

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19700297
 研究課題名(和文) 発生期脊髄背側部における netrin1 の時期・領域特異的な発現調節機構の解明
 研究課題名(英文) Regulation of temporal and area specific expression of netrin-1 in the developing dorsal spinal cord
 研究代表者
 渡辺 啓介 (WATANABE KEISUKE)
 熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
 研究者番号：20446264

研究成果の概要(和文): 本研究では、マウス発生期脊髄において、軸索誘導分子 netrin-1 が背側部で産生される神経細胞を脊髄腹側部まで誘導することを明らかにした。さらに、線虫で netrin-Dcc シグナルとの関与が示唆されている Gsg1 が、発生期大脳皮質における適切な神経細胞の移動と樹状突起形成に重要な役割をもつことが示唆された。これらの結果から、発生期の神経回路網形成に重要な netrin-1 のさらなる重要性を明らかになった。

研究成果の概要(英文): We revealed that guidance molecule netrin-1 attracts ventral-ward migration of dorsal interneurons in the developing spinal cord. Furthermore, Gsg1, which is known to regulate neuroblast migration in *C. elegans*, is required for proper radial migration and dendrite formation of glutamatergic neurons during development of the cerebral cortex.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 神経科学・神経科学一般

キーワード： netrin-1、軸索誘導、発現調節、脊髄、DRG

1. 研究開始当初の背景

機能的な神経回路網形成の基盤は、発生期において多様な機能をもつ神経細胞の個性の獲得とそれに続く細胞移動や軸索伸長

が適切に行われることにある。後者の過程には netrin, semaphorin に代表される分泌性(長距離作動性)軸索誘導分子が重要な働きを持つ。軸索誘導分子は標的または非標的細

胞から分泌され、神経・グリア細胞に対して誘引または反発活性を持ち、細胞や軸索を適切な位置まで導くための細胞外環境を作り出す。発生期では、短期間に多くの種類の神経細胞やグリア細胞がそれぞれ異なる、しかも複雑な移動・投射パターンを示すことから、軸索誘導分子は様々な標的に対して時期・領域特有の作用をもつと考えられる。申請者がこれまで解析を行ってきた発生期のマウス脊髄での netrin の作用に限局しても、交差性の神経細胞や腹側部の介在神経細胞の軸索投射制御、オリゴデンドロサイト前駆細胞の移動制御など、その作用は実に多様であり、様々な場で使い分けられている。その広範な標的細胞の動態制御機構として、現在まで軸索伸長を行う細胞自身のレセプターの発現が変化することにより、netrin に対する反応性が変化するというメカニズムが明らかになっている。例えば、脊髄背側部の神経細胞の軸索は神経管底板の netrin-1 により誘引されるが、軸索が底板に接すると別の誘導分子 slit に対するレセプター Robo が発現し、netrin レセプター Dcc と相互作用する結果、netrin-1 に対する軸索の誘引反応性は失われ、slit により反発される。これに対して、我々は脊髄背側部の細胞が netrin-1 をある特定の時期にのみ局所的に発現することが、一次求心性神経線維 (dorsal root ganglion (DRG) 線維) の適切な軸索投射に重要であるということ新たに明らかにした。この結果は今まで報告されてきたような軸索伸長を行う細胞側の変化のみでなく、netrin-1 の発現部位自身が劇的に変化する (軸索誘導分子発現細胞側の変化) ことも広範な標的細胞の動態制御に重要であり、さらに回路網形成において、適切なタイミングで細胞移動や軸索投射が起こることが必要であることを示している。

2. 研究の目的

発生期中枢神経系では、先に誕生して移動を終えた神経細胞が特定の時期にのみ軸索誘導分子を発現することで、その後に産生される細胞細胞や軸索投射を正しく導き、さらにその発現時期と領域は何らかの機構により厳密に制御されているのではないかと考えるに至った。しかしながら、軸索誘導分子 netrin-1 の時期・領域特異的な発現制御機構は全く明らかとされておらず、その解明を本研究の目的とする。さらに netrin-1 シグナルに焦点を当て、その多様な機能を解析することで、発生期の神経回路網形成のメカニズムの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 脊髄背側部 netrin-1 発現細胞の同定と

netrin-1 による Olig3 系譜細胞の移動制御

まず始めに脊髄背側部における netrin-1 発現細胞の産生時期、移動様式の解析を行った。この過程で、脊髄背側部で産生される転写因子 Olig3 系譜細胞が netrin-1 に誘引される可能性を見出したため、引き続き詳細な解析を行った。

様々な妊娠ステージの netrin-1^{+/-lacZ} マウスに BrdU を投与し、その後組織切片を作製し、BrdU 免疫染色と X-gal 染色を行うことで、netrin-1 発現細胞の産生時期について解析を行った。

netrin-1 とそのレセプター Dcc 遺伝子欠損マウスを用いて、Olig3 系譜細胞の移動に異常がみられるかを Olig3^{+/-lacZ};netrin-1 ノックアウト、Olig3^{+/-lacZ};Dcc ノックアウトマウスを作製し、X-gal 染色することで検討した。さらに、脊髄背側部の組織片を netrin-1 強制発現細胞と共培養、ニワトリ胚エレクトロポレーション法を用いることで、Olig3 系譜細胞 (背側介在神経) に対する netrin-1 の誘因作用を調べた。

(2) Netrin シグナル関連分子による神経回路網形成機構の解析

発生期中枢神経系において、netrin-1 は多様な細胞移動・軸索伸長を制御している。Netrin-1 の機能についてさらなる知見を得るため、線虫で netrin-Dcc シグナルとの関与が示唆されている Gsg 1 (glutamatergic-specific gene 1) について解析を行った。

発生期中枢神経系の組織切片を作製し、Gsg1 の発現パターンを in situ hybridization 法を用いて検討した。

Gsg1 shRNA プラスミド を GFP プラスミド と共に in utero electroporation 法によりマウス胎仔脳に導入することで、Gsg1 のノックダウン実験を行い、その後大脳皮質での GFP 陽性細胞の分布を調べた。

上記と同様な手法を用いて Gsg1 のノックダウン実験を行い、皮質興奮性神経細胞の樹状突起形成異常を検討した。

4. 研究成果

(1) 脊髄背側部 netrin 1 発現細胞の同定と netrin-1 による Olig3 系譜細胞の移動制御

netrin 1 を一過性発現する細胞の同定を行った。その結果、脊髄背側部 netrin-1 発現細胞がマウス胎生 (E)10.5 ~ 11.5 日目に背側脊髄の腹側部で生まれ、E12.5 に脊髄背外側部まで放射状に移動する神経細胞であることを明らかとなった。

Olig3 系譜神経細胞は E9.5 ~ 10.5 に脊

髄背側部で産生され、脊髄腹側部まで達する(図 1B)。この移動様式は抗 Olig3 抗体を用いた免疫染色(図 1A)では、検出できないが、Olig3^{lacZ} マウスを用いた X-gal 染色を行うことで可視化できる(図 1B,C; Ding et al., 2005)。そこで、この移動に腹側正中中部で発現する netrin-1 が関わっているかを調べるために netrin-1^{-/-}; Olig3^{lacZ/+} マウス、および Dcc^{-/-}; Olig3^{lacZ/+} マウスを作製して解析を行った結果、これらのノックアウトマウスで Olig3 系譜細胞の移動に著しい異常がみられた(図 2B,C; 図 3 矢頭)。さらに組織片培養を用いた共培養により netrin-1 が Olig3 系譜細胞に対して誘因作用を持つことを明らかにした(図 4)。ニワトリ胚を用いたエレクトロポレーション法により、最背側部に netrin-1 を異所性に発現させると、背側神経細胞(Islet1/2 陽性細胞)の腹側側への移動が障害された(図 5、黄色矢印)。

これらの結果より、脊髄腹側正中中部由来の netrin-1 が Olig3 系譜細胞に対して誘引的に作用し、脊髄腹側部までの移動を制御していることが明らかとなった。

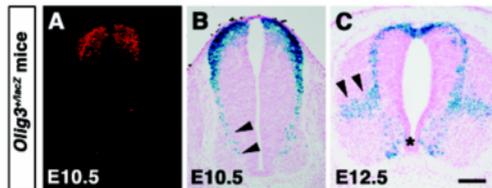


図 1. (A) E10.5 脊髄での Olig3 抗体を用いた免疫染色. (B,C) Olig3^{lacZ/+} マウス脊髄の X-gal 染色像. (B) E10.5. (C) E12.5.

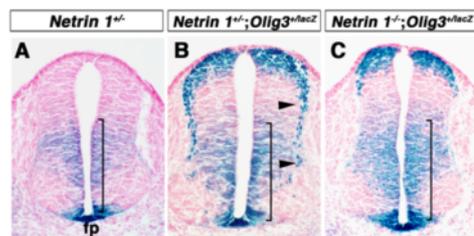


図 2. (A) netrin-1^{-/-}; (B) netrin-1^{+/-}; Olig3^{lacZ/+} netrin-1^{-/-}; (C) netrin-1^{-/-}; Olig3^{lacZ/+} マウス脊髄(E10.5)における Olig3 系譜細胞の分布.

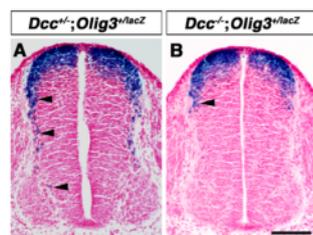


図 3. (A) Dcc^{+/+}; Olig3^{lacZ/+}、(B) Dcc^{-/-}; Olig3^{lacZ/+} マウス脊髄(E10.5)における Olig3 系譜細胞の分布.

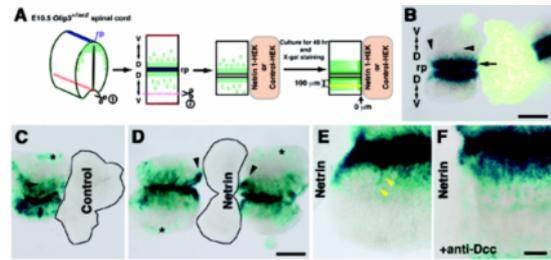


図 4. E10.5 Olig3^{lacZ/+} 脊髄背側部組織片と Netrin-1 発現細胞の共培養. (A) 実験のスキーム. (B-F) X-gal staining. (B) 培養開始前 (C)コントロール. (D)netrin-1 発現細胞との共培養. Netrin-1 発現細胞側に Olig3 系譜細胞が誘引されているのが観察される.(D 矢頭).

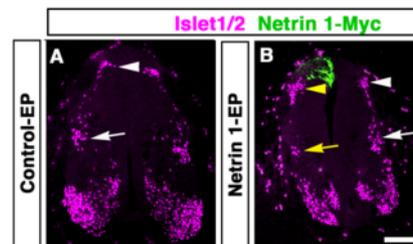


図 5. ニワトリ胚エレクトロポレーション法による netrin-1 異所性発現実験. (A) Control. (B) 脊髄背側部に netrin-1 を強制発現させた(左側、緑色). 強制発現側で dorsal interneuron(Islet1/2 陽性細胞)の腹側方向への移動(黄矢頭 矢印)に異常がみられる。

(2) netrin シグナル関連分子による神経回路網形成機構の解析

マウス E14.5 の中枢神経系において、Gsg1 は大脳皮質の興奮性神経細胞に強く発現を示した(図 6A)。間脳、中脳領域にも発現するが、この時期の他の脳領域では強い発現は観察されなかった、ほぼ大脳皮質特異的な発現パターンを示した。

コントロール shRNA と GFP を E14.5 の大脳皮質に導入し、1 週間後に GFP 陽性細胞の分布を調べると、ほとんどの陽性細胞は皮質表層に到達しているのが観察された(図 6B)。一方で、Gsg1 のノックダウンされた神経細胞では細胞移動に障害がみられ、異所性に細胞が分布することが明らかになった(図 6C)。

前述した Gsg1 のノックダウンされた神経

細胞の細胞形態を観察したところ、コントロールにおける神経細胞は多数の基底樹状突起が認められたが(図 6D 矢頭) Gsg1 のノックダウン細胞ではその形成に著しい異常が観察された(図 6E 矢頭)。

以上の結果より、マウス発生期大脳皮質において、Gsg が興奮性神経細胞に特異的に発現し、適切な神経細胞の移動と樹状突起形成に重要な役割をもつことが明らかとなった。

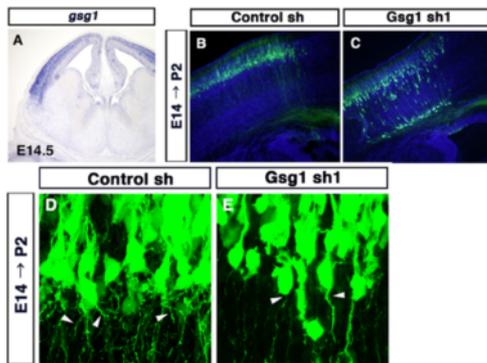


図 5. (A) マウス E14.5 大脳皮質での gsg1 の発現. (B-E) shRNA を用いた Gsg1 ノックダウン実験.

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 6 件)

Murakami S, Ohki-Hamazaki H, Watanabe K, Ikenaka K and Ono K. Netrin 1 provides a chemoattractive cue for the ventral migration of GnRH neurons in the chick forebrain. *J. Comp. Neurol.* 518. 2019-2034, **2010**. (査読有)

Muramatsu E, Nakahara S, Ichikawa J, Watanabe K, Matsuki N and Koyama R. The ratio of DCC to UNC5A netrin-1 receptors on the growth cone regulates mossy fibre directionality. *Brain* 133. 60-75, **2010**. (査読有)

Ono K and Watanabe K. Netrin1 signaling and dorsal spinal cord formation. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.* 118,

77-85, **2009**. Review (in Japanese). (査読無)

Tanahira C, Higo S, Watanabe K, Tomioka R, Ebihara S, Kaneko T and Tamamaki N. Parvalbumin neurons in the forebrain as revealed by parvalbumin-Cre transgenic mice. *Neurosci. Res.* 63. 213-223, **2009**. (査読有)

Masuda T,* Watanabe K,* Sakuma C,* Ikenaka K, Ono K and Yaginuma H. Netrin-1 Acts as a Repulsive Guidance Cue for Sensory Axonal Projections toward the Spinal Cord. *J. Neurosci.* 28, 10380-10385, **2008**. * These authors equally contributed.

(査読有)

Ono K, Takebayashi H, Ikeda K, Furusho M, Nishizawa T, Watanabe K and Ikenaka K. Regional- and temporal-dependent changes in the differentiation of Olig2 progenitors in the forebrain, and the impact on astrocyte development in the dorsal pallium. *Dev. Biol.* 320, 456-468, **2008**. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

渡辺啓介、Novel membrane protein Gsg1 is essential for neuronal migration and dendrite formation of cortical pyramidal neurons 第 4 回神経発生討論会、2010 年 3 月 19-20、自然科学研究機構、愛知

渡辺啓介、Identification of genes specific to glutamatergic-neuron precursors in the developing mouse neocortex、COE サマーリトリートセミナー、2009 年 9 月 3-4、ホテルグリーンピア南阿蘇、熊本

渡辺啓介、Identification of genes specific to glutamatergic-neuron precursors in the developing mouse neocortex、第 32 回神経科学大会、2009 年 9 月 16-18 日、名古屋国際会議場、愛知

渡辺啓介、Videomicroscopic observation
of the proliferating intermediate
GABAergic neuron progenitors in vitro、
第31回神経科学大会、2008年7月9-11日、
東京国際フォーラム、東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 啓介 (WATANABE KEISUKE)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：20446264