

平成 22 年 3 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2005 年度～2008 年度
 課題番号：17390086
 研究課題名 (和文) 大脳皮質神経発達における Cajal-Retzius 細胞の機能的役割の分子的基盤
 研究課題名 (英文) Molecular bases of cerebral cortical development controlled by Cajal-Retzius cells
 研究代表者
 田辺 康人 (TANABE YASUTO)
 大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授
 研究者番号：10311309

研究成果の概要：

本研究課題においては、Cajal-Retzius 細胞によって発生制御を受ける皮質投射ニューロンに発現されている転写因子 Meis2 に主眼をおいて解析を進めてきた。これまでの解析結果から、転写因子 Meis2 は皮質構築過程において (A) 神経細胞への運命決定・分化 (B) 神経細胞の脳室帯から皮質板への細胞移動調節 (C) 皮質前駆細胞の細胞分裂調節のおもに 3 つの発達素過程に重要な役割を果たすことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	4,500,000	0	4,500,000
2006 年度	4,200,000	0	4,200,000
2007 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	14,300,000	1,680,000	15,980,000

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：分子・細胞神経科学、発生

1. 研究開始当初の背景

大脳の新皮質の層形成過程において中心的な役割を果たす Cajal-Retzius 細胞は、従来、新皮質原基そのものに発生すると考えられてきた。しかしながら、研究開始当初の我々の研究成果により Cajal-Retzius 細胞には幾つかのサブタイプが存在すること、そして、少なくともそのサブタイプの主要なものは、皮質 GABA 作動性介在ニューロンの場合と同様に新皮質外の局所的な細胞集団から発生し、新皮質内に接線方向に細胞移動し広く新皮質を覆うことなどが明らかにされた (Takiguchi-Hayashi ら, 2004、Yamasaki

ら, 2004)。新皮質構築そのものを調節しうる Cajal-Retzius 細胞が新皮質にとって外来性の細胞であることは、新皮質形成機構を考える上で新しい視点を与えると考えられた。本研究では、従来から謎の多かった Cajal-Retzius 細胞が示す皮質構築における機能的役割の分子的基盤の一端を明らかにすることを目的とした。

Cajal-Retzius 細胞には、reelin を介した皮質層形成調節機構のほかに、新規な皮質構築調節機能を有する事が示唆されている。例えば、(1) Cajal-Retzius 細胞を実験発生的に取り除いたマウスは、大脳皮質形成に異

常を生じる (Super ら, 2000)。(2) この異常に伴って、大脳皮質の radial glial cell が astrocyte へと正常発生に比べて時期的に早い段階で分化している。(3) astrocyte は radial glial cell への re-transformation を維持しているが、この re-transformation は、Cajal-Retzius 細胞を含む marginal zone から分泌される未同定の分泌因子によって誘導される事が *in vitro* での実験により示されている (Hunter と Hatten 1995, Soriano ら, 1997)。このように、Cajal-Retzius 細胞は皮質構築に対して神経幹細胞である radial glial cells に対して働きかけて皮質前駆細胞の増殖、細胞分化を調節し、さらには発生してきた皮質細胞の細胞移動・細胞体配置を調節するといった重要な働きを発生段階において担うことが示唆されているが、どのような分子基盤によって調節しているのか、また一方皮質前駆細胞ならびに皮質細胞においてどのような分子が発現され、皮質構築を調節しているのかに関しての詳細な解析は遅れていた。

大脳皮質の個々の層を構成する皮質細胞は脳室帯における神経前駆細胞から発生する。深い層を構成する皮質細胞は発生の早期に、一方浅い層を構成する細胞は後期に発生する。またニューロンの発生の後にアストロサイトが発生する。皮質細胞は脳室帯から皮質板 (将来の神経細胞層) へと細胞移動し、個々の層に正確に細胞体を配置する。このような時間的・空間的調節機構は、神経前駆細胞の細胞分裂・分化調節機構、皮質細胞の細胞体配置機構によって支えられていると捉えられるが、どのような分子機構が働き層構築にいたるのか十分な理解は進んでいない。大脳皮質は進化的に最も顕著に拡大してきた中枢神経系の一領域であり、そのような発生調節機構の理解が極めて重要であると考えられる。

我々は、以前より皮質前駆細胞ならびに皮質細胞に発現される分子として転写因子 Meis2 (myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 2) を同定していた。転写因子は様々な遺伝子の転写調節を引き起こし細胞全体のグローバルな性質を決定づける。過去の研究から転写因子 Meis2 はショウジョウバエから脊椎動物に至るまで進化的に保存されており、様々な生物種においてそれぞれの組織形成に重要な役割を果たすことが示されてきた。本研究においては転写因子 Meis2 が示す皮質構築における機能的役割を解明することに焦点を絞り解析を進めた。

2. 研究の目的

皮質構築過程においてほぼ全ての皮質前駆細胞である radial glial cells ならびに皮質細胞 (将来の皮質錐体細胞) に発現されて

いる転写因子 Meis2 が、皮質構築にどのような機能的役割を果たすのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

転写因子 Meis2 に対する抗体を作成し免疫組織学的手法を用いて Meis2 蛋白質がどのように分布しているのかを先ず解析した。また機能解析のために転写因子 Meis2 の転写抑制型または転写促進型のキメラタンパク質発現ベクターを用意して、*in vivo* 電気穿孔法による遺伝子導入法を用いて皮質前駆細胞に強制的に発現させた。その後、Meis2 キメラタンパク質を強制的に発現された皮質前駆細胞ならびにそこから発生してきた皮質細胞の挙動を、細胞分裂、細胞分化、細胞移動の観点から、免疫組織学的手法を用いて *in vivo* において解析した。

4. 研究成果

(1) 発生期大脳皮質における Meis2 の発現パターン

大脳皮質の発生過程において皮質深層を構成する皮質細胞の発生が始まる胎生 12.5 日において既に Meis2 は皮質前駆細胞が存在する脳室帯に発現されていた。また、その脳室帯における発現は皮質浅層を構成する皮質細胞が発生してくる胎生 18.5 日まで継続されていた。また一方、皮質前駆細胞から発生してくるほぼ全ての皮質細胞において発現が検出された。これらの結果は、転写因子 Meis2 が皮質構築の発生過程において、ほぼ全ての皮質前駆細胞ならびに皮質細胞の発生調節に関与することを示唆した。

(2) Meis2 の皮質構築調節機構

①皮質前駆細胞における細胞分裂の調節

Meis2 は、慢性骨髄性白血病を引き起こすガン遺伝子として発見された遺伝子であり、細胞増殖に関与することが予測された。実際過去の研究において網膜形成、後脳・中脳での領域形成において神経前駆細胞の細胞分裂調節に関与していることが示されている

(Heine ら, 2008, 2009; Agoston & Schulte 2009)。我々は今回皮質前駆細胞において Meis2 が細胞分裂を調節していることを示した。Meis2 の転写活性が抑制されると前駆細胞の細胞分裂が抑制される。一方 Meis2 の大量発現および転写促進によってはコントロールと比較して顕著な変化は検出されなかった。これらの結果は、Meis2 が皮質前駆細胞における細胞分裂の調節に重要な機能的役割を果たし、将来的に個々の層を構成する皮質錐体細胞の数の調節に関与する可能性を示した。

②皮質前駆細胞における細胞分化の調節

前述の通り皮質前駆細胞からはニューロンの発生の後にアストロサイトが発生するこ

とが示されている。このような時間特異性がどのようにして調節されているのかは過去から大きな問題として存在する。我々は今回、Meis2の転写抑制によって正常より早期にアストロサイトの分化が誘導されてしまうことを明らかにした。この結果はニューロンの発生時期においては、Meis2の転写が少なくとも促進されていることがアストロサイトの発生を抑制するために必須であり、皮質構築における時間特異的な調節機構の一つとしてMeis2の転写活性の調節が関与している可能性が示された。

③皮質細胞における細胞移動の調節

皮質前駆細胞から発生してきた皮質細胞は脳室帯から皮質板まで法線方向に移動する。この細胞移動の過程において皮質細胞はダイナミックに細胞形態を多極性から双極性へと特徴的に変化させ、脳室下帯、中間層を経て皮質板にいたることが知られている。皮質深層を構成する皮質細胞が発生してくる胎生12.5日の脳室帯に転写抑制型Meis2を発現させたところ、分化してきた皮質細胞は多極性の形態を保持したまま中間層において留まることが示された。野性型Meis2および転写促進型Meis2の強制発現によっては細胞移動において何ら顕著な変化は示されなかった。この細胞移動の阻害が果たして神経前駆細胞の段階で示された神経細胞分化の阻害による二次的なものによるものかどうかを明らかにする目的で、導入遺伝子を神経細胞において初めて発現されるように実験操作したところ、やはり同様な障害が引き起こされた。さらに、皮質浅層を構成する皮質細胞が発生する後期の過程において同様の実験を行ったところ、やはりMeis2の転写抑制により細胞移動が阻害されることが示された。これらの結果は、皮質細胞の細胞移動の過程においてMeis2の転写活性が調節されていることが重要であり、皮質細胞が中間層において多極性から双極性へと細胞形態を変化させ皮質板へ細胞体を配置させるためにMeis2が必須であることを示した(投稿準備中)。

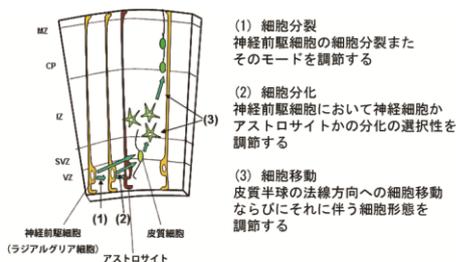


図1：皮質構築の発生過程において転写因子Meis2は異なる3つの機能的役割を果たすことが明らかとなった(詳しくは本文を参照)。

④Meis2の皮質構築における機能的役割の作業仮説

以上の結果は、Meis2が皮質構築における皮質前駆細胞の細胞分裂・分化、皮質細胞の細胞移動において重要な機能的役割を果たすことを示唆する(図1)。

皮質構築の過程において、神経前駆細胞が分裂するのか分化するのか、ニューロンかグリアに分化するのか、また細胞移動中にニューロンが多極性形態を保持するのか双極性形態を獲得するのかといった皮質構築過程における二者択一の局面において、転写因子Meis2の転写活性のon-offがそれらの選択のスイッチとして働く役割をもつことを示唆する(図2)。

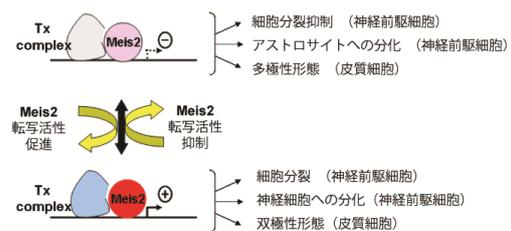


図2：Meis2の転写活性は細胞外シグナル分子の作用や転写複合体形成を通じて調節されることにより、皮質構築の過程の様々な局面での二者択一のスイッチ機構として働く作業仮説を示す。

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 2件)

- ① Crucial roles of Robo proteins in midline crossing of cerebellofugal axons and lack of their up-regulation after midline crossing. Atsushi Tamada, Tatsuhiro Kumada, Yan Zhu, Tomoko Matsumoto, Yumiko Hatanaka, Keiko Muguruma, Zhe Chen, Yasuto Tanabe, Makio Torigoe, Kenta Yamauchi, Hiroshi Oyama, Kazuhiko Nishida and Fujio Murakami, *Neural Development*, 3, 9, 2008 査読有
- ② 田辺康人 : Cajal-Retzius細胞と大脳皮質形成. 脳21 8, 240-245, (2005). 査読無

[学会発表] (計 7 件)

- ① Transcriptional Control of Neocortical Neurogenesis by TALE-family Homeodomain Factor, Meis2. Yasuto Tanabe, 国際シンポジウム Construction and reconstruction of the brain, 2009 年 10 月 9 日, Awaji Yumebutai (兵庫)
- ② Meis2 activities in the control of three distinct developmental steps during the corticogenesis, Yasuto Tanabe, 国際シンポジウム, 2008 年 3 月 24 日, 神戸理研 (神戸)
- ③ Meis2 転写因子の脳皮質発達素過程における機能的役割、田辺康人、シンポジウム招待講演、「脳皮質の発生と可塑性」基礎生物学研究所研究会, 2008 年 3 月 7 日, 基礎生物学研究所 (岡崎)
- ④ Meis2 activities in the control of three distinct developmental steps during the corticogenesis, 田辺康人, 第 30 回日本神経科学学会, 2007 年 9 月 11 日, パシフィコ横浜 (横浜)
- ⑤ Development of Cajal-Retzius Cells in the Cerebral Cortex, Yasuto Tanabe, 国際シンポジウム招待講演 Dynamics of cortical development and neuronal migration 慶應義塾大学医学部国際シンポジウム, 2006 年 1 月 30 日, 慶應義塾大学 (東京)
- ⑥ Characterization of Cajal-Retzius Cell Development in the Cerebral Cortex, 田辺康人, シンポジウム招待講演「脳皮質の発生と機能構築」基礎生物学研究所研究会, 2006 年 3 月 17 日, 基礎生物学研究所 (岡崎)
- ⑦ Ontogenic and Molecular Characterization of Cajal-Retzius

Cells in the Developing Cerebral Cortex, Yasuto Tanabe, 国際シンポジウム招待講演, Neuronal Differentiation in Cortical Development, 2005 年 9 月 16-17 日, 大阪大学 (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺康人 (TANABE YASUTO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授
研究者番号: 10311309

(2) 研究分担者

村上富士夫 (MURAKAMI FUJIO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号: 20089882

(3) 連携研究者

無