

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17023028

研究課題名（和文） 脳の構築と神経回路形成における細胞移動の役割

研究課題名（英文） Role of neuronal migration for the formation of neuronal connections

研究代表者

村上 富士夫 (MURAKAMI FUJIO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：20089882

研究成果の概要（和文）：後脳の小脳前核細胞をモデルとして、神経細胞の移動、その結果形成される神経核、そして神経核形成と神経回路形成の関係を検討した。その結果、神経核形成の分子機構としてネトリンによる誘引の他に、N-Cadherin による接着、さらには SDF-1 による誘引など、様々な分子機構の関与があることが判明した。そして SDF-1 をノックアウトすると橋核が異所性に形成されることを利用して、神経回路形成と神経核形成の関係について検討したところ、神経核が異所性に形成されても正常な回路形成が起こることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The development of mossy-fibre projecting precerebellar neurons (PCN) presents a classical example of tangential neuronal migration. Among the PCN, the pontine neurons follow a stereotypic anteroventral-directed pathway to form the pontine nuclei in the pons. The guidance mechanisms that determine the marginal migration of PCN and the anterior migration of pontine neurons are poorly understood. Here, we report that a chemokine SDF1 derived from the meningeal tissue regulates the migratory pathways of PCN. PCN are chemoattracted by the meningeal tissue, an effect that is mimicked by an SDF1 source. Analysis of knockout mice for the Sdf1 receptor Cxcr4 shows that both the marginal migration of PCN and the anterior migration of pontine neurons are disrupted. We further find that SDF1/CXCR4 signalling regulates these two processes cell-autonomously. As a result of disrupted neuronal migration, pontine nuclei formation was highly abnormal, with the presence of multiple ectopic pontine clusters posteriorly. The ectopic pontine clusters led to ectopic collateral branch formation from the corticospinal tract. Our results together demonstrate crucial roles for SDF1/CXCR4 in multiple aspects of PCN migration and highlight the deleterious consequence of derailed migration on proper nuclei formation. Furthermore, we provide the first in vivo evidence that pontine neurons themselves induce collateral branching from the corticospinal axons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,600,000	0	3,600,000
2006年度	11,800,000	0	11,800,000
2007年度	23,500,000	0	23,500,000
2008年度	22,400,000	0	22,400,000
2009年度	21,100,000	0	21,100,000
総計	82,400,000	0	82,400,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：ラディアル線維 / 下菱脳唇 / 小脳前核細胞 / 接線方向移動 / 放射状方向移動 / 神経回路形成 / 神経核 / 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

近年の発生神経科学の発展は神経回路形成の機構の解明に向かって大きな前進をもたらした。特に伸長しつつある軸索の先端部に形成される成長円錐のガイド機構に関して、底板に代表される中間標的による誘引、反発やガイドキューに対する反応性の変化など新たな概念が確立されるとともに、分子機構に関する理解も大きく進展しつつある。神経回路の形成は言うまでもなく、シナプス前要素とシナプス後要素の連携によって実現される。すなわち、シナプス前要素である軸索の適切な部位への誘導と同時にそれを受けるべきシナプス後細胞の適切な部位への配置が協調的に実現することにより両者はシナプスを形成することができる。シナプス後細胞の適切な部位への配置、つまり適切な層構造や神経核の形成は神経細胞の整然とした移動がおこることによって実現される。よって神経細胞がどのようにして適切な場所へ移動するのかという問題の解明は脳の形態形成のみならず、脳の領域に特異的な性質を持った神経回路の構築を解明するのに不可欠な重要な問題である。

2. 研究の目的

そこで本研究では神経細胞の移動の基本原理の解明を行うとともに、その後おこる神経回路形成にどのような役割を果たすのかを明らかにする。具体的には下記の日標を設定して解明をおこなう。(1) 起源を共有する移動細胞も多くの場合複数の異なる部位へ向かって移動するが、どのようにして異なる部位へ分配されるのかを解明する。(2) 神経核などの構造の形成は移動が停止することによって実現されるが、その機構を解明する。(3) 移動という現象が、その後おこる神経細胞の軸索の投射に如何なる影響を及ぼすのか、(4) 同様に移動という現象が他の神経細胞によって支配に必要な変化を神経細胞にもたらすのか、もしそうであるならば如何なる機構によるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

まず後脳小脳前核細胞群の核形成の過程の

研究を行った。そのため、マウスの胎仔標本を用いて、後脳背側部の菱脳唇に片側性に *exo utero* 電気穿孔で EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) 遺伝子を導入することによって菱脳唇由来の小脳前核細胞の前駆細胞を *in vivo* で標識し、その運命を追った。またスライス標本を作製してタイムラプス解析を行った。

また分子機構を明らかにするために、ケモカインの一種である SDF-1 またはその受容体である CXCR4 のノックアウトマウスの利用、子宮内電気穿孔法による接着因子である NCadherin の阻害実験によりを用い、神経細胞の移動及び核形成の異常の解析をおこなった。さらにその結果生じる神経回路形成の異常についても検討を行った。

4. 研究成果

橋と延髄において小脳前核を形成する4つの神経核の移動と核形成の過程を可視化することに成功した。その結果、これまでの報告に反して橋核と橋被蓋網様核 (PGN/RTN) の神経細胞の一部は正中線を交叉して移動することが明らかになった。また外側網様核と外楔状核の神経細胞が正中線を越えて移動することが明らかになった。興味深いことに小脳前核細胞の前駆細胞は何れも移動の最終段階において脳室方向に向かって移動する様子が観察された。ラディアル線維を選択的に染める抗ネスチン抗体を投与したところ、脳室方向に向かって移動する細胞はネスチン陽性繊維に沿うように分布していた。また電子顕微鏡を用いて観察をおこなったところ、ラディアル繊維に移動細胞が接触している様子が観察された (図 1、Kawauchi et al., 2006)。

そこでこの移動の分子機構の一端を明らかにするために、神経系に発現が豊富にみられ、移動への関与が示唆されていた N-Cadherin に着目し、その機能阻害による影響を評価した。その結果、橋核と橋被蓋網様核の形成異常を認められ、神経核形成に N-Cadherin が重要であることが明らかになった (Taniguchi et al., 2006)。

次に我々は小脳前核神経細胞群の移動動態

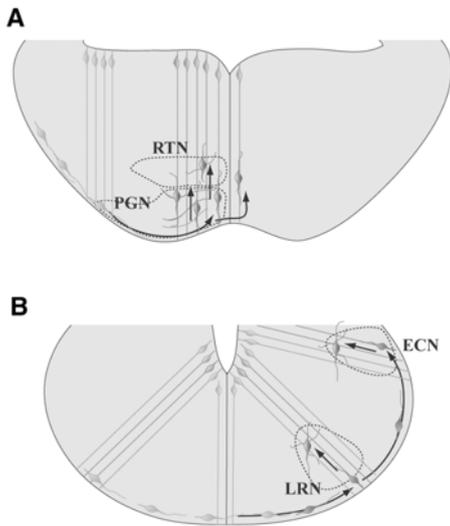


図 1

を観察することとした。小脳前核神経細胞群の中でも我々は、PGN/RTN ニューロンに着目した。PGN/RTN ニューロンは下菱脳唇で生まれ、接線方向に軟膜直下の経路を移動し、その後、橋の腹側正中線付近で放射状方向に移動方向を変化させ、核形成に至ると考えられている。しかし、これは固定標本の観察によるものであり、実際にどのような動態を示し移動しているかは不明であった。我々は、橋の腹側正中線付近でおこる PGN/RTN ニューロンの放射状方向への移動方向の変化から核形成に至る前までの移動局面に着目した。この移動局面は組織内部の適切な位置に PGN/RTN ニューロンが核を形成する上で必須のステップであると考えられるため、その動態を詳細に調べることにした。その結果 PGN/RTN ニューロンが接線方向・背腹軸方向の様々な方向へ移動したり、移動方向を変えたりしている様子が観察され、固定標本でも同様の形態をした PGN/RTN ニューロンが観察された。以上の結果から、PGN/RTN ニューロンは、橋の腹側正中線近傍に到達し、移動方向を変え、核形成に至るまでの間に、左右軸・背腹軸の様々な方向への移動、及び多様な移動形態をとっていることが明らかになった (Watanabe and Muakami, 2009)。

我々はこれまでにこの細胞の移動がケモカインの一種である SDF-1 によって制御を受けていることを明らかにしてきた。SDF-1 は髄膜に発現しているのに対して、移動中の橋核細胞はその受容体である CXCR4 を発現している。そして SDF-1 またはその受容体である CXCR4 をノックアウトしたマウスでは移動経路に異常が生じるほか、核形成も大きく乱れ、異所性にそして左右非対称に核形成が起

こる。このように異所性に神経核が形成された場合神経回路形成に関しては 2 つの可能性が考えられる。一番目は、神経核の位置とは関係なく定まった位置に軸索が誘導されるというもので、2 番目は神経核の位置の変化に呼応して神経支配が起こるといったものである。

これらの可能性を検討するため、皮質脊髄路からの側枝による橋核の支配を観察した。CXCR4 ノックアウトマウスは胎生致死のため、*Wnt1-Cre* マウスと *Cxcr4^{fl/fl}* マウスの交配を行うことで、小脳前核細胞特異的に *Cxcr4* を欠失させた。また皮質脊髄路は *Di1* を注入することによって標識した。

生後 3-5 日目に観察を行った結果、皮質脊髄路からの側枝は異所的に形成された橋核の位置に対応する位置に形成されていた。このことは、神経回路形成はシナプス後要素の位置の変化に依存して可塑的に変化することを示している。

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 15 件)

- ① Tamada A, Kawase S, Murakami F, Kamiguchi H.: Autonomous right-screw rotation of growth cone filopodia drives neurite turning. *J Cell Biol.* 2010 Feb 8;188(3):429-41. Epub 2010 Feb 1. , 査読有
- ② Hatanaka Y, Matsumoto T, Yanagawa Y, Fujisawa H, Murakami F, Masu M.: Distinct roles of neuropilin 1 signaling for radial and tangential extension of callosal axons. *J Comp Neurol.* 2009 May 20;514(3):215-25. , 査読有
- ③ Watanabe H, Murakami F.: Real time analysis of pontine neurons during initial stages of nucleogenesis. *Neurosci Res.* 2009 May;64(1):20-9. Epub 2009 Jan 22. , 査読有
- ④ Tanaka DH, Yanagida M, Zhu Y, Mikami S, Nagasawa T, Miyazaki J, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F.: Random walk behavior of migrating cortical interneurons in the marginal zone: time-lapse analysis in flat-mount cortex. *J Neurosci.* 2009 Feb 4;29(5):1300-11. , 査読有
- ⑤ Tamada A, Kumada T, Zhu Y, Matsumoto T, Hatanaka Y, Muguruma K, Chen Z, Tanabe Y, Torigoe M, Yamauchi K, Oyama H, Nishida K, Murakami F.: Crucial roles of Robo proteins in midline crossing of cerebellofugal axons and lack of their up-regulation after midline crossing.

Neural Dev. 2008 Nov 5;3:29. , 査読有

⑥ Murakami F, Tanaka D, Yanagida M, Yamazaki E.: Intracortical multidirectional migration of cortical interneurons. Novartis Found Symp. 2007;288:116-25; discussion 125-9, 276-81. , 査読有

⑦ Andrews W, Barber M, Hernandez-Miranda LR, Xian J, Rakic S, Sundaresan V, Rabbitts TH, Pannell R, Rabbitts P, Thompson H, Erskine L, Murakami F, Parnavelas JG.: The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and morphological differentiation of cortical interneurons. Dev Biol. 2008 Jan 15;313(2):648-58. Epub 2007 Nov 13. , 査読有

⑧ Tashiro Y, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F.: Development and migration of GABAergic neurons in the mouse myelencephalon. J Comp Neurol. 2007 Jul 10;503(2):260-9. , 査読有

⑨ Zhu Y, Guthrie S, Murakami F.: Ephrin A/EphA controls the rostral turning polarity of a lateral commissural tract in chick hindbrain. Development. 2006 Oct;133(19):3837-46. , 査読有

⑩ Kadison SR, Murakami F, Matise MP, Kaprielian Z.: The role of floor plate contact in the elaboration of contralateral commissural projections within the embryonic mouse spinal cord. Dev Biol. 2006 Aug 15;296(2):499-513. Epub 2006 Jun 15. , 査読有

⑪ Andrews W, Liapi A, Plachez C, Camurri L, Zhang J, Mori S, Murakami F, Parnavelas JG, Sundaresan V, Richards LJ.: Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. Development. 2006 Jun;133(11):2243-52. , 査読有

⑫ Tanaka DH, Maekawa K, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F.: Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. Development. 2006 Jun;133(11):2167-76. Epub 2006 May 3. , 査読有

⑬ Taniguchi H, Kawauchi D, Nishida K, Murakami F.: Classic cadherins regulate tangential migration of precerebellar neurons in the caudal hindbrain. Development. 2006 May;133(10):1923-31. Epub 2006 Apr 12. , 査読有

⑭ Kawauchi D, Taniguchi H, Watanabe H, Saito T, Murakami F.: Direct visualization of neurogenesis by precerebellar neurons: involvement of

ventricle-directed, radial fibre-associated migration. Development. 2006 Mar;133(6):1113-23. , 査読有

⑮ Kobayashi H, Yamamoto S, Maruo T, Murakami F.: Identification of a cis-acting element required for dendritic targeting of activity-regulated cytoskeleton-associated protein mRNA. Eur J Neurosci. 2005 Dec;22(12):2977-84. , 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① 村上富士夫: "大脳皮質介在ニューロンの移動と成熟のダイナミクス" 大阪バイオサイエンス研究所マンスリーレクチャー. (2008. 5. 22). 大阪

② 村上富士夫: "大脳皮質介在ニューロンの移動のダイナミクスと成熟への足跡" H19 年度特定領域研究「統合脳」冬のシンポジウム. (2007. 12. 22). 東京

③ 村上富士夫: "脳における接線方向への神経細胞移動: そのダイナミクスと分子メカニズム" つくばプレインサイエンスセミナー. (2007. 10. 8). つくば

④ 村上富士夫: "脳における神経細胞移動のダイナミクス" 脳神経科学を社会へ還流する教育研究拠点キックオフシンポジウム, 東北大学グローバル COE シンポジウム. (2007. 7. 19). 仙台

⑤ 村上富士夫: "Migration and neurogenesis of rhombic lip-derived hindbrain neurons." Neurogenesis2007, 神経の再生と分化に関する国際カンファレンス. (2007. 5. 15). 東京

⑥ 村上富士夫: "脳の組立と配線を行こう神経細胞" 世界脳週間 2007 大阪講演会. (2007. 5. 13). 大阪

[図書] (計 2 件)

① 田中大介, 山内健太, 村上富士夫: "神経細胞移動と軸索伸長のガイダンスメカニズム BRAIN and NERVE" 医学書院. 60, 405-413 (2008)

② 村上富士夫: 成長円錐の走行制御と神経回路形成. Medical Science Digest 33(6), 2-3(2007).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 富士夫 (MURAKAMI FUJIO)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号: 20089882

(2) 研究分担者

塩井 剛 (SHIOI GO)
理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・研究員
研究者番号: 60391968

(H21 から分担者として参画)

田辺 康人 (TANABE YASUTO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：10311309

(H19 から分担者として参画)