

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：12601
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2009～2012
課題番号：21300122
研究課題名（和文） 大脳新皮質における神経細胞の発生および維持に関する分子機構の解析
研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms underlying neuronal development and neuronal maintenance
研究代表者 真田 佳門（SANADA YOSHIKADO） 東京大学・大学院理学系研究科・准教授 研究者番号：50431896

研究成果の概要（和文）：胎生期マウス脳において、神経細胞は神経幹細胞から生み出される。本研究により、この神経細胞への分化過程に関する新たな仕組みを明らかにした。また、胎生期に誕生した神経細胞は、生涯を通して維持されなければならない。私共は、この維持機構に関する分子を見出した。また、筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルマウスにおいて、この機構を人為的に活性化すると、ALSの発症を遅延させることができた。

研究成果の概要（英文）：In the developing neocortex in mice, neural progenitor cells give rise to neurons. In the present study, I identified a novel regulatory mechanism contributing to neuronal differentiation of neural progenitor cells. Also, I identified a molecule with neuroprotective role and neuronal overexpression of the molecule in ALS mice alleviated motor neuron degeneration and delayed onset of the disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経科学一般

キーワード：神経前駆細胞、神経細胞移動、神経保護

1. 研究開始当初の背景

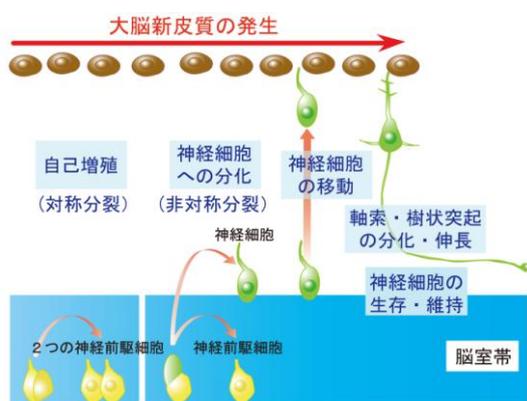
(1) 神経前駆細胞の運命制御機構

大脳新皮質の発生期において、神経前駆細胞は脳室を取り囲む領域(脳室帯)に局限して存在する。大脳新皮質形成の初期段階では、神経前駆細胞は対称分裂して二つの神経前

駆細胞を生み出し、自己複製して数を増やす(図の左側)。一方、発生が進むのに伴って神経前駆細胞は非対称分裂し、一つの神経細胞と一つの神経前駆細胞という、互いに異なる二つの細胞を生み出すようになる(図の中央)。また、発生後期においては、神経前駆

細胞からアストロサイトなどのグリア細胞が産生される。このように、神経前駆細胞の細胞系譜は発生時期に応じて規定され、細胞運命が制御されている。しかし、細胞運命決定の分子機構は未だ不明な点が多く、複雑な運命決定の仕組みを解き明かすためには、あらたな制御機構を明らかにすることが極めて重要であると考えられる。

従来の研究から、増殖因子やサイトカイン等の細胞外シグナル因子およびその膜受容体が神経前駆細胞の運命制御に寄与していることが知られる。しかしながら、膜受容体の中で最大のスーパーファミリーを形成するG蛋白質共役受容体 (GPCR) の寄与についてはほとんど判っておらず、GPCR の関与が明らかになれば、神経前駆細胞の運命決定の仕組みをさらに理解するための大きな突破口になる可能性がある。



(2) 神経細胞移動の分子機構

神経前駆細胞から誕生した神経細胞は、脳表層側へと長い距離を移動する (図の中央)。この神経細胞移動の過程は脳の構築に極めて重要である。私共はこれまで、LKB1 と呼ばれる Ser/Thr キナーゼが、神経細胞移動に必須の分子であることを見出していた。このLKB1 を介したシグナリングを精査することによって、神経細胞移動を司る仕組みの理解が大きく前進すると考えられた。

(3) 神経保護機構の分子基盤

成体の中枢神経系において、神経細胞は長い年月にわたって生存して維持されなければならない。そのため神経細胞は、様々な細胞ストレスから自己を防御するための強固な神経保護システムを備えていると考えられるが、そのシステムに関する知見は少ない。このような保護システムに関与する分子を同定し、保護システムの理解を前進させることは、神経変性疾患 (アルツハイマー病など) に対する治療および予防という観点からも極めて重要であるが、研究は進んでいない。

2. 研究の目的

(1) 神経前駆細胞の運命制御機構

本研究では、神経前駆細胞の運命決定における GPCR の寄与について調べた。神経前駆細胞の運命決定のメカニズムにおいて、GPCR に着目した研究は少なく、本研究は当分野に新風を巻き起こし、運命決定に関する分子レベルでの研究を大きく前進させることは間違いない。また、市販されている治療薬の約 50% は GPCR シグナリングを標的にしていることを考え合わせると、GPCR の機能解析およびリガンド探索を行うことは、未知の情報伝達機序の発見に繋がるのみならず、神経分化を促進する薬剤開発の基礎研究になると期待できる。

(2) 神経細胞移動の分子機構

本研究では、LKB1 の下流シグナリングを探索することによって、神経細胞移動の仕組みに迫ることを目的とした。

(3) 神経保護機構の分子基盤

従来の研究から私共は、培養した大脳系神経細胞において、神経傷害性の細胞ストレス刺激によって bZIP 型転写因子 Nfi13 の発現量が顕著に上昇することを見出した (未発表)。興味深いことに Pro-B 細胞において、Nfi13 は抗アポトーシス作用を示し、Pro-B 細胞の生存に寄与する。これらの知見を考え合わせると、Nfi13 は神経細胞の生存に大きく寄与する可能性がある。つまり、Nfi13 の役割解析を通して、神経細胞の細胞傷害に対する防御システムに迫れる可能性がある。そこで本研究では、神経変性を防御・抑止する分子機構を解析することを目的とし、Nfi13 の神経細胞における役割を、培養細胞およびマウス個体を用いて明らかにすることを目的とした。本研究により、Nfi13 やその下流シグナリングを人為的操作することが可能になれば、細胞傷害に対する抵抗力を上昇させる手法の確立に大きく寄与する。このことは、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の発症を抑止または遅延させるための新たな治療戦略の指針を提供する。

3. 研究の方法

いずれの研究においても、培養した神経前駆細胞や神経細胞およびマウス個体を用いて、着目する遺伝子の発現を抑制する、または過剰発現するなどして、神経前駆細胞の神経分化、神経細胞移動、神経変性などに及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 神経前駆細胞の運命制御機構

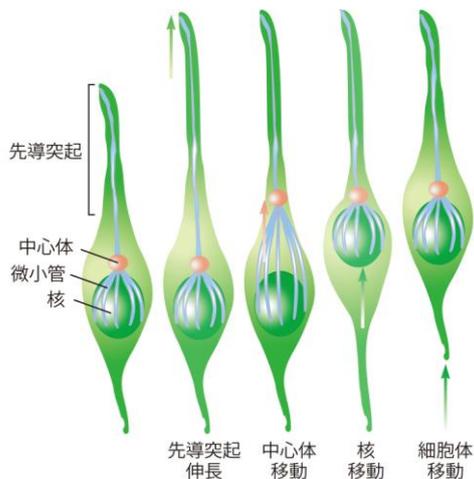
私は、胎生期マウス大脳新皮質の神経前駆

細胞に発現するGPCR、特にリガンドが未知のオーファンGPCRを探索した。その結果、GPCR5Bと呼ばれるG蛋白質共役受容体がマウス大脳新皮質の神経前駆細胞に特異的に発現していることを見出した。GPCR5Bに対するshRNAを神経前駆細胞にインビボ遺伝子導入すると、神経前駆細胞が神経分化しなくなることを見出した。さらに、これら細胞は最終的にアストロサイトへと分化するようになった。このGPCR5Bの下流経路を解析した結果、GPCR5Bは三量体G蛋白質G12と共役すること、さらにβカテニンを介したシグナリングを調節することを明らかにした。大脳新皮質の発生の後期過程では、βカテニンを介したシグナリングが神経細胞への分化決定に重要な役割を果たすことが知られており、GPCR5BはG12を介してβカテニンシグナリングを調節し、神経前駆細胞の神経分化をコントロールしていると考えられた。

またGPCR5B以外のG蛋白質共役受容体について、神経前駆細胞に特異的に発現するオーファン受容体をいくつか同定できた。現在、それら分子の機能について解析中である。本研究の結果、従来の研究では全く見過ごされてきた、神経前駆細胞の運命を決定する新たなシグナリングを同定することができた。このことは、神経前駆細胞の複雑な運命決定のメカニズムを理解する上で極めて重要な発見である。

(2) 神経細胞移動の分子機構

移動中の神経細胞は(下図)、(i) 先端突起が進行方向に伸展し、(ii) 進行方向に中心体が移動し、(iii) 中心体が微小管を介して核を引っ張り上げる、というサイクルを繰り返すことが知られている。



そこで移動中の神経細胞におけるLKB1の

下流シグナリングを探索した。その結果、LKB1はGSK3βのSer9のリン酸化を担い、GSK3βの不活性化に寄与することを見出した。興味深いことに、Ser9リン酸化型のGSK3βは先端突起の先端に濃縮して存在し、Ser9がリン酸化されないGSK3β変異体を移動中の神経細胞に発現すると、中心体の移動が顕著に停滞した。このことから、LKB1はGSK3βのリン酸化および不活性化を介して、中心体の移動および神経細胞の移動に貢献していることが示唆された。また、GSK3βの標的分子を精査したところ、GSK3βのSer9リン酸化の阻害に伴って、(i) APCが微小管のプラス端から解離すること、さらに(ii) 先端突起内の微小管が不安定化すること、を見出した。APCは微小管のプラス端と結合して微小管の膜アンカーおよび安定化に寄与すること、さらにGSK3βによってリン酸化されるとプラス端に結合できなくなることが知られている。このことから、先端突起において、(i) GSK3βがLKB1によってリン酸化されて不活性化し、(ii) その結果としてAPCが微小管プラス端に結合でき、さらに(iii) APCを介して微小管が膜にアンカーして安定化する、というモデルが得られた。加えて、これら一連の過程が中心体の移動に必須であることから、微小管が膜にアンカーすることによって進行方向に引っ張られていると推察された(Asada & Sanada, J. Neuroscience 2010)。以上の解析からLKB1は、中心体の局在やダイナミクスを空間的に制御することによって、神経細胞の移動に寄与すると考えられた。本研究は、微小管や中心体の方向性を持った制御にLKB1が大きく寄与することを明らかにしたのと同時に、神経細胞の移動において中心体の位置制御が重要な鍵となるイベントであることを示している。これらの知見は、神経系の構築メカニズムを理解するうえで極めて重要な知見であると考えられた。

(3) 神経保護機構の分子基盤

Nfil3は元来、インターロイキン3(IL-3)のプロモーター領域に結合するbZIP型転写因子として同定された(Cowell et al., 1992; Zhang et al., 1995)。近年の研究により、Nfil3は種々の免疫系細胞において多彩な役割を担うことが明らかになりつつある転写因子である。

私共は、培養神経細胞を種々の神経毒に暴露するとNfil3の発現量が増加することを見出した。さらに、培養神経細胞にNfil3を強

制発現すると、神経毒依存的な神経変性が顕著に抑制された。一方、Nfil3 を発現抑制すると、神経毒に対する脆弱性が亢進した。このことから、Nfil3 は神経保護を担うことが明らかになった。

そこで、Nfil3 が生体内で神経保護作用を示す可能性を検討するため、神経系特異的にNfil3 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルマウスと交配させて二重変異マウスを作製したところ、この二重変異マウスはALSモデルマウスと比較して、運動神経の変性が緩和され、症状の発症が顕著に遅延した。以上の結果から、Nfil3 の発現が神経変性の抑止に寄与するという知見が得られた。

本研究は、「神経細胞に内在する自己保護システムを活性化することでALSを含む神経変性疾患を予防・遅延する」という治療戦略の有効性を強く支持する。さらに本研究で見出したNfil3 を介した神経保護システムについて、その活性化経路や下流遺伝子群の解析が進捗すれば、このようなシステムを人為的に活性化する薬剤・手法の開発につながる可能性があり、神経変性疾患に対する新たな治療戦略の指針を提供しうる。

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 3 件)

①Koizumi, H., Kurabayashi, N., Watanabe, Y. and Sanada K. Increased anxiety in offspring reared by circadian Clock mutant mice. PLoS ONE, 掲載決定済. 査読有

②Asada, N. and Sanada, K. (2010) LKB1-mediated spatial control of GSK3 β and APC required for centrosomal forward movement and neuronal migration in the developing neocortex. J. Neurosci. 30, 8852-8865. 査読有

③Kurabayashi, N., Hirota, T., Sakai, M., Sanada, K. and Fukada Y. (2010) DYRK1A and glycogen synthase kinase 3 β , a dual-kinase mechanism directing proteosomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. Mol. Cell. Biol. 30, 1757-1768. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

①Kamon Sanada: G protein-coupled receptor

signaling required for neurogenesis in the developing neocortex. 第 85 回日本生化学会大会、2012.12.15、福岡国際会議場 (福岡県)

②小泉皓子、玉井総一、眞田佳門: 概日時計に異常を呈する母マウスによる養育が仔の情動に及ぼす影響. 第 85 回日本生化学会大会、2012.12.15、福岡国際会議場 (福岡県)

③Yasuki Naito, Kamon Sanada: AMP-activated protein kinase regulates neuronal migration in the developing neocortex. 第 85 回日本生化学会大会、2012.12.15、福岡国際会議場 (福岡県)

④倉林伸博、玉井総一、眞田佳門: 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける Nfil3 の神経保護作用. 第 85 回日本生化学会大会、2012.12.15、福岡国際会議場 (福岡県)

⑤Naito Yasuki, Naoyuki Asada, Kamon Sanada : Role of AMP-activated protein kinase in neuronal migration in the developing neocortex. International Symposium "Neocortical Organization", 2012.3.12、岡崎国際会議場 (愛知県)

⑥Kamon Sanada : Role of polarity protein LKB1 in neuronal migration. 第 3 4 回神経科学大会、2011.9.16、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑦Kamon Sanada、Naoyuki Asada, Yasuki Naito : Centrosomal forward movement in migrating neocortical neurons is mediated by LKB1-GSK3 β -APC pathway. 第 3 4 回日本分子生物学会年会、2011.12.16、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑧Naoyuki Asada, Kamon Sanada : 神経細胞移動において LKB1-GSK3 β -APC シグナリングは中心体の前方移動を制御する. Neuro2010, 2010.9.3、神戸コンベンションセンター (兵庫県)

⑨Naoyuki Asada, Kamon Sanada : LKB1-mediated control of GSK3 β and APC regulates centrosomal forward movement and neuronal migration. Neuroscience 2010、2010.11.14、San Diego Convention Center (USA)

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/mgr1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞田 佳門 (SANADA YOSHIKADO)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：50431896

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：