

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700295

研究課題名（和文） 接着分子による大脳皮質層形成メカニズムの解析

研究課題名（英文） Regulation of neocortical lamination by adhesion molecules

研究代表者

大石 康二 (OISHI KOJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80420818

研究成果の概要：哺乳類の大脳皮質は6層構造から成り、各層のニューロンはそれぞれ異なった性質を持つ。しかしながら、どのように各層のニューロンが形成されるかについては未解明な部分が多い。本研究では、接着分子の一つである Protocadherin20 が大脳皮質第 IV 層の形成に重要な役割を果たしていることを見出した。すなわち、この分子が皮質第 IV 層細胞の配置および分化を制御することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

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：大脳皮質、層構造、細胞間接着、プロトカドヘリン、ニューロン分化、ニューロン移動

1. 研究開始当初の背景

我々の「脳」がその能力を発揮するためには、神経核や層構造といった機能的なニューロンの集団が形成されることが根本にある。進化上ヒトで最も発達した大脳皮質は、6層からなる見事な層構造を呈しており、脳の高次機能の発揮に必須であると考えられているが、その形成メカニズムについては未だ完全には解明されていない。

これまでの研究から、大脳皮質の皮質板を構成するニューロンは、脳室付近で誕生し、辺縁帯直下まで放射状に移動した後に皮質板形成に参加すること、また皮質板の各層を

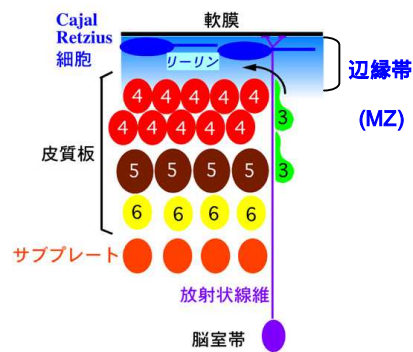


図 1 皮質板形成時のニューロンの移動様式
早生まれ(4,5,6層)の上に遅生まれ(3層)のニューロンが移動・配置される

構成するニューロンの誕生時期はほぼ共通であり、早生まれニューロンほど深層に配置されることがよく知られている(図1)。しかしながら、実際にどのようにして「整然とした層構造」が形成されるかについてはほとんど明らかにされておらず、移動を終えた細胞が、単に「堆積していくように」配置されていくことで各層ができていくという、いわば受動的システムであるという概念であった。

2. 研究の目的

前述の考えに対して、以下に挙げる2つの独自の知見から、大脳皮質を構成するニューロンは、各層での細胞の接着性が異なることで、むしろ積極的に層構造を形成しているのではないかと考えるに至った。第一に、我々のグループは、*in vitro*での大脳皮質の再凝集培養系において、ニューロンの接着特性が細胞の誕生時期によって異なることを明らかにした(Ajioka and Nakajima, Eur. J. Neurosci., 2005)。第二に、皮質板形成時のニューロンは、細胞移動終了部位である辺縁帯直下で約1日間という長い時間停滞するため、同時期に誕生し個別に移動してきた細胞群が凝集し、細胞密度が著しく高くなることを見出した。辺縁帯直下は、*in vivo*において細胞が誕生時期依存的に選別されていく部位でもある。これらの事実から、辺縁帯直下では移動中と比べてニューロン間の接着活性が強く、誕生時期依存的な細胞接着を担う分子が発現することにより細胞選別(=層形成)が行われている可能性が強く示唆される。

我々はまた、この現象を担う候補分子の探索を行い、Cadherinスーパーファミリーに属するProtocadherin20(Pcdh20)が辺縁帯直下で強く発現することを見出した(図2参照)。Protocadherinファミリーメンバーのいくつかは、細胞間接着に関与することが報告されている。

そこで本研究では、Pcdh20の解析をさらに発展させ、大脳皮質層の構築に、ニューロン間の接着特性がどのような役割を果たすか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Pcdh20の発現解析

発生過程におけるPcdh20の発現を調べるために、各ステージの脳切片を用いてPcdh20のmRNAに対する*in situ* hybridizationを行った。

(2) 大脳皮質第IV層の形成におけるPcdh20の必要性の検討

マウス胎仔大脳皮質へ子宮内電気穿孔法(Tabata and Nakajima, Neuroscience,

2001)を用いて遺伝子導入を行い、Pcdh20の*in vivo*での機能について検討を行った。具体的には、RNA干渉法ベクターを胎仔脳に導入し、Pcdh20の発現を抑制して大脳皮質第IV層の形成に影響があるか調べた。解析としては、細胞の位置および細胞分化について行った。

4. 研究成果

まず、発生過程におけるPcdh20の発現様式の検討を行った(図2)。

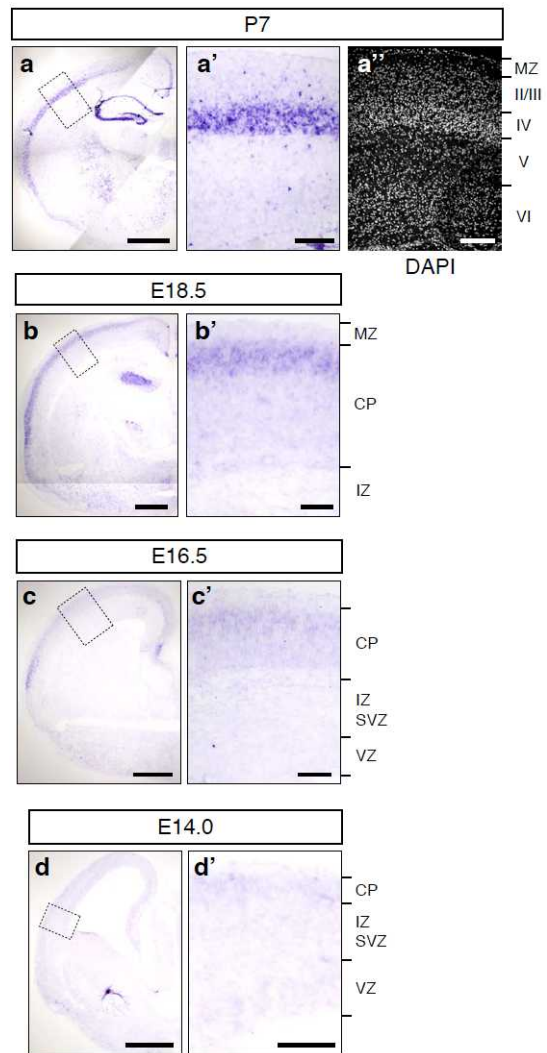


図2 Pcdh20の発現様式
生後7日目(P7)、胎生18.5日目(E18.5)、胎生16.5日目(E16.5)、胎生14.0日目(E14.0)の脳切片を用いて検討を行った。

Pcdh20のmRNAは生後7日目で皮質第IV層に強く発現していること、また胎生18.5日目では辺縁帯(MZ)直下に強く発現していることが明らかになった。胎生18.5日目の辺縁帯直下は将来の皮質第IV層細胞が存在することから、Pcdh20のmRNAが将来皮質第IV層を形成する細胞に発現することが示唆

された。そこで、さらに早い時期の胎生 16.5 日目、胎生 14.0 日目でその発現を調べた。しかしながら、これらの時期では弱いシグナルしか得られなかった。したがって、Pcdh20 は、移動を終了する過程の将来の皮質第 IV 層細胞で発現を開始することが示唆された。

次に、Pcdh20 の皮質第 IV 層形成における役割について検討を行った。Pcdh20 の機能を抑制するために、まず RNA 干渉法用ベクターを作製した。このベクターの効果は 293T 細胞を用いて確かめた。次に、得られたベクターを、子宮内電気穿孔法を用いて胎仔脳に導入することで、生体内での Pcdh20 の機能について検討を行った。遺伝子の導入は将来の第 IV 層細胞が生まれ出される時期である胎生 14.0 日目に行い、遺伝子導入された脳は大脳皮質の基本的な構造が完了する生後 7 日目に解析した (図 3)。

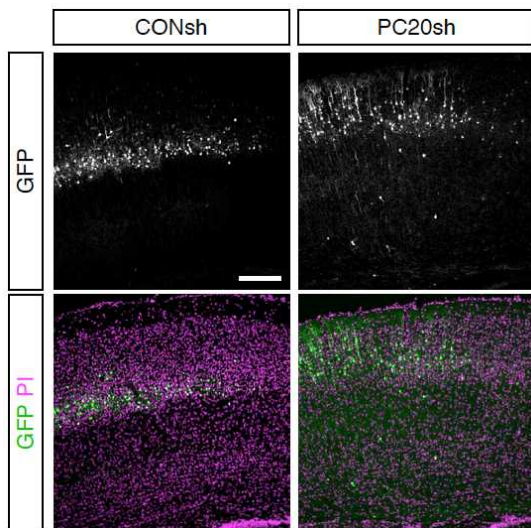


図 3 Pcdh20 の抑制実験
コントロールベクター (CONsh) あるいは Pcdh20 に対する RNA 干渉法ベクター (PC20sh) を GFP 発現ベクターと共に胎生 14.0 日目の胎仔脳に導入し、生後 7 日目で解析を行った。

その結果、コントロール細胞のほとんどが皮質第 IV 層に位置したのに対し、Pcdh20 抑制細胞はより表層側の皮質第 II/III 層に多くが位置することが分かった。したがって、Pcdh20 が皮質第 IV 層形成に必須な遺伝子であることが示唆された。

大脳皮質層を形成する細胞は脳室帯及び脳室下帯で誕生し、辺縁帯直下まで移動した後に皮質形成に参加する。そこで、Pcdh20 の発現抑制が細胞の誕生、あるいは移動過程に影響を与えるか検討を行った (図 4)。胎生 14.0 日目に遺伝子導入を行い、胎生 16.5 日目、胎生 18.0 日目に解析を行った。コントロール実験から、胎生 16.5 日目では多くの細胞が移動中、また胎生 18.0 日目では移動終了過程にあることが分かった。一方、Pcdh20 抑制細胞はコントロールとほとんど変化見られなかった。したがって、Pcdh20 の発現抑

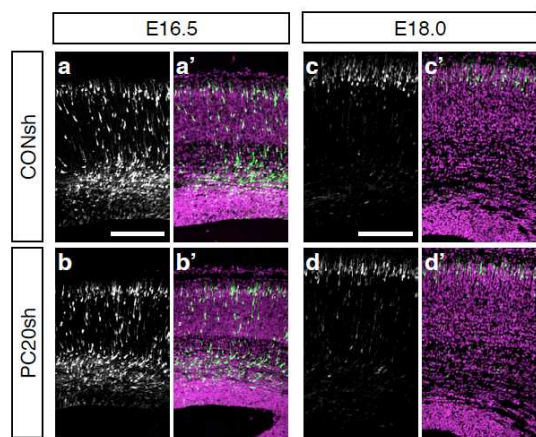


図 4 継続的な Pcdh20 抑制実験
CONsh あるいは PC20sh を GFP 発現ベクターと共に胎生 14.0 日目の胎仔脳に導入し、胎生 16.5 日目、胎生 18.0 日目で解析を行った。

制は将来の皮質第 IV 層細胞の誕生や移動に影響せず、その後の過程が障害されたことが示唆された。

また、細胞形態の観察から、Pcdh20 抑制細胞は形態が対照群と大きく異なることが明らかになった (図 3 参照)。Pcdh20 抑制細胞は先端突起を有しており、これは皮質第 II/III 層細胞の特徴とよく似ていた。そこで、Pcdh20 抑制細胞の細胞分化について検討を行った。細胞分化を調べるために皮質第 IV 層特異的なマーカーである RORβ に対する免疫組織化学染色を行った (図 5)。

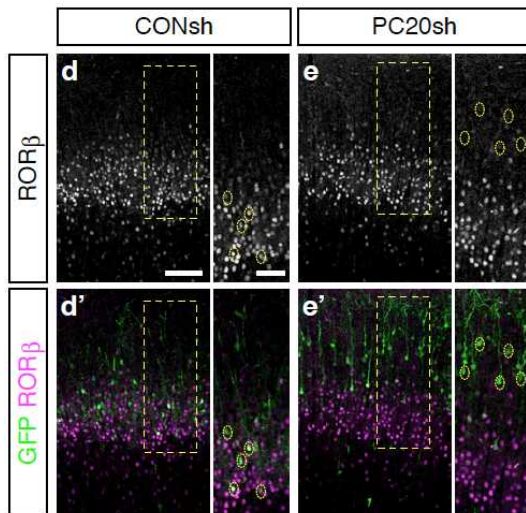


図 5 Pcdh20 抑制細胞の RORβ の発現
CONsh あるいは PC20sh を GFP 発現ベクターと共に胎生 14.0 日目の胎仔脳に導入し、生後 7 日目で解析を行った。RORβ と GFP に対して免疫組織化学染色を行った。

その結果、コントロールでは多くの細胞が RORβ を発現しているのに対し、Pcdh20 抑制細胞は RORβ を発現する細胞の割合が著しく減少することが明らかになった (図 5)。したがって、Pcdh20 の発現抑制は細胞の位置のみならず分化にも影響を与えることが明らかになった。

本研究の結果は、ニューロンの移動終了後の過程の厳密な制御が、正常な大脳皮質層形成（細胞の配置・分化）に必須であることを示唆している。ニューロンの移動後の過程の重要性については、これまでほとんど議論されていなかったため、本研究は大脳皮質層形成機構の解明に新たな展開を与える可能性のあるものと考えられる。

本研究では、細胞接着活性の差異が大脳皮質層の形成に関与する可能性を考え、Pcdh20 が接着分子として機能しているかについては、明かな結果が得られなかった。Pcdh20 が接着性を制御するのか、あるいは他の細胞特性を制御するのか、今後の解析が必須である。

また、これまでニューロンの層特異的な性質はニューロンの誕生時に獲得されるという考え方が一般的であった。本研究では、移動終了後の配置過程が最終的な分化・成熟過程に必須であることを強く示唆しており、新たな層特異的な分化決定メカニズムの解明に繋がるものと考えられる。

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)

[学会発表](計 8件)

大石康二、刀川夏詩子、佐々木慎二、仲嶋一範 “細胞外環境による大脳皮質層形成メカニズムの解析” 第3回神経発生討論会、岡崎、2009年3月12-13日

錦見満暁、大石康二、仲嶋一範 “脳梁交連線維系 ニューロンの領域依存的な軸索走行” 第3回神経発生討論会、岡崎、2009年3月12-13日

Koji Oishi, Kashiko Tachikawa, Shinji Sasaki, and Kazunori Nakajima (大石康二、刀川夏詩子、佐々木慎二、仲嶋一範) “Role of Pcdh20 in cortical lamination (Pcdh20による大脳皮質層形成メカニズムの解析)” 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

錦見満暁、大石康二、仲嶋一範 “大脳皮質交連ニューロン軸索の脳梁通過時の領域依存的な制御” 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

Koji Oishi, Kashiko Tachikawa, Shinji Sasaki, and Kazunori Nakajima “Regulation of cortical laminar formation by cadherin family proteins” 第31回日本神経科学大会、

東京、2008年7月9-11日

大石康二、刀川夏詩子、佐々木慎二、仲嶋一範 “細胞間接着による大脳皮質層形成機構の解明” 第37回慶應ニューロサイエンス研究会、東京、2008年6月21日

金谷繁明、星野直哉、大石康二、田畑秀典、仲嶋一範 “新たに誕生した神経細胞が好んで進む方向を規定する因子の同定” 科学技術振興機構 生物の発生・分化・再生領域 第6回公開シンポジウム、東京、2007年11月20日

大石康二、刀川夏詩子、佐々木慎二、仲嶋一範 “細胞間接着による大脳皮質層形成機構の解析” 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)、横浜、2007年9月10-12日

[図書](計 1件)

Koji Oishi and Kazunori Nakajima. “Neurogenesis” Encyclopedia of Neuroscience (Editors: Marc D. Binder, Nobutaka Hirokawa and Uwe Windhorst), Springer, 2673-2676 (2009).

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし