

平成 23 年 4 月 10 日現在

機関番号： 10101

研究種目： 新学術領域研究

研究期間： 2008 ～ 2010

課題番号： 20200011

研究課題名（和文） 脊髄上行路形成過程の解析とその分子機構の解明

研究課題名（英文） Ascending spinal tract formation in developing chick

研究代表者

山本 融 (YAMAMOTO TOHRU)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号： 10251480

研究成果の概要（和文）： 脊髄上行路は体内外のような感覚情報を上位中枢へと伝達する重要な経路であるが、その形成過程はこれまでほとんど明らかになっていなかった。我々は、ニワトリ胚をモデル系とし、本研究のために新たに改良を加えた電気穿孔法と、走行軸索の高感度検出法を用いることにより、脊髄上行路の伸長経路・速度・投射先などの詳細を初めて明らかにした。また、その分子機構を解明していくための時空間選択的な遺伝子発現制御系を確立し、さらに、前・後脊髄小脳路をはじめとする主要な上行路の選択的な可視化を進めた。これらの結果により、脊髄上行路形成の初期過程の全体像が明らかになるとともに、脊髄は単なる軸索の通り道ではなく、その走行を制御する機構をも併せ持った精妙な組織であることが示された。

研究成果の概要（英文）： Ascending spinal tracts (AST) relay various external and internal information received in a body to the brain. The origins and destinations of AST have been extensively studied in wide variety of species; however, relatively little is known on the pathways and processes taken by the axons to reach their destinations during development. We developed the method utilizing newly developed *in ovo* electroporation conditions for making possible to follow the single axons derived from an intended single spinal segment of chick embryos, and followed the elongation time course and the paths of the ascending axons, including the mammalian counterparts of ventral and dorsal spinocerebellar tracts. Our observations unveiled the pathways and elongation processes taken by AST neurons, and suggested that a spinal cord may provide cues to coordinate their behavior.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	16,800,000	5,040,000	21,840,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学 神経科学一般

キーワード：脊髄上行路 脊髄小脳路 脊髄神経 神経回路網形成

1. 研究開始当初の背景

我々動物の運動・行動は、外界および体内からの各種情報を参照しながらおこなわれており、神経解剖学の黎明期から、その構築基盤の解明にむけた努力が積み重ねられてきた。これら情報のうち、体幹部に属する深部感覚や各種知覚情報の伝達は、脊髄灰白質に起始核をもつ脊髄上行性伝導路によって担われている。その存在は早くから知られ、起始核・投射先・成体における伝導路の位置などは、その後の生理学的・解剖学的方法論の進展にともなう数多くの解析により、現在教科書に見るような形にまとめられている。このように、早くから関心が持たれ、内外からの情報の「ボトムアップ」経路として重要な位置を占めている脊髄からの上行路系であるが、発生期において、その回路網形成が「どのように」なされているのか、すなわち、起始核から発した軸索群が、いつどのような経路を取って上行し、投射先へ達するのか、については、後述する技術的困難もあり、ほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

脊髄上行性伝導路の形成過程とその分子メカニズムを、ニワトリ胚をモデル系として明らかにする。具体的には、頸部、上腕部、胸部、腰部より上行する脊髄伝導路の標的までの軸索伸長過程を可視化し、その伸長開始時から標的到達までの伸長経路・速度・投射先を明らかにする。次いで、上行性伝導路を構成する脊髄小脳路などの各機能単位を選択的な可視化法を構築する。さらに、各伝導路の経路選択・標的認識の分子機構を明らかにしていくための方法論を確立し、解析を加える。

3. 研究の方法

これまで脊髄上行路の形成過程が明らかにされていなかった理由として、標的に至るまでの距離が長いため、その経路すべてを可視化することが難しいことに加え、古典的な順行標識法では、様々な時期に誕生した神経群が一樣に標識され、また、脊髄という比較的狭い領域を走行するために、標識された軸索群の明瞭な弁別がほぼ不可能であること、さらに、これら神経群は発生初期に誕生し、しかもその後脊髄内を分散して移動するために、何時誕生したどの部位に投射しつつある神経かを発生中に同定することが困難であること、などの技術的問題点があげられる。そこで、発生期の脊髄に容易にアクセスでき、上行路の主たるターゲットのひとつである

小脳の発達も早く、孵化前にすべての回路網形成が完了するニワトリ胚をモデル系として採用した。前後軸に沿った脊髄神経の発生運命や機能は、およそ体節程度を単位として決定されている。そこで、単体節程度に限局して遺伝子導入をおこなえるよう新たに改良した電気穿孔法により GPI アンカー型耐熱性アルカリフォスファターゼを発現させることで、定まった部域の発生初期に産生された神経群の軸索を感度良く可視化することを可能とした。

上行する軸索群は、いくつかの経路選択点を経て標的へと到達する。その分子機構を明らかにするためには、任意の時期に望んだ遺伝子の発現を制御する必要がある。*in ovo* electroporation では、遺伝子は中心管に面した神経前駆細胞に導入されるので、このためには、遺伝子発現・抑制コンストラクトを不活性化状態で安定に保持し、任意の時点で活性化させねばならない。そこで、Tol2 トランスポゾンを用いたゲノム内遺伝子組み込み系を用いることで、導入した発現・抑制コンストラクトを細胞内に安定に保持させるとともに、低バックグラウンドの Cre-ER システムを利用することにより、タモキシフェン投与による任意の時点での遺伝子発現・抑制を行わせるシステムを構築した。本研究のために新たに構築したこれら方法論を用いて、脊髄上行性伝導路形成過程の解析を進めた。

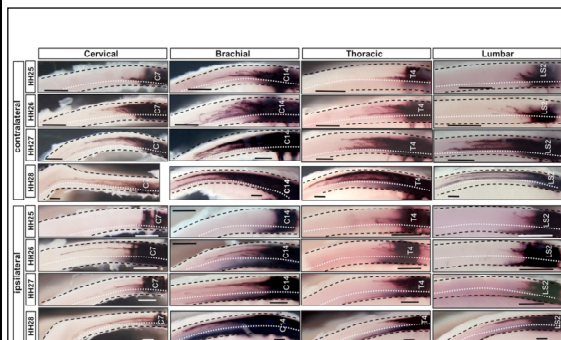


図1. 脊髄各部域から上行する軸索群の伸長過程
頸部(C7)・上腕部(C14)・胸部(T4)・仙腰部(LS2)から対側(上段)および同側(下段)を上行する軸索群の伸長を経時的に示す。

4. 研究成果

頸部(C7)・上腕部(C14)・胸部(T4)・仙腰部(LS2)から上行する軸索群の伸長過程を解析した。上行する軸索群がとる主要な経路は全てにおいて共通しており、同側については背側を、対側については背側と腹側を通り上行していた(図1)。さらに、同側においては

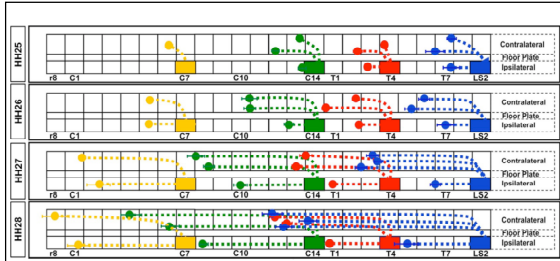


図2. 上行する軸索群の伸長過程

頸部(黄)・上腕部(緑)・胸部(赤)・仙腰部(青)から上行する軸索群の伸長過程を模式的に示す。HH28において、仙腰部を発した対側の軸索が先行する胸部由来の軸索群に追いついている。

蓋板近辺および底板近辺を上行する軸索群が、また、LS2からは対側において背側と腹側の両主要経路の中間を上行する軸索群が少数観察された。また、この方法では、軸索の伸長距離・速度を体節程度の分解能で解析することが可能である。そこで、各体節を発する軸索群の伸長過程のダイアグラムを作成した(図2)。軸索伸長の初期においてはそれぞれ同様の速度で上行しているが、発生が進むにつれ、仙腰部を発する軸索群は対側では上腕部で、同側では延髄到達時まで、それぞれ先行する胸部を発する軸索群に追いついており、ほぼ同時に延髄に侵入していることがわかった。同様の傾向は頸部と上腕部についても見られた(図3)。これらのことは、伸長開始時期や位置が異なる軸索群が、大きく上半身由来と下半身由来とに分かれていることを示している。延髄侵入後、背側を走行していた軸索群の一部は発生中の小脳へ進入し、残りの軸索群は上髄帆へ向かっていた(図3)。発生中の小脳へと進入した軸索群は、小脳の形態形成の進行とともにそれぞれ特徴的なパターンでII/III葉の虫部周辺に投射しており、脊髄小脳路のsomatotopicな投射パターンは、小脳への進入時においてすでに確立されていることが明らかとなった(図4)。

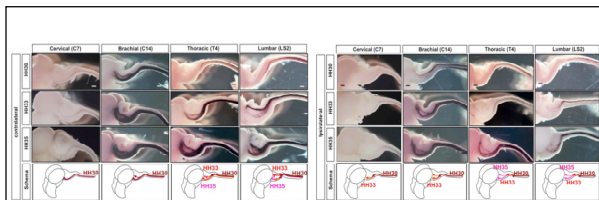


図3. 延髄進入後の伸長過程

対側(左)同側(右)を上行して延髄に進入した軸索群の伸長を経時的に示す。頸部と上腕部、胸部と仙腰部由来の軸索群はそれぞれ延髄進入時までに足並みを揃え、背側を上行する軸索群の一部が小脳へ進入する。その他の軸索群は上髄帆へと向かう。

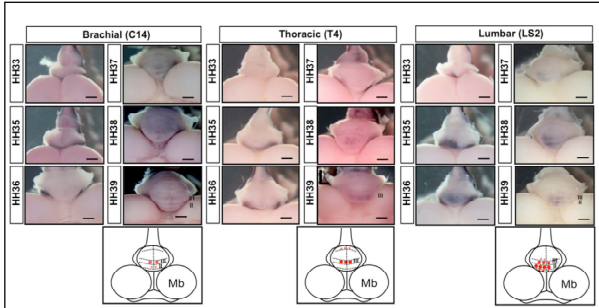


図4. 上腕部・胸部・仙腰部から小脳への投射過程

発生中の小脳へ進入した脊髄由来の苔状繊維は、小脳の形成に伴い起始核の存在位置に対応した特定の投射パターンをとる。

以上の解析により、脊髄上行性伝導路形成の初期過程について、その全容を明らかにすることが出来た。しかしながら、各体節を発する軸索群は複数種の神経群より構成されている。そこで、次に、機能・投射先の異なる個々の伝導路を選択的に可視化することを試みた。脊髄神経は脳室帯に存在する前駆細胞から誕生するが、特定の機能を持つ神経群は脳室帯の特定の領域から誕生する。これらの神経群は、その分化制御に重要な役割を果たしている転写制御因子群の発現パターンに基づいてクラス分けすることができる。そこで、これらのうちのdI1ニューロンの前駆細胞に特異的に発現するMath1エンハンサーの制御下にCreを発現させることにより、dI1ニューロンの選択的な可視化をおこなった。dI1ニューロンは、先に観察された3つの主たる経路をとって、同様の速度で上行し、うち、同側を上行するものの一部と、対側を上行するもののうち、背側を上行するものが小脳へと投射していた(図5)。前者が後脊髄小脳路、後者が前脊髄小脳路に相当する軸索群であるものと推定され、両脊髄小脳路の少なくとも一部がdI1ニューロン由来であることを確認するとともに、その伸長過程・経路を明らかにすることができた。同様に、dI2ニューロンに選択的に発現するFoxd2のエンハンサーを用いて、同様の解析をおこなった。dI2ニューロンは対側を背側の経路のみをとって、先に観察された神経群と同様の伸長経過をとって上行し、延髄に到達後、腹側の経

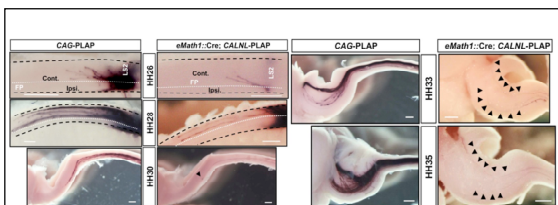


図5. dI1ニューロンの軸索伸長過程(対側)

背側と腹側の経路をとって上行し、背側を上行する軸索が小脳へと進入する。

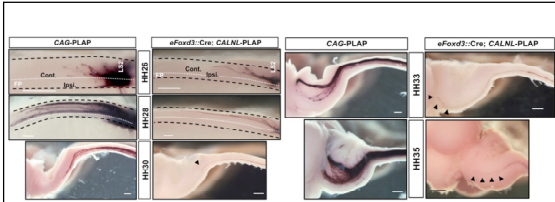


図 6. d12 ニューロンの軸索伸長過程
対側を背側の経路をとって上行し、延髄進入後、腹側を上髄帆へ向かう。

路をとって、上髄帆方向へ伸長していた (図 6)。前脊髄小脳路を構成する軸索群が背側をから小脳へ向かうのに対し、d12 ニューロンは脊髄では同じく背側を経由しながら、延髄では腹側に向かうことから、延髄にこれら神経群の選択点となるシグナルが存在していることが考えられる。なお、d12 ニューロンはその後延髄内に側枝を伸ばし、延髄中の神経核に投射する様子が観察されており、脊髄と延髄の中継核とを結ぶ伝導路を構成していることが示唆された。

こうして上行性伝導路形成の初期過程の全体像を明らかにするとともに、各種上行路の選択的な可視化を進めた。これら上行路は本研究で一部が新たに明らかになったように、複数の経路選択点を経て標的へと軸索を伸長させていく。この制御過程には複数の軸索ガイド因子群が関わっていることが予想されるが、どのような因子が関与しているかを特定し、検証するには、*in vivo*において、その因子に対する応答性を検証することが必須である。一般には、因子を特定後、その遺伝子改変動物を用いて検証する必要があるが、脊髄神経の場合、その軸索は脊髄という比較的狭い領域を必ず通過する。したがって、検証したい軸索ガイド因子を電気穿孔法を用いて通過経路である脊髄中に導入・発現させることにより、任意の軸索通過部域の環境を修飾し、導入部位を通過する軸索群の伸長にどのような影響が見られるかを観察することで、どのような軸索ガイド因子に対す

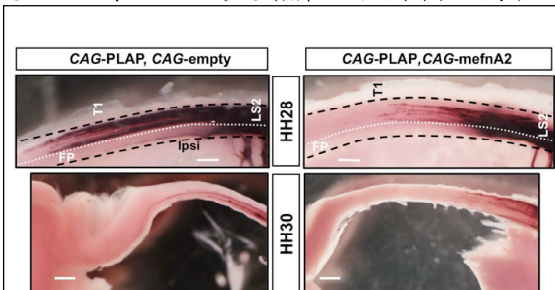


図 7. 対側を上行する軸索群の ephrin 感受性
胸部脊髄に空ベクター (左側) もしくは ephrinA2 発現ベクター (右側) を導入したときの LS2 を発する軸索群の伸長を示す。対側を上行する軸索群の伸長は ephrinA2 導入領域で一時的に阻害される。

る応答性を有するかを *in vivo* で解析することが出来ると考えた。そこで、苔状繊維に発現が認められる EphA ファミリー群に対する応答性を、以上述べた方法論で検証した。その結果、対側を上行する神経群はすべて、ephrinA2 を発現させた部位で伸長が一時停止した (図 7)。その後、経路の変化もなく、導入部位を超えて伸長が再開されていることから、ephrinA2 の発現により、導入領域の組織構築が異常になったため、それ以上の伸長が出来なくなったわけではないものと考えられる。従って、脊髄を上行する神経群はすべて、ephrinA2 に対する感受性を有していることが示唆された。同様の解析を主要な軸索ガイド因子群について行うことにより、各伝導路を構成する神経群がどのようなシグナルに対して感受性を持つのかを明らかにし、その経路選択・標的認識とその制御の分子機構を、本研究の遂行過程で開発した時空間選択的遺伝子発現制御法を用いて明らかにするとともに、多大の費用と労力が必要な遺伝子組み換え動物を用いた解析を補完し得る新たなモデルシステムとしての有用性を示していきたいと考えている。

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)

[雑誌論文] (計 9 件 ; すべて査読有り)

1. Nakazawa S, Gotoh N, Matsumoto H, Murayama C, Suzuki T, Yamamoto T. Expression of sorting nexin 18 (SNX18) is dynamically regulated in developing spinal motor neurons. *J. Histochem. Cytochem.* 59, 2011, 202-213.
2. Ishikawa T, Gotoh N, Murayama C, Abe T, Iwashita M, Matsuzaki F, Suzuki T, Yamamoto T. IgSF molecule MDGA1 is involved in radial migration and positioning of a subset of cortical upper layer neurons. *Dev. Dyn.* 240, 2011, 96-107.
3. Kondo M, Shiono M, Itoh G, Takei N, Matsushima T, Maeda M, Taru H, Hata S, Yamamoto T, Saito Y, Suzuki T. Increased amyloidogenic processing of transgenic human APP in X11-like deficient mouse brain. *Mol. Neurodegener.* 2010, 5, 35.
4. Hata S (他 18 名・16 番目) Alcadein cleavages by amyloid beta-precursor protein (APP) alpha- and gamma-secretases generate small peptides, p3 -Alcs, indicating Alzheimer disease -related

- gamma-secretase dysfunction. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 36024-36033.
5. Mizumaru C, Saito Y, Ishikawa T, Yoshida T, Yamamoto T, Nakaya T, Suzuki T. Suppression of APP-containing vesicle trafficking and production of beta-amyloid by AID/DHHC12 protein. *J. Neurochem.* 2009, 111, 1213-1224.
 6. Sakuma M, Tanaka E, Taru H, Tomita S, Gandy S, Narin AC, Nakaya T, Yamamoto T, Suzuki T. Phosphorylation of the amino-terminal region of X11L regulates its interaction with APP. *J. Neurochem.* 2009, 109, 465-475.
 7. Saito Y, Sano Y, Vassar R, Gandy S, Nakaya T, Yamamoto T, Suzuki T. X11 proteins regulate the translocation of amyloid beta-protein precursor (APP) into detergent-resistant membrane and suppress the amyloidogenic cleavage of APP by beta-site-cleaving enzyme in brain. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 35763-35771.
 8. Arakawa T, Iwashita M, Matsuzaki F, Suzuki T, Yamamoto T. Paths, elongation, and projections of ascending chick embryonic spinal commissural neurons after crossing the floor plate. *Brain Res.* 2008, 1223, 25-33.
 9. Sumioka A, Saito Y, Sakuma M, Araki Y, Yamamoto T, Suzuki T. The X11L/X11beta/MINT2 and X11L2/X11gamma/MINT3 scaffold proteins shuttle between the nucleus and cytoplasm. *Exp. Cell Res.* 2008, 314, 1155-1162.
- [学会発表] (計 28 件)
1. 山本融, からだと脳はどのように結ばれるか - 脊髄上行路形成機構の解析, 日本生理学会・日本解剖学会合同年会, 2011年3月28日-30日, パシフィコ横浜
 2. Gotoh N, Intracellular Dynamics of a Kinesin-1 Cargo, Alcadein, The American Society for Cell Biology, Annual Meeting, Dec.11-15, 2010, Philadelphia USA
 3. Suzuki T, Alcadein as a Kinesin-1 Cargo Receptor with Motor Regulation, The American Society for Cell Biology, Annual Meeting, Dec.11-15, 2010, Philadelphia USA
 4. Arakawa T, Ascending spinal tract formation in developing chick, Society for Neuroscience annual meeting, Nov. 13-17 2010, San Diego USA
 5. Yamamoto T, IgSF molecule MDGA1 is involved in radial migration and positioning of a subset of cortical upper-layer neurons, Nov.13-17 2010, San Diego USA
 6. Kato T, Ascending spinal tract formation in developing chick, Neuro 2010, 2010年9月2-4日, 神戸国際会議場
 7. Yamamoto T, Novel IgSF molecule MDGA1 is involved in radial migration and positioning of a subset of cortical upper-layer neurons, Neuro 2010, 2010年9月2-4日, 神戸国際会議場
 8. Konno, T, Increased p3-Alca, a g-secretase reaction product of Alcadein, in plasma of sporadic Alzheimer's disease subjects, ICAD2010, Jul.10-15 2010, Honolulu USA
 9. Piao, Y, Expression and localization of Alcadein along with X11L and APP in mouse brain, ICAD2010, Jul.10-15 2010, Honolulu USA
 10. 松本弘嵩, IgSF分子MDGA1の脳皮質形成過程における役割, 日本解剖学会全国学術集会, 2010年3月28-30日, 岩手県民会館
 11. 加藤哲朗, ニワトリ胚脊髄上行路形成過程の解析, 日本解剖学会全国学術集会, 2010年3月28-30日, 岩手県民会館
 12. 斎藤有紀, X11 proteins欠損によるAβ産生増加と痙攣発作発症の分子基盤解明, 日本認知症学会, 2009年11月20-22日, 東北大学百周年記念会館
 13. 塩野真希, APP代謝と細胞内局在に果たすX11Lの機能ドメインの解析, 日本生化学会大会, 2009年10月21日-24日, 神戸国際会議場
 14. 丸田千明, 新規キネシンカーゴAlcadein αはαセクレターゼにより恒常的に効率よく切断される, 日本生化学会大会, 2009年10月21日-24日, 神戸国際会議場
 15. Arakawa, T, Analysis of spinocerebellar tract formation in developing chick, 日本神経科学大会, 2009年9月16-18日, 名古屋国際会議場
 16. Matsumoto, H, Functional characterization of MDGA1, a GPI-anchored IgSF molecule specifically expressed by layer II/III neurons in the cerebral cortex, 日本神経科学大会, 2009年9月16-18日, 名古屋国際会議場
 17. 丸田千明, Alcadein family タンパク質の代謝と細胞内動態の解析, 日本病態プロテアーゼ学会, 2009年8月21-22日,

- 千里ライフサイエンスセンター
18. Shiono, M, Regulation of intracellular APP transport by X11L, ICAD 2009, Jul.11-16, 2009, Vienna, Austria
 19. Araseki, M, Regulatory mechanism of APP and Alcadein transport by kinesin-1, ICAD 2009, Jul.11-16, 2009, Vienna, Austria
 20. Ishikawa, T, Functional characterization of MDGA1, a GPI-anchored IgSF molecule specifically expressed by layer II/III neurons in the cerebral cortex, Keystone Symposia, Feb.17-22, 2009, Keystone, USA
 21. Nakazawa, S, Functional analysis of a gene selectively expressed by newly born motor neurons, Keystone Symposia, Feb.17-22, 2009, Keystone, USA
 22. Yamamoto, T, Spinocerebellar tract formation of developing chick: Paths, elongation, and projections of ascending embryonic spinal commissural neurons after crossing the floor plate. in neuronal cells and tissues, Keystone Symposia, Feb.17-22, 2009, Keystone, USA
 23. 荒関雅彦, JIP1bによるAPPのキネシン-1への接続機構と神経におけるAPP輸送機構, BMB2008, 2008年12月9日～12日, 神戸国際会議場
 24. 後藤直也, Alcadein familyタンパク質の代謝と細胞内動態の解析, BMB2008, 2008年12月9日～12日, 神戸国際会議場
 25. 荒川貴弘, ニワトリ胚における脊髄上行性伝導路形成過程の解析, BMB2008, 2008年12月9日～12日, 神戸国際会議場
 26. 齋藤有紀, X11 family proteinsによるAPP代謝抑制の分子機構～X11/X11L double KO miceの解析, 日本病態プロテアーゼ学会, 2008年8月22-23日, 千里ライフサイエンスセンター
 27. Furukori, K, Analysis of axonal transport of APP in JIP1 gene-deficient mice, ICAD 2008, Jul.27-31, 2008, Chicago USA
 28. Gotoh, N, Intracellular dynamics of Alcadein family molecules and their metabolites in neuronal cells and tissues, ICAD 2008, Jul.27-31, 2008, Chicago USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 融 (YAMAMOTO TOHRU)
北海道大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号: 10251480

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし