多かった。

Slit2 カルボキシル末端側のペプチドの Slit2C は PlexinA1 に直接結合するリガンドとして反発性の軸索ガイダンス作用を発揮する[]。Slit2 のカルボキシル末端側を認識する抗体を用い

て、胎生 17.5 日齢マウス脳の冠状断切片における Slit2 の発現を免疫組織化学により確認した。WT、PlexinA1KO どちらにおいても Slit2 の発現が確認できた。WT、PlexinA1KO の両方で、Slit2 の局在位置は、皮質板と Glial Wedge において Slit2 の発現を示す蛍光が強く観察された。皮質板における Slit2 は、Npn1 陽性脳梁軸索に接するように皮質板の深層において帯状の局在を示した。E16.5 および E17.5 の WT と PlexinA1 KO の cortical midline 由来の抽出タンパクを用いた western blotting において、両遺伝子型において分子量 55Kd の Slit2C のみが検出され、全長の Slit2 は検出されなかった。また Slit2C の発現レベルにおいて有意差は見られなかった。Slit2C と PlexinA1 の相互作用が Npn1 陽性脳梁軸索の正中線交差に關与するかどうかは今後の検討課題である。

(3) 胎生 17.5 日齢 plexinA1 欠損マウスでは Npn1 陽性脳梁軸索の正中線交差が障害される：
Npn1 の免疫染色により、E17.5 の両遺伝子型間において、Npn1 陽性軸索の正中線交差について解析を行った。WT では 24 匹中 18 匹で正中線交差を確認し、6 匹で交差は認めなかった。一方 PlexinA1 KO では 24 匹中 4 匹のみで交差を認め、20 匹で交差は認めなかった(カイ 2 乗検定、 $P < 0.05$)。そのため、WT と比較して、E17.5 の PlexinA1 欠損 Npn1 陽性軸索が正中線を交差することが有意に少ないことが分かった(カイ 2 乗検定、 $P < 0.05$)。Dil を帯状回皮質に注入する tract tracing も Npn1 の免疫染色結果を支持した。野生型 10 匹のうち 9 匹で脳梁軸索の正中線交差が確認できた。PlexinA1 KO マウス 16 匹の中で、2 匹のみで正中線交差を認め、14 匹で交差は無かった。E17.5 の PlexinA1 欠損脳梁軸索の正中線交差が有意に少ないことが分かった(カイ 2 乗検定、 $P < 0.05$)。また E17.5 の PlexinA1 KO において、Npn1 のセマフォリン結合ドメイン欠損マウスで確認されたような脳梁軸索の中隔への mistargeting[]は認めなかった。Npn-1 陽性軸索は両遺伝子型において帯状皮質から正中線にかけての伸長が認められた。そのため、正中線方向への Npn-1 陽性軸索の伸長には PlexinA1 は必須ではないことが示唆される。しかし、野生型の Npn-1 陽性軸索は 75%が正中線を交差しているのに対し、PlexinA1 欠損型で正中線を交差しているものは 16.6%と有意に少なかった。また、PlexinA1 欠損型の Npn-1 陽性軸索は、大部分で正中線交差の直前における伸長停止がみられた。以上のことから、PlexinA1 は、Npn-1 陽性軸索の正中線交差の段階に深く關与することが示唆された。この PlexinA1 の作用メカニズムについては今後のさらなる解析が必要である。

(4) 生後 0.5 日齢の PlexinA1 欠損マウスは脳梁欠損を呈する：
E17.5 の PlexinA1 KO 脳梁軸索の正中線交差直前での停止状態が、約 2 日後の生後 0.5 日齢 (postnatal day 0.5, 以下 P0.5) でどのようになっているかを調べるために、L1CAM に対する抗体を用いた免疫染色にて、WT と PlexinA1 KO マウスの脳梁軸索の正中線交差について解析を行った。WT は、16 匹中 16 匹で L1CAM 陽性脳梁軸索が正中線交差を示したが、KO では、13 匹中 10 匹で L1CAM 陽性脳梁軸索は正中線を交差していなかった。そのため、P0.5 の KO での脳梁軸索の正中線交差は WT と比べて有意に少ないことが分かった。さらに、脳梁軸索の正中線交差を示さなかった KO マウスは、10 匹とも脳梁の前半部が欠損していることが判明した。現在まで、2 つの研究グループが脳梁形成における PlexinA1 の役割検討のため子宮内胎児脳遺伝子導入により大脳皮質背外側で PlexinA1 の信号伝達を阻害する、あるいは PlexinA1 の発現を抑制する試みを行い、脳梁軸索の脱束状化や軸索の正中線過剰交差などの異常を確認している[]。しかし、脳梁軸索の正中線直前における伸長停止や脳梁欠損は検出されていない。そのため、本研究で明らかになった BALB/cAJ マウス遺伝的背景下の PlexinA1 欠損マウスにおけるパイオニア軸索の正中線直前での伸長停止と脳梁欠損は、BALB/cAJ マウス遺伝的背景の影響を受けて明らかになった表現型であり、脳梁形成における PlexinA1 の未解明の機能を反映したもので、脳梁形成機構の解明研究においては意義が高いと考えている。今後の展望としては、PlexinA1 欠損マウスの脳梁表現型が道標の異常によるのか、正中線交差前のパイオニア軸索で PlexinA1 が働かないことによるかを解決していく必要がある。そのために、3. 研究方法に示した(2) の帯状回外移植片を用いて PlexinA1 のリガンドによる軸索伸長を評価する実験や、研究方法(3) の野生型と PlexinA1 欠損マウスの帯状回皮質の交換移植実験において確実な実験結果を得ていくことが重要である。また、子宮内胎児脳への遺伝子導入により帯状回皮質で PlexinA1 発現を抑制した場合、脳梁軸索の伸長が正中線直前で停止するかどうかの解析も行う必要がある。

<引用文献>

- Piper M, Plachez C, Zalucki O, Fothergill T, Goudreau G, Erzurumlu R, et al. Neuropilin 1-Sema Signaling Regulates Crossing of Cingulate Pioneering Axons during Development of the Corpus Callosum. *Cerebral Cortex* 2009; 1:i11-i21.
- Nawabi H, Briançon-Marjollet A, Clark C, Sanyas I, Takamatsu H, Okuno T, et al. A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Genes Dev.* 2010; 24(4):396-410.
- Niquille M, Garel S, Mann F, Hornung JP, Otsmane B, Chevalley S, et al. Transient neuronal populations are required to guide callosal axons: a role for semaphorin 3C. *PLoS Biol.* 2009; 7(10):e1000230.

Delloye-Bourgeois C, Jacquier A, Charoy C, Reynaud F, Nawabi H, Thoinet K, et al. PlexinA1 is a new Slit receptor and mediates axon guidance function of Slit C-terminal fragments. *Nat Neurosci.* 2015; 18:36-45.

Wu K-Y, He M, Hou Q-Q, Sheng A-L, Yuan L, Liu F, et al. Semaphorin 3A activates the guanosine triphosphatase Rab5 to promote growth cone collapse and organize callosal axon projections. *Sci Signal.* 2014; 7(340):ra81.

Son AI, Fu X, Suto F, Liu JS, Hashimoto-Torii K, Torii M. Proteome dynamics during postnatal mouse corpus callosum development. *Sci. Rep.* 2017; 7:45359.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 6 件)

Md. Mosharaf Hossain, Takuji Ito, Takamasa Tsuzuki, Fumitaka Imaizumi, Kana Kamiya, Mitsuki Okada, Ikuko Takahashi, Takayuki Negishi, **Kazunori Yukawa**: PlexinA1 is crucial for the midline crossing of cingulate axons during the formation of corpus callosum in BALB/c mice. 第 41 回 日本分子生物学会年会 (2018)

Md. Mosharaf Hossain, Takuji Ito, Takamasa Tsuzuki, Fumitaka Imaizumi, Ikuko Takahashi, Takayuki Negishi, **Kazunori Yukawa**: PlexinA1 is crucial for the midline crossing of callosal axons during corpus callosum development in BALB/c mice. *Neuroscience* 2018., 367.04 (2018)

Md. Mosharaf Hossain, Fumitaka Imaizumi, Ikuko Takahashi, Takayuki Negishi, **Kazunori Yukawa**: Mapping the localization of semaphorins and semaphorin binding partners in the mouse cortical midline during corpus callosum development. 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017., (2017)

湯川和典、池谷明寛、今泉文孝、Mohammad Mosharaf Hossain、Laboni Mst-Sharifa-Jahan、Mohammad Eliusur Rahman Bhuiyan、根岸隆之: 脳梁発達期の帯状回パイオニア軸索ガイダンスにおける plexinA1 の役割, 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017., (2017)

Kazunori Yukawa, Md. Mosharaf Hossain, Laboni Mst-Sharifa-Jahan, Md. Eliusur Rahman Bhuiyan, Ikuko Takahashi, Takayuki Negishi: The role of plexin-A1 receptor in the guidance of cingulate pioneering axons during the corpus callosum development. *Neuroscience* 2017., (2017)

湯川和典、池谷明寛、長浜真美、金城秀明、榊原一希、稲垣真美、今泉文孝、フセイン モハメド モシャラフ、根岸隆之: 脳梁発達初期のパイオニア軸索の伸長と道標形成における PlexinA1 受容体の役割, 第 94 回日本生理学会大会., (2016)

[その他]

ホームページ等

Kazunori Yukawa, Kazuki Sakakibara, Mami Inagaki, Tomomi Mouri, Kenji Yoshida, Takayuki Negishi: The role of PlexinA1 receptor in the elongation of pioneer axons and the guidepost formation Halted elongation of callosal pioneer axons . *Bulletin of Research Institute of Meijo University*, 22:185-188(2017) 査読無

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 根岸 隆之

ローマ字氏名 : NEGISHI, takayuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。