

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430020

研究課題名(和文) 大脳皮質層形成過程におけるプレキシンA2/A4シグナルの解析

研究課題名(英文) A role of Plexin A2/A4 signaling in layer formation of the mouse cerebral cortex

研究代表者

畠中 由美子 (HATANAKA, Yumiko)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特別協力研究員

研究者番号：40271548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：プレキシンA2/A4二重変異マウスでは大脳皮質浅層ニューロンが移動を停止できず第1層に異所的に分布する。本研究ではこのマウスの解析を通し、新規移動停止機構の解明を目指した。プレキシンA2/A4タンパク質は浅層ニューロンの先導突起上に分布し、細胞自律的に機能した。一方、リガンドであるセマフォリン6Aは脳室帯のラジアルグリア細胞に由来し、そのタンパク質はラジアルグリア細胞の突起上に分布するが、特に第1層近傍の遠位側に濃縮していた。ニューロンはラジアルグリア突起を基質として移動するため、第1層近傍のこれら分子間の相互作用が移動細胞を基質から離脱させ、その結果停止に至るといった新しい機構が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated a phenotype of Plexin A2/A4 double mutant mouse, in which a fraction of upper layer neurons of the cerebral cortex failed to terminate migration and ectopically invaded layer 1. PlexinA2/A4 proteins were expressed on leading processes of upper layer neurons and rescue experiment indicated that Plexin A2/A4 played a cell-autonomous role. On the other hand, Semaphorin 6A, the ligand for Plexin A2/A4, was concentrated in layer 1 and found to originate from radial glial cells in the ventricular zone. These results provide a novel model for termination of neuronal migration; (1) neurons migrate along radial glial cell fiber to reach the top of the cortical plate, (2) Plexin A2/A4-positive leading process touch the distal part of radial glial cell fiber in layer 1, which expresses Semaphorin 6A, and (3) probably due to repulsive effect, interaction between these molecules leads to detachment of migrating neurons from their substrate, thereby terminating migration.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経発生 細胞移動 層形成 大脳皮質形成 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

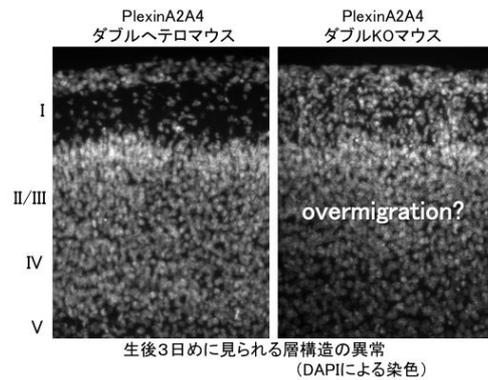
多くのニューロンは、機能単位となる神経核や層などの細胞集団を形成する。大脳新皮質は6層構造をもつが、これは皮質脳室帯から生じた興奮性ニューロンが、ラジアルグリア細胞の突起に沿って表層方向に移動したのち、表層直下で移動を止め、安定的に配置することで形成される。近年、ニューロン移動のメカニズムやこれに関わる分子の解析が進む一方、ニューロンがどのように移動を終了するのか、その停止過程には未解明な点が多い。

この停止過程を解明する1つの手段として、層形成異常を示すマウスの解析がある。リーラーマウスはそのうち最も有名なもので、層構造がほぼ逆転している。表層直下に分布するカハールレチウス細胞 (CR cell) が原因遺伝子リーリンを発現することから、当初、CR cell のリーリンが移動停止シグナルとして働いているという見方があった。しかし、リーラーマウス脳室帯でリーリンを異所的に発現させても、深層ニューロンの配置はレスキューされるが、移動停止が見られないこと、別マウス系統において、CR cell を選択的に取り除いても層構造に異常がないことなどから、CR cell のリーリンが単独で停止シグナルとして働くかについては不明である。また、リーリンに対する複合受容体として ApoER2 と VLDLR が知られており、受容体側からの解析も行われているが、移動停止におけるこれらの働きも明確にはなっていない。

細胞の動的解析から、皮質の細胞移動に関して、ラジアルグリア細胞依存的な “locomotion” と、移動の最終段階に表層直下で見られるラジアルグリア細胞非依存的な “terminal translocation” モードの2つがあることが知られている。移動停止はこの terminal translocation への切り替えが必要なのかもしれない。

2. 研究の目的

大脳皮質脳室帯から生じた興奮性ニューロンの停止過程の詳細は未だ不明である。申請者は *PlexinA2/A4* ダブルノックアウト (*PlxnA2/A4 dKO*) マウスにおいて、第1層に異所性に興奮性ニューロンが分布することを新たに見いだした (図参照)。本研究では、*PlxnA2/A4 dKO* マウスの解析を通し、1) 層形成異常の表現系の詳細と、2) 移動停止過程における *PlxnA2/A4* の役割を明らかにすることを目的とする。予備的な実験から、細胞移動の停止過程の異常であることを予想しており、本研究課題の解明を通して、移動停止に関わる新規メカニズムを提出することを目指す。



3. 研究の方法

(1) 動物

PlxnA2, *PlxnA4*, *Sema6A* (gene trap line, *Sema6A*^{-/-}, Mitchell 博士より供与)、*Sema6A* (flox line, 研究分担者川崎が新たに作成)、*Sema6B* (吉田博士より供与)、*Emx1-Cre* (岩里博士より供与)、*Nestin-CreER^{T2}* (影山・今吉博士より供与)、*Ai14* (Jackson より購入) の各遺伝子改変マウスについて必要な遺伝型マウスを交配により作出し使用した。タモキシフェン (3mg) はコーンオイルに溶解し、腹腔内投与した。すべての動物実験は生理学研究所・遺伝学研究所の動物実験ガイドラインに従って行った。

(2) 脳の固定標本

パラフォルムアルデヒド固定液を用い、胎仔は浸漬固定、生後脳は灌流固定を行った。固定脳は 30% ショ糖/PBS に浸漬後、OCT コンパウンドで包埋した。免疫染色は、クリオスタットで 30 μm 厚の冠状断切片を作成し、浮遊切片の状態で各種抗体溶液を反応させて行った。一部はニッスル染色を行った。In situ ハイブリダイゼーションは、クリオスタットで 16 μm 厚の冠状断切片を作成し、スライドガラスに直接貼り付けたのち各種プローブを用いて行った。X-gal 染色は、クリオスタットで 8 μm 厚の冠状断切片を作成し、スライドガラスに直接貼り付けて行った。同切片の一部はその後抗体染色も行った。

(3) In situ 結合実験

生後0日齢 (P0) のマウス脳を 4% 低融点アガロース/PBS に包埋して固めた後、300 μm 厚の冠状断スライスにした。あらかじめヤギ抗 Fc 抗体で集合化させた *Sema6A*-Fc あるいは IgG-Fc タンパク質を用意し、4 1時間の条件でスライスに作用させた。スライスは洗浄後、軽く固定し、結合 Fc タンパク質は蛍光標識された抗ヤギ抗体で検出した。

(4) In situ ハイブリダイゼーション

各 cDNA (*PlxnA2*, 1.0kb; *PlxnA4*, 0.7kb; *Sema6A*, 0.5kb; 須藤博士より供与) はジゴキシゲニン 11-UTP を用いた in vitro 転写により標識し、常法により in situ ハイブリダイゼーションを行った。

(5) BrdU 標識

BrdU (50 mg/kg body weight) を妊娠母マウスに腹腔内投与し出産仔を生後 7 日に回収した。作成した切片は、37 °C の 2N HCl 溶液で 60 分間処理後に中和し、抗 BrdU 抗体を作用させた。第一次体性感覚野における標識細胞の分布を解析した。

(6) 子宮内電気穿孔法

麻酔下で妊娠親マウスの腹部を切開したのち、実体顕微鏡下で確認しながら、ガラスキャピラリーを使ってプラスミド溶液 *pCAGGS:EGFP*、あるいは *pCAGGS:myc-PlxnA2* (須藤博士より供与) + *pCAGGS:EGFP* の混合物を胎仔の側脳室に注入した。ピンセット型電極を用いて 4 回の電気刺激 (30V, 50 msec ON, 950 msec OFF) を与え、脳室帯細胞にプラスミドを導入した。腹壁と皮膚をそれぞれ縫合したのち、母親マウスは保温して回復させ、自然出産または帝王切開により仔を得て生後 3 日に回収した。

4. 研究成果

(1) *PlxnA2/A4* *dKO* マウスの層形成異常の解析 層マーカーによる評価

各層のニューロンに対するマーカー分子の発現を調べた。各層はほぼ正しい順序で並んでおり、ニューロンの配置異常は浅層の 2/3 層と第 1 層のみに見られた。通常、興奮性ニューロンは第 1 層には分布しないが、変異マウスでは興奮性ニューロンが第 1 層に侵入していた。

層形成異常が現れる時期の同定

P1 から P3 の時期に第 1 層に異所配置するニューロンが現れた。この時期は、移動してきた浅層ニューロンが表層近傍に到達する時期に対応していた。

BrdU 標識細胞の分布比較

胎生 15.5 日齢 (E15.5) または E16.5 に BrdU を投与し、標識ニューロンの分布を P7 で調べた。異所配置するニューロンは、E16.5 の投与で標識される割合が高く、浅層ニューロンの中でも、後期に生まれるニューロンが主に層形成異常を起こしていることがわかった。

GFP 標識細胞の分布と形態

子宮内エレクトロポレーション法により浅層ニューロンを標識したのち、P3 で回収して細胞の位置と形態を調べた。標識細胞は皮質板上部まで移動し、そのうち一部が第 1 層まで侵入していた。皮質板内にとどまっている細胞の先端突起は野生型と同様に、表層に向いていたが、第 1 層まで移動したものはその長さが短くなったものや、表層と並行になるものなどの形態異常が見られた。

これらの結果から、*PlxnA2/A4* *dKO* マウスでは浅層ニューロンが適切な位置で停止できず overmigration していると考えられた。

(2) *PlxnA2/A4* シグナルとその作用点の解析

PlxnA2/A4 に対するリガンドの同定
PlxnA2 と *A4* の共通リガンドとして Semaphorin (Sema) 6A が、*PlxnA4* のリガンドとして、Sema3A と Sema6B が知られている。*Sema3A*^{-/-} マウスでは位置異常は報告されていない。また、*PlxnA2*、*PlxnA4* 単独 *KO* マウスでは異常は現れず *dKO* マウスでのみ異常が見られることから、今回の層形成異常は Sema6A がリガンドとして働いている可能性が高い。事実、対応する変異マウスを調べたところ、*Sema6A*^{-/-} *6B*^{+/+} マウスは *PlxnA2/A4* *dKO* マウスと同様な異常を示したが、*Sema6A*^{+/+} *6B*^{-/-} マウスに異常は見られなかった。よって、Sema6A がリガンドであると結論した。

PlxnA2/A4 と Sema6A の発現分布

P1 マウスで調べたところ、皮質板上部の細胞が *PlxnA2/A4* mRNA を共に強く発現していた。また、両タンパク質は、これら細胞が第一層内に伸ばしている突起上に分布していた。一方 *Sema6A* mRNA は第一層を含め、皮質内に散在する細胞や脳室帯細胞 (ラジアルグリア細胞を含む) に発現していた。奇妙なことに *Sema6A* タンパク質は第 1 層に濃縮していた。*Sema6A* を合成する細胞について、*Sema6A* 遺伝子座に β -ガラクトシダーゼをノックインしたマウスを使ってさらに調べたところ、*Sema6A* は脳室帯細胞や一部の GABA 抑制性ニューロン、その他小型細胞に発現しているが、皮質興奮性ニューロンには発現していないことがわかった。

Sema6A タンパク質の *in situ* 結合実験

(2) の結果から、*PlxnA2/A4* を発現する移動ニューロンの先端突起が、第 1 層内の Sema6A タンパク質と相互作用すると考えられた。そこで Sema6A-Fc タンパク質を生後直後の生きた脳スライスに作用させたところ、主に第 1 層に結合し、機能的受容体が予想通り第 1 層に形成されていることを確認した。

PlxnA2/A4 のレスキュー実験

PlxnA2/A4 *dKO* マウスにおいて、子宮内エレクトロポレーション法により浅層ニューロンに *PlxnA2* を導入したところ、導入された細胞では第 1 層への侵入が抑制された。従って *PlxnA2/A4* は移動ニューロンで細胞自律的に機能していると考えられた。

Sema6A コンディショナル *KO* 実験 (1)

浅層ニューロンの移動停止に働く Sema6A の由来を明らかにするため、大脳皮質原基特異的に組換えを引き起こす *Emx1-Cre* マウスを使い *Emx1-Cre:Sema6A*^{/flox} マウスを作成し

た。得られたマウスは、*Sema6A*^{-/-} と同等な浅層ニューロンの配置異常を示した。よって項目(2)で解析した *Sema6A* 発現細胞のうち、*Sema6A* の主起源は *Emx1* の系譜である、大脳皮質脳室帯細胞であると予想された。

Sema6A コンディショナル KO 実験 (2)
ニューロン移動の停止に関わる *Sema6A* の起源は脳室帯細胞であることを確認するため、脳室帯細胞特異的 KO マウスの作成を試みた。*Nest in-CreER^{T2};Sema6A^{fllox}* マウスを作成し、神経産生がほぼ終了する E17.5 に母マウスにタモキシフェンを投与した。Ai14 レポーターマウスを使った予備実験では、この投与により約 90%の脳室帯細胞で組換えが起こった。*Nest in-CreER^{T2};Sema6A^{fllox}* 母マウスに同条件下でタモキシフェンの投与を行ったところ、予想に違わず浅層ニューロンに配置異常が現れ、第1層に侵入した。

(3)*PlexinA2/A4-Sema6A* シグナルとリーリンシグナルとの関係
ニューロン移動の停止制御にはリーリンシグナルが関与している可能性がある。しかし、*PlexinA2/A4 dKO* マウスにおいて、第1層内でリーリンを発現する CR cell の分布に大きな差は認められなかった。また、*PlexinA2/A4 dKO, Sema6A^{-/-}* マウスにおいて、リーリンシグナル下流分子の *Dab1* 発現量に大きな変動は認められなかった(服部・河野博士による解析)。配置異常が一部のニューロンにしか出ていないため変動が検出できない可能性もあるが、リーリンシグナルとの直接の関連性は低いことが考えられた。

(4)まとめと考察
これらを総合すると、浅層ニューロン移動の最終段階で *PlexinA2/A4* の発現が先導突起上で一過的に高まり、同時にリガンドである *Sema6A* が脳室帯細胞で発現し、*Sema6A* タンパク質が何らかの機構により基底膜側に濃縮することで、移動ニューロンと相互作用し、移動停止に至ると考えられた。この相互作用はリーリンシグナル系とは独立して働いている可能性がある。

興奮性ニューロンは、移動の基質となるラジアルグリア細胞(脳室帯細胞)の突起を足場として移動したのち、停止時にはこの足場から離れる段階があることが指摘されていたがその実態は不明であった。*PlexinA2/A4-Sema6A* の相互作用には反発活性があることが知られており、今回新たに見出した移動細胞と脳室帯細胞間の *PlexinA2/A4-Sema6A* 相互作用は、反発活性を利用した、この離脱段階である可能性が高い。また、この相互作用が、移動ニューロンを“locomotion”から“terminal translocation”モードに切り替えていることも考えられる。

PlexinA2/A4-Sema6A シグナル自体は浅

層ニューロンだけに適応されるという限定もある。しかし、本研究が示したような、「移動から停止状態に移行させる分子の存在」を提示できたことは、停止メカニズムの概念に新たな分子の実態を与えた。この概念は、大脳皮質の層だけでなく、神経核や他の脳部位の層の形成メカニズムを考える基盤になると期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Yumiko Hatanaka, Tomohiro Namikawa, Kenta Yamauchi and Yasuo Kawaguchi. “Cortical divergent projections in mice originate from two sequentially generated, distinct populations of excitatory cortical neurons with different initial axonal outgrowth characteristics.” *Cerebral Cortex*, **26**, 2257-2270 (2016) 査読有 Doi: 10.1093/cercor/bhv077

Yumiko Hatanaka, Yan Zhu, Makio Torigoe, Yoshiaki Kita and Fujio Murakami. “From migration to settlement: the pathways, migration modes and dynamics of neurons in the developing brain.” *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences*, **92**, 1-19 (2016) 査読有 DOI: 10.2183/pjab.92.1

Akira Sakakibara and Yumiko Hatanaka. “Neuronal polarization in the developing cerebral cortex.” *Frontiers in Neuroscience*, **9**, 116 (2015) 査読有 Doi: 10.3389/fnins.2015.00116

Yumiko Hatanaka and Kenta Yamauchi. “Excitatory neurons with multipolar shape establish neuronal polarity by forming a tangentially oriented axon in the intermediate zone.” *Cerebral Cortex*, **23**, 105-113 (2013) 査読有 DOI: 10.1093/cercor/bhr383

[学会発表](計3件)

皇中由美子、川崎能彦、川口泰雄、平田たつみ、Proper termination of migration for uppermost part of layer 2/3 neurons requires PlexinA2/A4 - Semaphorin6A signaling in the mouse cerebral cortex. 第39回日本神経科学学会大会、2016年7月20日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜)

皇中由美子、川崎能彦、平田たつみ、川口泰雄、Plexin A2/A4 - Semaphorin 6A signaling is involved in termination of migration for upper most layer neurons in the mouse cerebral cortex. International Symposium on Adaptive Circuit Shift 2016 (ACS2016). 2016年

3月3日、同志社大学寒梅館（京都府、京都）
畠中由美子、川崎能彦、平田たつみ、川口泰雄、PlexinA2/A4 signaling is necessary for proper termination of migration for upper most part of layer 2/3 neurons in the mouse cerebral cortex. International Symposium “Neocortical Organization III” 2016年2月12日、東京大学小柴ホール（東京都、文京区）

〔その他〕

生理学研究所大脳神経回路論研究部門
ホームページ
<http://www.nips.ac.jp/circuit/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠中 由美子 (HATANAKA, Yumiko)
生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特別協力研究員
研究者番号：40271548

(2) 研究分担者

平田 たつみ (HIRATA, Tatsumi)
国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授
研究者番号：80260587

川崎 能彦 (KAWASAKI, Takahiko)
国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教
研究者番号：00322751