

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06508

研究課題名(和文) Reelin-Dab1シグナルによる大脳新皮質Layer1維持機構の解明

研究課題名(英文) Study of neocortical layer1 maintenance mechanism through Reelin-Dab1 signaling pathway

研究代表者

本田 岳夫 (Honda, Takao)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30365225

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)：脳表から分泌されるReelinは、神経細胞内のDab1を介して神経細胞の移動を制御する。reelinやdab1欠損マウスでは、細胞の移動障害以外に辺縁帯(後のLayer1)の消失も起こるが、その原因が移動障害による二次的影響に起因する可能性が含まれていた。そこで、神経細胞移動終了後にdab1をロックアウトし、辺縁帯/Layer1消失原因が二次的であるかを明らかにする目的で研究を行った。神経細胞の移動終了後にdab1のロックアウトを行った所、Layer1の消失を観察したことから、生後では、Dab1が『Layer1の維持』に直接関与している可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳新皮質は運動や感覚の最上位中枢が存在し意思決定等が行われる重要部位です。大脳新皮質は胎生期における大規模な神経細胞移動で形成されますが、その移動過程には脳表から分泌されるReelinと神経細胞内のDab1が必須で、reelinやdab1を欠損した場合、神経細胞の移動障害以外に脳表層にあるLayer1が消失します。Reelin-Dab1シグナルが神経細胞移動を制御することから、二次的にLayer1消失が生じた可能性が残されていましたが、本研究でDab1がLayer1の維持に直接関与することを明らかにしました。Layer1は認知機構制御を行う重要部位でその維持機構の一端が明らかになりました。

研究成果の概要(英文)：Reelin is a secreted protein and regulates neuronal migration through a cytoplasmic protein Dab1. Mutation in the reelin or the dab1 gene causes a severe neuronal migration failure of excitatory neurons and lack of marginal zone (future layer 1). Although the Reelin-Dab1 signaling pathway regulates the neuronal migration, it has been unclear whether the lack of marginal zone/layer 1 is caused secondarily by the failure of neuronal migration. To examine whether the Reelin-Dab1 signaling pathway directly regulate layer 1 formation, we conditionally knocked out the dab1 gene when the excitatory neurons finished their migration. As a result, we observed a lack of layer 1, suggesting that the Dab1 signaling pathway directly regulates the maintenance of the layer 1.

研究分野：神経発生

キーワード：Reelin Dab1 reeler yotari 大脳新皮質 辺縁帯 Layer 1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳新皮質は6層構造を持ち、最表層のLayer1は神経細胞の樹状突起から形成され、同側・対側皮質、基底核、視床等からの軸索入力を受けて、情報統合を行うことで認知機能の制御を行っている機能的な重要部位である (Solaris and Stoner, *Front. Neur. Anat.*, 2011)。Layer1は発生期には辺縁帯と呼ばれ、脳最表層のCajal-Retzius細胞直下に神経細胞が移動し、樹状突起を発達させて細胞体が侵入出来ない領域“辺縁帯”を作る所から形成が開始される。後から誕生した神経細胞は先に誕生した細胞を追い越して脳表側に移動し、辺縁帯直下で移動を停止して樹状突起を辺縁帯中で発達させる。これまでの研究により、辺縁帯にあるCajal-Retzius細胞から分泌されるReelinと、神経細胞内のDab1のリン酸化が神経細胞移動及び、辺縁帯形成に關与していることが、変異マウス(それぞれ *reeler* と *yotari*) の解析等から示唆されてきた。

2. 研究の目的

しかしながら、Reelin-Dab1シグナルが神経細胞移動に關与することから、辺縁帯/Layer1が形成されない原因が、神経細胞の移動障害による二次的結果なのか、Reelin-Dab1シグナルそのものの異常であるかは不明であった。

そこで本研究ではこれら2つの可能性を区別する為に、興奮性神経細胞の移動がほぼ終了した時期に *dab1* のノックアウトを行い、上記2つの可能性を区別することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞移動終了後の *dab1* ノックアウト

神経細胞の移動終了後に *dab1* のノックアウトを行うため、EGFPとCreを共発現可能なEGFP-P2A-Creをコードするプラスミドを用いて、アデノ随伴ウイルス(AAV)の作成を行った。このAAVを生後2日目の *dab1* flox マウスの両側脳室に注入し、生後14日目に観察した。

(2) Layer1維持におけるDab1のチロシンリン酸化の必要性検討

神経細胞の移動終了後に、上記EGFP-P2A-Creにより *dab1* のノックアウトを行うと同時に、野生型、あるいはチロシンリン酸化部位に変異を導入したDab1を発現するAAVを生後2日目の *dab1* flox マウスの両側脳室に注入し、生後14日目に観察した。

(3) 生後での深層神経細胞特異的な *dab1* ノックアウト

深層神経細胞の誕生時期である胎生12日目に、C末端側のCreを発現するAAVを *dab1* flox マウスの側脳室に導入し、生後2日目にN末端側のCreを発現するAAV及び、Cre依存的にEGFPを発現するAAVを側脳室に注入した。Creの発現が深層の神経細胞にのみ限局して生じていることをEGFPの発現で確認し、大脳新皮質の形態観察を行った。

4. 研究成果

(1) 神経細胞移動終了後の *dab1* ノックアウト

神経細胞移動への影響を避ける為、興奮性神経細胞の移動が終了した生後2日目の *dab1* flox マウスの両側脳室に、Cre発現AAVを注入し、生後14日目に観察した。Creと同時発現するGFPの蛍光観察により、大脳新皮質全体で *dab1* がノックアウトされていると推定された。AAV感染を受けた野生型マウスではLayer1が維持されていたが、*dab1* flox マウスのヘテロマウスではLayer1が約半分の厚さに、ホモマウスでは完全に消失していた。Layer1を欠いた脳では、Layer2の神経細胞が本来のLayer1の位置まで侵入していた以外は層構造が維持されていた。これらの観察結果より、神経細胞移動の終了直後に起こる『辺縁帯形成』については、移動障害による二次的影響を否定出来ないが、少なくとも生後では、Dab1が『神経細胞の移動』とは別に『Layer1の維持』に直接關与している可能性が強く示唆された。

(2) Layer1維持におけるDab1のチロシンリン酸化の必要性検討

ReelinはそのレセプターであるApoER2、及び、VLDLRを通じて細胞内のDab1のチロシンリン酸化を行うことで、細胞内へとシグナルを伝達することが知られている。Reelinのシグナル伝達に必須のDab1のチロシンを全てフェニルアラニンに置換したマウスでは神経細胞移動の障害と辺縁帯/Layer1の消失が生じ、*reeler* や *yotari* マウスと同様の異常が生じることが知られている。そこで、Dab1のチロシンリン酸化がLayer1の維持にも必須であるかを調べる為、レスキュー実験を行った。*dab1* flox マウスに、Cre発現AAVと野生型のDab1、あるいはチロシンリン酸化部位に変異を持つDab1を発現するAAVを同時に感染させ、P14で観察した。その結果、野生型Dab1の発現ではLayer1が維持されていたが、チロシンリン酸化部位に変異を持つDab1の発現ではLayer1が消失したままであった。この結果より、Dab1のチロシンリン酸化を介するシグナルがLayer1の維持に必須であることを明らかにした。

(3) 生後での深層神経細胞特異的な *dab1* ノックアウト

神経細胞移動終了後の *dab1* ノックアウト実験において、AAV の感染が主に深層の神経細胞のみ起こっているのにも関わらず、Layer1 厚の減少を観察する場合があった。この観察結果をより詳細に検討するため、生後に深層神経細胞でのみ *dab1* のノックアウトを行う実験系を構築し検証を行った。深層の神経細胞が誕生する胎生 12 日目に Cre の C 末端を、生後 2 日目に Cre の N 末端を AAV により導入し、生後での深層神経細胞特異的な *dab1* ノックアウトを行った。その結果、Layer1 厚が約半分になることを見出し、深層の神経細胞が Layer1 の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takao Kohno, Keisuke Ishii, Yuki Hirota, Takao Honda, Makoto Makino, Takahiko Kawasaki, Kazunori Nakajima and Mitsuharu Hattori	4. 巻 40
2. 論文標題 Reelin-Nrp1 Interaction Regulates Neocortical Dendrite Development in a Context-Specific Manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8248-8261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/jneurosci.1907-20.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keisuke Okabe, Hugh FukadaIkue, Tai-Nagara, Tomofumi Ando, Takao Honda, Kazunori Nakajima, Norihiko Takeda, Guo-Hua Fong, Masatsugu Ema, Yoshiaki Kubota	4. 巻 459
2. 論文標題 Neuron-derived VEGF contributes to cortical and hippocampal development independently of VEGFR1/2-mediated neurotrophism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 65-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2019.11.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本田岳夫、宮川拓、仲嶋一範
2. 発表標題 CRISPR/Cas9によるゲノム編集によりHAタグラベルしたDab1 発現マウスの解析
3. 学会等名 第 43 回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉永怜史、本田岳夫、根本愛子、長谷川紘之、大石康二、久保健一郎、仲嶋一範
2. 発表標題 i-Gonad法を用いて、発生期大脳皮質の細胞外環境が細胞に与える影響を効率的に解析する
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田岳夫、仲嶋一範
2. 発表標題 CRISPR/Cas9によるゲノム編集によりHAタグラベルしたDab1発現マウスの解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田岳夫、仲嶋一範
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集によりHAタグラベルしたDab1発現マウスの開発
3. 学会等名 第54回TOKYOニューロサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田岳夫、仲嶋一範
2. 発表標題 CRISPR/Cas9によるゲノム編集によりHAタグラベルしたDab1発現マウスの開発
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Honda and Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Haploinsufficiency of dab1 causes upward shift and invasion of superficial-layer neurons into the cortical layer I and splitting of the CA1 pyramidal cell layer
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田岳夫、仲嶋一範
2. 発表標題 CRISPR/Cas9により高感度タグラベルしたDab1の脳新皮質神経細胞における細胞内分布の解析
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takao Honda and Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Analysis of subcellular distribution of Dab1 in cerebral neocortical excitatory neurons using highly sensitive tagging by genome editing
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田岳夫、仲嶋一範
2. 発表標題 Reelin-Dab1シグナルによる脳新皮質Layer1形成の制御機構
3. 学会等名 第53回TOKYOニューロサイエンス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田岳夫、仲嶋一範
2. 発表標題 Cas9を用いたゲノム編集技術によって高感度タグラベルされたDab1の脳新皮質神経細胞における細胞内局在の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------