

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570226

研究課題名(和文)放射状グリアの形態と機能の関係

研究課題名(英文)A study on the structure -function relationship of radial glia cells

研究代表者

ZHU YAN (Zhu, Yan)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：50464235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：放射状グリア(RG)は脳の構築に不可欠である。RGは放射状突起をもつが、これは発生過程では物理的足場になっている。本研究ではRGの形態維持の機構とその意義の解明を目指した。そしてCXCL12/CXCR4/CXCR7シグナル伝達系欠損遺伝子改変マウスの脊髄で、RGの突起形成の阻害を見出した。また、末梢神経の中枢神経への侵入を観察した。さらに、RGの基底膜への接着性への関与を示し、さらにCXCL12によるRGのインテグリンB1の活性化を見出した。よって、CXCL12/CXCR4/CXCR7シグナル伝達系がRGの放射状突起の基底膜への接着性を増すことで、その足場構造の維持に寄与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Radial glia cells are crucial to construct the nervous system. They have dual functions as neural progenitors as well as extending radial processes as physical scaffold for the developing neural tube. How their radial morphology is maintained and whether this is important are the key questions we have addressed in this project. Here we show that radial processes are disrupted in spinal cord of mouse mutants deficient in CXCL12/CXCR4/CXCR7 signaling. Interestingly this disruption causes leaky interface between the central nervous system and the periphery as cells from the latter are seen to invade into the former. We then showed that CXCL12 signaling affect the adhesiveness of radial glia to basement membrane components. Furthermore, we found that CXCL12 stimulation facilitates integrin B1 activation. Thus CXCL12/CXCR4/CXCR7 are important in maintaining the integrity of radial scaffold which in turn maintains the cellular segregation of the central nervous system.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学

キーワード：放射状グリア 放射状突起 CXCL12 CXCR4 1インテグリン 基底膜

## 1 研究開始当初の背景

放射状グリア細胞は、脊椎動物の中樞神経系（CNS）の構築のための最も重要な細胞型であることはほぼ間違いない。この細胞は、神経前駆細胞としてだけでなく、発生途上の神経管を支えるための物理的な足場として法線方向に伸びるプロセスとしての役割も担っている。神経上皮の頂端面を揃える脳室帯（VZ）内に閉じ込められて、その細胞体と、放射状グリア細胞の長い基礎プロセスは、発生途上の神経管の軟膜表面の上にある基底膜に到達し、連絡することを拡張する。神経管は急速に濃くしながら、どのように放射状グリア細胞の放射状形態学の完全性は、発生中に維持されているのであろうか？神経管の適切な開発のための放射状の足場のこの整合性はどのくらい重要であらうか？これらの問いに関する我々の理解は不完全のままである。基底膜に放射状グリアとその上軟膜髄膜の基礎過程のエンドフィートの持続的な接触は軟膜髄膜から分泌外部信号が半径のプロセスの整合性に貢献するかもしれないという可能性を提起する。ケモカイン、CXCL12は、発達過程では部位によらず軟膜髄膜細胞で発現する。その受容体、主にCXCR4、へのシグナリングは、増殖、遊走および細胞接着を含む神経発達の様々なプロセスを制御することが示されている。従って私は放射状グリアの発達における役割を探求す

る試みとして、CXCL12 および CXCR4 に焦点を当てた。

## 2 研究の目的

このプロジェクトの目的は、CXCL12 が放射状グリア細胞の発達を制御する外来性の信号として働くか否かを検証するとともに、その基盤となる分子および細胞メカニズムを検討することである。

## 3 研究の方法

in situ ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学を脊髄の発達途上の神経細胞分化の時期における CXCL12 の二つの受容体である CXCR4 および CXCR7 の発現パターンを調べるために使用した。そしてマウスを用いた遺伝学的方法を、放射状グリア発達における CXCL12 シグナル伝達の機能的関与を調査するために使用した。具体的には CXCL12 および CXCR4 欠損マウスを用い、それらの脊髄の法線方向の骨格構造の完全性は、ネスチンの免疫組織化学を用いて分析した。高いレベルの CXCR4 を発現する第二の細胞型、境界細胞は、Krox20 および SOX10 の in situ ハイブリダイゼーションによって調べた。観察された異常が細胞自律的または他の主要な異常の結果起こったものであるかどうかを調べるために、細胞型特異的なコンディショナルノックアウトマウスを、Cre-LoxP 技術を使用して生成した。放射状グリア特

異的 CXCR4 のノックアウトマウスは、CXCR4 フロックスマウス系統とネスチン CreERT2 マウスを交配することで得た。同様に、境界キャップ細胞の発達における CXCR4 の細胞自律的な役割は、Wnt1 - Cre をラインおよび CXCR4 フロックスラインを用いて調べた。

放射状グリア発達における CXCL12 の機能の基礎となる細胞および分子機構を調べるために、基底膜成分へ放射状グリアの接着性細胞接着アッセイを用いて調べた。解離細胞を、CXCR4 プロモーターおよびエンハンサーエレメントの制御下で GFP を発現するトランスジェニック系統の Tg

(CXCR4 -GFP) の胎仔の脊髄から調製した。基底膜成分へのこれらの細胞の接着の程度は培養プレートを振とうした後に接着したままである細胞の割合によって測定した。CXCL12 刺激によるインテグリンベータ 1 の立体構造の活性化は、具体的インテグリンベータ 1 受容体の細胞外ドメインの活性コンホメーションを認識する抗体 (9EG7) を用いて調べた。

#### 4 研究成果

( 1 ) 我々は、CXCL12 の主要な受容体である CXCR4 は、発達中の脊髄の脳室帯において発現されることを見出した。高解像度の研究は、CXCR4 が放射状グリア細胞とその基底エンドフィートで発現されることを示した。CXCR4 発現の高いレベルの第 2 部位

は、末梢神経系の細胞であり、感覚および運動神経の根を包む境界キャップ細胞である。また、CXCL12 は脊髄全体を覆う髄膜で発現されることを確認した。

( 2 ) CXCL12 または CXCR4 のノックアウトマウスの解析の結果、2 つの興味深い異常が明らかになった。第一に、これらの変異体における脊髄の放射状の骨格は異常を呈していた。具体的には、相互接続された基底エンドフィートの層に隙間があり、いくつかの basal 側のプロセスが基底膜に到達する前に曲がったり発育がとまったりしていた。第二に、末梢神経である境界キャップ細胞は、これらの変異体では異所的に脊髄内に配置されていた。

( 3 ) これらの欠陥の性質を理解し、それらを CXCL12/CXCR4 シグナリングの細胞自律機能によって引き起こされているかどうかを知るため、我々は、細胞型特異的コンディショナルノックアウトマウスを構築した。ネスチン CreERT2 : CXCR4 (フロックス) トランスジェニックマウスは放射状グリアに影響を与えずに、境界キャップ細胞で CXCR4 ノックアウトすることができる。一方、の Wnt1 - Cre を : CXCR4 (フロックス) トランスジェニックマウスは、特に境界キャップ細胞からではなく、放射状グリアから CXCR4 をノックアウトするために作成した。2 つのタイプのコンディショナルノックアウトマウスの解析の結果、CXCL12/CXCR4 シグナル伝達が細胞自律的に

正常な法線方向の足場形成に必要であることを示した。また放射状グリア足場の欠陥は、二次的に境界キャップ細胞の位置異常の原因となる。

(4) また、放射状グリア開発における CXCR7、CXCL12 の第二の受容体の関与を解析した。我々は、CXCR7 も現像脊髄の VZ に発現し、その発現パターンは、CXCR4 の発現パターンと部分的に相補的な、部分的に重複であることを示した。放射状グリア形態はまた、CXCR7 ノックアウトマウスで破壊されている。

(5) 次に、放射状グリア発達における CXCL12 の役割の基礎となる細胞および分子メカニズムを検討した。まず、これらの細胞は神経幹/前駆細胞であるため、このシグナリングは、放射状グリア細胞の増殖に影響を与えるかどうかを調べた。まず、これらの細胞の増殖への影響は見つからなかった。そこで直接放射状グリアの basal 側の突起の発達に CXCL12 シグナルが影響を与えるのではないかと考えた。CXCL12 は細胞接着を調節することが知られている(特にインテグリンの調節を介して)。そこで私は、CXCL12 が基底膜への放射状グリアの接着を調節するという仮説を立てた。私は、細胞接着アッセイを使用して、この仮説を検証し、実際 CXCL12 刺激がフィブロネクチンおよびラミニンに放射状グリアの密着性に小さいが有意な増加を引き起こすことを見出した。次に、CXCL12 刺激が放射状グリア

細胞の解離培養系における活性形インテグリン b1 の増加につながることを示すために実験を行った。in vitro データに一致して、我々は、脊髄 CXCL12 ノックアウト動物におけるインテグリン b1 の活性型レベルの低下を検出した。

結論として、このプロジェクトは、これまで知られていなかった神経管の発達の神経細胞産生期間中に放射状グリアプロセスの正常な形態を維持する上で

CXCL12/CXCR4/CXCR7 が果たす役割を明らかにした。これは、発生過程の放射状のプロセスに異常が生ずることで、末梢に存在するはずの境界キャップ細胞がその二次的効果で脊髄内に位置する可能性があることを示している。CXCL12 シグナリングは放射状グリア細胞基底膜へ接着性を増加させ、細胞接着分子 1 インテグリン活性を増加させる。このことは、CXCL12 シグナル伝達は、神経管が急速に成長する際に basal 側の endfeet が基底膜に継続的に接触を維持するのに役立つというモデルを提起する。弱い接着は、放射状のプロセスを切り離し、脊髄の表面から離れていくことになり、その結果末梢の細胞の浸潤を"招く"原因となるものと考えられる。

#### 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3件)

Masaki Shinohara, Yan Zhu and Fujio Murakami. Four-dimensional analysis of nucleogenesis of the pontine nucleus in the hindbrain. J. Comp. Neurol. 査読有、 (2013) 521:3340-57.  
DOI:10.1002/cne.23353

Mitsutoshi Yanagida, Ryota Miyoshi, Ryohei Toyokuni, Yan Zhu and Fujio Murakami. Migration of cortical interneurons in living mouse embryos: Dynamics of the leading process, nucleus and the Golgi apparatus. Proc Natl Acad Sci U S A . 査読有、 (2012) 109:16737-42.  
DOI:10.1073/pnas.1209166109

Yan Zhu and Fujio Murakami. Chemokine CXCL12 and its receptors in the developing central nervous system: emerging themes and future perspectives. Dev Neurobiol. 査読有、 (2012) 72:1349-62, DOI:10.1002/dneu.22041

〔学会発表〕（計1件）

Yan Zhu, Xun Hong, Koki Shirotsaki, Frederic Sierro, Fabienne Mackay, Takashi Nagasawa, Fujio Murakami. “A chemokine receptor CXCR7 non-cell-autonomously controls migration and nuclei formation of pontine neurons from the migratory environment.”  
第34回日本神経科学大会、2011.9.15、  
パシフィコ横浜会議場

6 . 研究組織

(1)研究代表者

Zhu Yan (Zhu Yan)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：50464235

(2)研究分担者

無し

(3)連帯研究者

無し