

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 28日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500310

研究課題名（和文）大脳皮質興奮性神経細胞の軸索形成過程と皮質間線維の発達過程の解析

研究課題名（英文）Analysis of axonal formation and extension from excitatory cortical neurons

研究代表者

畠中 由美子 (HATANAKA YUMIKO)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・特別協力研究員

研究者番号：40271548

研究成果の概要（和文）：大脳皮質の皮質外投射ならびに連合・交連の皮質間投射線維の初期形成過程と発達過程を明らかにするため、興奮性神経細胞を標識してその形態変化を調べた。その結果、まず中間帯で多極性の形態を示した後、軸索を形成し、その後皮質板に移動することで初期投射パターンを形成することが明らかとなった。これら神経細胞は無極性状態から極性を獲得すると思われる。この形成過程は成熟神経細胞の投射パターンに依存せず、すべての皮質興奮性神経細胞に共通すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To clarify axonal formation and development of excitatory neurons in the mouse cerebral cortex, we labeled the ventricular zone cells by electroporation and examined morphological changes of their progeny. Our observation indicated that excitatory cortical neurons with multipolar shape in the intermediate zone initiate directed axon outgrowth before radial migration into the cortical plate, suggesting that neuronal polarity in these cells is established *de novo* from a nonpolarized stage. This process seems to be a common trait among excitatory cortical neurons, which show variety of projection patterns in later development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経発生・分化・神経回路形成・エレクトロポレーション・イメージング

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質では、皮質外領域と皮質を結ぶ線維に加え、同側・対側皮質間の領域を結ぶ線維が非常に発達している。これらの線維は、主に興奮性神経細胞から構成されており、結合様式から、皮質下投射と皮質間を結ぶ連合・

交連ニューロンに分類される。各ニューロンは層特異的な分布を示すが、その線維はまず共通して細胞体から白質に向かって走行した後、白質内で向きを変え、脳表面に平行になるよう上行性または下行性に走行する。高次脳機能を発揮するために、これらの結合は

重要な役割を持つが、その複雑さのため、その形成と発達過程、特に皮質間線維の発達については未解明な部分が多く残されている。

(1) 初期軸索形成過程の解析

神経細胞は軸索と樹状突起という極性 (neuron polarity) を持っており、これが神経細胞の情報の方向性を決めている。これまで、極性形成機構について、主に海馬神経細胞の分散培養系が解析モデルとして使われてきた。この系において、神経細胞は複数の短い突起をダイナミックに伸縮させる“無極性状態”を経て軸索を形成 (極性獲得) することが知られている。一方、生体内の網膜神経節細胞などは、神経上皮の頂底極性を引き継いで神経極性を形成することが報告されている。実際の生体内で、神経細胞は上皮の極性を引き継いで軸索を形成すると一般化されるのか、あるいは新たに極性獲得する場合があるのか、議論の対象となっていた。

大脳皮質興奮性神経細胞は、皮質脳室帯 (神経上皮) に由来する。分化する過程で「多極性細胞」と呼ばれる複数の短い突起を持つ状態になることから、これら細胞は、海馬分散培養のモデル系に似た、無極性状態を経ることが予想された。また、私たちは、表層に向かって移動している時には、すでに極性を確立しており、先端に伸びた突起が樹状 (先端) 突起に、後端に伸びた突起が軸索になることを観察している。これらより、興奮性神経細胞は生体内において無極性状態から軸索を形成し、極性を獲得すると予想した。

(2) 皮質間結合線維の初期発達過程の解析

大脳皮質興奮性細胞は投射神経である。皮質は6層構造より形成され、神経細胞は各層毎に典型的な投射パターンを示す。深層 (V、VI 層) の細胞は主に皮質外へ、浅層 (II, III 層) の細胞は皮質間で遠距離投射をする。一方、IV 層に分布する神経細胞は近傍に投射する。また、深層には、皮質間に投射する神経細胞も一部含まれている。これら投射パターンの異なる神経細胞がどのようにその軸索を形成し、発達させるのかについて統一された理解はまだない。もし軸索形成が(1)で考えられるように神経細胞の分化直後に起こるとすると、各層のそれぞれの神経細胞と軸索投射はどのような関係があるのだろうか? 初期投射とその発達過程を調べるこ

で、大脳皮質投射形成のルール、特に未解明な部分が多い皮質間投射形成のルールが明らかになることを期待した。

2. 研究の目的

大脳皮質内外の脳領域を結ぶ連合・交連・皮質下投射線維の発達を統一的に理解するため、(1)大脳皮質興奮性神経細胞の初期軸索形成過程と、(2)皮質間線維の初期発達過程を解析する。

3. 研究の方法

Cre/FloxP プラスミドを用いた電気穿孔法によって少数の大脳皮質脳室帯細胞を標識し、そこから派生する興奮性神経細胞の形態を固定切片並びにスライス培養系で解析した。

(1) 初期軸索形成過程の解析

① Cre/Flox プラスミドの準備と子宮内電気穿孔法

mCherry と、膜移行型配列 (GAP-43 の N 末 20 残基付加) を持つ EGFP (memEGFP) をそれぞれ pCALNL5 ベクター (Riken Bioresource Center, RDB:1826) の loxP 配列間にクローニングした。また、pCAGGS:Cre (大阪大学 宮崎先生より供与) と pCAGGS:EGFP、pCAGGS:mCherry を用意した。

胎生 12 日齢のマウスを使用した。麻酔下で親マウスの腹部を切開したのち、実体顕微鏡下で確認しながら、ガラスキャピラリーを使ってプラスミド溶液 (i) pCALNL5:mCherry + pCAGGS:Cre + pCAGGS:EGFP (位置マーカー)、あるいは (ii) pCALNL5:memEGFP + pCAGGS:Cre + pCAGGS:mCherry (同上) を胎仔の側脳室に注入した。ピンセット型電極を用いて5回の電気刺激 (30V, 75 msec ON, 950 msec OFF) を与え、脳室帯細胞にプラスミドを導入した。腹壁と皮膚をそれぞれ縫合したのち、母親マウスは保温して回復させ、目的の時期まで飼育した。

② 標識固定脳の観察

遺伝子導入から 24、30、あるいは 40 時間後に胎仔を回収し、4%パラフォルムアルデヒド-0.1 M リン酸緩衝液で浸漬固定した。固定した脳は 4%低融点アガロース/PBS に包埋し、150-200 μ m 厚の冠状断スライスにした。共焦点レーザー顕微鏡 (SP5, Leica) で撮影し細

胞の全体像を得た。

③ タイムラプス法

遺伝子導入から 32、あるいは 37 時間後に胎仔を回収し、4%低融点アガロース/PBS に包埋して 300 μm 厚の冠状断スライスを作成した。ガラス底の培養皿にのせ、その周囲をコラーゲン溶液で固定した。培地を加え、顕微鏡ステージ上の培養装置 (ONICS、東海ヒット) にセットし、95%酸素-5%CO₂ 混合ガスを流しながら、37°C で培養した。30 分に 1 回、20 倍の長作動距離レンズ (LUCPLFLN, NA = 0.45) を用い、共焦点レーザー顕微鏡 (Radiance 2000, BioRad) で Z 軸方向に焦点を変えながらターゲット細胞全体をカバーする像を撮影した。画像は ImageJ または Fiji を用いて明るさを反転し、コントラスト等を調整した。

(2) 皮質間線維の初期発達過程の解析

① 様々な時期の子宮内電気穿孔法と標識細胞の形態、ならびに層分布

胎生 13.5-16.5 日齢のマウスに対して (1) と同じプラスミドを用いて子宮内電気穿孔法を行った。2-4 日後に回収して、固定後に、150-200 μm 厚の冠状断スライスを作製した。細胞形態を共焦点レーザー顕微鏡で記録した。一部のマウスは生後 3 週齢まで飼育し、標識細胞の層分布を解析した。

② 免疫組織化学

胎生 12.5 日あるいは 13.5 日齢の脳にプラスミドを導入し、胎生 15 日齢に回収した。固定後、30% ショ糖/PBS に浸漬し、OCT コンパウンドで包埋した。クリオスタットで 16 μm 厚の冠状断切片とし、抗 Ctip2 抗体あるいは抗 Satb2 抗体で染色した。

4. 研究成果

(1) 初期軸索形成過程の解析

① Cre/Flox プラスミドを用いた子宮内電気穿孔法

蛍光タンパク質遺伝子を LoxP 配列間にはさんだ発現プラスミドと、非常に低濃度の Cre プラスミドを併用することにより (図 1 A)、少数の細胞を標識することが可能となった (図 1 B と C)。この結果、個々の細胞の形態を詳しく観察することが出来る様になった。

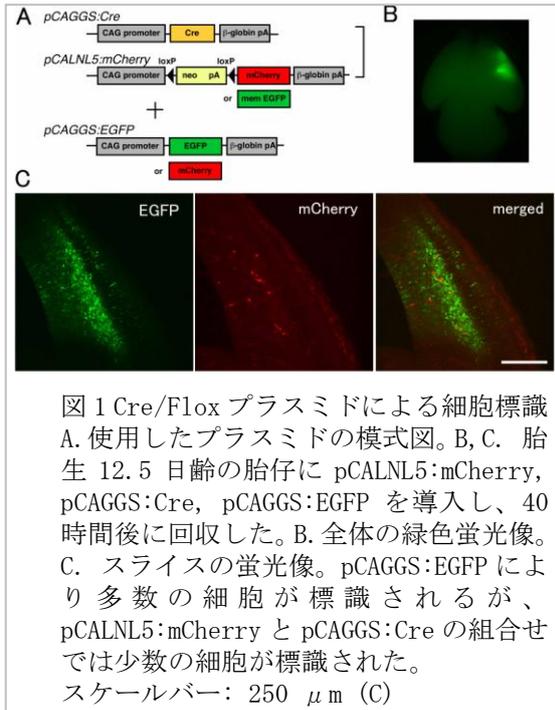


図 1 Cre/Flox プラスミドによる細胞標識
A. 使用したプラスミドの模式図。B, C. 胎生 12.5 日齢の胎仔に pCALNL5:mCherry, pCAGGS:Cre, pCAGGS:EGFP を導入し、40 時間後に回収した。B. 全体の緑色蛍光像。C. スライス上の蛍光像。pCAGGS:EGFP により多数の細胞が標識されるが、pCALNL5:mCherry と pCAGGS:Cre の組合せでは少数の細胞が標識された。
スケールバー: 250 μm (C)

② 固定標識脳の観察

プラスミド導入 40 時間後に標識細胞の形態を調べたところ、皮質板 (CP) に到達している細胞はみな中間帯 (IZ) 内を走行する長さ 100 μm 以上の突起を伸長させていた (図 2A、B、B'、CP cell、矢頭)。中間帯の細胞は、突起の形態から、(1) 複数の短い突起を持つもの (図 2C、IZ cell, type 1)、(2) 複数の短い突起と中間帯を走行する 1 本の長い突起を持つもの (図 2D、IZ cell, type 2)、そして (3) 中間帯を走行する 1 本の突起と脳表層

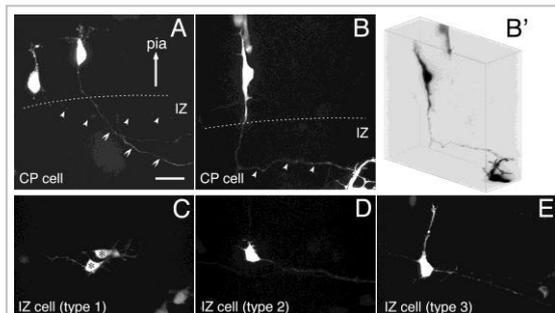


図 2 プラスミド導入後 40 時間で見られる標識細胞の形態

A, B. 皮質板 (CP) 内に到達した細胞。B', 明るさを反転させた B の 3 次元投影像。C-E 中間帯 (IZ) の細胞。突起の長さとその向きによって 3 タイプ (type 1-3) に分類した。
スケールバー: 20 μm (A)

に向けて少し太い突起を持つもの (図 2E, IZ cell, type 3)、の 3 つに分けることができ

た。標識後 24, 30, 40 時間で、各細胞の割合を調べると、最初 type 1 だけであったが、時間が経過するにつれ、type 2, 3 そして CP cell が現れ割合も増えることから、これらの順に細胞形態が変化することが推測された。

③ タイムラプスイメージングの結果

直接形態変化を調べるため、生体内の環境に近いスライス培養系を用い、タイムラプスイメージングを行った。その結果、脳室帯を離れた細胞は、数時間にわたって中間帯で数十 μm 程度の複数の突起を盛んに伸縮させたのち(図 3A)、突然一本の突起を中間帯内に伸ばし始め、その突起がそのまま軸索になること、その後、細胞体は脳表面に向かって移動することがわかった(図 3B)。これらの結果より、興奮性神経細胞は神経上皮の頂底極性を一度失ったのち、新たに神経細胞としての極性を獲得していると考えられた。

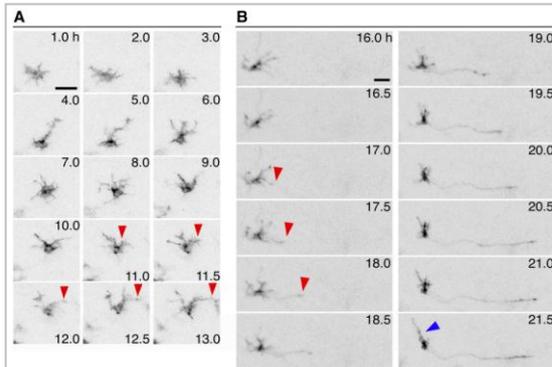


図 3 皮質興奮性細胞の極性獲得過程

A. 幼弱な皮質興奮性神経細胞が中間帯で神経突起を伸縮させているところ。胎生 12.5 日齢のマウス脳室帯細胞を膜移行型配列を持つ EGFP で標識した。32 時間後にスライスを作成し、培養しながら共焦点レーザー顕微鏡で記録した。標識細胞はしばらく突起の伸縮を繰り返した後、突然一本の突起(赤矢頭)を中間帯=将来の白質に伸ばし始め、その後この突起は軸索となった。B. 軸索(赤矢頭)が決まった後、残りの神経突起は先端突起を形成した(青矢頭)。その後細胞は表層に向かって移動した。

スケールバー: 20 μm (A) と (B)

大脳皮質興奮性神経細胞の軸索形成過程をまとめると、図 4 に示す様に 4 つのステージ (I-IV) に分けることが出来る。ステージ I : 脳室帯 (VZ) を離れた細胞が、中間帯 (IZ、あるいは脳室下帯 SVZ) で複数の短い突起を保持した細胞になり、数時間にわたってこれら

をダイナミックに伸縮させる段階。ステージ II : 新規に形成された 1 本の突起がそのまま中間帯を伸長していく段階。ステージ III : 皮質表層に向かって先端突起が形成される段階。ステージ IV : 細胞が双極性となり、表層に向かって移動することで L 字型の軸索が形成される段階である。

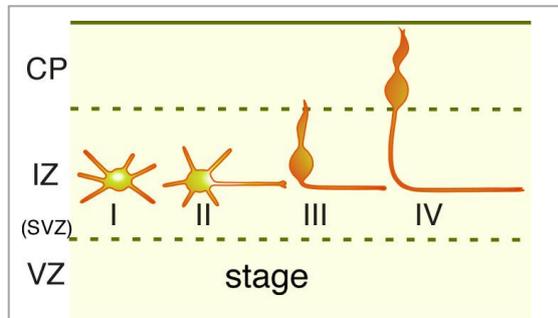


図 4 皮質興奮性細胞の初期軸索形成過程のまとめ (本文参照)

以上のように、皮質興奮性神経細胞の極性は皮質板への移動に先立って、中間帯にいるときに無極性の状態から新たに獲得されると考えられた。

(2) 皮質間線維の初期発達過程の解析

① 様々な時期の子宮内電気穿孔法と標識細胞の形態、ならびに層分布

(1)の実験で、胎生 12.5 日齢のマウス胎仔の脳室帯細胞に標識をした場合、深層神経細胞が標識される。これらは主に皮質外に投射するが、皮質間投射の神経細胞も同様に軸索を形成するのだろうか? 大脳皮質は、深層細胞が先に、浅層は後に分化する特徴を持つ。そこで、浅層細胞を標識するため、子宮内電気穿孔法を胎生 13.5 から 16.5 日齢の各胎仔に対しても行った。2-4 日後に、中間帯、皮質板における標識細胞の形態を調べたところ、皮質板に到達した細胞はみな中間帯を走行する長さ 100 μm 以上の突起を持っていた。また、胎生 12.5 日齢と同様に、中間帯では type1 から 3 までの細胞が見られた。これらことから、軸索の初期形成過程はこれら神経細胞間で共通していると考えられた。

興味深いことに胎生 12.5 日齢の遺伝子導入では、軸索伸長は外側か内側のいずれかであったが、胎生 13.5 日齢以降は内側方向にのみ伸長した。生後 3 週間で層分布を調べると、胎生 12.5 日齢標識の細胞は大部分が深層 (V, VI 層) に分布するのに対し、胎生 13.5

齢では IV 層を主として一部 V, VI 層に、胎生 14.5 日齢以降は II/III 層に分布した。以上の結果から、深層の皮質間投射、IV 層の近傍投射、ならびに II/III 層の皮質間投射神経は初期には共通して内側方向にまず初期軸索を形成することが推測された。

② 免疫組織化学

胎生 13.5 日以降に標識した細胞の性質を調べるため抗 Ctip2 抗体（皮質外投射神経細胞の分子マーカー）と抗 Satb2 抗体（交連神経細胞の分子マーカー）の染色を行った。その結果、これら細胞はほぼ ctip2 陰性、satb2 陽性であり、交連神経であることを示唆した。今後さらに、分子発現だけでなく、実際に交連線維を形成すること、ここから様々なタイプの皮質間結合が生じることなどを検証する必要があるが、以上の結果は、皮質間結合線維の初期発達過程が共通ルールを経て開始するという考えを支持するものであった。

過去の投射形成の研究は、逆行性標識による解析が主であったが、本研究では、細胞そのものを標識し、直接その形態を解析する方法を用いることで、生体内における初期軸索形成過程を明らかにすることができた。今後この方法を利用し、皮質間線維が発達し各領野間を結ぶ過程、そのメカニズムを明らかにする研究が期待できる。

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 2 件）

- ① Yumiko Hatanaka and Kenta Yamauchi, “Excitatory neurons with multipolar shape establish neuronal polarity by forming a tangentially oriented axon in the intermediate zone.” *Cerebral Cortex*, **23**, 105-113 (2013) 査読有
DOI: 10.1093/cerecor/bhr383
- ② Yumiko Hatanaka, Kenta Yamauchi, and Fujio Murakami, “Formation of axon-dendrite polarity *in situ*: Initiation of axons from polarized and non-polarized cells.” *Development, Growth & Differentiation*, **54**, 398-407 (2012) 査読有
DOI:10.1111/j.1440-169X.2012.01344.x
〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 畠中 由美子「マウス大脳皮質内線維連絡の発生過程」平成 24 年度学融合推進センター・共同プロジェクト研究会 脳の進化-大脳新皮質の起源を尋ねて-、2012 年 11 月 12 日、総合研究大学院大学 葉山キャンパス（葉山町）
- ② 畠中 由美子、山内 健太、並河 知宏、川口 泰雄 「初期投射パターンによる皮質興奮性神経細胞の分類」第 35 回日本神経科学学会大会 (Neuro2012) 2012 年 9 月 19 日、名古屋国際会議場（名古屋）
- ③ 畠中 由美子、山内 健太、川口 泰雄 “Excitatory cortical neurons with multipolar shape establish neuronal polarity by forming a tangentially oriented axon in the intermediate zone.” International Symposium “Neocortical Organization” 2012 年 2 月 12 日、岡崎コンファレンスセンター（岡崎）
- ④ 畠中 由美子、山内 健太「大脳皮質興奮性神経細胞は中間帯において多極性細胞から軸索を決定する」第 34 回日本神経科学学会大会 (Neuro2011)、2011 年 9 月 16 日、パシフィコ横浜（横浜）
- ⑤ 畠中 由美子、並河 知宏、山内 健太、「大脳皮質脳室帯由来の神経細胞の軸索形成過程の解析」、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)、2010 年 9 月 2 日、神戸コンベンションセンター（神戸）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.nips.ac.jp/circuit/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠中 由美子 (HATANAKA YUMIKO)
生理学研究所・大脳皮質機能研究系・
特別協力研究員
研究者番号：40271548

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：