

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830014

研究課題名(和文)Sema3E-PlexinD1シグナルによる新生ニューロンの移動維持・停止機構

研究課題名(英文)Neuronal migration termination by Sema3E-PlexinD1 signaling in the postnatal brain

研究代表者

澤田 雅人(SAWADA, Masato)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20645288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生後の脳には神経幹細胞が存在し、産生された新生ニューロンは嗅球へと長距離を移動する。しかし、嗅球に到着した新生ニューロンがどのようなメカニズムで適切な位置で移動を停止し、成熟を開始するかは不明だった。本研究では、嗅球内を移動する新生ニューロンが、未熟な形態を維持するためにSema3E-PlexinD1シグナルを必要とすることを明らかにした。本結果は、移動ニューロンの形態制御メカニズムが分化のタイミングを調節し、脳内のニューロンの配置を制御するメカニズムとして、神経生物学分野における新しい概念となり得る。

研究成果の概要(英文)：In the postnatal brain, newly born neurons continue to migrate toward their final destinations, where they terminate their migration and differentiate into mature neurons. Migrating neurons show immature morphology with a single leading process, and maintain their migration in a saltatory manner. In contrast, the neuronal morphology during termination process of migration is still unknown. Here we studied the role of Sema3E-PlexinD1 signaling in the regulation of neuronal morphology during termination process of migration in the postnatal olfactory bulb (OB). During the termination process of migration, new neurons formed cellular protrusions branched from the leading process. Furthermore, Sema3E-PlexinD1 signaling controls migratory potential of new neurons by regulating protrusion formation, thereby contributing to their final positioning and function in the OB. Results indicate the importance of morphological regulation in migrating new neurons in OB development and function.

研究分野：神経発生・再生

キーワード：成体脳のニューロン新生 ニューロン移動 嗅球 脳室下帯

1. 研究開始当初の背景

成体脳の脳室下帯では、神経幹細胞が存在し、生涯を通じてニューロン新生が生じている。産生された新生ニューロンは嗅球へと長距離を移動する。申請者の所属するグループでは、脳室下帯で産生される新生ニューロンの移動メカニズムを明らかにしてきた。

新生ニューロンは嗅球に到着後、顆粒細胞層または糸球細胞層へと振り分けられ、それぞれ顆粒細胞または傍糸球細胞へと分化する。申請者はこれまでに、2光子顕微鏡を用いた嗅球ニューロンの長期成体イメージング法を用いて、嗅覚入力依存的な新生ニューロンの停止位置決定機構を明らかにした (Sawada et al., *J. Neurosci.*, 2011)。また、嗅球ニューロン新生における発達期嗅覚入力の重要性 (Kato#, Kaneko#, Sawada# et al., *PLoS One*, 2012) を報告した。しかし、嗅球に到着した新生ニューロンがどのようなメカニズムで適切な位置で移動を停止し、成熟を開始するかは不明である。

申請者はこれまでに、糸球細胞層まで移動する新生ニューロンが、未熟な形態を維持するために PlexinD1 を必要とすることを明らかにした。そこで本研究では、移動するニューロンの未熟な形態を保つ分子メカニズムを解明することで、Sema3E- PlexinD1 シグナルによる新生ニューロンの停止位置決定の制御機構を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、Sema3E-PlexinD1 シグナルが移動ニューロンの形態を制御することで移動能をコントロールし、嗅球内の配置を決定しているメカニズムの詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新生ニューロンの移動から停止に至る形態制御メカニズムの解明

移動するニューロンが成熟する過程では、先導突起の他に短い突起 (以下: 側方突起) を伸ばし、やがて樹状突起へと発達すると推測されているが、詳細は不明である。そこで本研究では、様々なライブイメージング法を用い、移動ニューロンの側方突起が樹状突起に発展する可能性を解析した。具体的には、Sema3E-PlexinD1 シグナルの下流で関与が示唆されている低分子量 G タンパク質に着目し、その活性化パターンについて FRET プローブや光活性化型プローブを用いて解析することで、Sema3E による側方突起抑制の分子メカニズムを明らかにした。

(2) 嗅覚入力が生ニューロンの移動形態を制御し、その配置を決定する機構

嗅覚入力による新生ニューロンの停止位

置の決定に、Sema3E-PlexinD1 シグナルが関与する可能性がある。この点を調べるため、嗅覚入力と Sema3E、PlexinD1 の発現制御との関係について、組織学的に解析した。

4. 研究成果

本研究では、Sema3E-PlexinD1 シグナルが移動する新生ニューロンの形態を調節することで移動能をコントロールし、嗅球内のニューロン配置を決定することを明らかにした。さらに、新生ニューロンの嗅球内での移動及び成熟過程は嗅覚入力の影響を受けることを明らかにした。これらの結果は、移動ニューロンの形態制御メカニズムが分化のタイミングを調節し、感覚入力に応じて脳内のニューロンの配置を制御するメカニズムとして、神経生物学分野における新しい概念となり得る。

また、脳梗塞を始めとする脳疾患後には、脳室下帯で産生された新生ニューロンの一部が脳傷害部位へと移動するが、成熟する割合はわずかである。本研究で明らかになった新生ニューロンの移動形態制御及び分化調節のメカニズムは、ニューロンの再生効率の向上につながる知見になる可能性があり、神経系の再生医療への貢献が期待される。

(1) Sema3E-PlexinD1 シグナルの側方突起形成における役割

新生ニューロンが分化・成熟する過程では先導突起の他に側方突起を形成しながら移動を停止する。PlexinD1 をノックダウンするベクターを生ニューロンに導入し、側方突起形成について解析した結果、Sema3E-PlexinD1 シグナルは側方突起の形成を抑制することが分かった。側方突起の形成におけるアクチン重合の様子を解析するために、アクチンプローブを生ニューロンに導入し、詳細に解析した。その結果、先導突起の一部でアクチンが重合して側方突起が形成されることが分かった。さらに、形成された側方突起は F-アクチンが豊富な構造体であることが明らかになった。

(2) 側方突起形成と樹状突起形成の関係

組織レベルで、新生ニューロンの側方突起が樹状突起に発達する可能性について明らかにするために、共焦点顕微鏡およびスライス培養法を用いた新生ニューロンの移動形態のタイムラプスイメージングを行った。その結果、移動停止過程では、新生ニューロンは側方突起を形成し、そのうちの一部が徐々に発達して樹状突起様の構造へ変化していく様子を明らかにした。

(3) FRET プローブを用いた低分子量 G タンパク質の活性評価

アクチン重合に重要な役割をもつ Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 Rac1 について、

Sema3E- PlexinD1 シグナルによる活性化制御の可能性を in vitro FRET イメージングで解析した。その結果、Sema3E の添加により新生ニューロンの先導突起における Rac1 の活性化が抑制されることが分かった。

(4) 光活性化 Rac1 (PA-Rac1)を用いた側方突起形成における Rac1 の機能解析

Rac1 の活性化が側方突起形成に十分かどうかを検討するため、PA-Rac1 を導入した新生ニューロンの先導突起の一部を光刺激し、側方突起の形成について in vitro タイムラプスイメージングで観察した。その結果、光刺激によって新生ニューロンの先導突起から側方突起が形成されること、この側方突起の形成は光刺激非感受性 PA-Rac1 では生じないことが明らかになった。

(5) PlexinD1 の過剰発現系におけるニューロンの移動動態解析

新生ニューロンにウイルスベクターを用いて PlexinD1 を過剰発現させ、スライス培養下でタイムラプスイメージングを行い、その挙動を解析した。

(6) 嗅覚刺激、嗅覚遮断による新生ニューロン配置に Sema3E-PlexinD1 シグナルが与える影響

我々が過去に報告した、香辛料を用いた嗅覚刺激法 (*PLoS One* 2012) や外鼻孔閉塞プラグを用いた嗅覚遮断法 (*J Neurosci* 2011) を用いて、Sema3E, PlexinD1 の発現量に与える影響を調べた。

次に、嗅覚入力変化が新生ニューロン配置に与える影響を解析するために、脳室下帯の新生ニューロンをレンチウイルスで蛍光標識し、マウスに嗅覚刺激及び嗅覚遮断をおこなった後、感染ニューロンの嗅球における最終停止位置を評価した。さらに、この過程における Sema3E-PlexinD1 シグナルの役割を明らかにするために、PlexinD1 の RNAi を発現するレンチウイルスを用いて、同様の解析を行った。以上の結果から、Sema3E-PlexinD1 シグナルが嗅覚入力依存的な嗅球内の新生ニューロン配置決定に関与することが示唆された。

引用文献

Sawada M, Kaneko N, Inada H, Wake H, Kato Y, Yanagawa Y, Kobayashi K, Nemoto T, Nabekura J, Sawamoto K. Sensory input regulates spatial and subtype-specific patterns of neuronal turnover in the adult olfactory bulb, *Journal of Neuroscience*, 31: 11587-11596, 2011.

Kato Y#, Kaneko N#, Sawada M# (# Co-first authors), Ito K, Arakawa S, Murakami S, Sawamoto K. A

subtype-specific critical period for neurogenesis in the postnatal development of mouse olfactory glomeruli, *PLoS One*, 7: e48431, 2012.

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)

Kaneko N, Sawada M, Sawamoto K. Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. 2017, in press. *Journal of Neurochemistry*, doi: 10.1111/jnc.14002. 査読あり

Tsuboi Y, Sawada M, Otsuka T, Sawamoto K. Neuronal regeneration by using endogenous stem cells and DDS technology. *Drug Delivery System*, 32, 46-49, 2017. doi: <https://doi.org/10.2745/dd.32.46>. 査読なし

Miyake M, Ito Y, Sawada M, Sakai K, Suzuki H, Sakamoto T, Sawamoto K, Kamijima M. Subchronic inhalation exposure to 2-ethyl-1-hexanol impairs the mouse olfactory bulb via injury and subsequent repair of the nasal olfactory epithelium. *Archives of Toxicology*, 90, 1949-58, 2016. doi:10.1007/s00204-016-1699-6. 査読あり

Ogino T, Sawada M, Takase H, Nakai C, Herranz-Pérez V, Cebrian-Silla A, Kaneko N, Garcia-Verdugo JM, Sawamoto K. Characterization of multiciliated ependymal cells that emerge in the neurogenic niche of the aged zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, 524, 2982-2992, 2016. doi:10.1002/cne.24001. 査読あり

Hirota Y#, Sawada M#, Huang S# (#Co-first authors), Ogino T, Ohata S, Kubo A, Sawamoto K. Roles of Wnt signaling in the neurogenic niche of the adult mouse ventricular-subventricular zone. *Neurochemical Research*, 41, 222-230, 2016. doi: 10.1007/s11064-015-1766-z. 査読あり

Yamagishi S, Yamada K, Sawada M, Nakano S, Mori N, Sawamoto K and Sato K. Netrin-5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain. *Frontiers in Cellular*

Neuroscience, 9: 146, 2015. doi: 10.3389/fncel.2015.00146. 査読あり

Ajioka I, Jinnou H, Okada K, Sawada M, Saitoh S, Sawamoto K. Enhancement of neuroblast migration into the injured cerebral cortex using laminin-containing porous sponge. *Tissue Engineering part A*, 21, 193-201, 2015. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0080. 査読あり

Ota H#, Hikita T#, Sawada M# (#Co-first authors), Nishioka T, Matsumoto M, Komura M, Ohno A, Kamiya Y, Miyamoto T, Asai N, Enomoto A, Takahashi M, Kaibuchi K, Sobue K, Sawamoto K. Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmip-mediated local inactivation of RhoA. *Nature Communications*, 30 July, 2014, doi: 10.1038/ncomms5532. 査読あり

澤本和延、松本真実、澤田雅人 「成体ニューロン新生における血管の役割」*生体の科学*、65: 215-219, 2014. <https://doi.org/10.11477/mf.24251016> 11. 査読なし

[学会発表](計 5 件)

Sawada M and Sawamoto K. Mechanisms for migration and maturation of new neurons in the adult brain. *The 8th Research Conference of Developmental Neurobiologists in South Korea*. 2016.07.08-09. Yonsei University International Campus, ソウル (韓国)

Sawada M, Huang S, Hikita T, Uemura A, Sawamoto K. A novel protrusion in new neurons regulating the migratory potential in the postnatal brain. 第39回日本神経科学大会、2016.07.20-22 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Sawamoto K and Sawada M. Olfactory input-dependent spatial regulation of neuronal turnover in the adult mouse olfactory bulb. *Japan Australia Meeting ON CELL DEATH*. 2015.10.21-23 The Walter and Eliza Hall Instituteメルボルン (オーストラリア)

Sawada M, Huang S, Hikita T, Uemura A, Sawamoto K. A mechanism regulating the morphology of migrating new neurons determines their final positioning in the postnatal olfactory bulbs. 第38回日本神経科学

大会、2015.7.28-31 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Sawada M, Huang S, Hikita T, Uemura A and Sawamoto K. Activity-dependent layer-specific sorting of new neurons in the olfactory bulb by Semaphorin3E-plexinD1 signaling-mediated regulation of migratory morphology. 第37回日本神経科学大会, 2014.09-11-13, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 雅人 (SAWADA, Masato)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 20645288