

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500298

研究課題名（和文） 発生期大脳皮質神経細胞の多段階的移動を制御する分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms for stepwise migratory processes during the cortical plate development.

研究代表者

田畑 秀典（TABATA HIDENORI）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80301761

研究成果の概要：

本研究課題では、マウス大脳皮質発生過程において、側脳室に面する脳室帯(VZ)から移動を開始する2つの集団に関して移動様式を検討した。一方はVZ内で最終分裂を終了するもので、約10時間VZ内に留まったのち、分裂を伴わずに多極性細胞へと形態変化し、VZのすぐ表層側に集積する。一方、VZを出発してもまだ分裂能を持つ細胞集団は脳表面側へと伸びる長い突起を有し、前者よりもより表層側へ早く移動し分裂する。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経科学、脳・神経、発生・分化、解剖学、神経回路

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、脳室帯で誕生した皮質神経細胞は脳表面側の辺縁帯に移動する過程で、その大部分が脳室下帯（SVZ）に一過性に留まり多極性細胞の形態をとること、多極性細胞はさらに皮質板（CP）に入る前に放射状線維を足場として移動するロコモーション細胞へと形態変化することを観察してきた。しかし、多極性細胞を経ることの意義は明らかではなかった。多極性細胞の時期には、移動方向と直行する接線方向に軸索を伸ばし始めることが観察されるので、多極性細胞は、周囲の微小環境を読み取り、軸索を正しい方

向に伸ばすために必要な時期であると推測された。

2. 研究の目的

（1）本研究課題では、多極性細胞における移動制御、及び軸索伸展の分子機構を解明することを目的とした。スクリーニングにより多極性細胞の存在するSVZに発現する膜タンパク質を幾つか同定し、その内、特に軸索ガイダンスに関わる受容体であるRobo2に関して、多極性細胞での機能を詳細に検討した。

（2）研究期間中の国内外の研究情勢から、SVZが第二の神経細胞産生場として注目され始めた。しかし我々の観察では、SVZに留

まる多極性細胞は分化過程の神経細胞であり、分裂能があるとの認識からは隔たりがあった。そこで、SVZ に存在する多極性細胞と、SVZ で分裂する非脳室面分裂細胞との関連を明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 多極性細胞における Robo2 の役割:

Robo2 の多極性細胞での発現を *in situ* hybridization により検討した。

Robo2 のノックダウンベクターや強制発現ベクターを子宮内電気穿孔法にて導入し、その効果を検討した。

(2) 非脳室面分裂細胞と、VZ 内で分裂を終了する細胞の移動様式の観察:

子宮内電気穿孔法と BrdU の投与を組み合わせた集団解析を行った。

4. 研究成果

(1) 多極性細胞における Robo2 の役割

GFP ベクターを子宮内電気穿孔法により導入し、多極性細胞が GFP により可視化された切片に対して、蛍光を用いた分解能の高い *in situ* hybridization を行った。その結果、実際に多極性細胞に Robo2 が発現していることが確認された。

Robo2 は SVZ に留まる多極性細胞に発現し、そのリガンドである Slit1 は皮質板 (CP) の深層に発現する。Slit1 は Robo2 に結合し、反発性のシグナルを伝える。このような知見から Robo2 の多極性細胞における役割として、CP への侵入の阻止が考えられた。この仮説が正しければ、Robo2 を強制発現させた場合には CP への侵入が遅れ、阻害した場合には早まることが期待された。子宮内電気穿孔法による Robo2 の強制発現では、CP への進入が遅れることはすでに本研究実施前に確かめていた。本研究課題では、Robo2 を阻害した場合の効果を検討した。方法としては、RNA interference の原理による Robo2 のノックダウンを試みた。Robo2 に対する short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターを作成し、ノックダウン効率を *in vitro* の実験系において、確かめた後、子宮内電気穿孔法により胎仔脳へ導入した。しかし結果としては、移動が早まることは観察されず、むしろ若干の遅れが確認され、また、これらの神経細胞は中間帯において異常な凝集を示していた。この結果は、Robo2 が単純に CP 侵入の阻止に働いているのではなく、中間帯内での組織化にも寄与している可能性を示唆する。

(2) 非脳室面分裂細胞と、VZ 内で分裂を終了する細胞の移動様式の観察

子宮内電気穿孔法と BrdU 投与実験を組み合わせ、VZ で特定の期間に最終分裂を終えた集団を追跡した。その結果、VZ で最終分裂を終了する集団は、VZ 内に約 10 時間留まったのち、“組織学的”な定義に基づく SVZ に典型的な多極性細胞としてさらに停留し、やがて放射方向への

極性を獲得して速い移動様式であるロコモーションへと変化して CP に侵入すること。また、VZ から移動開始後にさらに分裂する集団に関しては、細胞体トランスポケーションの形態を取りながら、前者よりも早期に中間帯へ侵入し、その上行性突起を短縮させて分裂することを観察した。SVZ の定義は、Boulder committee により定められており、VZ より脳表層側に位置して、分裂細胞を含む領域とされている。今回我々は、“組織学的”定義に基づく SVZ には最終分裂を終了した神経細胞が高密度に密集していることを観察した。つまり、この機能的定義による SVZ と、多極性細胞が集積する組織学的 SVZ は異なる領域を指していると言える。このような SVZ の定義の違いによる誤解を避けるため、組織学的 SVZ に対して、多極性細胞蓄積帯 (multipolar cell accumulation zone: MAZ) という呼称を提唱する。(Cerebral Cortex, '09)。

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7件)

Differences of migratory behavior between direct progeny of apical progenitors and basal progenitors in the developing cerebral cortex. Hidenori Tabata, Shigeaki Kanatani, and Kazunori Nakajima. *Cereb. Cortex*, 19 (9), 2092-2105 (2009) 査読有り

COUP-TFII is preferentially expressed in the caudal ganglionic eminence and is involved in the caudal migratory stream. Shigeaki Kanatani, Masato Yozu, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima, *J. Neurosci.*, 28 (50), 13582-13591 (2008). 査読有り

Cell-autonomous roles of ARX in cell proliferation and neuronal migration during corticogenesis. Gaëlle Friocourt, Shigeaki Kanatani, Hidenori Tabata, Masato Yozu, Takao Takahashi, Mary Antypa, Odile Raguènes, Jamel Chelly, Claude Ferec, Kazunori Nakajima, and John G. Parnavelas. *J. Neurosci.*, 28 (22), 5794-5805 (2008). 査読有り

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. Shinji Sasaki, Hidenori Tabata, Kashiko Tachikawa and Kazunori

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

Migratory behavior of presumptive interneurons is affected by AMPA receptor activation in slice cultures of embryonic mouse neocortex. Masato Yozu, Hidenori Tabata, Norbert Koenig, and Kazunori Nakajima. Dev. Neurosci., 30 (1-3), 105-116 (2008). 査読有り

Labeling embryonic mouse CNS cells by *in utero* electroporation. Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima. Develop. Growth Differ., 50 (6), 507-511 (2008) 査読有り

Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex. Toshio Ohshima, Motoyuki Hirasawa, Hidenori Tabata, Tetsuji Mutoh, Tomoko Adachi, Hiromi Suzuki, Keiko Saruta, Takuji Iwasato, Shigeyoshi Itoharu, Mitsuhiro Hashimoto, Kazunori Nakajima, Masaharu Ogawa, Ashok B. Kulkarni and Katsuhiko Mikoshiba. Development, 134 (12), 2273-2282 (2007). 査読有り

[学会発表](計 16 件)

Yuko Gonda, Hidenori Tabata, Kazunori Nakajima, Shigeo Uchino, Shinichi Kohsaka (権田裕子、田畑秀典、仲嶋一範、内野茂夫、高坂新一) “ Expression pattern of Roundabout1 (Robo1) in the developing mouse forebrain(発達期のマウス前脳における Roundabout1(Robo1)の発現分布様式)” 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会(BMB2008)、神戸、2008 年 12 月 9 -12 日

佐々木恵、田畑秀典、仲嶋一範 “マウス胎生後期大脳皮質の中間帯で見られる新たな細胞移動様式” 日本解剖学会関東支部第 96 回学術集会、つくば、2008 年 11 月 22 日

権田裕子、田畑秀典、仲嶋一範、内野茂夫、高坂新一、マウス前脳における Robo1 の発現様式、第 50 回日本神経化学会大会、2008.9.11 -13、富山

久保健一郎、本田岳夫、富田憲司、田畑秀典、仲嶋一範、発生中大脳皮質におけるリーリングナルの役割の解析、第 50 回日本神

経化学会大会、2008.9.11 -13、富山

Shigeaki Kanatani, Masato Yozu, Hidenori Tabata, Kazunori Nakajima “ Screening of the molecules that regulate the migratory stream from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse telencephalon.” 第 31 回日本神経科学大会、東京、2008 年 7 月 9 -11 日

Shinji Sasaki, Hidenori Tabata, Kashiko Tachikawa, and Kazunori Nakajima “ Molecular mechanisms that regulate the behavior of multipolar migration neurons in the developing cerebral neocortex ” 第 31 回日本神経科学大会、東京、2008 年 7 月 9 -11 日

Ken-ichiro Kubo, Kenji Tomita, Kazuma Kobayashi, Asuka Uto, Takao Honda, Hidenori Tabata, Kazunori Nakajima “ The application of the in utero gene transfer system to investigate the role of Reelin in the developing neocortex ” 第 31 回日本神経科学大会、東京、2008 年 7 月 9 -11 日

Hidenori Tabata, Megumi Sasaki, and Kazunori Nakajima “ A novel migration mode observed in the intermediate zone during the late cortical development ” 第 31 回日本神経科学大会、東京、2008 年 7 月 9 -11 日

Ken-ichiro Kubo, Takao Honda, Kenji Tomita, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima “ Investigation of the roles of Reelin on the cortical layer development ” Cortical Development Meeting 2008, Crete, Greece, 2008 年 5 月 22 -25 日

田畑秀典、佐々木恵、仲嶋一範 “大脳後期発生過程に見られる新規移動様式、不軌道性移動の解析” 第 113 回日本解剖学会全国学術集会、大分、2008 年 3 月 27 -29 日

森本桂子、滝上紘之、前田卓哉、味岡逸樹、刀川夏詩子、佐々木慎二、本田岳夫、田畑秀典、仲嶋一範 “大脳皮質興奮性ニューロンの移動における髄膜の役割” 第 113 回日本解剖学会全国学術集会、大分、2008 年 3 月 27 -29 日

Shigeaki Kanatani, Masato Yozu, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima “ Screening and functional analyses of the

molecules that are preferentially expressed in the caudal ganglionic eminence in the developing mouse brain." Society for Neuroscience, 37th Annual Meeting, San Diego, CA, U.S.A., 2007年11月3-7日

大島登志男, 平澤基之, 田畑秀典, 岩里琢治, 糸原重美, 仲嶋一範, Ashok Kulkarni, 御子柴克彦 " Cdk5 は大脳皮質神経細胞の放射状移動時の多極性-双極性変換に必要である" 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2007), 横浜, 2007年9月10-12日

権田裕子, 櫻井準, 田畑秀典, 平田幸男, 味岡逸樹, 仲嶋一範 " IGFBP1 は発生期脳において新たに誕生した神経細胞の局在部位に強く発現する傾向を有する" 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2007), 横浜, 2007年9月10-12日

佐々木慎二, 田畑秀典, 刀川夏詩子, 平田幸男, 仲嶋一範 " 発生期大脳新皮質における多極性移動神経細胞の挙動を制御する分子の検索と解析" 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2007), 横浜, 2007年9月10-12日

内野茂夫, 福村怜子, 田畑秀典, 平澤孝枝, 服部功太郎, 湯浅茂樹, 仲嶋一範, 高坂新一 " 大脳皮質形成過程における NMDA 受容体を介した細胞移動の分子基盤" 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2007), 横浜, 2007年9月10-12日

〔図書〕(計1件)

In utero electroporation; assay system for migration of cerebral cortical neurons. Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima. *Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology* (Editor: Harukazu Nakamura), Springer, 143-152, April 2009

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特記すべき項目無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 秀典 (TABATA HIDENORI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 80301761

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし