

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 10 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500421

研究課題名(和文) 大脳皮質形成の神経細胞移動と配置における ERK1/2 の役割

研究課題名(英文) Roles of ERK1/2 in neuronal migration and positioning during cerebral cortical development

研究代表者

今村 宰 (IMAMURA, OSAMU)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・准教授)

研究者番号：40534954

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)：MAPキナーゼファミリーに属するErk1/2は中枢神経細胞の増殖・分化および記憶・学習などに関与するシグナル伝達分子である。本研究では大脳皮質形成過程におけるErkシグナル伝達経路の役割を、主に神経細胞特異的Erk1/2ダブルノックアウトマウス(Erk1<sup>-/-</sup>-Erk2<sup>flox/flox</sup>;Synapsin-Cre)を用いて解析し、Erkシグナリングが神経細胞の移動・配置に加えて神経回路網の構築にも機能していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The mitogen activated protein kinases, Erk1 and Erk2 (Erk1/2) are critical intracellular signaling intermediates in proliferation and differentiation. Erk1/2 is also essential for memory and learning in the brain. In this study, to elucidate the roles of Erk1/2 in the developing mouse cerebral cortex, we generated neuron-specific Erk1/2 double knockout mice using Synapsin-Cre mice and found that Erk signaling is required for radial migration, neuronal positioning and neuronal circuit formation.

研究分野：総合領域

キーワード：大脳皮質形成 シグナル伝達 細胞移動 ノックアウトマウス 神経回路

### 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質を構成している神経細胞には興奮性ニューロンと抑制性ニューロンが存在している。興奮性ニューロンは、胎生期の脳室帯に存在する放射状グリアから産生され、放射方向に移動し、先に生み出されたニューロンほど深層に、後から誕生したニューロンほど表層に配置することにより6層構造を形成する。一方、大脳皮質の抑制性ニューロンは大脳基底核原基で誕生し、接線方向への移動により皮質へと進入し神経回路に組み込まれる。近年、大脳皮質形成異常を示すモデル動物およびヒト遺伝性疾患の原因遺伝子の同定を足がかりに、神経細胞の移動障害が脳形成異常のみならず精神遅延を伴う重篤な精神疾患を引き起こすことが明らかになりつつある。しかし、これまでに神経細胞の移動・配置に関与する候補分子は複数同定されてきているものの、それらを制御する仕組みについては未解明な点も多く残されている。

代表者はこれまでに、Nestin-Cre マウスを用いた神経幹細胞特異的 Erk2 ノックアウトマウス(Erk2 Nes-ck0)を作出し、中枢神経系における Erk2 の機能が神経幹細胞の生存、自己複製および未分化維持に重要であることを示してきた(Stem Cells 2008)。さらに、大脳皮質の発生過程において Erk1 が Erk2 の機能を代償している可能性が示唆されたため、Erk1 の全身性ノックアウトマウスと Erk2 Nes-ck0 を交配させ、Erk1/2 ダブルノックアウトマウス(Nes-DKO)を作出したところ、大脳皮質の層構造形成異常や神経細胞の大脳皮質表層(第2/3層)への移動障害および放射状グリアの突起構造異常などを見出した(Genes Cells 2010)。しかし、Nestin-Cre マウスは神経幹細胞において Cre リコンビナーゼを発現するために、発生過程の大脳皮質を構成する神経細胞における Erk シグナル伝達経路の役割については未解決の問題が存在

していた。

### 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて、本研究では Erk シグナリングを介した細胞移動・配置のメカニズムをさぐることにより、大脳皮質形成における神経細胞の移動・配置に関わる分子機構の解明および神経細胞特異的 Erk1/2 ノックアウトマウスの作製及びその表現解析から大脳皮質形成における Erk シグナル伝達経路の役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

申請者らのグループによって Cre-loxP システムを利用して作出された C57BL/6 バックグラウンドの Erk2<sup>flox/flox</sup> と Erk1<sup>-/-</sup>Erk2<sup>flox/flox</sup> コンディショナルノックアウトマウスおよび野生型マウスを用いて以下の研究項目を中心に行った。

(1) マウス胎生 14.5 日の脳室帯あるいは大脳基底核原基に子宮内電気穿孔法で Cre リコンビナーゼと蛍光タンパクを発現するプラスミドを導入し、発生期の様々な時期に生み出される Erk2 あるいは Erk1/2 欠損神経細胞の移動および大脳皮質内での配置を固定切片およびスライス培養系で継時的に観察した。

(2) 神経細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Synapsin-Cre トランスジェニックマウス (Jackson Laboratory より購入) と交配させて Erk2 あるいは Erk1/2 ダブルノックアウトマウスを作成し、大脳皮質の層構造形成における機能と異常を明らかにした。大脳皮質の 6 層構造は各層に特異的な抗体 (Reelin, Cux1, Ctip2, Foxp2, Tbr など) を用いた免疫組織染色により評価した。リン酸化抗体アレイは Kinexus Antibody Microarray Service、プロテオーム解析は島津テクニカ研究所の受託解析を利用した。ゴルジ染色は FD Rapid GolgiStain Kit のマニ

ュアルに準じて実施した。

#### 4. 研究成果

脳室帯に存在する放射状グリアの非対称分裂によって生み出された興奮性ニューロンは、放射状グリアの突起に沿って放射移動するが、Nes-DKO では放射状グリアの足場構造となる突起が胎生後期から維持できなくなることから、Erk1/2の機能欠損による細胞移動障害の影響がニューロン自身によるものなのか(細胞自律的)、あるいは放射状グリアの足場構造の異常によるものなのか(細胞非自律的)不明であった。そこで、Erk1/2が細胞自律的に神経細胞移動を制御しているか検討した。胎生期マウス  $Erk1^{-/-}Erk2^{flox/flox}$  の脳室帯あるいは大脳基底核原基に子宮内電気穿孔法で Cre リコンビナーゼと蛍光タンパクを発現するプラスミドを導入し、発生期に生み出される神経細胞の挙動を時系列的に観察したところ、Erk1/2を機能抑制した新生神経細胞の放射方向と接線方向への移動に遅延が認められた。また、層構造特異的に発現するマーカーに対する抗体を用いた免疫組織学的解析の結果、脳室帯から生み出された Erk1/2 ノックダウン神経細胞では皮質板内の配置に異常が観察された。これらのことから大脳皮質形成における神経細胞移動と配置に Erk1/2 が細胞自律的に機能している可能性が考えられた。

次に、 $Erk2^{flox/flox}$  マウスまたは  $Erk1^{-/-}Erk2^{flox/flox}$  マウスを Synapsin-Cre トランスジェニックマウスと交配することにより、神経細胞における Erk1/2 の役割について検討した。Erk2 ノックアウトマウス (Syn-Erk2) では成長障害や神経発生異常は認められず、大脳の組織学的な解析においても顕著な変化は確認できなかった。Erk1/2 ダブルノックアウトマウス (Syn-DKO) はメンデルの法則に従い正常に生まれたが、生後5日目から成長遅延を呈し、10日目頃より歩行障害などの運動機能異常が観察されるように

なり、2週間以内に全て死亡した。また、大脳や海馬、小脳が Syn-Erk2 よりも顕著に萎縮していた。発生段階的に大脳皮質をヘマトキシリン・エオジン染色ならびに層構造特異的なマーカーに対する免疫染色により観察したところ、Syn-DKO では胎生後期より層構造の乱れに加えて表層と深層に局在する細胞数の減少や形態異常が認められた。この原因として神経細胞移動に障害がある可能性が考えられたため、プロモデオキシウリジンをを用いた Birthdating 解析を行った結果、中間帯から皮質板への進行が遅延していることが明らかとなった。一方、Nestin-Cre トランスジェニックマウスとの交配により作出された Erk1/2 ダブルノックアウトマウスで見られた放射状グリアの突起構造異常は観察されなかったことから、大脳皮質形成における神経細胞移動と配置には Erk1/2 の自律的機能が重要であると考えられた。

発生期の神経細胞における Erk1/2 の制御機構を解明するために、Syn-DKO および野生型のマウス大脳皮質抽出液を出発材料として、二次元電気泳動と LC-MS/MS およびリン酸化抗体アレイによるプロテオーム解析を行ったところ Erk1/2 欠損によりリン酸化状態が変動するタンパク質として、アクチン細胞骨格の脱重合因子であるコフィリンとその調節因子である LIM キナーゼ (LIMK) を同定した。現在、Erk1/2 欠損による LIMK/コフィリンのリン酸化状態の低下と Syn-DKO で認められた神経細胞移動障害との関連について検討を進めている。

LIMK/コフィリンは神経細胞の伸展や退縮に機能することが知られていることから、次に神経突起形成における Erk1/2 の関与について検討した。生後12日目の新生仔マウスに対してゴルジ染色を行ったところ、Syn-DKO の大脳皮質や海馬領域では神経突起の伸展や形態に異常があることが明らかとなった。また、Syn-DKO の大脳皮質領域では、

樹状突起スパイン数の減少は認められなかったが、異常な形態を示すスパインの割合が増加していた。一方、発生過程の Syn-DKO 大脳皮質における放射方向への移動細胞の神経突起形態に大きな変化は見られなかった。大脳皮質から神経細胞を採取し培養したところ、Syn-DKO では軸索伸展や樹状突起形成に異常が認められた。また、Erk1/2 欠損に伴い LIMK とコフィリンのリン酸化が低下していることもウェスタンブロット法により明らかにし、神経細胞の突起形成や成熟に Erk/LIMK/ コフィリン経路が重要な役割を果たしていると推察された。以上の結果より、Erk1/2 は大脳皮質形成過程において神経細胞の移動・配置に加えて神経回路網の構築にも寄与している可能性が示唆された。

#### 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)

[学会発表](計5件)

今村宰、新井仁明、伊達木穰、内田龍児、供田洋、瀧嶋邦夫「神経幹細胞の分化を制御する既存薬剤の探索及びその作用機構の解明」第87回日本生化学大会、2014年10月17日、国立京都国際会館(京都)

新井仁明、今村宰、松村耕治、伊達木穰、瀧嶋邦夫「外傷性脳損傷におけるSROB1によるp53を介した細胞死」第87回日本生化学大会、2014年10月16日、国立京都国際会館(京都)

今村宰、伊達木穰、新井仁明、Gilles Pages、Jacques Pouyssegur、遠藤昌吾、瀧嶋邦夫「大脳皮質形成過程におけるERKシグナルの役割」第86回日本生化学大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜(横浜)

新井仁明、今村宰、松村耕治、伊達木穰、瀧嶋邦夫「神経突起伸長へのSROB1の関与」第86回日本生化学大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜(横浜)

新井仁明、松村耕治、今村宰、伊達木穰、瀧嶋邦夫「SROB1は脳外傷における神経細胞死経路に關与する」第85回日本生化学大会、2012

年12月15日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

今村 宰 (Imamura Osamu)

防衛医科大学校医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号：40534954

##### (2)研究分担者

瀧嶋 邦夫 (Takishima Kunio)

防衛医科大学校医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号：50531365

##### (3)伊達木 穰 (Dateki Minori)

防衛医科大学校医学教育部医学科専門課程・助教

研究者番号：00415879