

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22220004

研究課題名(和文) 大脳皮質抑制性ニューロン皮質内分布とシナプス結合決定のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms underlying intracortical distribution of inhibitory interneurons and their synaptic connections

研究代表者

村上 富士夫 (Murakami, Fujio)

大阪大学・生命機能研究科・名誉教授

研究者番号：20089882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 166,400,000円

研究成果の概要(和文)：介在ニューロン(IN)の移動の終了と最終分布位置決定の機構を解明すると共に、多様性出現の機構の解明を最終目的とした。その結果、INのin vivo imagingに世界で初めて成功し、辺縁帯で多方向へ、そして中間帯/脳室下帯では正中線方向に向かう移動を確認した。さらに移動の終了が内在的機構と外因性機構の両方によって制御されていることを示した。INが最終位置に分布する際には軸索と樹状突起を有するようになるが、この極性の獲得が移動細胞の極性を引き継ぐのではなく、新たに獲得されることを示した。また、INが正しく最終位置に分布するには辺縁帯における(ランダムウォーク様)移動が重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The present study was performed to gain insight into the mechanisms of migration termination and final distribution of cortical interneurons (CIs) within the neocortex. To this end we developed a system in which migrating CIs can be observed in living embryos. We found that the CIs migrate in all directions in the marginal zone (MZ) and medially in the intermediate/subventricular zones. We also found that the termination of migration is regulated both by intrinsic and extrinsic mechanisms using time-lapse imaging of dissociated CIs and cortical explants. At the final settlement CIs extend axons and dendrites. We carried out time-lapse imaging for days and found the polarity of migrating CIs is not inherited by mature neurons but rather they acquire a new polarity de novo. There is a variety of subtypes of CIs and each of them shows intracortical distribution of its own. We found that random walk-like migration of CIs in the MZ is required for the final distribution of CIs subtypes.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 抑制性介在ニューロン 移動の終了 皮質内最終分布 極性獲得

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質によって担われる高次機能は興奮性と抑制性ニューロンで構成される神経回路の働きに依存する。皮質を構成する神経細胞のうち後者の占める割合は2割程度であるものの、形態的にも、電気生理学的にも、分子的にも極めて多様である。そのため介在ニューロンによって形成される局所回路は極めて複雑であり、その機能の全容の解明には至っていない。

介在ニューロンの複雑さを理解するにはその構築プロセス、即ち発生の解明が有効なアプローチである。近年介在ニューロン発生の部位と、タイミングの違いによって多様性の一部が説明出来ることが明らかになってきた (Butt et al., 2005; Miyoshi et al., 2007)。このことは、介在ニューロンの多様性の一部は遺伝的に制御されていることを示しているが、それだけでは説明できないほど複雑な多様性を、介在ニューロンは有している。

介在ニューロンは大脳基底核原基に由来するが、誕生後接線方向への移動によって新皮質に到達する (Marín and Rubenstein, 2001; Marín and Rubenstein, 2003; Parnavelas, 2000)。最近の我々の研究により、これらのニューロンが、その後皮質板を通り抜けて辺縁帯 (MZ) に移動し、MZ で全方向に移動することが明らかになった (Tanaka et al., 2003; 2006; 2009)。またこれらの細胞のMZでの滞留は2日間にも及び、その間ランダムウォーク様の動きをする (Tanaka et al., 2009)。さらに、これらのニューロンは皮質板 (CP) に下降して、最終位置へと到達する (Hevner et al., 2004) が、この際にも正しい動きは示さない。このような一見確率論的な動きを示す介在ニューロンの移動が細胞自律的な機構だけによって規定されているとは考え難い。したがって、最終位置が完全に細胞自律的な機構によって制御されているとの説明は困難である。以上のような背景から、申請者らは介在ニューロンの最終位置が、細胞自律的な遺伝プログラムに加え、環境要因にも依存している可能性を考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では介在ニューロンの移動の終了と最終分布位置決定の機構を解明すると共にそれを切り口として多様性出現の機構の解明を目指した。特にシナプス活動を含む環境要因による影響を想定し、その関与の有無を検討する。また移動と興奮性細胞とのシナプス結合との関係も明らかにする。具体的にはまずリアルタイムイメージング、特にマウス胎仔からの *in vivo imaging* を駆使して辺縁帯から皮質板への介在ニューロンの移動のモードを解析する。その知見に基づき、皮質板への移動の分子機構の解明を進める。また、皮質板の最終位置の決定に環境因子(他の神経細胞からのシナプス入力を含む)が関与している可能性を検討するために、興奮性細胞の移動

に乱れを生じさせて、その影響を評価し、関与を示す結果が得られた場合はその分子機構を目指す。さらに、介在ニューロンの辺縁帯での移動の結果辿り着いた位置と、興奮性ニューロンからの投射との間の関係の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 抑制性ニューロンはどのようにして CP に降りていくのか。

① 接線方向の移動からの方向の転換

次のような仮説を立てて検討する。接線方向に移動していた細胞が MZ で次第に速度を落とし、最終的に停止する。そして停止した細胞が下に降りてゆく。これまでの研究において MZ でほとんど動かない stationary cell が見つかったこと (Tanaka et al., 2009) はこの考えと一致する。一方 stationary cell が長時間 MZ に留まっていることも観察されており、このことは上の考えと一見矛盾する。しかしこれは *in vitro* の実験であり、*in vivo* での観察系を用いて確認する。

② 辺縁帯から CP への下降のモード

介在ニューロンの CP への下降は単調なものであり、CP 内での接線方向への移動はほとんど起こらない可能性が高いが、接線方向への動きがあることも考えられる。これまでの我々の予備的な実験により、CP への下降は生後に起こることが確認されているため、この時期の固定標本の観察と *in vivo* 標本を用いた time lapse 解析をおこなうことでこの問題に迫る。

in vivo の観察では生きた胎仔の脳の中の細胞移動を深部 (CP) まで追う必要がある。この問題に対応するために、電気穿孔法を用いて標識した介在ニューロンのタイムラプス解析を、我々がこれまでに開発してきた *in vivo* 標本 (図1) に改良を加えて2光子励起レーザー顕微鏡を用いておこなう。

③ 一度 CP を通り抜けて MZ に移動した介在ニューロンが如何なる機構で CP に降りていくか。これにはいくつかの複雑な問題が関係する。具体的には、何故一旦通り抜けた CP にまた戻ってくるのか。MZ に到達した介在ニューロンが再び CP に向かうのは如何なる機構によるのか。

(2) 皮質板における介在ニューロンの移動制御のメカニズム

介在ニューロンが最終的に CP の中のどの深さに位置するようになるかは、移動を制御する機構と関連していると考えられる。実際介在ニューロンが辺縁帯から CP へと移動する際には顕著な移動速度の変化が起こる。即ち、それまで2極性であった細胞が多数の突起を伸縮させるようになるが、それに伴い移動速度も大幅に低下する。移動停止の機構としてはイ) 環境要因、ロ) 細胞内在的な機構による制御、そしてその組み合わせが考えられる。

4. 研究成果

本研究遂行の結果、下記の成果が得られた。

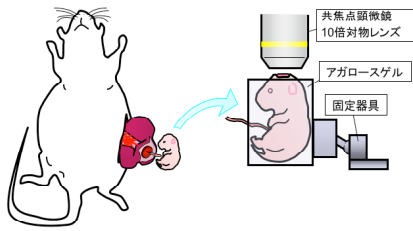


図 1

(1) 大脳皮質抑制性介在ニューロンの *in vivo* imaging:

図 1 のような標本を作製し、抑制性介在ニューロンを予め子宮内電気穿孔法で標識しておくことで、生きた胎仔の大脳皮質辺縁帯における移動の動態を世界で初めて観察することに成功した。その結果、抑制性介在ニューロンは全ての方向に向かって不規則に移動している様子が観察できた。また、複数の先導突起を伸ばして、そのうちの一本を選ぶことで方向転換を実現していた (論文⑭)。その後、技術的改良により、中間帯/脳室下帯を移動するニューロンの可視化にも成功した (論文①)。これらのニューロンは辺縁帯のニューロンとは異なり、正中線に向かって真っ直ぐに移動していた。このように皮質内をで接線方向への移動がおこる発生の比較的早い時期における *in vivo* イメージングには成功したものの、介在ニューロンが辺縁帯から皮質板へ降下する時期には脳の厚みが増すとともに脳及び頭蓋の透明度が低下することなどの理由により、可視化を実現することは出来なかった。

(2) 移動終了のメカニズム: 皮質抑制性介在ニューロンの移動の終了が外部からの要因によって制御されているのか、それとも内在的な要因によるのかを明らかにするために、2種類の *in vitro* の標本を用いて解析をおこなった。一つ目は解離培養系を用いたものであり、発生時期の異なるフィーダー細胞上での介在ニューロンの移動速度/距離を調べる方法であり、二つ目は異なる発生時期に異なる蛍光色を有するプラスミドを基底核原基に子宮内電気穿孔法で導入し、辺縁帯に上がってきた介在ニューロンの移動能を比較する方法であった。これらの研究から発生の進行にともなう移動能の低下は内在性の要因と外因性の要因の両方が協調して作用することによることが明らかになった (論文⑯)。

(3) 大脳皮質介在ニューロンの極性決定のメカニズム: 辺縁帯でランダムウォークを行

った介在ニューロンは成熟して神経回路の形成をおこなう。そのために先導突起を有する移動細胞から別の極性、すなわち樹状突起と軸索を有する成熟細胞の形態へと変化する。その際移動細胞の極性が引き継がれる可能性と新たに獲得される可能性が考えられる。この何れかが真実があるかを確かめるため、マウスが生まれる前後の時期に介在ニューロンの数日間という長時間亘る時系列観察をおこなった。その結果、軸索伸長開始直前には介在ニューロンは多極性の形態を示し (すなわち移動細胞としての極性を失い)、その後軸索の伸長が開始することが明らかになった (論文⑳)。

(4) 辺縁帯における移動と最終分布: 介在ニューロンは辺縁帯において長時間に亘ってランダムウォーク様の動きをする (Tanaka et al., 2009) が、それが皮質内最終分布の決定にどのような役割を果たすのかは明らかではなかった。この問題に取り組むために、辺縁帯を移動する介在ニューロンはケモカイン CXCR12 の受容体である CXCR4 を発現していることに着目し、辺縁帯を移動する時期特異的に CXCR4 の発現を抑制した。その結果、辺縁帯を移動する介在ニューロンの数が減少し、成熟マウスの大脳皮質尾側部と外側部におけるカルレチニン発現細胞とニューロペプチド Y 発現細胞の数がそれぞれ減少し、表層部におけるソマトスタチン陽性細胞が相対的に減少した (論文㉑)。このことは辺縁帯における (ランダムウォーク様) 移動が、介在ニューロンの皮質内最終分布に重要であることを示している。

(5) 辺縁帯から皮質板への移動の基質: 辺縁帯から皮質板への移動の際に用いるであろう基質を明らかにするために、2つの可能性を調べた。その一つは興奮性ニューロンの尖頭樹状突起であり、2番目は放射状グリアの突起である。前者は皮質外套部への子宮内電気穿孔法で、後者は抗ネスチン抗体を用いて可視化し、介在ニューロンとこれらの構造物との関係に注目し、介在ニューロンが皮質板へ降下する時期と思われる生後間もない時期に観察を行った。その結果、予想に反して介在ニューロンはその何れとも密接な関係を示す証拠は得られなかった。

(6) まとめ: 以上のように本研究で当初に計画した目的の一部は達成できなかった。しかし、介在ニューロンの皮質内移動、移動の機構、極性獲得、最終分布の決定機構などに関して、予想を越える多くの成果が得られた。

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 23 件)

① Higuchi, Y., Kita, Y. and Murakami, F. *In vivo* imaging of cortical interneurons migrating in the intermediate/subventricular zones. *Neurosci Res.*

- S0168-0102(16)30004-9. 2016, doi: 10.1016/j.neures.2016.03.005 査読有り
- ② Torigoe, M., Yamauchi, K., Kimura, T., Uemura, Y., and Murakami, F. Evidence that the Laminar Fate of LGE/CGE-Derived Neocortical Interneurons Is Dependent on Their Progenitor Domains. *J. Neurosci* 36: 2044-2056, 2016, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3550-15.2016 査読有り
- ③ Hatanaka, Y., Zhu, Y., Torigoe, M., Kita, Y., and Murakami, F. From migration to settlement: the pathways, migration modes and dynamics of neurons in the developing brain. *Proc Jpn Acad. Ser B*, 92, 1-19. 2016, doi.org/10.2183/pjab.92.1 査読有り
- ④ Torigoe, M., Yamauchi, K., Zhu, Y., Kobayashi, H and Murakami, F. Association of astrocytes with neurons and astrocytes derived from distinct progenitor domains in the subpallium. *Sci Rep* 5: 12258, 2015 doi:10.1038/srep12258 査読有り
- ⑤ Zhu, Y., Matsumoto, T., Nagasawa, T., Mackay, F., Murakami, F. Chemokine Signaling Controls Integrity of Radial Glial Scaffold in Developing Spinal Cord and Consequential Proper Position of Boundary Cap Cells. *J. Neurosci* 35, 9211-9224, 2015, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0156-15.2015 査読有り
- ⑥ Kobayashi, H., Saragai, S., Naito, A., Ichio, K., Kawauchi, D, Murakami, F. *Calm1* signaling pathway is essential for the migration of mouse precerebellar neurons. *Development* 42, 375-384, 2015, doi: 10.1242/dev.112680 査読有り
- ⑦ Kita, Y., Tanaka, K., Murakami, F. Specific labeling of climbing fibers shows early synaptic interactions with immature Purkinje cells in the prenatal cerebellum. *Dev. Neurobiol.* 75, 9257-934, 2015, doi: 10.1002/dneu.22259 査読有り
- ⑧ Kimura, T. and Murakami, F. Evidence that dendritic mitochondria negatively regulate dendritic branching in pyramidal neurons in the neocortex. *J. Neurosci* 34, 6938-6951, 2013, doi:10.1523/JNEUROSCI.5095-13.2014 査読有り
- ⑨ Torigoe, M., Yamauchi, K., Tamada, A., Matsuda, I., Aiba, A., Castellani, V., and Murakami, F. Role of neuropilin-2 in the ipsilateral growth of midbrain dopaminergic axons. *Eur J Neurosci* 37: 1573-1583, 2013, doi: 10.1111/ejn.12190 査読有り
- ⑩ Shinohara, M., Zhu, Y., and Murakami, F. Four-dimensional analysis of nucleogenesis of the pontine nucleus in the hindbrain. *J. Comp Neurol* 521, 3340-3357, 2013, doi: 10.1002/cne.23353 査読有り
- ⑪ Kita, Y., Kawakami, K., Takahashi, Y and Murakami, F. Development of cerebellar neurons and glias revealed by in utero electroporation: Golgi-like labeling of cerebellar neurons and glias. *PLoS One* 8:7. e70091. 2013, doi.org/10.1371/journal.pone.0070091 査読有り
- ⑫ Kobayashi, H., Kawauchi, D., Hashimoto, Y., Ogata, T., and Murakami, F. The control of precerebellar neuron migration by RNA-binding protein *Csde1*. *Neurosci* 253,292-303, 2013 doi:10.1016/j.neuroscience.2013.08.055 査読有り

- ⑬ Luccardini, C., Hennekinne, L., Viou, L., Yanagida, M., Murakami, F., Kessaris, N., Ma, X., Adelstein, RS., Mage, R-S., and Metin, C. N-cadherin sustains motility and polarity of future cortical interneurons during tangential migration. *J. Neurosci* 33, 18149-18160, 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0593-13.2013 査読有り
- ⑭ Yanagida, M., Miyoshi, R., Toyokuni, R., Zhu, Y., and Murakami, F. Dynamics of the leading process, nucleus, and Golgi apparatus of migrating cortical interneurons in living mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109:16737-16742, 2012, doi: 10.1073/pnas.1209166109 査読有り
- ⑮ Zhu, Y., and Murakami, F. Chemokine CXCL12 and its receptors in the developing central nervous system: Emerging themes and future perspectives. *Dev Neurobiol* 72, 1349-1362, 2012, doi: 10.1002/dneu.22041 査読有り
- ⑯ Inamura, N., Kimura, T., Tada, S., Kurahashi, T., Yanagida, Y., Yanagawa, Y., Ikenaka, K. and Murakami, F. Intrinsic and extrinsic mechanisms control the termination of cortical interneuron migration. *J Neurosci* 32, 6032-6042, 2012, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3446-11.2012 査読有り
- ⑰ Hatanaka, Y., Yamauchi, K. and Murakami, F. Formation of Axon-dendrite polarity in situ: Initiation of axons from polarized and non-polarized cells. *Dev Growth Differ* 54, 398-407, 2012, doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01344.x 査読有り
- ⑱ Wada, Y., Yamauchi, K., Murakami, F. and Tanabe, Y. Temporally- and spatially regulated generation of distinct descendants by sonic hedgehog-expressing progenitors in the forebrain. *Dev Neurobiol* 72, 1099-1113, 2012, doi: 10.1002/dneu.20861 査読有り
- ⑲ Nishida, K., Nakayama, K., Yoshimura, S. and Murakami, F. Role of Neph2 in pontine nuclei formation in the developing hindbrain. *Mol Cell Neurosci* 46: 662-670, 2011, doi: 10.1016/j.mcn.2011.01.007 査読有り
- ⑳ Yamasaki, E., Tanaka, DH., Yanagawa, Y. and Murakami, F. Cortical GABAergic Interneurons Transiently Assume a Sea Urchin-Like Nonpolarized Shape before Axon Initiation. *J Neurosci* 30, 15221-15227, 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1527-10.2010. 査読有り
- ㉑ Tanaka, DH., Mikami, S., Nagasawa, T., Miyazaki, J-I., Nakajima, K. and Murakami, F. CXCR4 is required for proper regional and laminar distribution of cortical somatostatin-, calretinin-, and neuropeptide y-expressing GABAergic interneurons. *Cereb Cortex* 20, 2810-2817, 2010, doi: 10.1093/cercor/bhq027 査読有り
- ㉒ Tamada, A., Kawase, S., Murakami, F. and Kamiguchi, H. Autonomous right-screw rotation of growth cone filopodia drives neurite turning. *J Cell Biol* 188, 429-441, 2010, doi: 10.1083/jcb.200906043 査読有り
- ㉓ Nishida, K., Hoshino, M., Kawaguchi, Y. and Murakami, F. Ptf1a directly controls expression of immunoglobulin superfamily molecules Neph1 and Neph3 in the developing central nervous system. *J Biol Chem* 285, 373-380, 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.060657 査読有り
- [図書] (計 1 件) 査読有り

Murakami, F. Cell migration analysis of cortical interneurons after electroporation pp81-92,
Chapter 6. In Electroporation Methods in Neuroscience, ed Tetsuichiro Saito, Human Press (Springer, New York), 2015, total pages: 195,
DOI:10.1007/978-1-4939-2459-2_6

[その他]
ホームページ等
http://publicationlist.org/fj_murakami

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上富士夫 (MURAKAMI, Fujio)
大阪大学名誉教授
研究者番号：2008982

(2) 研究分担者

宋 文杰 (SONG, Wen-Jie)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：90216573

山本亘彦 (YAMAMOTO, Nobuhiko)
大阪大学大学院・生命機能研究科・教授
研究者番号：00191429