

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:34310

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2010~2012

課題番号:22790998

研究課題名(和文)

神経細胞特異的なロコモーション移動の経時的な形態変化と神経極性獲得の機構

研究課題名(英文) Dissecting the Factors Involved in the Locomotion Mode of Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex.

研究代表者

西村 嘉晃(NISHIMURA YOSHIAKI)

同志社大学・高等研究教育機構・助教

研究者番号:50508603

研究成果の概要(和文):神経細胞移動は脳皮質形成に重要であり、異常を来すと様々な神経疾患を引き起こす。神経細胞移動の過程のうちロコモーション移動は、移動の最も長い距離を占めている重要な過程にも関わらず従来直接的な解析が困難だったため、その制御機構はほとんど不明だった。本研究ではスライス培養法を用いた機能阻害剤によるスクリーニングによりこの問題を解決し、いくつかの分子が核や先導突起の形態変化の制御を通じてロコモーション移動に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文): Neuronal migration is essential for proper cortical layer formation, as migration defects result in neurological disorders. The locomotion mode of neuronal migration covers most of the migration route and thereby is the main contributor to cortical layer formation. However, analysis of the molecular mechanisms regulating this mode is difficult. In this study, we used an ex vivo chemical inhibitor screening, allowing us to directly analyze the locomotion mode of migration, and found several regulatory molecules regulating the locomotion mode.

交付決定額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野:小児科学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・小児科学

キーワード:発達小児科学

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質形成過程において、脳室帯を出た神経細胞はまず多極性細胞になり、その後極性を獲得して一本の先導突起を持つロコモーション細胞となり脳表層までの長い距離を移動し、整然とした層構造を形成する。層構造形成の異常

により滑脳症などの精神遅滞を伴う脳疾患が引き起こされることが知られていることから、神経細胞移動は脳が高次機能を発揮するための必須段階であると考えられる。研究開始当初所属していた研究グループは、当初までに神経細胞移動における多極性細胞の形態形成や先導突起

形成を制御する分子経路を報告してきた。さらに我々は Rac1 の上流因子である P-Rex1 および PAK1 が神経細胞移動に関わることを明らかにしており、神経細胞移動を制御するいくつかの分子および分子経路が明らかとなってきた。しかし、ロコモーション移動に関しては、移動の最も長い距離を占めている重要な過程にも関わらずその制御機構はほとんど分かっていなかった。その理由として、「ロコモーション移動は多極性などの過程を経た後に行われるため、従来の実験手法では二次的な影響を排して直接特定の分子の機能を抑制する実験が困難であった」という問題点が存在した。

2. 研究の目的

大脳皮質形成過程において上述した問題のため研究開始当初まで直接的な解析がほとんどなされてこなかったロコモーション様式の移動に関して、移動を制御する分子群を見出し、また、移動に伴う神経細胞の時間依存的な形態変化がどのような分子によって制御されているかを明らかにすることにより、ロコモーション移動を分子的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではマウス胎仔脳に簡便に外来遺伝子を導入することができる「子宮内電ポレーション法」を用いて、移動神経細胞の細胞形態を EGFP で、また（移動には核の動態が重要であると考えられるので）核を Ds-Red で可視化した大脳皮質のスライスをタイムラプス顕微鏡下で培養し、その培養液中に様々な分子に対する機能阻害剤を添加することにより特定の分子の機能を抑制する実験を行い、ロコモーション細胞の移動に関わる分子をスクリーニングした（図1）。さらに一つ一つのロコモーション細胞をより詳細な時間間隔で高倍率で観察することにより、ロコモーション細胞の時間依存的な形態変化を

制御する分子機構を解析した。

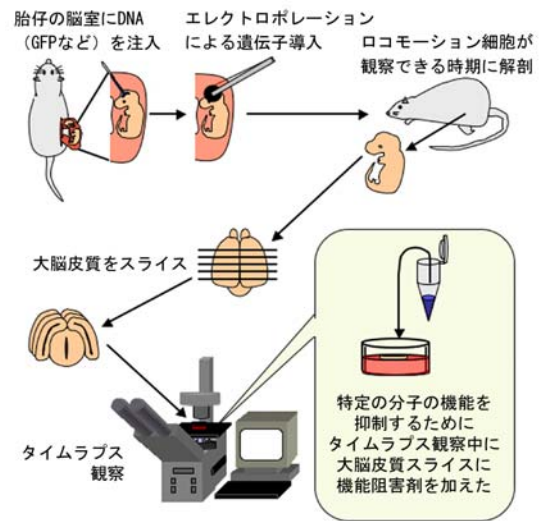


図1 本研究で用いた実験系

4. 研究成果

(1) ロコモーション移動に関与する分子を調べるため、上述の実験系により機能阻害剤を用いた分子のスクリーニングを行った。その結果、Ro31-8220、Gö6976、Rottlerin などの機能阻害剤の添加によりロコモーション移動に異常が生じることが確認された。また細胞骨格系への影響を調べるために大脳皮質の初代培養細胞にこれらの機能阻害剤を添加すると、Rottlerin などの添加により微小管の配向に影響を与えることが観察された。

(2) 神経細胞移動の過程は、先端突起の伸長・核の移動、後方突起の退縮など複数の段階が連続的に行われるため、次にスクリーニングによって得られた阻害剤の標的分子群がそれぞれ神経細胞移動のどの段階を制御しているかを明らかにすることにより、ロコモーション移動の機構を総合的に理解することを目指した。

そこで、一つ一つのロコモーション細胞の細胞体の移動速度や形態変化、先端突起や軸索の伸長過程など時間依存的なロコモーション細胞の形態変化を詳細に調べるために、タイムラプス観察の系を改良し、高倍率のレンズを用いて

短い時間間隔での撮影を行うことにより、スクリーニングによって得られた阻害剤の標的分子が神経細胞移動に伴う形態変化のどの段階に関与しているかを調べた。その結果、核の形態変化、先端突起の形態変化に Cdk5 などの分子が関与していることが示され、複数の段階が連続的に行われることによってなされるロコモーション移動の機構の一端を明らかにすることができた。

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 3 件)

① Hidenori Ito, Rika Morishita, Kaori Sudo, Yoshiaki V. Nishimura, Yutaka Inaguma, Ikuko Iwamoto, Koh-ichi Nagata. “Biochemical and morphological characterization of MAGI-1 in neuronal tissue.”

J Neurosci Res. 90(9), pp.1776-81, 2012(査読有) doi: 10.1002/jnr.23074.

② Yoshiaki V. Nishimura, Tomoyasu Shinoda, Yutaka Inaguma, Hidenori Ito and Koh-ichi Nagata. “Application of in utero electroporation and live imaging in the analyses of neuronal migration during mouse brain development.”

Med Mol Morphol. 45(1), pp.1-6, 2012(査読有) doi: 10.1007/s00795-011-0557-0.

③ Yoshiaki V. Nishimura, Katsutoshi Sekine, Kaori Chihama, Kazunori Nakajima, Mikio Hoshino, Yo-ichi Nabeshima, and Takeshi Kawauchi. “Dissecting the Factors Involved in the Locomotion Mode of Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex.”

J Biol Chem. 285(8), pp.5878-87, 2010(査読有) doi: 10.1074/jbc.M109.033761.

[学会発表] (計 15 件)

① Yoshiaki V. Nishimura, Yutaka Inaguma,

Masatsugu Ema, Mitsuharu Hattori, Koh-ichi Nagata, Ken-ichi Mizutani. “Neurovascular interaction in the developing neocortex.”

第 20 回日本血管生物医学学会学術集会 (The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology)、徳島、12 月 5-7 日、2012 年

② Koh-ichi Nagata, Yutaka Inaguma, Yoshiaki V. Nishimura, Ayako Taguchi, Hidenori Ito, Motomasa Suzuki, Masanori Hosokawa, Toshiyuki Kumagai. “Essential role of SIL1, a causative gene of Marinesco-Sjögren syndrome, in the neuronal migration during corticogenesis.” Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting, New Orleans, LA, USA, Oct 13-17, 2012

③ Takeshi Kawauchi, Yoshiaki V. Nishimura, Mima Shikanai, Koh-ichi Nagata, Kazunori Nakajima. “Molecular and cellular mechanisms for the locomotion mode and terminal translocation mode of neuronal migration.”

第 35 回日本神経科学大会、名古屋、9 月 18-21 日、2012 年

④ Takeshi Kawauchi, Yoshiaki V. Nishimura, Mima Shikanai, Koh-ichi Nagata, and Kazunori Nakajima. “Cdk5 plays multiple roles in cortical neuronal migration and morphological changes.”

第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会、神戸、5 月 28-31 日、2012 年

⑤ Yoshiaki V. Nishimura, Yutaka Inaguma, Ayako Taguchi, Hidenori Ito and Koh-ichi Nagata. “Angiogenesis in the developing cerebral cortex”

第 19 回日本血管生物医学学会学術集会 (The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting)、東京、12 月 8-10 日、2011 年

⑥ Hidenori Ito, Rika Morishita, Yoshiaki Nishimura, Tomoyasu Shinoda, Ikuko Iwamoto, Koh-ichi Nagata. “Functional analysis of

Dysbindin, a schizophrenia risk factor, in dendritic spine formation.”

2011 American Society for Cell Biology Annual Meeting, Denver, CO, USA, Dec 3-7, 2011

⑦ 伊東秀記、森下理香、西村嘉晃、篠田友靖、岩本郁子、須藤香織、永田浩一、「神経突起伸長における MAGI-1 の機能解析」

第 84 回日本生化学会大会、京都、9 月 21-24 日、2011 年

⑧ 西村嘉晃、星野幹雄、永田浩一、仲嶋一範、川内健史、「ライブイメージングを用いた発生期大脳皮質における神経細胞移動の制御機構の解析」

第 43 回日本臨床分子形態学会学術集会、大阪、9 月 9-10 日、2011 年

⑨ Koh-ichi Nagata, Tomoyasu Shinoda, Yoshiaki V. Nishimura, Hidenori Ito. “Role of the Septin in neural cell migration during brain development.”

International Society for Neurochemistry-European Society for Neurochemistry 23rd Biennial Meeting, Athens, Greece, Aug 28-Sept 1, 2011

⑩ 西村嘉晃、稲熊裕、田口紋子、伊東秀記、永田浩一、“Possible involvement of Rap1 signaling and septins in angiogenesis and brain development”

第 2 回「血管と神経」新学術領域会議、熊本、8 月 18-20 日、2011 年

⑪ Shin-ichiro Horigame, Sayaka Takemoto-Kimura, Aki Adachi-Morishima, Natsumi Ageta-Ishihara, Kanzo Suzuki, Mio Nonaka, Michiko Okamura, Yoshiaki V. Nishimura, Takeshi Kawauchi, Kazunori Nakajima, Hiroyuki Okuno, Haruhiko Bito. “Regulation of radial migration of cortical pyramidal neurons by a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I

cascade.”

第 84 回日本薬理学会年会、横浜、3 月 22-24 日、2011 年

⑫ Tomoyasu Shinoda, Yoshiaki Nishimura, Hidenori Ito, Koh-ichi Nagata. “Role of Septins in neural cell migration during brain development—Screening of novel interacting partners.”

EMBO Workshop “Function and structure of septins, filament-forming GTP-binding proteins”, St. Goar, Germany, Mar 6-9, 2011

⑬ Yoshiaki V. Nishimura, Koh-ichi Nagata, Yo-ichi Nabeshima, Mikio Hoshino, Kazunori Nakajima, Takeshi Kawauchi. “Analyzing the mechanisms of the morphological changes of locomoting neurons in the developing cerebral cortex.”

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸、12 月 7-10 日、2010 年

⑭ Yoshiaki Nishimura, Katsutoshi Sekine, Kaori Chihama, Koh-ichi Nagata, Kazunori Nakajima, Mikio Hoshino, Yo-ichi Nabeshima, Takeshi Kawauchi. “Dissecting the factors involved in the morphological changes of locomoting neurons in the developing cerebral cortex.”

第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010)、神戸、9 月 2-4 日、2010 年

⑮ 西村嘉晃、関根克敏、地濱香央里、永田浩一、仲嶋一範、星野幹雄、鍋島陽一、川内健史、「大脳皮質形成過程におけるロコモーション移動を制御する分子機構の解析」

第 74 回日本生化学会中部支部例会、名古屋、5 月 29 日、2010 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

西村 嘉晃 (NISHIMURA YOSHIAKI)
同志社大学・高等研究教育機構・助教
研究者番号:50508603

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし