

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659082

研究課題名(和文) 新たな戦略による神経細胞の接線方向への移動に関する制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the control mechanism of Neuronal migration by new stratagem.

研究代表者

黒田 一樹 (Kuroda, Kazuki)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：60557966

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)：大脳皮質には、興奮性と抑制性神経細胞が存在し、皮質内をそれぞれ法線及び接線方向に移動して大脳皮質を形成している。本研究は、転写因子Ptfl1aにより誘導される興奮性神経細胞の細胞移動の変化を利用して、接線方向への細胞移動に関わる分子の解明を目的とした。Ptfl1aの標的遺伝子の解析から、幾つかの候補分子を見出したが、明確に接線方向への移動に関わる分子を見つけるには至らなかった。この為、Ptfl1a以外の転写因子で神経細胞の移動を変化させる因子の検索を行ったところ、抑制神経細胞の発生に関わる転写因子の幾つかが神経細胞の移動に影響を与えることを新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：Cell migration is an essential process in the embryogenesis and maintenance of multicellular organisms. The cerebral cortex contains the excitatory and inhibitory neurons, these neurons arise in the differential region of cerebral cortex. The excitatory neurons move from the ventricular zone to the cortical plate by the radial migration and the inhibitory neurons move from the ganglionic eminence to the cerebral cortex by the tangential migration. The forced expression of the transcriptional factor Ptfl1a induced the tangential migration on the developing excitatory neurons. The Ptfl1a targeting genes were searched by the microarray analysis. Some targeted genes were upregulated in the Ptfl1a-expressing excitatory neurons, but these Ptfl1a targeted genes were not involved in tangential migration on functional analysis. We are modifying the screening method for the tangential migration-related genes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：神経細胞 細胞移動 興奮性神経細胞 抑制性神経細胞 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

胎生期の組織構築において細胞移動が重要な役割を果たしている。申請者は以前、骨格筋の発達や再生を研究している過程で、四肢の骨格筋は体節で生じた筋芽細胞が手足に移動して形成する事を観察してきた。最近、神経細胞の移動を解析する機会を得て、細胞移動と組織構築の普遍性を見出したいと考えるに至った。大脳皮質には興奮性神経細胞(グルタミン酸作動性)と抑制性神経細胞(GABA作動性)が存在する。前者は脳室帯にて生まれ、法線方向(脳室から脳表面)に移動し、後者は基底核原基で生まれ、大脳皮質内には接線方向に移入して、大脳皮質を構成している。近年、これらの神経細胞の移動に関して、移動の開始、移動途中の挙動、停止に関与する分子の解明が進みつつあった。今回、新たな戦略によって神経細胞の移動メカニズムの解明を行うに至った。

## 2. 研究の目的

胎生期における細胞の移動は正常な組織を構築する上で非常に重要である。大脳皮質には、興奮性と抑制性神経細胞が存在し、それぞれ異なる部位で生じた後、皮質内をそれぞれ法線及び接線方向に移動して6層から成る大脳皮質を形成している。最近、神経細胞の移動を制御する分子の解析が進んできたが、未だ不明な点も多く残されている。本研究はこれまでとは異なる方法で神経細胞の移動に関与する分子を見出し、大脳皮質における神経細胞の移動を解明することを目的としている。既に、転写因子 Ptf1a を興奮性神経細胞に導入すると、細胞の移動が法線方向から接線方向へと変化することを見出しており、この細胞移動の変化を緒とし、抑制性神経細胞の接線方向への細胞移動を制御する分子機構や遺伝子カスケードを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Ptf1a の発現ベクターを蛍光タンパク質である EGFP の発現ベクターと共に胎生期(E14.5)の大脳皮質の興奮性神経細胞に子宮内エレクトロポレーション法により導入し、胎児の大脳皮質(E17.5)より Ptf1a が導入された細胞をセルソーターで単離し、RNA を精製してマイクロアレイ解析を行った。コントロールとしては蛍光タンパク質である EGFP のみを発現した細胞を用いた。マイクロアレイ解析により Ptf1a 陽性細胞において発現が変化(増加/減少)した遺伝子を検索し、転写因子を中心に解析を行った。

(2) マイクロアレイ解析により発現が増減する転写因子の shRNA を用いて、Ptf1a により

誘導される接線方向への細胞移動の変化を調べた。Ptf1a の発現ベクターと共に候補遺伝子の shRNA を発現するベクターを胎児期(E14.5)の大脳皮質にエレクトロポレーションし、胎児の大脳皮質(E17.5)で回収して、固定後、ビプラトームにより切片を作製して蛍光顕微鏡下で観察を行った。

(3) Ptf1a 以外に興奮性神経細胞の移動を接線方向に変化させる抑制性神経細胞で発現する転写因子の検索を、Ptf1a の解析と同様に胎児期(E14.5)の大脳皮質にエレクトロポレーションし、胎児の大脳皮質(E17.5)で回収して、固定後、ビプラトームにより切片を作製して蛍光顕微鏡下で観察を行った。

## 4. 研究成果

(1) Ptf1a の導入により法線方向へ細胞移動が変化した興奮性神経細胞において発現が変化(増減)する遺伝子の解析を行った。Ptf1a により増加する転写因子としては Prox1、Ebf1、Zfp521、Lhx6 や Fosb が、減少する転写因子としては Dbx1、Oligo1、Pou3f2 (Brn2)、Cux1、Cux2、や Zhx2 が見出された。

(2) Ptf1a により増加する転写因子の shRNA を発現するベクターを作製し、Ptf1a の発現ベクターと共に候補遺伝子の shRNA を発現するベクターを胎児期の大脳皮質にエレクトロポレーションして機能解析を行った。しかし、Ptf1a により発現が誘導された候補遺伝子の発現を抑制したが、効率よく接線方向への移動を抑制するものは見出されなかった。この結果は、Ptf1a により誘導される転写因子が複数存在し、その下流で機能する因子を単一の遺伝子の発現抑制では行えなかったものと考えられる。

(3) Ptf1a 以外の神経細胞の移動に変化を与える GABA 抑制神経細胞の発生に関わる他の転写因子の検索を行った。PCR 法により Dix1、Heslike、Sox6 や Nkx2.1 をクローニングし、胎児期の大脳皮質にエレクトロポレーションして解析を行った。Dix1 及び Heslike を発現する神経細胞は脳室帯(VZ)から脳室下帯(SVZ)までは移動するのだが、中間帯(IZ)に移動することが出来ず、細胞移動が停止することが示された。Heslike に関してはアイソフォームが存在し、そのアイソフォームを発現した細胞はコントロールの神経細胞と同様に皮質板(CP)まで移動することが示された。他の Sox6 や Nkx2.1 を導入した胎児は E17.5 より以前に胎生致死となり、解析を行うことが出来なかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- (1) Toba, S., Tamura, Y., Kumamoto, K., Yamada, M., Takao, K., Hattori, S., Miyakawa, T., Kataoka, Y., Azuma, M., Hayasaka, K., Amamoto, M., Tominaga, K., Wynshaw-Boris, A., Wanibuchi, H., Oka, Y., Sato, M., Kato, M. and Hirotsune, S. (2013) Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective neuronal migration and neuronal circuit formation in lissencephaly. *Sci. Rep.* 3:1224. (査読有)
- (2) Kuroda, K., Kuang, S., Taketo, MM. and Rudnicki, MA. (2013) Canonical Wnt signaling induces BMP-4 to specify slow myofibrogenesis of embryonic myoblasts. *Skelet Muscle.* 3(1):5. (査読有)
- (3) Komada, M., Iguchi, T., Takeda, T., Ishibashi, M. and Sato, M. (2013) Smoothed controls cyclinD2 expression and regulates the generation of intermediate progenitors in the developing cortex. *Neurosci. Lett.* 547:87-91. (査読有)
- (4) Komeda, H., Kosaka, H., Saito, N-D., Inohara, K., Munesue, T., Ishitobi, M., Sato, M. and Okazawa, H. (2013) Episodic memory retrieval for story characters in high-functioning autism. *Molecular Autism* 4(1):20. (査読有)
- (5) Kosaka, H., Munesue, T., Ishitobi, M., Asano, M., Omori, M., Sato, M., Tomoda, A. and Wada, Y. (2012) Long-term oxytocin administration improves social behaviors in a girl with autistic disorder. (case report) *BMC Psychiatry* 12(1):110. (査読有)
- (6) Takitoh, T., Kumamoto, K., Wang C.-C., Sato, M., Toba, S., Wynshaw-Boris, A. and Hirotsune, S. (2012) Activation of Aurora-A is essential for neuronal migration via modulation of microtubule organization. *J. Neurosci.* 32(32):11050-11066. (査読有)
- (7) Omata, N., Murata, T., Narita, K., Maruoka, N., Mitsuya, H., Mita, K., Nishimoto, T., Sato, M. and Wada, Y. (2012) Effects of antidepressants and mood stabilizers on serum levels of adiponectin. *NeuroEndocrinol. Lett.* 33(1):1-2. (査読有)
- (8) Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang C.-C., Komada, M., Zhao, H., Sakakibara, A., Miyata, T., Nagata, K., Oka, Y., Iguchi, T. and Sato, M. (2012) WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cerebral Cortex* 23(6):1410-1423. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 黒田一樹、謝敏カク、尾身実、八木秀司、佐藤真：神経細胞のスパインにおけるFILIP 関連分子の生体における機能解析。ポスター、第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014年3月28日、栃木県下野市。
- (2) Kuroda, K., Yagi, H., Xie, M.-J., Oka, Y., Iguchi, T. and Sato, M. : FILIP-related molecule controls spine maturation and synaptic function in the hippocampal neuron via non-muscle myosin b. ポスター、Society For Neuroscience 2013, 2013年11月11日、米国サンディエゴ。
- (3) 黒田一樹：神経細胞の棘突起（スパイン）におけるLUZPの機能解析。一般口演、第14回ORIGIN神経科学研究会夏のワークショップ、2013年8月31日、岐阜県下呂市。
- (4) 黒田一樹、八木秀司、謝敏カク、岡雄一郎、猪口徳一、佐藤真：FILIP 関連分子による Myosin- b を介した神経細胞野間形成の制御とシナプス可塑性における機能解析 (FILIP-related molecule controls spine maturation and synaptic function in the hippocampal neuron via non-muscle myosin b)。ポスター、Neuro2013, 2013年6月21日、京都府京都市
- (5) 黒田一樹、謝敏カク、猪口徳一、岡雄一郎、尾身実、王振吉、八木秀司、佐藤真：神経細胞の棘突起（スパイン）形成におけるFILIP 関連分子の機能解析。ポスター、第118回日本解剖学会全国学術集会、2013年3月30日、香川県高松市。
- (6) Kuroda, K., Yagi, H., Xie, M.-J., Oka, Y., Iguchi, T., and Sato, M. FILIP-related molecule controls

spine maturation in the hippocampal neuron via non-muscle myosin IIb. ポスター, The 11<sup>th</sup> Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012年9月29日, 兵庫県神戸市.

- (7) 黒田一樹: 神経細胞の棘状突起(スパイン)形成におけるLUZPの機能解析. 一般口演, ORIGIN 神経科学研究会夏のワークショップ, 2012年9月1日, 石川県小松市.

〔図書〕(計 1件)

黒田一樹、佐藤真: 脳科学辞典(Web版)の「終脳」の項目  
(<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/終脳>)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

黒田 一樹 (Kuroda, Kazuki)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 60557966

### (2)研究分担者

佐藤 真 (Sato, Makoto)  
大阪大学・連合小児発達学研究科・教授  
研究者番号: 10222019

謝 敏カク (Xie, Min-Jue)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 40444210

猪口 徳一 (Iguchi, Tokuichi)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究所)・助教  
研究者番号: 60509305