

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06839

研究課題名(和文) 大脳皮質ニューロンのネトリン-1に対する反応が発生段階に依存する機構の解明

研究課題名(英文) Studies on developmental stage-dependent responsiveness of cerebral cortical neurons to netrin-1

研究代表者

松本 英子 (Matsumoto, Hideko)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00312257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多機能性の軸索ガイダンス因子ネトリン-1に対し齧歯類の大脳皮質ニューロンが示す反応には軸索伸長と軸索側枝形成が知られる。マウスを用いた過去の我々の研究により、大脳皮質ニューロンのネトリン-1に対する反応は発生段階に依存することが示唆された。そこで本研究課題ではこの機構の解明を目指して、生体内で軸索側枝を生ずる各細胞集団でネトリン-1刺激時の一次軸索長、分岐数・密度を計測し、軸索伸長/側枝形成反応を示すか否かを調べた。皮質脊髄路ニューロンではこれらの値に有意な変化はみられなかった。一方、Ⅰ層脳梁交連ニューロンでは軸索分岐数・密度の増加が認められ、ネトリン-1依存的な軸索側枝形成が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質ニューロンを総体として捉えた場合、マウス胎生14日(E14)ニューロンは軸索伸長反応、E16ニューロンは軸索側枝形成反応をネトリン-1に対して示すことがわかっていた。しかしながら大脳皮質ニューロンに種々の細胞集団が含まれることを考慮すると、特定の細胞集団が発生過程でその性質を変化させた可能性と、これら二種類の反応を示す細胞集団がそれぞれ別に存在する可能性がともに残されていた。本研究課題では大脳皮質ニューロンの各サブポピュレーションのうちⅠ層脳梁交連ニューロンが、E16大脳皮質ニューロン総体で観察されていたネトリン-1依存的な軸索側枝形成を担う細胞集団の一つであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Netrin-1, an axon guidance cue, is known to exert various functions in the correct wiring of the nervous system during development. Our previous study raised the possibility of a shift in netrin-1 function from axon outgrowth to axon collateral branching in neurons dissociated from cerebral cortices of embryonic mice, and thus suggested developmental stage-dependent responsiveness of the neurons to netrin-1. In this research project we aimed to elucidate the mechanism underlying this developmental stage dependency of responsiveness to netrin-1 in cortical neurons.

The culture employed in our study was supposed to be highly heterogeneous containing multiple subpopulations of cortical neurons. We here focused on the subpopulations with collateral branches known in vivo, to analyze netrin-1-induced axon outgrowth/collateral branching. Axon collateral branching in E16 layer 2/3 callosal projection neurons, but not in corticospinal motor neurons, was promoted by netrin-1.

研究分野：発生神経生物学

キーワード：神経回路形成 大脳皮質ニューロン 軸索ガイダンス 軸索側枝形成 ネットリン-1

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軸索ガイダンス因子ネトリン-1 は発生過程における神経回路形成の際に、種々のニューロンにおいて、軸索の伸長 / 誘引、反発、側枝形成などの多様な生理作用を果たす。発生期の齧歯類大脳皮質ニューロンがネトリン-1 に対して示す反応には、軸索伸長と軸索側枝形成がともに知られている。過去の我々の研究で、胎生 14 日 (E14) マウス大脳皮質に由来する分散培養ニューロンを培養 5 日目 (5DIV) にネトリン-1 で刺激した際には軸索伸長、E16 ニューロンでは側枝形成が促進され、ネトリン-1 に対する反応が発生段階で異なることが示された。しかしながらこの培養系が種々の細胞集団を含むことを考慮すると、これは大脳皮質ニューロンを総体として捉えた際の反応に過ぎないともいえ、このうち特定の細胞集団が発生の過程で性質を変化させた可能性と、軸索伸長反応を示す細胞集団と軸索側枝形成反応を示す細胞集団とがそれぞれ別に存在する可能性とが、ともに残されていた。

大脳皮質ニューロンのサブポピュレーションのうち、生体内で軸索側枝を生ずるものには、皮質脊髄路ニューロンや脳梁交連ニューロンなどが挙げられる。このうち皮質脊髄路ニューロンについては、線条体や橋などに軸索側枝を送ることが既に知られていた。また脳梁交連ニューロンは誕生時期の異なる細胞集団を含んでおり約 80% が Ⅰ 層、20% 弱が Ⅱ 層、少数が Ⅲ 層に存在していること、脳梁交連ニューロンが共通してもつ対側皮質への投射は軸索側枝より形成され、このとき一次軸索では分岐よりも先端の部分が消失することが報告されていた。

2. 研究の目的

ネトリン-1 に対して軸索伸長反応、軸索側枝形成反応を示す大脳皮質ニューロンのサブポピュレーションをそれぞれ明らかにし、大脳皮質ニューロンのネトリン-1 に対する反応が発生段階に依存する機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

我々の過去の研究と同様の手順により E16 マウス大脳皮質から初代分散培養を調製し、3~7 日間の培養後にネトリン-1 (250ng/mL) を培地に添加して 4 時間の刺激を行い、細胞を固定した。その後、大脳皮質ニューロンの種々のサブポピュレーションを各種マーカー抗体による免疫蛍光染色やチミジンアナログ EdU の投与により標識した。落射蛍光・微分干渉顕微鏡を用いた画像取得を行ったのち、一次軸索の長さ、一次軸索上の分岐数・分岐密度を画像上で計測し、これらの値にネトリン-1 刺激の有無により差異が生ずるか否かを調べた。

4. 研究成果

皮質脊髄路ニューロンでは、E16+5DIVにおいてネトリン-1による処理を行った際、一次軸索の長さ、分岐数・密度に有意な変化は認められなかった。

/ 層脳梁交連ニューロンではE16+5DIVにおいてネトリン-1依存的な軸索側枝形成が認められた。その際、一次軸索の長さには変化は認められなかった。 / 層脳梁交連ニューロンは、E16大脳皮質ニューロン総体で観察されていた軸索側枝形成を担うサブポピュレーションの一つであるものと考えられた。また、マウス / 層脳梁交連ニューロンでは出生前後の時期に、ネトリン-1が軸索側枝形成を促進する因子として働く可能性が示唆された。

さらに、ネトリン-1の他に脳由来神経栄養因子BDNFにも軸索側枝形成を促進する作用が知られることから両者に対する反応の比較を試みたところ、 / 層脳梁交連ニューロンではネトリン-1とBDNFの両者に応じ軸索分岐数・密度の増加がみられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 松本 英子	4. 巻 49
2. 論文標題 脳梁交連ニューロンの各サブポピュレーションに働きかける軸索分岐形成因子の探索	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 埼玉医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 133 - 134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 英子, 永島 雅文
2. 発表標題 脳梁交連ニューロンの発生過程で働く軸索側枝形成因子に関する解析
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松本 英子, 永島 雅文
2. 発表標題 脳梁交連ニューロン軸索におけるネトリン-1依存的な側枝形成の解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本 英子, 永島 雅文
2. 発表標題 脳梁交連ニューロンにおけるネトリン-1作用の解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideko Matsumoto, Masabumi Nagashima
2. 発表標題 Effects of netrin-1 on the subpopulations of developing layer 5 cortical neurons
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 英子, 永島 雅文
2. 発表標題 ネトリン-1に反応する大脳皮質ニューロンのサブポピュレーションの探索
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本 英子、永島 雅文
2. 発表標題 皮質脊髄路ニューロンにおけるネトリン-1作用の解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------