

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07071

研究課題名(和文) 中脳をモデル系とした新規神経細胞発生及び移動様式の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel patterns of neuronal development and migration using the midbrain as a model system

研究代表者

有村 奈利子 (Arimura, Nariko)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・リサーチフェロー

研究者番号：20420375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中脳は認知、情動、運動機能制御に関わる大変重要な領域である。しかし中脳の神経細胞の発生機構については不明な点が多い。多くの中枢神経細胞は、産生される場所と配置されて実際に機能する部位が異なるため、脳室面等で分化した後、細胞移動を行う。本研究の目的は、進化の最初期に発達する中脳をモデル系として、神経細胞移動の分子機構を明らかにすることである。本実験課題の実績として中脳神経細胞の移動様式の解明に関する研究をまとめ、神経細胞移動の最初期に起きる、分化直後の脳室面における脱上皮化を制御する分子機構を、組織染色およびタイムラプス法を用いて解明した。これらの結果については論文としてまとめて公刊した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常な脳神経系を作るためには、神経細胞が正しい場所に配置されることが必要です。今回の研究は、その神経細胞移動という重要な発生過程の最初期段階メカニズムを明らかにしたという点で、大きな意義があります。また、この過程がうまくいかないと様々な自閉症やてんかんの原因となると言われていますので、今回の研究成果は病態の理解や治療法の開発にもつながることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：The midbrain is a critical region that controls cognitive, emotional, and motor functions. However, the developmental mechanisms of neurons in the midbrain are still unclear. Many CNS cells undergo cell migration after differentiation in the ventricular surface and other areas since their product's location differs from the site where they are located and function. This study aims to elucidate the molecular mechanisms of neuronal migration using the midbrain, which develops during the earliest stages of evolution, as a model system. We have summarized the results of our studies on the migration patterns of mesencephalic neurons and elucidated the molecular mechanisms that control the de-epithelialization of the ventricular surface immediately after differentiation, which occurs at the beginning of neuronal migration by using tissue staining and time-lapse techniques. These results were summarized in a paper and published.

研究分野：神経科学、分子生物学

キーワード：中脳 神経細胞移動 Dscam

## 1. 研究開始当初の背景

中脳はドーパミンなどの重要な神経伝達物質を分泌して認知、情動、運動機能制御に関わる大変重要な領域である。また、脊椎動物の脳進化のごく初期に中脳は最も発達しており、緻密な神経回路を形成しうる分子的、形態的基盤を保存していると考えられる。しかしこの中脳の神経細胞の発生機構については不明な点が多い。

多くの中枢神経細胞は、産生される場所と配置されて実際に機能する部位が異なるため、脳室面等で分化した後、細胞移動を行う。大脳の興奮性及び抑制性神経細胞は、全く別の場所で分化し、大脳皮質まで移動する。一方、中脳神経細胞は、限られた脳室面から様々な種類の興奮性、抑制性細胞が「同時期に同領域で」産生され、同じ場所を移動するが、この分化・移動の制御機構はほとんど不明である。このような興奮性、抑制性細胞が同じ場所で分化・移動する現象は、橋や延髄などの神経核などで構成される他の領域にも共通する現象であるが、その詳細は未解明である。また、中脳背側(上丘)の神経細胞を短期的にラベルすると、同時期同領域で分化した細胞が各層にバラバラに移動・停止し大まかな層構造を形成する事から、中脳は、大脳小脳とは異なる未解明の層構造形成機構があると考えられる。

## 2. 研究の目的

中脳神経細胞で強く発現している Dscam (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule) は、一回膜貫通型の膜分子でありホモフィリック結合する。Dscam は発生初期から発現している事が示唆されていたが、その機能は不明であった。これまでの研究において私はプロテオミクス解析や中脳子宮内電気穿孔法を行い、中脳神経細胞では興奮性、抑制性細胞共に神経細胞移動の開始に Dscam/RapGEF2 (Rap1 活性化分子)/Rap1 のシグナル伝達が必須であることを見出した。Dscam は細胞外でホモフィリック結合をすることから、Dscam は神経細胞移動を開始させるスイッチであり、Rap1/RapGEF2 と共役して機能することを見出した。本研究では、これまで分化や移動が未解明である中脳をモデル系として、「多様に分化した神経細胞がいかんして個々の機能すべき場所に移動し、停止するか」を、現象論から分子機構まで明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

( ) 「同時期同領域で」多様に分化する中脳神経の遺伝子発現解析

中脳背側(上丘)は大まかな層構造をなし、多種多様な細胞群にて構成されるが、これら細胞はすべて第三脳室面で分化すると考えられている(右図4)。予備的実験にて、「同時期同領域」で多様な細胞が生まれ、多様且つ新規な細胞移動様式を示し、最終停止地点が異なる(=機能的に異なる)ことを見いだしているが、その詳細は不明である。そこで、各々の細胞(種)の遺伝子発現パターンの解析(トランスクリプトーム解析)と細胞間比較を行う。具体的には、レーザーマイクロダイセクションを用いた各細胞の RNA 回収、及び RNAseq によるトランスクリプトーム解析と細胞(種)間比較を行う。これにより幹細胞→分化・移動→機能的神経細胞の一連の遺伝子発現変化の全体像を解明する。さらに、細胞移動時の、移動や停止に関わる機能分子(誘因・反発因子などの受容体や細胞移動に関わる因子等)のスクリーニングを行い、細胞移動と停止に関わる分子が細胞間でいかに異なるかを明らかにする。これにより「各層での停止のメカニズム」にもアプローチする。これら実験で中脳発生を包括的に理解できると考えている。

( ) タイムラプス観察による中脳神経細胞の「多様な」移動様式の解明

上記( )でも述べた通り、中脳では幾つかの神経細胞移動様式が見られており、例えば様々な形態の leading process が観察されている。また興味深い事に、移動開始前に軸索を移動方向に伸長する神経細胞も見られた。これは移動後方に軸索を伸ばす従来の移動モデルとは逆であった。本研究では、子宮内電気穿孔法、中脳タイムラプス培養系とスライス培養組織染色法を使用して、中脳における神経細胞移動の仕組みを解明する。また、( )で同定した機能分子の過剰発現やノックダウンを行って、それぞれの細胞移動における機能を明らかにする。

## 4. 研究成果

当該年度の研究実績としては、多様に分化する中脳細胞の遺伝子発現解析として、まずは、大脳、小脳で知られているマーカー分子の発現パターンを中脳で包括的に解析した。そして新たな中脳神経細胞の分裂、分化様式を提案した(有村ら、Genes to Cells, 2019)。中脳神経細胞の発生は大脳皮質のそれと類似しているが、分裂細胞の位置が脳室面に限局し intermediate progenitor が存在しないことや、pro-neuronal marker として知られているマーカーが、中脳では post-mitotic に発現することなど、大脳皮質との決定的な違いが明らかとなった。これらについては論文にまとめ受理された。さらに、中脳神経細胞で興奮性細胞特異的 promotor を使用して、神経ラベルを行い、その特徴的な細胞移動様式が大きく3タイプに別れることを見出した(岡田ら、投稿準備中)。

更に、我々は、タイムラプス観察による中脳神経細胞の移動様式の解明に関する研究をまとめ、神経細胞移動の最初期に起きる、分化直後の脳室面における脱上皮化を制御する分子機構を、組

織染色およびタイムラプス法を用いて解明した。本研究を遂行するためには、神経組織の中で神経細胞だけを色分け標識する必要があった。そこでまず、子宮内電気穿孔遺伝子導入法と Cre-LoxP ゲノム組換え法を組み合わせることによって、神経細胞だけを色分けする方法を開発した。さらに、この中脳組織をスライス培養して経時(タイムラプス)動画レコーディングすることによって、生まれたての神経細胞の終足が脳室面に接着する様子や、それを剥がして神経細胞が上方へと移動を開始する様子を詳細に観察することが可能となった。この方法を使って神経細胞の終足を可視化し、さらにこの部分に集積するタンパク質について調べたところ、終足の先端部分、つまり接着部分の近傍に DSCAM というタンパク質が濃縮していることを見出した。次に、子宮内電気穿孔遺伝子導入法を用いてノックダウンベクターを遺伝子導入することで DSCAM タンパク質の機能を阻害(ノックダウン)し、生まれたての神経細胞の振る舞いを動画観察した。すると、DSCAM の機能を阻害した神経細胞では、終足を脳室表面から剥がすことができず(図2A 黄矢頭、図2C)、終足が長く引き伸ばされた(図2B)。この引き伸ばされた終足は、脳室面から引き剥がされず、結果として神経細胞が上方へと移動できなくなっていることがわかった。これまでの海外の研究により、神経細胞の終足は、N カドヘリンという接着剤の働きをするタンパク質によって脳室面へと繋ぎ止められている、ということがわかってきた。本研究グループは、DSCAM の機能を阻害すると終足の脳室への接着面における N カドヘリンの量が増加することを見出した。次に、DSCAM と結合して共に機能する分子をプロテオミクスという手法を用いて探索した。その結果、RapGEF2 という細胞内タンパク質が DSCAM の細胞内部分と結合することがわかった。RapGEF2 は低分子量 G タンパク質 Rap1 の活性化因子だが、DSCAM と結合するとその Rap1 活性化機能が大きく損なわれることを見出した。もともと Rap1 が N カドヘリンの接着剤としての機能を高めることは知られていましたので、「DSCAM が RapGEF2 に結合して Rap1 活性が低下すると、N カドヘリンという接着剤が減少して、その結果として終足が脳室面から剥がれる」のではないかと考えられた。実際に、DSCAM の機能を阻害(ノックダウン)すると終足の離脱障害が生じるが、この障害はさらに N カドヘリンや RapGEF2 の機能を阻害する(ダブルノックダウン)ことで解消されるということが観察された。これは、中脳の実際の神経細胞でも、DSCAM の下流シグナルとして RapGEF2 や N カドヘリンが働き、終足の離脱を調節しているということの意味していた。以上の我々の研究結果により、(i)新しく生まれた神経細胞の終足の先端部分に DSCAM が集積し、(ii)そこで RapGEF2 に結合してその機能を阻害することで Rap1 の活性を低下させ、(iii) N カドヘリンの接着剤としての働きを低下させることで、(iv) 終足の離断と神経細胞の移動を開始させる、ということが明らかにされた。

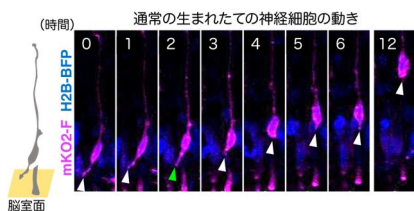


図1：子宮内電気穿孔法と Cre-LoxP ゲノム組換え法による神経細胞の可視化(紫)。左端の灰色の細胞は、0時間の細胞の形を描き出したもの。脳室面に短い突起が付着している(写真中の白矢印)。ラディアルグリアでは紫色に標識されないが、神経細胞へ分化したらすぐに紫色で標識されるようになる。通常(対照群)は、終足と呼ばれる神経細胞の短い突起(白い矢頭)が脳室面に接着しているが、ほどなくして脳室面から剥がれ、上方へと移動する(緑矢頭)。

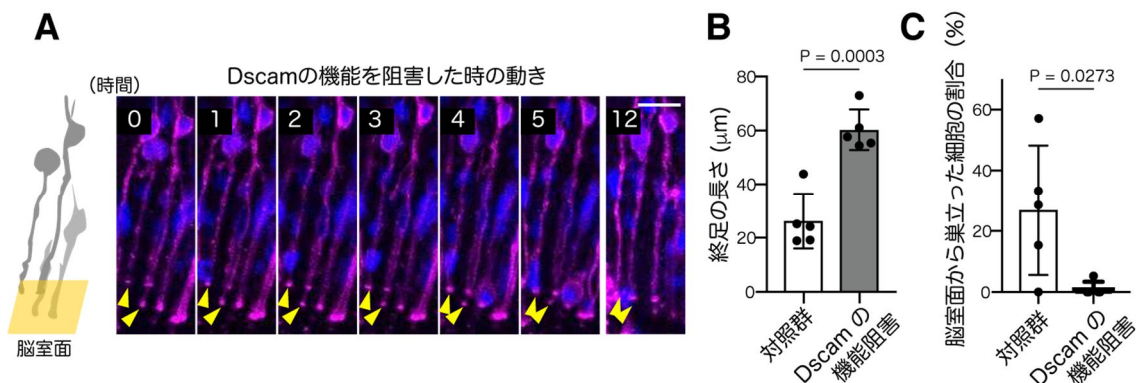


図2 (A) 図2と同様の方法で、DSCAM を機能阻害(ノックダウン)した時の細胞の動き。左端の灰色の細胞は、0時間の細胞の形を描き出したもの。DSCAM の機能阻害によって終足が剥れずに引き伸ばされる。結果として神経細胞の上方への移動が阻害されることになる。(B)終足の長さ。(C)脳室面から旅立った神経細胞の割合(%)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamashiro Kunihiko, Hori Kei, Lai Esther S.K., Aoki Ryo, Shimaoka Kazumi, Arimura Nariko, Egusa Saki F., Sakamoto Asami, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Watanabe Takaki, Uesaka Naofumi, Kano Masanobu, Hoshino Mikio	4. 巻 23
2. 論文標題 AUTS2 Governs Cerebellar Development, Purkinje Cell Maturation, Motor Function and Social Communication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101820 ~ 101820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arimura Nariko, Okada Mako, Taya Shinichiro, Dewa Ken-ichi, Tsuzuki Akiko, Uetake Hiroto, Miyashita Satoshi, Hashizume Koichi, Shimaoka Kazumi, Egusa Saki, Nishioka Tomoki, Yanagawa Yuchio, Yamakawa Kazuhiro, Inoue Yukiko U., Inoue Takayoshi, Kaibuchi Kozo, Hoshino Mikio	4. 巻 6
2. 論文標題 DSCAM regulates delamination of neurons in the developing midbrain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaba1693 ~ 1693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aba1693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arimura Nariko, Dewa Ken-ichi, Okada Mako, Yanagawa Yuchio, Taya Shin-ichiro, Hoshino Mikio	4. 巻 24
2. 論文標題 Comprehensive and cell-type-based characterization of the dorsal midbrain during development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 41 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 有村奈利子
2. 発表標題 幼若神経細胞の脳室面離脱：接着解除の分子機構
3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有村奈利子
2. 発表標題 DSCAMが制御する神経細胞の脳室面離脱：RapGEF2とN-cadherinの機能抑制を介して
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nariko Arimura, Mako Okada, Shin-ichiro Taya, Ken-ichi Dewa, Hiroto Uetake, Tomoki Nishioka, Yukiko U. Inoue, Takayoshi Inoue, Kozo Kaibuchi, Mikio Hoshino
2. 発表標題 DSCAMによるRapGEF2/Rap1とN-Cadherinの抑制が神経細胞の脱上皮化と細胞移動を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nariko Arimura, Kenichi Dewa, Mako Okada, Yuchio Yanagawa, Shin-ichiro Taya, Mikio Hoshino
2. 発表標題 The functional analysis of a down syndrome-associated gene in delamination of midbrain neurons
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Dewa, Nariko Arimura, Mako Okada, Yuchio Yanagawa, Shin-ichiro Taya, Mikio Hoshino
2. 発表標題 Functional analysis of Down's syndrome associated molecule in the cerebellum excitatory synapse formation
3. 学会等名 2018年度国際薬理学会(WCP2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nariko Arimura, Kenichi Dewa, Mako Okada, Yuchio Yanagawa, Shin-ichiro Taya, Mikio Hoshino
2. 発表標題 The functional analysis of a down syndrome-associated gene in neuronal migration of midbrain neurons
3. 学会等名 第12回神経発生討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nariko Arimura, Kenichi Dewa, Mako Okada, Yuchio Yanagawa, Shin-ichiro Taya, Mikio Hoshino
2. 発表標題 The functional analysis of a down syndrome-associated gene in delamination of midbrain neurons
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nariko Arimura, Kenichi Dewa, Mako Okada, Yuchio Yanagawa, Shin-ichiro Taya, Mikio Hoshino
2. 発表標題 The functional analysis of a down syndrome-associated gene in neuronal migration of midbrain neurons
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nariko Arimura, Kenichi Dewa, Mako Okada, Yuchio Yanagawa, Shin-ichiro Taya, Mikio Hoshino
2. 発表標題 The functional analysis of a down syndrome-associated gene in neuronal migration of midbrain neurons
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 出羽 健一, 有村 奈利子, 田谷 真一郎, 境 和久, 小泉 修一, 星野 幹雄
2. 発表標題 Functional analysis of Down's syndrome associated molecule in the cerebellum excitatory synapse formation.
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 出羽 健一, 有村 奈利子, 田谷 真一郎, 境 和久, 小泉 修一, 星野 幹雄
2. 発表標題 The role of DSCAM in the cerebellum.
3. 学会等名 第9回 光操作研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 出羽 健一, 有村 奈利子, 田谷 真一郎, 境 和久, 宮崎 大輔, 山崎 美和子, 一戸 紀孝, 渡辺 雅彦, 小泉 修一, 星野 幹雄
2. 発表標題 小脳興奮性シナプス形成におけるダウン症関連分子の機能解析
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山 義久, 山形 朋子, 有村 奈利子, 星 英司
2. 発表標題 行動ゴール達成過程における前頭葉 - 大脳基底核ネットワークの関与
3. 学会等名 第40回日本神経科学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshihisa Nakayama, Tomoko Yamagata, Nariko Arimura, Eiji Hoshi
2. 発表標題 Area-specific involvement of frontal areas and the basal ganglia in goal-directed behavior in monkeys
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap_有村奈利子 <a href="https://researchmap.jp/read0067214">https://researchmap.jp/read0067214</a> Personal homepage_Nariko Arimura, Ph.D <a href="https://www.truthofneuron.com/">https://www.truthofneuron.com/</a> 国立精神神経医療研究センター トピックス <a href="https://www.ncnp.go.jp/topics/2021/20210215.html">https://www.ncnp.go.jp/topics/2021/20210215.html</a> 国立精神神経医療研究センター プレスリリース <a href="https://www.ncnp.go.jp/topics/2020/20200903d.html">https://www.ncnp.go.jp/topics/2020/20200903d.html</a> 日本神経科学学会 神経科学トピックス <a href="https://www.jnss.org/news-topics?id=210209-01&amp;u=80ac6d55c92d77eead8d4d23c7bfcfc4">https://www.jnss.org/news-topics?id=210209-01&amp;u=80ac6d55c92d77eead8d4d23c7bfcfc4</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------