

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650184

研究課題名(和文) 神経細胞移動の分子機構の解明とてんかんモデルマウスの開発

研究課題名(英文) Molecular machinery for neuronal migration and epilepsy

研究代表者

星野 幹雄 (Hoshino, Mikio)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・部長

研究者番号：70301273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞移動は、中枢神経系の形成における重要な発生過程であり、これがうまくいかないと、てんかんや精神遅滞の原因となりうる。我々は、ある自閉症関連遺伝子がアクチン細胞骨格系を制御し、神経細胞移動及び神経突起伸長に関与していることを見いだした。そのノックアウトマウスでは、認知機能障害や不安様行動の低減が認められた。さらに、脳スライスに対する各種キナーゼ阻害剤のスクリーニングから、神経細胞移動に関与する可能性のあるリン酸化酵素を多数同定した。またFocal Cortical Dysplasia様構造を持つマウスを作り出したが、てんかん発作を観察するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Neuronal migration is one of pivotal steps during brain development, whose malfunction causes epilepsy and/or mental retardation. We found that an autism-related gene regulates actin dynamics and participates in neuronal migration. Targeted disruption of the gene in mice results in abnormal behavior resembling some human psychiatric disorders. By screening of kinase inhibitors that affect neuronal migration in slice cultures, we identified some candidate kinases involved in neuronal migration. Although we generated mice carrying focal cortical dysplasia-like structures in the brain, we could not detect epileptic symptoms among them.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経化学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経発生 神経細胞移動 てんかん

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経細胞移動は、中枢神経系の形成における重要な発生過程であり、これがうまくいかないと、てんかんや精神遅滞の原因となりうる。我々は子宮内エレクトロポレーション法を開発し(EMBO J 2003)、Rac1 シグナル伝達系による微小管制御機構(EMBO J 2003, J. Neurosci. 2005)、Cdk5-p27 経路によるアクチン制御機構(Nat Cell Biol 2006)、Rab ファミリー蛋白質による N カドヘリン輸送(Neuron 2010)が神経細胞移動に関与していることを明らかにしてきたが、その分子機構は未だに未解明の部分が多い。

(2) また、難治性てんかん患者の多くには、Focal Cortical Dysplasia (局所的な大脳皮質の形成異常)という神経細胞移動の異常による変異が認められるため、この Focal Cortical Dysplasia がてんかんの原因となっているのではないかと予想されてきた。しかし、Focal Cortical Dysplasia によっててんかんが引き起こされるしくみは未だに不明であり、またこのタイプの難治性てんかんに対する有効な治療法も確立されていない。その理由の一つとしては、Focal Cortical Dysplasia のモデル動物が開発されていないことが挙げられる。逆に言えば、このモデル動物が開発されれば、難治性てんかんの発症機構の解明や、有効な治療法の発見につながる事が期待される。我々は、Rac1 や Cdk5 の機能欠失変異(DN)体の子宮内エレクトロポレーションによる導入により、Focal Cortical Dysplasia 様の病態をマウスに作り出せることを報告した(EMBO J. 2003)。

2. 研究の目的

(1) 本研究では研究代表者のこれまでの経験と蓄積した技術を活かし、神経細胞移動に関与する分子群を網羅的に同定し、その分子機構を包括的に理解することを第一の目的とする。具体的には、我々の開発した子宮内エレクトロポレーション法にさらに RNAi 法および機能阻害薬剤(JBC 2010 責任著者)を組み合わせることによって、神経細胞移動に関与する分子群を網羅的に同定し、その機能を個別に解析し、最終的にそれぞれの果たす役割を神経細胞移動の各過程にプロットすることで、その分子機構を包括的に理解する。

(2) 本研究では、Focal Cortical Dysplasia のマウスモデルを作製し、いかにしててんかん発作を引き起こされるのかを調べることによって、ヒトの Focal Cortical Dysplasia タイプのてんかんの発症機構について調べる。

3. 研究の方法

(1) 子宮内エレクトロポレーションによる、各種分子の検証
子宮内エレクトロポレーション法により様々な細胞内情報伝達分子のドミナントネガティブ体あるいは RNAi の発現ベクターを

GFP 発現ベクターと共に E14 の胎仔の脳室帯の細胞群に導入し、E16, P0, P4 の各発生段階でマウス脳の切片を作製し、その GFP シグナルにより、神経細胞の位置、形態に異常があるかどうかについて調べる。また明らかな異常のあるものについては、

(2) タイムラプススライス培養系での、様々な分子機能阻害剤によるスクリーニング。

GFP 発現ベクターを子宮内エレクトロポレーションで E14 の胎仔脳に導入し、E16 でその脳組織を 36 時間スライス培養する系において、様々な分子の機能阻害薬剤(特にキナーゼ阻害剤)を加えることによって GFP で標識された移動神経細胞の動態に影響を与えるものをスクリーニングする。最初はかなり広汎な分子・キナーゼに作用する阻害剤から初めて(既にいくつかの候補が得られている)、次第により選択的、特異的な阻害剤に狭めて、神経細胞移動に関与する分子、特にキナーゼの同定に努める。ここで同定された分子に関しては、1 の方法でその RNAi またはドミナントネガティブ体を用いてさらに確認する。

(3) Focal Cortical Dysplasia 様の大脳皮質異常を持つマウスの作成と解析

Rac1 および Cdk5 のドミナントネガティブ体発現ベクター(IRES-GFP を組み込んでおく)を E14 の胎仔脳の様々な特定の領域に導入しその領域での神経細胞移動を阻害する。電圧、電極の向き、DNA 濃度などをコントロールすることによって、大脳皮質の様々な領域で、様々な重症度で、Focal Cortical Dysplasia 様変異を引き起こしたマウスを作成する。GFP の蛍光によって、生まれた直後に大脳皮質のどのあたりに病変があるのかは予想がつく。さらに、てんかん発作が生じるかどうかについて調べる。

4. 研究成果

(1) 神経細胞移動に関与する重要な遺伝子として、Auts2 (Autism Susceptibility Candidate 2)を同定した。この遺伝子のコードする AUTS2 蛋白質は、Rho ファミリー G 蛋白質の一つである Rac1 の活性化因子である P-Rex1 や Elmo2/Dock180 複合体と結合し、Rac1 を活性化する。それによって、アクチン細胞骨格系の再構成を引き起こし、神経細胞移動に寄与する、ということを示した。さらに、AUTS2 は、同様なシグナルカスケードを介して、神経突起伸長も引き起こす。

また、Auts2 のノックアウトマウスを作製したところ、ホモ接合体において神経細胞移動と神経突起伸長が著しく阻害されていた。ヘテロ接合体でも、やや穏やかではあるが有意な異常が認められた。

このヘテロ接合体は、AUTS2 遺伝子異常によって引き起こされるヒト精神疾患のモデ

ルとなりうるものが、マウス行動解析による認知機能障害や不安様行動の低減などによって示された(現在投稿中)。

(2) GFP を子宮内エレクトロポレーションして移動神経細胞をラベルしたスライスカルチャーにおいて、各種のキナーゼ阻害剤を加えて神経細胞移動に影響を引き起こす薬剤をスクリーニングした。その結果、Cdk5、PKC の一部のアイソフォーム、PKA などの阻害剤が抽出されたため、現在 siRNA による検証を行っているところである。

(3) Rac1 および Cdk5 のドミナントネガティブ(DN)体を導入し、FCD 様の構造を作り出すことに成功した。特に、前者では神経突起を持たない FCD の細胞塊、後者では神経突起(神経連絡)を持つ FCD の細胞塊が観察された。しかしながら、それらの中でてんかん様発作が引き起こされた個体を得ることはできなかった。このことは、FCD はヒトてんかん患者に多く観察されるが、実はてんかん発症とは関連が無い、ということを示唆しているのかもしれない。しかしながら、ヒトとマウスではやはり脳の構造および機能に大きな差があるために、そのように結論するのは大変危険であると思われる。今後は、マーマセットなど、ヒトにさらに近い動物モデルを使った検証を行う必要があるかもしれない。

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 9 件)

- 1) Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Taya S, Kumai M, Minaki Y, Hamaguchi A, Inoue YU, Inoue T, Miyashita S, Fujiyama T, Yamada M, Chapman H, Campbell K, Magnuson MA, Wright CV, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M. Temporal identity transition from Purkinje cell progenitors to GABAergic interneuron progenitors in the cerebellum. *Nat Commun*, 5 : 3337-3337, 2014. doi:10.1038/ncomms4337 (査読有)
- 2) Yamada M, Seto Y, Taya S, Owa T, Inoue YU, Inoue T, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M. Specification of spatial identities of cerebellar neuron progenitors by ptf1a and atoh1 for proper production of GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurosci*, 34 (14): 4786-4800, 2014. doi:10.1523/JNEUROSCI.2722-13.2014 (査読有)
- 3) Seto Y, Ishiwata S, Hoshino M. Characterization of Olig2 expression during cerebellar development. *Gene*

Expr Patterns, 15 (1): 1-7, 2014. doi:10.1016/j.gep.2014.02.001 (査読有)

- 4) Ito H, Shiwaku H, Yoshida C, Homma H, Luo H, Chen X, Musante L, Fischer U, Frints S, Romano C, Ikeuchi Y, Shimamura T, Imoto S, Miyano S, Kawauchi T, Hoshino M, Sudol M, Arumughan A, Wanker E, Rich T, Schwartz C, Matsuzaki F, Bonni A, Kalscheuer V, Okazawa H. In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells. *Molecular Psychiatry*(in press) (査読有)
- 5) Esposito G, Yoshida S, Ohnishi R, Tsuneoka Y, Rostagno Mdel C, Yokota S, Okabe S, Kamiya K, Hoshino M, Shimizu M, Venuti P, Kikusui T, Kato T, Kuroda KO. Infant calming responses during maternal carrying in humans and mice. *Curr Biol*, 23 (9): 739-745, 2013. doi:10.1016/j.cub.2013.03.041 (査読有)
- 6) Chonko KT, Jahan I, Stone J, Wright MC, Fujiyama T, Hoshino M, Fritzsche B, Maricich SM. Atoh1 directs hair cell differentiation and survival in the late embryonic mouse inner ear. *Dev Biol*, 381 (2): 401-410, 2013. doi:10.1016/j.ydbio.2013.06.022 (査読有)
- 7) Terakawa YW, Inoue YU, Asami J, Hoshino M, Inoue T. A sharp cadherin-6 gene expression boundary in the developing mouse cortical plate demarcates the future functional areal border. *Cereb Cortex*, 23 (10): 2293-2308, 2013. doi:10.1093/cercor/bhs221 (査読有)
- 8) Worzfeld T, Swiercz JM, Sentürk A, Genz B, Korostylev A, Deng S, Xia J, Hoshino M, Epstein JA, Chan AM, Vollmar B, Acker-Palmer A, Kuner R, Offermanns S. Genetic dissection of plexin signaling in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 (6): 2194-2199, 2014. doi:10.1073/pnas.1308418111 (査読有)
- 9) Bjerknes M, Khandanpour C, Moroy T, Fujiyama T, Hoshino M, Klisch TJ, Ding Q, Gan L, Wang J, Martin MG, Chen H: Origin of the brush cell lineage in the mouse intestinal epithelium. *Dev Biol*, 362, 194-218, 2012. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.009(査読有)

[学会発表](計 31 件)

- 1) Hoshino M. Neuron subtype specification in the cerebellum .Joint symposium between Max Planck Institute and National Center of Neurology and Psychiatry .Munich, Germany, 10. 3-5, 2012.
- 2) Hoshino M. Analysis of a rat model for human temporal lobe epilepsy . International Synapse Research Workshop 2012, Okazaki, Japan, 11.8-9, 2012.
- 3) Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Minaki Y, Kumai M, Hamaguchi A, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M. Transcriptional regulation of the diversity of cerebellar GABAergic neurons . Neuroscience 2012, Society for Neuroscience's 42nd annual meeting . New Orleans, USA, 10.13-17, 2012.
- 4) 藤山知之, 星野幹雄. Ptf1a 遺伝子改変マウスを用いた視床下部の発生および機能の解析 .平成 24 年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ . 仙台 , 7.24-27, 2012.
- 5) Hori K, Taya S, Nishioka T, Kumanogoh H, Kaibuchi K, Hoshino M. Characterization of a novel Autism-related gene in the CNS development .第 35 回日本神経科学大会 . 名古屋 , 9.18-21, 2012.
- 6) 藤山知之, 早瀬ヨネ子, 長岡麻衣, 熊ノ郷晴子, 柳川右千夫, マグヌソン マーク, 小幡邦彦, 田中智宏, 伊村明浩, 船戸弘正, 川口義弥, 鍋島陽一, 星野幹雄. A genetic analysis of hypothalamic development and function using Ptf1a-cre & Ptf1a-flox mice . 第 35 回日本神経科学大会 . 名古屋 , 9.18-21, 2012.
- 7) 瀬戸裕介, 中谷智哉, 増山典久, 皆木康子, 熊井実, 濱口晶子, 川口義弥, 池田一裕, 竹林浩秀, 石渡信一, 尾野雄一, 星野幹雄 . Temporal identity transition of GABAergic neural precursors in embryonic cerebellum . 第 35 回日本神経科学大会 . 名古屋 , 9.18-21, 2012.
- 8) 大輪智雄, 田谷真一郎, 西岡朋生, 貝淵弘三, 星野幹雄. 小脳発達制御因子 Atoh1 の結合分子の網羅探索および機能解析 .第 35 回日本神経科学大会 .名古屋 , 9.18-21, 2012.
- 9) Taya S, Owa T, Nishioka T, Kaibuchi K, Hoshino M. Roles of Atoh1 and Atoh1-interacting molecules in cerebellar development . 第 35 回日本分子生物学会年会 . 福岡 , 12.11-14, 2012.
- 10) Hori K, Taya S, Nishioka T, Kumanogoh H, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Kaibuchi K, Hoshino M. Characterization of the molecular function for a novel Autism-related gene in the CNS development . 第 35 回日本分子生物学会年会 .福岡 , 12.11-14, 2012.
- 11) Fujiyama T, Nagaoka M, Kumanogoh H, Hayase Y, Funato H, Tanaka T, Imura A, Yanagawa Y, Magnuson M, Obata K, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M. A genetic analysis of hypothalamic development and function using Ptf1a-genetically modified mice . 第 35 回日本分子生物学会年会 . 福岡 , 12.11-14, 2012.
- 12) 堀啓, 田谷真一郎, 西岡朋生, 熊ノ郷晴子, 安部学, 山崎真弥, 崎村健司, 貝淵弘三, 星野幹雄. 新規自閉症感受性遺伝子 Auts2 の分子機能の解明 . 第 6 回神経発生討論会 . 和光 , 3.14-15, 2013.
- 13) Fujiyama T, Nagaoka M, Kumanogoh H, Hayase Y, Funato H, Tanaka T, Imura A, Yanagawa Y, Magnuson M, Obata K, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M. A genetic analysis of hypothalamic development and function using Ptf1a-genetically modified mice . 第 6 回神経発生討論会 .和光 ,3.14-15, 2013.
- 14) Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Taya S, Kumai M, Minaki Y, Hamaguchi A, Inoue Y, Inoue T, Fujiyama T, Yamada M, Magnuson M, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M. Temporal identity transition of cerebellar GABAergic neuron progenitors . 第 6 回神経発生討論会 . 和光 , 3.14-15, 2013.
- 15) 橋本了哉, 増山典久, 川口 義弥, 秋山治彦 , 星野幹雄 . Sox9 controls oligodendrocyte differentiation in the cerebellum and the midbrain . 第 6 回神経発生討論会 .和光 ,3.14-15, 2013.
- 16) Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Taya S, Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, Hoshino M. Cytoskeletal regulation by AUTS2 in Neuronal migration and neuritogenesis . International Symposium “ New Frontier of Neuropathology 2014 ” .Tokyo, Japan, 3.16-17, 2014.
- 17) Fujiyama T, Nagaoka M, Kumanogoh H,

- Hayase Y, Funato H, Yanagisawa M, Tanaka T, Imura A, Yanagawa Y, Magnuson MA, Wright CV, Obata K, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M. A genetic analysis of hypothalamic development and function by using Ptf1a-genetically modified mice. Neuroscience 2013, Society for Neuroscience's 43rd annual meeting. San Diego, USA, 11.9-13, 2013.
- 18) 増山 典久, 橋本了哉, 川口義弥, 秋山治彦, 星野幹雄. 分化発生期と成体期における小脳パーグマンガリアの系譜解析. 第36回日本神経科学大会. 京都, 6.20-23, 2013.
- 19) 宮下聡, 瀬戸祐介, 川口義弥, 宗田孝之, 星野幹雄. 小脳顆粒細胞前駆体の分化制御における Prox1 の役割. 第36回日本神経科学大会. 京都, 6.20-23, 2013.
- 20) 橋本了哉, 増山典久, 川口義弥, 秋山治彦, 小泉修一, 星野幹雄. Sox9 controls oligodendrocyte differentiation in the cerebellum. 平成25年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ. 名古屋, 8.29-9.1, 2013.
- 21) 大輪智雄, 田谷真一郎, 西岡朋生, 中村卓郎, 五飯塚僚, 貝淵弘三, 星野幹雄. 小脳顆粒細胞における Meis1 の果たす役割. 平成25年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ. 名古屋, 8.29-9.1, 2013.
- 22) 宮下聡, 瀬戸祐介, 川口義弥, 宗田孝之, 星野幹雄. Prox1 regulates the last mitosis of granule cell precursors. 平成25年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ. 名古屋, 8.29-9.1, 2013.
- 23) 田谷真一郎, 早瀬ヨネ子, 山田真弓, 初山俊彦, 西條琢真, 三浦義記, 大野行弘, 今奥琢士, 伊原信夫, 天野殖, 星野幹雄. てんかん自然発症ラット突然変異体の解析. 第36回日本分子生物学会年会. 神戸, 12.3 -6, 2013.
- 24) 山田真弓, 瀬戸裕介, 田谷真一郎, 大輪智雄, 井上由紀子, 井上高良, 川口義弥, 鍋島陽一, 星野幹雄. Regulation of spatial identities of cerebellar neuron progenitors by bHLH transcription factors. 第36回日本分子生物学会年会. 神戸, 12.3 -6, 2013.
- 25) 瀬戸裕介, 中谷智哉, 増山典久, 田谷真一郎, 熊井実, 皆木康子, 浜口晶子, 井上由紀子, 井上高良, 藤山知之, 山田真弓, Magnuson MA, 川口義弥, 池中一裕, 竹林浩秀, 石渡信一, 尾野雄一, 星野幹雄. Temporal identity transition of GABAergic neuron progenitors in the cerebellum. 第36回日本分子生物学会年会. 神戸, 12.3-6, 2013.
- 26) 橋本了哉, 増山典久, 川口義弥, 秋山治彦, 小泉修一, 星野幹雄. Sox9 controls oligodendrocyte differentiation in the cerebellum. 第36回日本分子生物学会年会. 神戸, 12.3 -6, 2013.
- 27) 大輪智雄, 田谷真一郎, 西岡朋生, 中村卓郎, 五飯塚僚, 貝淵弘三, 星野幹雄. Roles of Meis1 in the development of cerebellar granule cells. 第36回日本分子生物学会年会. 神戸, 12.3 -6, 2013.
- 28) 宮下聡, 瀬戸祐介, 川口義弥, 宗田孝之, 星野幹雄. 小脳顆粒細胞における Prox1 の機能解析. 第36回日本分子生物学会年会. 神戸, 12.3 -6, 2013.
- 29) 橋本了哉, 増山典久, 川口義弥, 秋山治彦, 小泉修一, 星野幹雄. Sox9 controls oligodendrocyte differentiation in the cerebellum. 第7回神経発生討論会. 吹田, 3.13-14, 2014.
- 30) 大輪智雄, 田谷真一郎, 西岡朋生, 中村卓郎, 五飯塚僚, 貝淵弘三, 星野幹雄. Roles of Meis1 in the development of cerebellar granule cells. 第7回神経発生討論会. 吹田, 3.13-14, 2014.
- 31) 宮下聡, 瀬戸祐介, 川口義弥, 宗田孝之, 星野幹雄. Prox1 switches Granule cell precursors from proliferative to differentiative state in cerebellum. 第7回神経発生討論会. 吹田, 3.13-14, 2014.
- 〔図書〕(計 2件)
- 1) Hoshino M, Seto Y, Yamada M. Specification of cerebellar and precerebellar neurons. Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders, Springer, Netherlands, 75-87, 2012.
- 2) 田谷真一郎, 星野幹雄. 培養皿上の成熟神経細胞への遺伝子導入. 実験医学別冊 目的別で選べる遺伝子導入プロトコール, 羊土社, 東京, 131-136, 2012.
- 〔その他〕
ホームページ
http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/index.html
6. 研究組織
(1)研究代表者
星野 幹雄 (HOSHINO, Mikio)
(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 病態生化学研究部 部長
研究者番号: 70301273