

平成 23 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612
 研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19200031
 研究課題名（和文）
 中枢神経系における神経細胞社会の構築機構
 研究課題名（英文）
 Mechanisms of the development of neuronal cell community in the central nervous system
 研究代表者
 仲嶋 一範（NAKAJIMA KAZUNORI）
 慶應義塾大学・医学部・教授
 研究者番号：90280734

研究成果の概要（和文）：

大脳皮質神経細胞の移動過程に注目し、まずは辺縁帯直下で移動終了過程にある細胞に強く発現する遺伝子を多数同定した。また、いくつかの分子について層形成や細胞動態における機能を見いだした。さらに、脳室帯で誕生した神経細胞と脳室下帯/中間帯で誕生した神経細胞とでは移動プロファイルが全く異なることを見いだした。前者は、脳室下帯とオーバーラップする部位で一時的に長時間滞留することを発見し、多極性細胞蓄積帯と命名した。

研究成果の概要（英文）：

We have focused on the migration process of neocortical neurons and identified many genes that are preferentially expressed in cells just beneath the marginal zone. In addition, we have identified functions of several genes in layer formation and migrating cell dynamics. We have also found the differences of migratory behavior between direct progeny of apical progenitors and basal progenitors in the developing neocortex. The former stay above the ventricular zone for almost 1 day, where we named the multipolar cell accumulation zone (MAZ).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2008 年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2009 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
総計	28,500,000	8,550,000	37,050,000

研究分野：発生神経生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：大脳皮質、発生・分化、神経科学、脳・神経、細胞移動

1. 研究開始当初の背景

(1) 大脳皮質の神経細胞は、多くが脳室面近くで誕生し、辺縁帯直下へと移動した後、誕生時期をほぼ共通にする細胞同士が集合して、脳表面に平行な 6 層からなる多層構造

(皮質板)を形成する。我々は、従来の研究で独自開発した移動神経細胞の可視化法（特許第 4536233 号）によって、脳室面近くで誕生した神経細胞がその後どのような挙動をとるかを観察した。その結果、多極性移動と

命名した新たな細胞移動様式を見いだした。すなわち、脳室面で誕生した神経細胞の多くが、実は移動開始後に多極性に形態変化し、「脳室下帯」と呼ばれる脳室帯直上の部位に長時間留まって多くの細い突起をさかんに出し入れする特徴的な運動をすることがわかった。それらはその後、中間帯で再度双極性に形態変化し、放射状線維に沿って脳表面近くの辺縁帯直下へと向かう（ロコモーション）。一方、「脳室下帯」は、本来 basal progenitors と呼ばれる分裂能を持った神経前駆細胞を多く含む部位として定義されており、上記の最終分裂を終えて同部位に蓄積する多極性移動細胞とどのような関係にあるのか、全く不明であった。

(2) 発生期大脳皮質の興奮性神経細胞の移動終了部位である辺縁帯直下では、移動停止の他、樹状突起形成、細胞凝集による層構造形成等の様々な重要なイベントが起こるが、その分子的制御機構については知見が乏しく、機能する分子についても報告されているものは少数しかなかった。

2. 研究の目的

大脳皮質神経細胞の移動過程のうち「脳室下帯」と辺縁帯直下の二カ所に特に注目し、移動神経細胞の動態制御を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) マウス胎生 16.5 日目と 18.5 日目の大脳皮質の皮質板を実体顕微鏡下で切り出し、さらに浅層と深層とに二分した。それらから mRNA を抽出し、Microarray で両者のトランスクリプトームを明らかにした。これらを用いて、辺縁帯直下で強く発現する分子を検索するとともに、IPA (Ingenuity Pathways Analysis) を用いたパスウェイ解析を行った。

(2) 上記で同定した分子の一部を含め、「脳室下帯」や辺縁帯直下で移動中の神経細胞で発現する分子について、子宮内胎児脳電気穿孔法による遺伝子導入によって、*in vivo*での機能解析を行った。

(3) 子宮内胎児脳電気穿孔法によって脳室面に接触する細胞を GFP 等でラベルし、同部位における神経細胞の誕生及びその後の動態を可視化して観察した。

4. 研究成果

(1) 我々は、辺縁帯直下で移動を終えつつある細胞は、核形態がヘテロクロマチン様からユークロマチン様に変化するとともに、同じ時期に誕生し個別に移動してきた細胞同士が再び凝集して新たな細胞間の関係を構築していくこと、それまで移動に使っていた先

導突起を変化させて著明な樹状突起を分化成熟させること等、様々な現象を一斉に示すことを見いだした。これらの事実は、辺縁帯直下で何らかのシグナルにより活発な転写が開始され、皮質形成において重要な一連の現象が開始される可能性を強く示唆する。そこで、まずはマウス胎生 16.5 日目と 18.5 日目の両方の時期で共通して辺縁帯直下に強く発現する遺伝子群を多数同定した。*In situ* hybridization によってそれらの発現を調べ、発現様式の違いによって分類した。次に、細胞移動終了のイベントが辺縁帯直下に限らず様々な皮質板部位で起こることが知られている複数の突然変異マウスで発現様式を検討した。その結果、同定した分子群は確かに細胞移動終了に関連したイベントに関わっていることが示唆された。さらに、上記のうち移動細胞側での発現が明瞭な 28 個の遺伝子について IPA (Ingenuity Pathways Analysis) を用いた解析を行なった結果、これらはカルシウムを中心としたネットワークで有意に強く関連づけられることがわかった。また、予想通り樹状突起の形成を制御する分子も多数検出され、その一部はカルシウムによる制御が知られているものであった。また、辺縁帯から分泌され層形成を制御することが知られているリーリン分子によってカルシウムシグナルが増強される分子も同定された。以上の結果から、辺縁帯直下の神経細胞では、これらのシグナル経路が顕著に動いていることが示唆された。

(2) 新たに辺縁帯直下で発現することを見いだしたカドヘリンファミリーの分子について、RNAi による阻害実験を子宮内胎児脳電気穿孔法により行った結果、層形成過程が乱れることを見いだした。

(3) マウス発生期大脳皮質の神経細胞の誕生及びその後の動態を可視化して観察することにより、脳室帯で誕生した細胞と脳室下帯/中間帯で誕生した細胞とでは移動プロファイルが全く異なることを見いだした。

まず前者は、脳室帯で最終分裂を終えて神経細胞として誕生した後、脳室帯内で 10 時間以上にわたって留まり、その後に脳室帯直上に多極性細胞として局在して、「多極性移動」と命名した特徴的な運動をしながら約一日間滞留することを、*in vivo*における定量的解析で証明した (slowly exiting population, SEP と命名)。脳室帯直上の部位は、従来分裂細胞 (神経前駆細胞) が高密度に局在する部位として認識され、またその意味で定義付けされた「脳室下帯」という名称で呼ばれてきたが、本研究により、その部位の多くの細胞は、実は分裂を終えて長時間滞留中の多極性移動神経細胞であることがわかった。そこで、その脳室帯直上の部位を多極性細胞蓄積帯

(multipolar cell accumulation zone; MAZ) と命名して報告した。また、それらが将来大脳皮質浅層の錐体神経細胞に分化することも示した。

一方後者は、脳室帯から細胞体トランスロケーションと呼ばれる様式で素早く脳室下帯または中間帯深部に移動し、その後さらに分裂を行った (rapidly exiting population, REPと命名)。すなわち、REPはbasal progenitorsと呼ばれる神経前駆細胞を含み神経細胞を産生するが、一部にグリア前駆細胞も含むと考えられた。

GFP発現ベクター等の脳室面への遺伝子導入によって脳室面の細胞をラベルしたところ、同時にラベルされたREPはSEPよりも早く脳室下帯/中間帯に移動したが、それらはその後その部位に留まった。一方SEPは、MAZを脱出後、脳室下帯/中間帯に停留中のREPを追い越して先に皮質板に進入し、辺縁帯直下に到達した。それにより、神経細胞としての誕生時期に依存した“インサイド-アウト”様式の各皮質層への細胞配置が保証されることがわかった。

(4) 滑脳症を含む重篤な脳奇形と関連することで注目されている Arx の大脳皮質発生における機能を解析した。その結果、脳室帯における神経前駆細胞の分裂からの離脱と、皮質板への放射状細胞移動の双方を制御していることが示唆された。また、多極性細胞蓄積帯における移動細胞の形態にも影響し、その結果として細胞移動の速度の制御にも関わっていることが見いだされた。さらに、大脳基底核原基に由来する抑制性神経細胞の脳表面に平行な向きの移動も制御していることを示唆する結果を得た。ただし、抑制性神経細胞の運命決定には関わっていない可能性が高いと考えられた。

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31件)

M Takemoto, Y Hattori, (他6名。Nakajima 7 番目), Laminar and areal expression of *Unc5d* and its role in cortical cell survival.

Cereb. Cortex, in press (2011) 査読有

K Sawamoto, Y Hirota, (他14名。Tabata 9 番目, Nakajima 11 番目) Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain.

J. Comp. Neurol., 519 (4), 690-713 (2011),

査読有

D H. Tanaka, S Mikami, (他4名。Nakajima 5 番目), CXCR4 is required for proper regional and laminar distribution of cortical somatostatin-, calretinin- and neuropeptide Y-expressing GABAergic interneurons.

Cereb. Cortex, 20 (12), 2810-2817 (2010), 査読有

K Kubo, K Tomita, (他7名。Nakajima 9 番目), Migration defects by DISC1 knockdown in C57BL/6, 129X1/SvJ, and ICR strains via *in utero* gene transfer and virus-mediated RNAi.

Biochem. Biophys. Res. Commun, 400 (4), 631-637 (2010), 査読有

S Uchino, T Hirasawa, (他6名。Nakajima 7 番目), Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor activity resulted in aberrant neuronal migration caused by delayed morphological development in the mouse neocortex

Neuroscience, 169 (2), 609-618 (2010), 査読有

T Kawauchi, K Sekine, (他7名。Nakajima 7 番目), Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-Cadherin trafficking.

Neuron, 67 (4), 588-602 (2010), 査読有

K Kubo, T Honda, (他7名。Tabata 8 番目, Nakajima 9 番目), Ectopic Reelin induces neuronal aggregation with a normal birthdate-dependent "inside-out" alignment in the developing neocortex.

J. Neurosci., 30 (33), 10953-10966 (2010). (cover illustration) ("This Week in The Journal" で紹介), 査読有

M Niwa, A Kamiya, (他16名。Nakajima 16 番目), Knockdown of DISC1 by *in utero* gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits.

Neuron, 65 (4), 480-489 (2010), 査読有

Y V. Nishimura, K Sekine, (他5名。Nakajima 4 番目), Dissecting the factors involved in the locomotion mode of neuronal migration in the developing cerebral cortex.

J. Biol. Chem., 285 (8), 5878-5887 (2010), 査読有

K Eto, T Kawauchi, (他3名。Tabata, Nakajima) Role of dual leucine zipper-bearing kinase (DLK/MUK/ZPK) in axonal growth.

Neurosci. Res., 66 (1), 37-45 (2010), 査読有

H Tabata, S Kanatani, K Nakajima, Differences of migratory behavior between direct progeny of apical progenitors and basal progenitors in the developing cerebral cortex.

Cereb. Cortex, 19 (9), 2092-2105 (2009), 査読有

K Oishi, K Watatani, (他5名, Nakajima 6番目), Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 106 (31), 13064-13069 (2009), 査読有

T Uchida, A Baba, (他6名, Nakajima 7番), Downregulation of functional Reelin receptors in projection neurons implies that primary Reelin action occurs at early/pre-migratory stages.

J. Neurosci, 29 (34), 10653-10662 (2009), 査読有

H Okado, C Ohtaka-Maruyama, (他16名, Nakajima 13番目), The transcriptional repressor RP58 is crucial for proper cell-division patterning and neuronal survival in the developing cortex.

Dev. Biol., 331 (2), 140-151 (2009), 査読有

S Kanatani, M Yozu, (他2名, Tabata 3番目, Nakajima 4番目), COUP-TFII is preferentially expressed in the caudal ganglionic eminence and is involved in the caudal migratory stream

J. Neurosci, 28 (50), 13582-13591 (2008), 査読有

A Kamiya, P L. Tan, (他10名, Nakajima 9番目), Recruitment of PCM1 to the centrosome by the cooperative action of DISC1 and BBS4: a candidate for psychiatric illnesses.

Arch. Gen. Psychiatry, 65 (9), 996-1006 (2008), 査読有

S Sasaki, H Tabata, K Tachikawa, K Nakajima, The cortical subventricular zone-specific molecule *Svet1* is part of the nuclear RNA coded by the putative Netrin receptor gene *Unc5d* and is expressed in multipolar migrating cells.

Mol. Cell. Neurosci, 38 (4), 474-483 (2008), 査読有

H Tabata, K Nakajima, Labeling embryonic mouse central nervous system cells by in utero electroporation

Develop. Growth Differ., 50 (6), 507-511 (2008), 査読有

G Friocourt, S Kanatani, (他9名, Tabata 3番目, Nakajima 10番目), Cell-autonomous roles of ARX in cell proliferation and

neuronal migration during corticogenesis. *J. Neurosci*, 28 (22), 5794-5805 (2008), 査読有

B Carletti, I M Williams, (他4名, Nakajima 4番目), Time constraints and positional cues in the developing cerebellum regulate Purkinje cell placement in the cortical architecture.

Dev. Biol., 317 (1), 147-160 (2008), 査読有

K Tachikawa, S Sasaki, T Maeda, Nakajima, Identification of molecules preferentially expressed beneath the marginal zone in the developing cerebral cortex.

Neurosci. Res., 60 (2), 135-146 (2008), 査読有

M Yozu, H Tabata, N Koenig, K Nakajima, Migratory behavior of presumptive interneurons is affected by AMPA receptor activation in slice cultures of embryonic mouse neocortex.

Dev. Neurosci., 30 (1-3), 105-116 (2008), 査読有

T T Maeda, I Ajioka, K Nakajima, Computational cell model based on autonomous cell movement regulated by cell-cell signalling successfully recapitulates the "inside and outside" pattern of cell sorting.

BMC Syst. Biol., 1, 43 (16 pages) (2007), 査読有

K Nakajima, Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex.

Neurochem. Int., 51 (2-4), 121-131 (2007), 査読有

Y Sato, M Taoka, (他8名, Nakajima 8番目), Regulation of the interaction of Disabled-1 with CIN85 by phosphorylation with Cyclin-dependent kinase 5.

Genes to Cells, 12 (12), 1315-1327 (2007), 査読有

Y Nakano, T Kohno, (他6名, Nakajima 7番目), The extremely conserved C-terminal region of Reelin is not necessary for secretion but is required for efficient activation of downstream signaling.

J. Biol. Chem., 282 (28), 20544-20552 (2007), 査読有

T Ohshima, M Hirasawa, (他12名, Nakajima 11番目), Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex.

Development, 134 (12), 2273-2282 (2007), 査読有

〔学会発表〕(計 101 件)

仲嶋一範、大脳皮質の形づくりのしくみ、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科セミナー、2009年12月15日、東京

仲嶋一範、大脳皮質の移動神経細胞のダイナミクス、頭部形成研究会、2009年11月16-18日、修善寺

仲嶋一範、子宮内胎児脳電気穿孔法の確立とそれを用いた神経細胞移動の解析”、シンポジウム：“遺伝子抑制と遺伝子導入法の展開から見えるもの～新技術から医薬応用に向けての新しい研究展開～第82回日本生化学会大会、2009年10月21-24日、神戸

K Nakajima、Migratory behavior of progenies of apical progenitors and basal progenitors in the developing cerebral cortex、International Symposium “Construction and Reconstruction of the Brain”、2009年10月8-10日、Awaji

仲嶋一範、The analysis of the role of DISC1 in the cortical neuronal migration、第38回慶應ニューロサイエンス研究会、2009年3月14日、東京

仲嶋一範、神経細胞移動・リーリンと脳形成、名古屋大学大学院医学系研究科グローバルCOEプログラム「ニューロサイエンスコース」、2008年11月7日、名古屋

K Nakajima、Screening of the molecules that regulate the migratory stream from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse telencephalon.、シンポジウム：“神経ネットワーク構築における細胞移動のダイナミクス (Dynamics of cell migration in neuronal network formation)”第31回日本神経科学大会、2008年7月9日-11日、東京

K Nakajima、Mechanisms of layer formation in the developing cerebral cortex、Global COE Program International Symposium “Mechanisms of Cerebral Cortical Development”、2008年7月8日、Tokyo

K Nakajima、Neuronal migration and layer formation in the developing cerebral cortex、Symposium：“Cell Behavior in 3D” American Association of Anatomists (AAA) Annual Meeting / Experimental Biology 2008 (E San Diego B 2008) Meeting、2008年4月5日-9日、San Diego

K Nakajima、Identification of molecules preferentially expressed in restricted regions in the developing telencephalon.、自然科学研究機構基礎生物学研究研究会：“大脳皮質の発生と可塑性 II”、2008年3月7日-8日、岡崎

K Nakajima、Dynamics of cerebral

cortical development、熊本大学発生医学研究センターグローバルCOEリエゾンラボ研究会、2008年1月30日、熊本

仲嶋一範、大脳皮質発生における神経細胞移動と層形成の制御機構、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(BMB2007)、2007年12月11-15日、横浜

K Nakajima、Dynamics of neuronal migration and layer formation in the developing cerebral cortex、Developmental Biology Special Seminar, The Children's Hospital of Philadelphia、2007年11月1日、Philadelphia

仲嶋一範、脳の発生過程における神経細胞のダイナミクス、生命科学イメージングシンポジウム～分子動態から発生・疾患の解明へ～、2007年10月16日、東京

仲嶋一範、発生期大脳皮質における神経細胞移動と層形成の制御、第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会

(Neuro2007)、2007年9月10-12日、横浜

仲嶋一範、大脳皮質構造の発生分化機構、聖マリアンナ医科大学フロンティア医科学大学院セミナー、2007年7月11日、川崎

仲嶋一範、大脳皮質神経細胞構築のダイナミクス、国立精神神経センター神経研究所セミナー、2007年7月3日、小平

K Nakajima、Neuronal migration and layer formation in the developing cerebral cortex.、International Meeting

“Neurogenesis 2007”、2007年5月15-16日、Tokyo

〔図書〕(計 4 件)

K Oishi, K Nakajima、Neurogenesis. Encyclopedia of Neuroscience、Springer、2673-2676(2009)

H Tabata, K Nakajima、*In utero* electroporation; assay system for migration of cerebral cortical neurons. Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology、Springer、143-152 (2009)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

仲嶋 一範 (NAKAJIMA KAZUNORI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：90280734

(2)研究分担者

榊原 康文 (SAKAKIBARA YASUBUMI)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：10287427
(H20 H21：連携研究者)

田畑 秀典 (TABATA HIDENORI)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：80301761
(H20 H21：連携研究者)

大石 康二 (OISHI KOJI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80420818
(H20 H21：連携研究者)