

## 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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500330

研究課題名（和文） 発生過程の大脳皮質において、脳室下帯が形成される意義

研究課題名（英文） Biological importance of the formation of subventricular zone during the cortical development

研究代表者

田畑 秀典 (Tabata Hidenori)

慶應義塾大学・医学部・講師（非常勤）

研究者番号：80301761

研究成果の概要（和文）：

哺乳類大脳皮質神経細胞は脳室に面した脳室帯、あるいは脳室下帯で産生され、脳表面側へと移動して整然と配置される。脳室下帯での神経産生はヒトを含めた霊長類では著しく増加しており、注目されている。一方、我々はマウス脳室下帯下部には分裂を終了して多極性細胞の形態をとる細胞が集積していること、分裂細胞は脳室下帯に広く分布することを報告した。本研究では脳室下帯多極性細胞の活発な突起伸縮がラメリポディンタンパク質によること、また様々な細胞マーカーを用いた解析から、マウス脳室下帯の組織構築が霊長類のものと良く一致することを観察した。

研究成果の概要（英文）：

During the development of mammalian cerebral cortex, cortical neurons are generated in the ventricular zone lining the ventricle, or in the subventricular zone (SVZ), and migrate toward the brain surface. The neurogenesis in the SVZ is greatly enhanced in the primate, suggesting its importance for the brain evolution in primates. On the other hand, we have previously reported that postmitotic multipolar cells are accumulated in the lower part of the SVZ, and proliferative cells are distributed in the SVZ widely. In this study, we revealed that Lamellipodin regulates the dynamic extension and retraction of the processes of multipolar cells in the lower SVZ. We also observed that the histological organizations of the SVZ in mice and primates were well correlated each other.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、マウス大脳皮質形成後期過程における神経細胞産生過程の詳細な観察から、脳室

帯で最終分裂を終了した神経細胞は、apical process により脳室面との接触を保ちながら、

しばらく脳室帯に留まった後、脳室面との接触を断ち、多極性細胞の形態をとりながら脳室帯の直上にある多極性細胞蓄積帯 (multipolar cell accumulation zone ; MAZ) にさらに留まること、一方、脳室帯を出た後もさらに分裂する集団は、長い上行性突起を短縮させながら細胞体を引き上げる細胞体トランスロケーションの様式により脳室帯を離脱し、MAZ を含めて脳室下帯に広く分布することを観察し、報告した。両者は脳室帯を離脱するタイミングが異なることから、前者は slowly exiting population (SEP)、後者は rapidly exiting population (REP) と呼ぶ。以上の観察事実から、MAZ には SEP が特異的に集積することが分かり、そこには何らかの生物学的意義があることが推測された。MAZ 内で多極性細胞はその複数の突起を活発に伸縮させ、やがて軸索を接線方向へ伸ばし、細胞体は放射状方向への移動を再開する。このことから、多極性細胞の突起の運動は、軸索や移動方向を知るための探索運動である可能性が考えられた。また、本研究期間中に霊長類脳室下帯内に自己複製能を持つ神経幹細胞が存在することが観察され、これによりヒト脳の巨大化が達成されると報告された。その形態や細胞動態は、我々の観察していた REP と類似しており、その相同性を解明することが重要となってきた。

## 2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究課題では、以下の2点を検討した。

(1) 多極性細胞における突起伸縮運動の分子機構

(2) マウスと霊長類における脳室下帯の組織構築の対応関係

## 3. 研究の方法

(1) 多極性細胞の突起運動の分子機構：

多極性細胞の探索的な突起伸縮は、軸索の先端に形成される成長円錐と類似点が多い。成長円錐はアクチン線維に裏打ちされた糸状仮足や葉状仮足を発達させ、アクチン線維の重合/脱重合の調節により、高い運動性を実現し、周囲の情報を読み取りながら、軸索を正しい方向へと導く。従って、多極性細胞の活発な突起伸縮運動もアクチン線維のリモデリングにより行われている可能性が高く、その調節機構に中心的な役割を持つことが知られるラメリポディンタンパク質を候補として、多極性細胞突起形成への役割を検討した。

## (2) 哺乳類脳室下帯の組織構築：

霊長類脳室下帯神経幹細胞は basal radial glia (bRG) と呼ばれ、特徴的な長い上行性突起と神経幹細胞としてのマーカーを発現する。一方、我々は MAZ に集積する多極性細胞はほとんどが分裂を終了した幼若神経細胞であることを観察しており、これを分裂能のある basal progenitor とすることに我々は疑問を持っている。これらのことを確かめるため、脳室下帯に発現する様々な分化マーカーの分布や子宮内電気穿孔法を用いた可視化による細胞形態の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 多極性細胞の突起運動の分子機構：

ラメリポディンは細胞内で働くアダプター分子であり、その PH ドメインで細胞膜のイノシトールリン脂質の一種、PI(3,4)P2 の存在する場所にアンカーされ、さらに FP4 ドメインを介して Ena/VASP ファミリータンパク質と結合する。これにより膜の特定の部分に集積した Ena/VASP が局所でアクチン線維の重合を促す。この働きにより多極性細胞の突起が形成される可能性に関して検討した (Yoshinaga, et al, 2012)。多極性細胞に

において、まずラメリポディンの発現を **short hairpin RNA (shRNA)** 発現ベクターの導入により抑制すると突起が少なくなることが確認され、この作用はラメリポディンの発現ベクターを同時に入れることで回復した。しかし、この際に **PH** ドメインを欠くラメリポディンを発現させても回復しなかった。つまり、ラメリポディンは実際に多極性細胞の突起形成に関与しており、その働きは **PH** ドメインに依存することが示唆された。また、**Ena/VASP** ファミリータンパク質をミトコンドリアに強制的に移行させる発現ベクターを導入しても同様に突起の減少が見られ、さらに **PI(3,4)P2** を合成する酵素である **SHIP2** の発現を **shRNA** ベクターにより抑制させた場合にも、同様に突起の減少が観察された。また、ラメリポディンの発現を抑制させた上で、**Ena/VASP** ファミリータンパク質を強制的に細胞膜に移行させた場合には、突起の数が回復した。こうした実験から、多極性細胞の突起形成とその伸縮運動には、**PI(3,4)P2**、ラメリポディン、**Ena/VASP** ファミリータンパク質、そしてアクチン線維へとつながる調節経路が関わっていることが証明された。この経路は成長円錐の運動に関わるものと基本的に同一であり、多極性細胞の探索的な行動は、成長円錐にその動態が似ているだけでなく、動きの分子機構も共通しており、このことは多極性細胞の突起運動も外界のシグナルを感じとる機構として働いている可能性を強く支持する。

## (2) 哺乳類脳室下帯の組織構築：

ヒト脳室下帯は大きく発達し、脳表面側の **outer SVZ (OSVZ)** と脳室側の **inner SVZ (ISVZ)** が区別される。**ISVZ** は様々な方向性を持った細胞が高密度で存在する。これに対し、**OSVZ** の細胞は放射方向に比較的揃った

カラム状の組織像を呈する。ヒト胎児の発生過程では **OSVZ** は大きく厚みを増すのに対して、**ISVZ** の厚みはほとんど変化しない。ヒト脳室下帯神経幹細胞の細胞動態が **Hansen** らにより記載された (**Hansen et al, 2010**)。これらの細胞は長い上行性突起を持ち、ちょうど **VZ** 内の放射状グリアと同様に、分裂に伴って上行性突起を受け継いだ方が次の分裂へと進み、受け継がなかった方は神経細胞になるか、もしくはさらにもう一回だけ分裂して2つの神経細胞を生じる **intermediate progenitor (IP)** となる。つまり上行性突起を持つこれらの細胞は自己複製能を持つ神経幹細胞である。これらの細胞は **OSVZ radial glia like (oRG)** 細胞と呼ばれたが、こうした細胞は **ISVZ** を含めて **SVZ** 内に広く分布することが確かめられ、**basal radial glia (bRG)** とも呼ばれる。**bRG** は当初ヒトや霊長類に特異的な細胞で、これにより神経細胞の膨大な産生が可能になったとされた。さて、このようなヒトを含めた霊長類脳室下帯の組織構築は、我々の観察したマウス脳室下帯と良く一致している。まず、脳室帯の上にはマウスでは **MAZ** があり、**SEP** が多極性細胞として高密度に集積している。霊長類では対応する場所に **ISVZ** があり、ランダムな方向性を持った細胞が高密度に存在する。この組織像は多極性細胞の集積を反映している可能性を強く示唆する。マウスでは分裂能を持ち、上行性突起を持った **REP** が **MAZ** を含めて **SVZ** 内に広く分散している。霊長類では **bRG** が同様の形態を持ち、**SVZ** 内に広く分布する。**bRG** は幹細胞 (放射状グリア) のマーカーである **Pax6** や **Hes1**, **Sox2** を発現すると報告された。そこで、**REP** 集団にこのようなマーカーを発現する細胞が含まれるかを検討した (**Tabata, et al, 2012**)。その結果、上行性突起を持ち、**SVZ** 内に広く分

散する REP の一部の細胞は確かに Pax6 や Sox2 に陽性であった。しかしながら、REP のほとんどは分裂に伴い上行性突起を失い、2つの神経細胞を産生して分裂を終了する IP である。IP は多極性細胞であるという主張もあるが、我々は IP も bRG も長い上行性突起を持つことを観察しており、両者は本質的には同種の細胞（脳室下帯分裂細胞 = REP）であると考えられる。SVZ の組織構築に関して、我々はその下部（脳室に近い方）には非分裂細胞である多極性細胞が集積して MAZ を形成することを主張してきたが、この場所を IP の集積する場所であるとする意見もある。これに関してはすでにチミジン誘導体 (BrdU) の投与と電気穿孔法を組み合わせた方法により確認済みであるが (Tabata et al, 2009)、やはり世界的には多極性細胞は IP であるという意見が多いため、再度マーカーによる検討を行った (Tabata, et al, 2012)。分裂を終了して分化を開始した細胞に発現する NeuroD は MAZ にほぼ一致して密な発現が認められた。このことは多極性細胞が分裂期を終え、分化が進行していることを表す。逆に IP のマーカーとして頻繁に使われる Tbr2 は MAZ よりも脳室側の脳室帯内に密な発現を観察でき、MAZ 内では少なくなり、さらに脳表面側へと広がる脳室下帯内では広く分散して発現していた。やはり多極性細胞のほとんどは Tbr2 陰性であることが示された。また、脳室帯内 Tbr2 は、ほとんどが細胞周期のブレーキとして働く p27Kip を発現し、BrdU の取り込み活性も非常に低く、ほとんどは分裂を停止している細胞と考えられる。一方で脳室下帯に分散して存在する Tbr2 陽性細胞は p27Kip にほとんど陰性であり、BrdU の取り込み率も高いため、これらは IP であろうと考えられた。すなわち Tbr2 の全てが IP では無いことが示唆

された。現在、Tbr2 が密に染まる VZ 内の部位が霊長類の ISVZ に相当するという議論があり、これは修正が必要であると考えられる。

#### 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)

[雑誌論文] (計 8 件)

① A phosphatidylinositol lipids system, Lamellipodin and Ena/VASP regulate dynamic morphology of multipolar migrating cells in the developing cerebral cortex. Satoshi Yoshinaga, Takahiro Ohkubo, Shinji Sasaki, Mutsuo Nuriya, Yukino Ogawa, Masato Yasui, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima. *J. Neurosci.*, 32(34), 11643-11656 (2012). (H.T. and K.N. are corresponding authors) 査読有り

② Cytoarchitecture of mouse and human subventricular zone in developing cerebral neocortex. Hidenori Tabata, Satoshi Yoshinaga, and Kazunori Nakajima. *Exp. Brain Res.*, 216 (2), 161-168 (2012). 査読有り

③ Segregation and pathfinding of callosal axons through EphA3 signaling. Mitsuaki Nishikimi, Koji Oishi, Hidenori Tabata, Kenichi Torii, and Kazunori Nakajima. *J. Neurosci.*, 31(45), 16251-16260 (2011). 査読有り

④ Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. Yuichi Tamura, Keisuke Matsumura, Motoaki Sano, Hidenori Tabata, Kensuke Kimura, Masaki

Ieda, Takahide Arai, Yohei Ohno, Hideaki Kanazawa, Shinsuke Yuasa, Ruri Kaneda, Shinji Makino, Kazunori Nakajima, Hideyuki Okano, and Keiichi Fukuda. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 31 (3), 582-589 (2011). 査読有り

⑤ Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain. Kazunobu Sawamoto, Yuki Hirota, Clara Alfaro-Cervello, Mario Soriano-Navarro, Xiaoping He, Yoshika Hayakawa-Yano, Masayuki Yamada, Keigo Hikishima, Hidenori Tabata, Akio Iwanami, Kazunori Nakajima, Yoshiaki Toyama, Toshio Itoh, Arturo Alvarez-Buylla, Jose Manuel Garcia-Verdugo, and Hideyuki Okano. *J. Comp. Neurol.*, 519 (4), 690-713 (2011). 査読有り

⑥ Ectopic Reelin induces neuronal aggregation with a normal birthdate-dependent "inside-out" alignment in the developing neocortex. Ken-ichiro Kubo, Takao Honda, Kenji Tomita, Katsutoshi Sekine, Kazuhiro Ishii, Asuka Uto, Kazuma Kobayashi, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima. *J. Neurosci.*, 30 (33), 10953-10966 (2010). 査読有り

⑦ Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor activity resulted in aberrant neuronal migration caused by delayed morphological development in the mouse neocortex. Shigeo Uchino, Takae Hirasawa,

Hidenori Tabata, Yuko Gonda, Chikako Waga, Yumiko Ondo, Kazunori Nakajima, and Shinichi Kohsaka. *Neuroscience*, 169, 609-618 (2010). (S. Uchino, T. Hirasawa, and H. Tabata are co-first authors.) 査読有り

⑧ Role of dual leucine zipper-bearing kinase (DLK/MUK/ZPK) in axonal growth. Kaoru Eto, Takeshi Kawauchi, Makiko Osawa, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima. *Neurosci. Res.*, 66, 37-45 (2010). (H. Tabata and K. Nakajima are corresponding authors) 査読有り

[学会発表] (計 31 件)

① 招待講演：大脳皮質発生過程における脳室下帯分裂細胞の動態解析、田畑秀典、第 54 回「脳の医学・生物学会」(名古屋)、平成 25 年 2 月 16 日

② 田畑秀典、八谷剛史、榊原康文、仲嶋一範。 “マウス大脳皮質発生過程における脳室下帯分裂細胞の産生と維持の調節 (Regulation of the production and maintenance of the progenitors in the subventricular zone during the mouse cortical development)” (oral)

第 35 回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、名古屋 (愛知県)、2012 年 9 月 18-21 日

③ 田畑秀典、八谷剛史、榊原康文、仲嶋一範 “霊長類進化過程で大脳皮質発達に寄与した遺伝子の機能的、生物情報科学的探索 (Functional and bioinformatic screening for the genes involved in the expansion of cerebral cortex during the primate evolution)” 第 34 回日本神経科学大会、横浜、

2011年9月14-17日

④ Hidenori Tabata, Megumi Sasaki, Hirohide Takebayashi, Kazuhiro Ikenaka, and Kazunori Nakajima “Migration profile of glial progenitors derived from the cerebral cortical ventricular zone” Conference on “Frontiers in Cell Migration & Mechanotransduction”, Bethesda, MD, U.S.A., 2011年5月24-26日

⑤ Hidenori Tabata, Tsuyoshi Hachiya, Yasubumi Sakakibara, and Kazunori Nakajima (田畑秀典、八谷剛史、榊原康文、仲嶋一範) “Screening for the genes that are involved in the production of non-surface-dividing cells during neocortical development and their evolutionary analyses” 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、\*集会中止のため、誌上発表

⑥ 田畑秀典、佐々木恵、竹林浩秀、池中一裕、仲嶋一範 “皮質脳室帯に由来するグリア前駆細胞の移動様式 (The migration of glial progenitors derived from the cortical ventricular zone)” 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010)、神戸、2010年9月2-4日

⑦ 田畑秀典、佐々木恵、仲嶋一範 “哺乳類大脳皮質形成後期において分裂を伴い速く移動する細胞集団の解析 (Investigation of the cell population that migrates quickly and divides during the late cortical plate development)” 第115回日本解剖学会総会・

全国学術集会、盛岡、2010年3月28-30日

⑧ 吉永怜史、大久保宇啓、佐々木慎二、田畑秀典、仲嶋一範 “大脳皮質発生において多極性移動神経細胞は2種類の異なる突起を伸長・退縮させる (Multipolar migrating neurons in the developing cerebral cortex have two distinct types of processes)” 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会、盛岡、2010年3月28-30日

⑨ 田畑秀典、仲嶋一範 “2種類の前駆細胞によるマウス大脳皮質錐体神経細胞産生の定量的解析” (poster) 定量生物学の会 第二回年会、大阪、2010年1月9-11日

〔図書〕 (計0件)

〔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 (非常勤)

研究者番号: 80301761

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし