

令和元年6月14日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18332

研究課題名(和文) 交連軸索腹側伸長における脳室帯を起源とするネトリン1の機能の解明

研究課題名(英文) The role of Netrin-1 from the ventricular zone in commissural axon guidance

研究代表者

山内 健太 (Yamauchi, Kenta)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：00513079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：長年に渡り交連軸索は腹側正中線から拡散したNetrin-1タンパクの濃度勾配を検出することにより腹側正中線へと到達すると信じられてきた(化学走性説)。研究代表者は腹側正中線、脳室帯のそれぞれにおいて特異的にNetrin-1 mRNAの発現を欠損させた際の交連軸索の腹側伸長に与える影響の解析を行い、交連軸索の腹側正中線への伸長は、脳室帯由来のNetrin-1タンパクの短距離作動性の作用により制御されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学走性説に従い交連軸索が腹側正中線へと到達するというモデルはRamon y Cajalによる提唱以来、神経回路形成の基本概念となっていた。本研究の「脳室帯由来Netrin-1が短距離作動性の軸索誘導分子として機能することにより交連軸索を腹側正中線へと誘導する」という結果は神経回路形成の基本概念に再考を迫り、神経軸索再生や細胞移植といった再生医療の樹立へ向けた重要な知見となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Based on his observations of commissural axon (CA) growth towards the ventral midline (VM), Ramon y Cajal proposed the 'chemotropic theory', attraction of developing axons by a long-range diffusible cue from their targets. Netrin-1 (Ntn1) emanating from the floor plate (FP) has been assumed as the chemoattractant. However, Ntn1 is expressed in the ventricular zone (VZ), in addition to the FP, raising a possibility that Ntn1 of extra-FP origin guides CAs to the VM. In this study, we generated Ntn1 FP conditional mutant (Ntn1FP-Ko) and VZ conditional mutant mice (Ntn1VZ-Ko). If Ntn1 acts CAs as the chemoattractant, CA guidance should be disrupted in Ntn1FP-Ko mice. Contrary to this prediction, deletion of Ntn1 from the VZ highly disrupted CA guidance, whereas deletion of Ntn1 from the FP had little impact on it. Our results fail to support the chemotropic theory, rather suggest a novel mechanism that VZ-derived Ntn1 directs CAs to the VM by its local actions.

研究分野：神経解剖学

キーワード：交連軸索 ネットリン1 軸索誘導 脳室帯 腹側正中線

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

1. 研究開始当初の背景

化学走性説 (Chemotropism) は、Ramón y Cajal により提唱された神経回路形成の基本概念の一つである。化学走性説において神経軸索先端の成長円錐は標的 (あるいは中間標的) 由来の化学誘引物質の濃度勾配を検出することより標的へと到達する。分泌タンパク、Netrin-1 による交連軸索の腹側正中線への誘導は、化学走性説を支持する最も重要な実験的証拠と見なされており、神経管背側部から腹側へと伸長する交連軸索はその中間標的である腹側正中線を構成する底板細胞から分泌、拡散により形成された Netrin-1 タンパクの濃度勾配を検出することで腹側正中線へと伸長すると信じられてきた。事実、Netrin-1 mRNA は底板細胞に発現し (Serafini et al., *Cell*, 1996)、ネトリン 1 タンパクは、交連軸索の伸長経路に沿って腹側正中線を頂点とする濃度勾配を示す (Kennedy et al., *J Neurosci*, 2006)。また、底板細胞並びに Netrin-1 タンパクは、交連軸索に対して長距離作動性の誘引作用を示し (Tessier-Lavigne et al., *Nature*, 1988, Kennedy et al., *Cell*, 1994)、Netrin-1 mRNA の発現量が顕著に低下する Netrin-1 ジェントラップマウスにおいて、交連軸索は腹側正中線へ向かい伸長できない (Serafini et al., *Cell*, 1996)。

しかしながら研究代表者である山内は、以上の実験結果からネトリン 1 が化学走性説に従い交連軸索を腹側正中線へと誘導していると結論づけることはできないと考えた。なぜならば、Netrin-1 mRNA は中間標的である底板細胞に加えてより背側の脳室帯にも発現することが明らかとなっており (Serafini et al., *Cell*, 1996)、交連軸索の腹側正中線への伸長は脳室帯を起源とする Netrin-1 タンパクにより担われている可能性を否定できていなかったからである。事実、腹側正中線を構成する底板細胞が分化しない Gli2 欠損マウスにおいても交連軸索は腹側へと伸長する (Matise et al., *Development*, 1998)。更に研究代表者は申請に先立って実施した予備実験において、底板細胞を起源とする Netrin-1 タンパクは交連軸索の腹側正中線への伸長に重要な役割を果たしていないことを見出していた。以上の結果は、交連軸索腹側伸長における腹側正中線由来の拡散性分子の寄与に疑問を投げかけ、「交連軸索はその中間標的である底板細胞から分泌、拡散により形成された Netrin-1 タンパクの濃度勾配を検出することにより腹側正中線に到達する」という化学走性説とは合致しないものであった。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえて研究代表者は、「交連軸索の腹側正中線への伸長は、底板細胞に由来する Netrin-1 タンパクではなく、脳室帯を起源とする Netrin-1 タンパクこそが交連軸索の腹側正中線への伸長を制御している」との仮説を立てた。本研究では、脳室帯を起源とする Netrin-1 タンパクが、交連軸索の腹側正中線への伸長に必要であるか否かを解明することにより、当仮説の真偽の検証を行った。そして得られた実験結果を統合することにより、化学走性説に替る「真の」交連軸索誘導機構を明らかにすることを目的とした。助成期間内には、以下の 4 つの項目を明らかにすることとした。

(1) 交連軸索伸長時の脳室帯における Netrin-1 の発現分布を明らかにする。

交連軸索が腹側正中線へと伸長する時期での Netrin-1 mRNA、Netrin-1 タンパクの発現分布の解析を行った。そして Netrin-1 mRNA 並びにタンパク発現分布が、「脳室帯に起源を持つ Netrin-1 タンパクが交連軸索の腹側正中線への伸長を制御する」という研究代表者の仮説に合致するかどうかを調べた。

(2) 交連軸索の腹側伸長に脳室帯を起源とする Netrin-1 が必要かどうかを解明する。

脳室帯に起源を持つ Netrin-1 タンパクが交連軸索の腹側伸長を制御しているならば、脳室帯特異的に Netrin-1 mRNA を欠損するマウス (Netrin-1 VZ-Ko マウス) において交連軸索の伸長異常が観察され、一方、底板細胞特異的に Netrin-1 mRNA を欠損するマウス (Netrin-1 FP-Ko マウス) においては、交連軸索は腹側正中線へと正常に伸長するはずである。これらマウスを作成し、交連軸索の挙動の解析を行うことにより、研究代表者の考える仮説の真偽の検証を行った。

(3) 交連軸索の腹側正中線への伸長と底板組織の交連軸索の化学誘引活性の相関を検証する。

「交連軸索が底板細胞由来の拡散性化学誘引物質により腹側正中線へと誘導される」という化学走性説を支持する重要な証拠の一つに、培養下における底板組織の交連軸索に対する長距離作動性の誘引作用が挙げられる(Tessier-Lavigne et al., *Nature*, 1988)。交連軸索が化学走性説に従い腹側正中線へと誘導されているならば、底板細胞の交連軸索に対する長距離作動性の誘引作用と交連軸索の腹側正中線への伸長の間に正の相関が確認されるはずである。一方で交連軸索の腹側正中線への伸長と底板細胞の交連軸索に対する長距離作動性の誘引作用に正の相関が認められない場合、交連軸索は化学走性説と異なる機構により腹側正中線へと誘導されていると結論づけられる。そこで野生型マウス、全身で Netrin-1 mRNA の発現が欠損する Netrin-1 Ko マウス、Netrin-1 FP-Ko マウス、Netrin-1 VZ-Ko マウスのそれぞれに由来する底板組織の交連軸索に対する長距離作動性の誘引作用を解析した。そしてそれぞれのマウスにおける交連軸索の腹側正中線への伸長異常との関係を明らかにすることにより、交連軸索の腹側正中線への伸長と底板組織の交連軸索の化学誘引活性の相関があるかどうかを検証した。

(4) 脳室帯を起源とする Netrin-1 タンパクが交連軸索の腹側伸長を制御している機構の解明。

発生期のマウス脊髄において Netrin-1 mRNA は、脳室帯腹側 3 分の 2 の領域に連続して発現していることが報告されている(Serafini et al., *Cell*, 1996)。そこで脳室帯の一部においてのみ Netrin-1 mRNA を欠損するマウスを作成、解析することにより、連続した Netrin-1 mRNA の発現が重要であるのか？あるいは特定領域に起源を持つ Netrin-1 タンパクが交連軸索の腹側正中線への伸長に重要な役割を果たしているのか？という問いに取り組んだ。

3 . 研究の方法

本研究では、Netrin-1 コンディショナルノックアウトマウス(Netrin-1 flox マウス)と底板細胞特異的、脳室帯特異的、脳室帯の特定領域特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスとを交配することにより、底板細胞特異的、脳室帯特異的、脳室帯特定領域特異的に Netrin-1 mRNA の発現を欠損するマウスを作成した。これらマウスにおける Netrin-1 mRNA 並びにタンパクの発現分布を *in situ* hybridization 法、免疫組織化学法により明らかにし、そして交連軸索の挙動を免疫組織化学法、脂溶性蛍光色素を用いた神経軸索の順行標識により解析した。実験系は解剖学的知見が豊富にあり、機能アッセイ系も確立されていた後脳交連軸索を用いた。具体的な研究方法を以下に記した。

(1) 交連軸索伸長時における Netrin-1 mRNA、Netrin-1 タンパクの発現分布の解析。

交連軸索が腹側正中線へと伸長する発生時期の、Netrin-1 mRNA、Netrin-1 タンパクの発現分布を明らかにするため、Netrin-1 cRNA プローブを用いた *in situ* hybridization 法、抗 Netrin-1 抗体を用いた免疫組織化学法を行った。また、交連軸索の走行と Netrin-1 mRNA の発現分布の関係を解析するため、Netrin-1 の遺伝子座に LacZ が挿入されているジーントラップマウスにおいて(Serafini et al., *Cell*, 1996)、X-gal 染色と交連軸索マーカーである Robo3 に対する抗体を用いた二重染色を実施した。

(2) 底板細胞特異的、脳室帯特異的、脳室帯の特定領域特異的において Netrin-1 mRNA の発現を欠損するマウスの作成。

Netrin-1 FP-Ko マウスは、Netrin-1 flox マウスと底板細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Foxa2Cre マウス(Horn et al., *PNAS*, 2012)との交配により、Netrin-1 VZ-Ko マウスは、Netrin-1 flox マウスと底板細胞以外の脳室帯の細胞で Cre リコンビナーゼを発現する NestinCre マウス(Kramer et al., *Neuron*, 2006)との交配により、背側脳室帯特異的に Netrin-1 mRNA の発現を欠損するマウス(Netrin-1 dVZ-Ko マウス)は、Netrin-1 flox マウスと背側脳室帯特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Pax3Cre マウス(Engleka et al., *Dev Biol*, 2005)

との交配により、運動ニューロンを産生する脳室帯の細胞特異的に Netrin-1 mRNA の発現を欠損するマウス(Netrin-1 pMN-Ko マウス)は、Netrin-1 flox マウスと運動ニューロン前駆細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Olig2Cre マウス (Schuëller et al., *Cancer Cell*, 2008) との交配によりそれぞれ作成した。

(3) 底板細胞特異的、脳室帯特異的、脳室帯の特定領域特異的において Netrin-1 mRNA の発現を欠損するマウスにおける交連軸索走行の解析。

項目(2)で作成したマウスにおいて交連軸索が走行異常を来しているかどうかを、Robo3 に対する免疫染色、脂溶性蛍光色素 Dil (1,1'-Diocetadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate)を用いた交連軸索の順行性標識により解析を行った。

(4) 交連軸索の腹側正中線への伸長と底板細胞の交連軸索に対する化学誘引活性の相関解析。

交連軸索の腹側正中線への伸長と底板細胞の交連軸索に対する化学誘引活性に正の相関があるかどうかを検証するため、交連神経を含むことがわかっている野生型マウスの後脳背部部の組織片と野生型マウス、Netrin-1 Ko マウス、Netrin-1 FP Ko マウス、Netrin-1 VZ-Ko マウスに由来する底板組織とをコラーゲンゲルマトリックス中で共培養を行なった。培養終了後に組織片を抗 Robo3 抗体を用いた免疫染色を行うことにより、それぞれのマウスに由来する底板組織の交連軸索に対する化学誘引活性の解析を行なった。得られた結果を項目(3)で得たそれぞれのマウスにおける交連軸索の伸長異常とどのような関係にあるのかを解析した。

4. 研究成果

研究助成期間中により以下の項目を明らかにした。

(1) 交連軸索が腹側正中線へと伸長する時期の後脳において、Netrin-1 mRNA は腹側正中線に加えて脳室帯腹側 3 分の 2 の領域に連続して発現していることを明らかにした。

(2) Netrin-1 mRNA の背腹軸方向の発現は交連軸索の全長もしくは全長の大半に及んでおり、Netrin-1 タンパクの合成は伸長中の交連軸索の近傍でも起こっていることを示した。

(3) 底板細胞から Netrin-1 mRNA の発現を除去した Netrin-1 FP-Ko マウスでは交連軸索は正常に腹側正中線へと伸長していたのに対して、脳室帯から Netrin-1 mRNA の発現を除去した Netrin-1 VZ-Ko マウスでは顕著な交連軸索の伸長異常を明らかにした。

(4) 背側脳室帯特異的に Netrin-1 mRNA の発現を欠損する Netrin-1 dVZ-Ko マウスでは交連軸索の腹側正中線への伸長異常が観察された。一方で、運動ニューロンを産生する脳室帯の細胞特異的に Netrin-1 mRNA の発現を欠損させることにより作成した背腹軸方向に連続した Netrin-1 mRNA の発現を乱した Netrin-1 pMN-Ko マウスにおいては、交連軸索は正常に腹側正中線へと伸長していた。これらの結果から Netrin-1 は短距離拡散性の軸索誘導分子として交連軸索の腹側正中線への伸長に寄与していることが示唆された。

(5) 交連軸索の腹側正中線への伸長と底板細胞の交連軸索に対する化学誘引活性には相関は認められなかった。培養下において野生型マウス、Netrin-1 VZ-Ko マウスに由来する底板組織は交連軸索に対して化学誘引活性を示した一方で、Netrin-1 Ko マウス、Netrin-1 FP Ko マウスの底板組織は交連軸索への化学誘引活性を示さなかった。野生型マウス、Netrin-1 FP Ko マウスでは交連軸索は腹側正中線へと伸長するのに対して、Netrin-1 Ko マウス、Netrin-1 VZ-Ko マウスは顕著な交連軸索の伸長異常を示した。これらの結果は交連軸索の腹側正中線への伸長と底板細胞の交連軸索に対する化学誘引活性は無関係にあることが解明された。

以上の結果より、底板細胞ではなく脳室帯に起源を持つ Netrin-1 こそが、後脳交連軸索の腹側正中線への伸長に必要不可欠な役割を果たしていることを明らかにした。また、Netrin-1 は短距離拡散性の軸索誘導分子として交連軸索の腹側正中線への伸長に寄与していることが示唆さ

れた。これらの研究成果は、Ramón y Cajal 以来百年を超えて信じられてきた神経回路形成の基本原理である化学走性説に見直しを迫るものであり、神経発生学の分野にパラダイムシフトをもたらすものである。また本研究で得られた知見は、神経軸索再生や細胞移植といった再生医療の樹立に向けた重要な知見となることが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamauchi Kenta, Yamazaki Maya, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Lickert Heiko, Kawasaki Takahiko, Murakami Fujio, Hirata Tatsumi, Netrin-1 Derived from the Ventricular Zone, but not the Floor Plate, Directs Hindbrain Commissural Axons to the Ventral Midline, Scientific Reports, 7、2017、11992、DOI: 10.1038/s41598-017-12269-8、査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

Yamauchi Kenta, Yamazaki Maya, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Lickert Heiko, Kawasaki Takahiko, Murakami Fujio, Hirata Tatsumi, Netrin-1 Derived from the Ventricular Zone, but not the Floor Plate, Directs Hindbrain Commissural Axons to the Ventral Midline、第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018

Yamauchi Kenta, Yamazaki Maya, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Lickert Heiko, Kawasaki Takahiko, Hirata Tatsumi, The role of Netrin-1 from the ventricular zone in commissural axon guidance、第 41 回日本神経科学大会、2018

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。