

研究種目：基盤研究(S)
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17100005
 研究課題名(和文) 大脳皮質介在ニューロンの移動・配置と領野特異性の形成
 研究課題名(英文) Migration, disposition of cortical interneurons and establishment of area specificity

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)：脳の神経細胞は興奮性ニューロンと抑制性介在ニューロンから成り、脳の機能は両者の協調により実現される。本研究では、大脳皮質の介在ニューロンが皮質内に如何にして組み込まれて行くのかを明らかにすることを目的とした。これらのニューロンは、脳の表面付近で2日間以上に亘って接線面で全方向に移動した。また、その動きは酔歩様であり、これを乱すと介在ニューロンサブタイプの皮質内分布に異常が生じた。これは各介在ニューロンの最終目的地は予め決定されているものではなく、確率過程によって決まるものであることを示している。

研究成果の概要(英文)：Migrating neurons are thought to travel from their origin near the ventricle to distant territories along stereotypical pathways by detecting environmental cues in the extracellular milieu. Here, we report a novel mode of neuronal migration that challenges this view. We performed long-term, time-lapse imaging of medial ganglionic eminence (MGE)-derived cortical interneurons tangentially migrating in the marginal zone (MZ) in flat-mount cortices. We find that they exhibit a diverse range of behaviors in terms of the rate and direction of migration. Curiously, a predominant population of these neurons repeatedly changes its direction of migration in an unpredictable manner. Trajectories of migration vary from one neuron to another. The migration of individual cells lasts for long periods, sometimes up to 2 d. Theoretical analyses reveal that these behaviors can be modeled by a random walk. Furthermore, MZ cells migrate from the cortical subventricular zone to the cortical plate, transiently accumulating in the MZ. These results suggest that MGE-derived cortical interneurons, once arriving at the MZ, are released from regulation by guidance cues and initiate random walk movement, which potentially contributes to their dispersion throughout the cortex. They also suggest that the final position individual interneurons are determined as a consequence of a stochastic process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	14,700,000	4,410,000	19,110,000
2006年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2007年度	19,100,000	5,730,000	24,830,000
2008年度	14,200,000	4,260,000	18,460,000
2009年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
総計	80,600,000	24,180,000	104,780,000

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：GABA/GFP/トレーサー/介在ニューロン/大脳基底核原基/大脳皮質/細胞移動/領野特異性

1. 研究開始当初の背景

脳の神経細胞は投射ニューロンと局所回路ニューロンによって構成されるが、前者の多くは興奮性ニューロン、後者の多くは抑制性ニューロンである。大脳皮質では興奮性ニューロンは皮質原基の脳室層で産生されるが、GABA 作動性の抑制性ニューロンは前脳腹側部の基底核原基で産生された後、接線方向に移動して大脳皮質に到る。我々は最近グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD67)遺伝子座に緑色蛍光蛋白質(GFP)をノックインしたマウス(GAD67-GFPマウス)を用いて、解析した。その結果、大脳皮質に到達したGABA作動性ニューロンの移動様式はそれまでに考えられていたよりも遙かに複雑であり、以前にはあまり注目されていなかった辺縁帯においても多様な方向性をもった移動をすることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

そこで問題となるのは皮質に移動していったGABA作動性ニューロンがどのようにして皮質内に配置、分配されるのかという問題である。大脳皮質には領野特異性があることを考えると次のような2つのシナリオが考えられる。その一つはGABA作動性の抑制性ニューロンは移動開始以前からその運命が定まっておき、それにしたがって異なる皮質の部位に移動して行くというものである。2番目は皮質に移動するGABAニューロンは一様な性質を有しており、ランダムに皮質に拡がって行くという考えである。本研究ではこれらの仮説を検証するとともに、この問題を突破口として皮質の領野特異性の獲得における抑制性ニューロンの関与について検討する。

3. 研究の方法

皮質でのGABA作動性ニューロンの動きを追うために、GAD67-GFPマウスを使用した。また、長距離に亘る移動の可否の検討のため、胎生15.5日目に脂溶性色素のDiDをガラス電極で皮質に注入し、1.5または3日後に胎仔を固定して標識された細胞の分布の解析を行った。また特定の部位に起源を有するGABA作動性ニューロンの移動を解析するため、mcherry遺伝子を電気穿孔法で胎仔のmedial ganglionic eminence(MGE)に導入し、数日間待った後、皮質を展開してreal-time

imagingを行った。

また、辺縁層での長時間に亘る接線方向への移動の分子機構を明らかにすると共に、その意義を解明するため、ケモカインSDF1の強制発現、その受容体の時期、部位特異的発現抑制を、電気穿孔法、遺伝子改変マウスと組み合わせることで実現した。

4. 研究成果

DiDは前頭葉、頭頂葉または後頭葉に注入したが、何れの場合も、注入後3日目には注入部位から2ミリ以上離れた脳表面の部位に標識ニューロンが観察された(Tanaka et al., 2006)。これは辺縁帯に到達したGABAニューロンは接線方向に長距離に亘って移動することを意味している。また、GABAニューロンが辺縁帯において数日間という極めて長期にわたって滞留するという驚くべき可能性を示唆している。

またGABAニューロンの起源の一つであるMGE由来のGABAニューロンを特異的に標識し、その移動の様子を辺縁帯で観察するため、mcherry遺伝子を電気穿孔法で胎仔のMGEに導入し、皮質を展開してreal-time imagingを行った。その結果、やはり全方向に向かうGABAニューロンの移動が観察された。このことは起源とは関係なくGABAニューロンは多方向への移動をすることを意味している。辺縁帯での全方向へのGABAニューロンの移動は切片標本では観察することが出来なかったが、皮質を展開して表面からアクセスすることで、観察することが出来た。したがって全方向へのGABAニューロンの移動は辺縁帯以外でも起こっている可能性が考えられる。技術的制約のため、表面から離れた部位のGABAニューロンの移動の可視化は困難である。しかし、脳室帯のニューロンは観察可能であろうと考え、皮質を展開し上下反転させて置いた標本を作製して脳室層のニューロンの動態を解析した。その結果、興味深いことに脳室層のニューロンも脳室に平行な面において全方向へ向かって移動していることが明らかになった(Tanaka et al., 2006)。さらに同様な実験条件下で長時間に亘るreal-time imagingを行ったところ、GABAニューロンは辺縁帯で2日以上にも亘って移動を続けており、またランダムウォーク様の動きをしていることが明らかとなった(Tanaka et al., 2009)。このことは各GABA

ニューロンの最終目的地は確率過程によって決まるものであり、予め決定されているものではないことを意味している。

次にこの動きが GABA ニューロンの最終位置決定に関係しているか否かを明らかにするため、まず、その分子機構の研究をおこなった。その結果、大脳新皮質の髄膜にはケモカインの一種である SDF1 が、GABA ニューロンにはその受容体である CXCR4 を発現しており、SDF1 の誘引によって GABA ニューロンが辺縁帯を移動することが明らかになった。そこで電気穿孔法を遺伝子改変マウスと組み合わせることで GABA ニューロン特異的にその受容体 CXCR4 の発現抑制を行い、GABA ニューロンのサブタイプの皮質内最終分布を調べた。その結果、GABA ニューロンのサブタイプの皮質内分布に異常が認められた。以上の結果は辺縁帯における長時間に互る接線方向への移動がその最終位置の決定に重要であることが明らかになった (Tanaka et al., 2009)。

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)

- ①Wada Y, Yamauchi K, Murakami F, Tanabe Y. : Temporally- and spatially-regulated generation of distinct descendants by sonic hedgehog-expressing progenitors in the forebrain. *Dev Neurobiol*. 2010 Dec 28. , 査読有
- ②Hatanaka 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
- ③Watanabe 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
- ④Tanaka 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
- ⑤Tamada 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

- ⑥Murakami 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
- ⑦Andrews 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
- ⑧Tashiro 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
- ⑨Zhu 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
- ⑩Kadison SR, Murakami F, Matisse 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
- ⑪Andrews 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
- ⑫Tanaka 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
- ⑬Taniguchi 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
- ⑭Kawauchi D, Taniguchi H, Watanabe H, Saito T, Murakami F. : Direct visualization of nucleogenesis 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" つくばブ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
nucleogenesis 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う神経
細胞" 世界脳週間 2007 大阪講演会.
(2007. 5. 13). 大阪

〔図書〕(計3件)

①田中大介: "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. 9 (2008)

② Fujio Murakami, Daisuke Tanaka,
Mitsutoshi Yanagida, Emi Yamazaki
(2008) Intracortical Multidirectional
Migration of Cortical Interneurons, In:
Cortical Development: Genes and Genetic
Abnormalities, Editor(s): Gregory Bock,
Jamie Goode, Wiley, Chichester, pp
116-129

③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

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)

小林 裕明 (KOBAYASHI HIROAKI)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号: 20314396

稲村 直子 (INAMURA NAOKO)
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任研
究員
研究者番号: 20397623
(H18 まで分担者として参画)

田中 大介 (TANAKA DAISUKE)
慶應義塾大学・医学系研究科・特別研究助
教
研究者番号: 90456921
(H19 から分担者として参画)