

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890096

研究課題名（和文）

大脳皮質形成機構のライブ観察に基づく解明

研究課題名（英文）

Reveal the mechanism of neocortical development by live imaging

研究代表者

榊原 明 (SAKAKIBARA AKIRA)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20510217

研究成果の概要（和文）：

生体組織内における大脳皮質椎体ニューロンの移動と軸索形成を胎仔脳スライス培養法により観察し、同時に、中心体の *in situ* における可視化を達成し、ニューロン移動・軸索形成への関与様式を明らかにした。主な成果としては、1) 多極型移動段階にあるニューロンにおいて中心体は最も盛んに伸長している突起に向かって動くこと；2) ロコモーション移動過程にあるニューロンにおいて核転位に伴い、核が中心体を追い越す局面が存在すること；3) ニューロンが移動しつつ後方に向かって軸索形成を行う際に、中心体は核の前方に位置したままであることを示した。これらの結果は、当該分野におけるこれまでの常識を覆すインパクトのあるものである。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we have highlighted some critical points regarding the centrosome positioning in neocortical pyramidal neurons during the migration and axon/dendrite formation *in situ*. Major points are: 1) centrosome in migrating multipolar neurons moves toward the most dominantly growing process; 2) leading centrosome is occasionally overtaken by rapidly translocating nucleus during a locomotion cycle; 3) centrosome proximity appears not to be essential to the backward formation of an axon-like process by locomoting neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：細胞生物学

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：大脳皮質形成、細胞移動、細胞極性、細胞骨格、イメージング

1. 研究開始当初の背景

哺乳類大脳皮質においては脳室面で早い時期に産生されたニューロンの細胞体ほど深層に配置されるというインサイドアウト様式の層形成が古くから知られており、遅生まれニューロンが脳室面を離れ表層に向かって移動してゆく過程で早生まれニューロンを追越してゆくと考えられている。しかし、この移動モデルはパルスチェイス実験後に固定化された標本におけるニューロンの配置を説明するために考案されたものであり、ライブイメージングの結果に基づいたものではない。それゆえ実際の層形成過程における個々のニューロンの動態をライブ観察することにより検証されるべきであろう。一方で、大脳皮質ニューロンが神経軸索を形成、伸長させてゆく過程、樹状突起を形成するタイミングなどに関する知見も極めて乏しい。これも同様に大脳皮質ニューロンによる軸索、樹状突起形成過程のライブ観察に基づく経時的な解析がほとんどなされていないことが原因である。

神経系に限らず、これまで、細胞の移動、極性化の基盤となる分子機構に関しては、二次元平板培養条件下での研究が盛んに行なわれており、分子レベルでの制御メカニズムに関して膨大な情報が集積されつつある。しかし、生体脳組織内におけるニューロン移動・極性化の制御が、これまでに研究されてきた異なる細胞種、培養条件のもとで観察された移動制御と共通のメカニズムを利用しているかどうかは定かでない。ゆえに、生体組織内におけるニューロン移動の動態観察に基づいた検証が必要であると考えた。

2. 研究の目的

大脳皮質錐体ニューロンを素材として、ニューロン移動、樹状突起形成、神経軸索形成といった脳形成の中心を為す形態形成過程のライブ観察に基づく実態解明を行なう。同時に、それらの基盤となる分子機構を解析するための手段として、散発性ニューロン標識と共役した形での遅延型遺伝子過剰発現システムを確立し、細胞骨格系制御因子に関して変異型分子の過剰発現に基づく包括的解析を試みる。本研究は、これまでの研究とは一線を画し、脳組織形成の基盤となる分子機構を生体組織内の実態に即して解明することを目指している。

3. 研究の方法

マウス胎仔脳スライス培養法を利用して、散発性に蛍光標識したニューロンを優れた

空間解像度、時間解像度で経時的に観察することが可能なイメージング系を確立した。

(1) マウス大脳皮質の錐体ニューロン発生過程における移動様式の解析ならびに軸索、樹状突起の形成初期段階に注目したニューロン形態変化のタイムラプス観察、

(2) ニューロン移動、軸索・樹状突起形成の基礎となる細胞極性の制御機構に関連して、ニューロンにおける主要微小管形成中心である中心体、細胞内膜輸送系極性化の指標となるゴルジ装置の可視化により、それらの細胞内動態を解析した。

4. 研究成果

本研究では、まず中間帯を多極型移動しているニューロンにおいて主要な微小管形成中心である中心体が最も盛んに伸長している突起に向かって動いてゆくことを明らかにした (図 1A)。さらに、ロコモーション移動段階にあるニューロンにおいて細胞核が前方に動く際に核の前方に配置された中心体をしばしば追い越してその位置関係が逆転する瞬間が存在することを見出した (図 1B)。この結果は、これまで一般に信じられてきた核の前方に位置する中心体から伸長した細胞質微小管がダイニンモーターの力を使って核を前方に引っ張っているというモデル (Tsai, LH, and Gleeson, JG, Nucleokinesis in neuronal migration (2005) Neuron 46: 383-388) では説明出来ない。つまり、今回の結果から核移動のための駆動力として微小管系モーター以外のメカニズムが利用されていることが強く示唆された。

また、皮質板に進入した後、脳の表面にむかってロコモーション移動するニューロンから後方に向かって軸索が形成される際には、中心体が核に対して前方に配置されたままの状態を開始されることを明らかにした (図 1C)。この結果は最近米国のグループが発表した原著論文 (de Anda, FC et al., Centrosome motility is essential for initial axon formation in the neocortex (2010) J. Neurosci. 30: 10391-10406) の内容と正反対の結果であることから SfN2010, ASCB2010 など海外の学会で発表した際に、盛んな議論を招くこととなった。

本研究では、さらに大脳皮質表層付近の皮質板に到達したニューロンが樹状突起を脳の表層に向けて形成する際の細胞極性制御において微小管細胞骨格が重要な役割を果たしていることをガンマ-チューブリン枯渇ニューロンの表現型解析から示した。通常、錐体ニューロンが樹状突起を形成する際には中心体は樹状突起の根元、細胞体に対して脳の表面側に配置されている。こ

の配置は樹状突起先端の成長領域に向けて微小管をレールとした膜小胞輸送を効率的に行うために適した配置であると想像出来る。ガンマ-チューブリン枯渇ニューロンにおいては樹状突起の成長方向が定まらず頻繁に向きを変えていること、このような状況下では中心体の細胞内配置も不安定であることが明らかになり、結果として皮質板内部に樹状突起・軸索極性が反転したニューロンが出現することを示した。

これらの結果は微小管細胞骨格の極性が大脳皮質錐体ニューロンの移動ならびに軸索・樹状突起形成それぞれの段階において極めて重要な役割を担っていることを示しており、機能的な大脳皮質を形作るニューロン配置・神経回路形成メカニズムを分子レベルで理解するという本研究の目標達成に向けて大きく前進した。

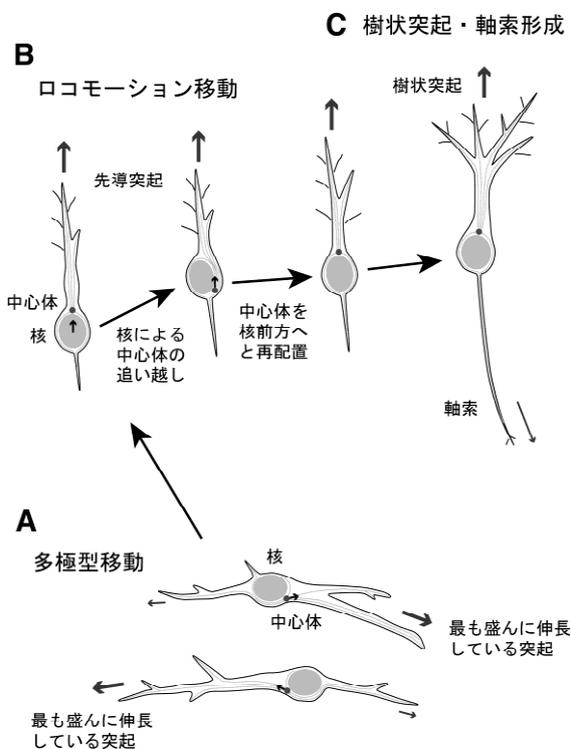


図1 本研究で明らかにした大脳皮質錐体ニューロンの移動過程における中心体動態

- (A) 多極型移動段階にあるニューロンでは中心体は最も盛んに伸長している突起に向かって動く
- (B) ロコモーション移動段階にあるニューロンにおいて核が前方に動く際に核の前方に配置された中心体をしばしば追い越してその位置関係が逆転する瞬間が存在する
- (C) ニューロン移動終盤に軸索・樹状突起が形成される際に中心体は軸索側でない

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 3 件) (全て査読有)

(1) Miyata, T., Ono, Y., Okamoto, M., Masaoka, M., Sakakibara, A., Kawaguchi, A., Hashimoto, M., Ogawa, M.: Migration, early axonogenesis, and Reelin-dependent layer-forming behavior of early/posterior born Purkinje cells in the developing mouse lateral cerebellum. (2010) *Neural Dev.* 5:23

(2) Wang, Y., Nakayama, M., Pitulescu, M. E., Schmidt, T. S., Bochenek, M. L., Sakakibara, A., Adams, S., Davy, A., Deutsch, U., Barberis, A., Benjamin, L. E., Makinen, T., Nobes, C. D., Adams, R. H.: Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. (2010) *Nature* 465:483-486

(3) Minobe, S., Sakakibara, A., Ohdachi, T., Kanda, R., Kimura, M., Nakatani, S., Tadokoro, R., Ochiai, W., Nishizawa, Y., Mizoguchi, A., Kawauchi, T., Miyata, T.: Rac is involved in the interkinetic nuclear migration of cortical progenitor cells. (2009) *Neurosci. Res.* 63:294-301

[学会発表] (計 12 件)

(1) Sakakibara, A., Sato, T., Masaoka, M., Miyata, T., Function of microtubule cytoskeleton in polarization of neocortical pyramidal neurons during the 3D migration and axon/dendrite formation in the developing mouse cerebrum. The 50th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2010 年 12 月 14 日 Pennsylvania Convention Center (USA)

(2) Sakakibara, A., Sato, T., Masaoka, M., Ogawa, M., Miyata, T., Dynamics of centrosome and Golgi apparatus in neocortical pyramidal neurons during the transition of migration mode from multipolar to locomotion, and formation of axon-like fiber. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2010 年 11 月 14 日 San Diego Convention Center (USA)

(3) 榑原明、佐藤俊之、正岡実、小川正晴、宮田卓樹 大脳皮質錐体ニューロンの示す多極型からロコモーションへの移動モード転換と軸索様突起伸長開始過程における中心体、ゴルジ装置の細胞内動態 第33回日本神経科学大会 2010年9月4日 神戸コンベンションセンター (兵庫県)

(4) 榑原明、佐藤俊之、正岡実、小川正晴、宮田卓樹 皮質板ニューロンに形成される一次樹状突起の形態的起源と動的变化：大脳皮質形成の実態 第43回発生生物学会 2010年6月22日 京都国際会館 (京都府)

(5) 榑原明、佐藤俊之、正岡実、小川正晴、宮田卓樹 マウス胎仔大脳皮質スライス培養を利用した錐体ニューロンの移動と軸索、樹状突起形成の動態解析 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010年3月28日 岩手県民会館 (岩手県)

(6) Sakakibara, A., Sato, T., Masaoka, M., Ogawa, M., Miyata, T., Live imaging the migration, axon/dendrite formation, and MTOC dynamics of cortical plate neurons under the 3D slice culture of embryonic mouse cerebrum. The 49th American Society for Cell Biology Annual Meeting 2009年12月7日 San Diego Convention Center (USA)

(7) 榑原明、佐藤俊之、正岡実、小川正晴、宮田卓樹 ライブイメージングに基づくマウス大脳皮質層形成過程の解析 第32回日本神経科学大会 2009年9月18日 名古屋国際会議場 (愛知県)

(8) Sakakibara, A., Sato, T., Masaoka, M., Ogawa, M., Miyata, T., Live imaging the cortical lamination in slice culture of embryonic mouse cerebrum. The 16th International Society of Developmental Biologists Congress 2009年9月8日 Edinburgh International Conference Centre (UK)

(9) 榑原明、佐藤俊之、正岡実、宮田卓樹 マウス大脳皮質ニューロンの移動と層形成機構の in situ イメージング解析 第61回日本細胞生物学会大会 2009年6月3日 名古屋国際会議場 (愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榑原 明 (SAKAKIBARA AKIRA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20510217

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし