

平成 21 年 6 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500296
 研究課題名（和文）カハールレチウス細胞の細胞移動の分子機構と大脳皮質形成における意義
 研究課題名（英文）The molecular mechanisms of migration of Cajal-Retzius cells, and their roles in cerebral cortex development.

研究代表者

吉田 道生（YOSHIDA MICHIO）
 熊本大学・発生医学研究センター・助教
 研究者番号：80305002

研究成果の概要：カハールレチウス（CR）細胞の細胞移動の分子機構を解析すると共に、CR細胞の大脳皮質形成における意義について検討する事を目的に、（1）電気穿孔法によるCR細胞の標識法、大脳組織スライス培養法および *in vitro* タイムラプス観察システムの検討を行ない、CR細胞の細胞移動を *in vitro* で詳細に観察する事が出来る実験系を確立した。この実験系は今後の分子機構の解析に大きく寄与すると考えられる。また、（2）*Emx1/Emx2* 二重変異マウスにおいてCR細胞の特異的なサブタイプに異常が見られる事を明らかにし、大脳皮質形成における各サブタイプの特異的な役割を明らかにするため、変異マウスの大脳皮質の異常を解析した。この解析結果は、大脳形成における各CR細胞サブタイプの特異的な役割を明確化する研究に手がかりを与えると期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：カハールレチウス細胞、大脳皮質、細胞移動、Emx1、Emx2

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の大脳新皮質は投射性神経（皮質板神経細胞）の inside-out 様式をともなった放射状細胞移動により形成される精巧な6層構造を有する。カハールレチウス細胞（CR細胞）は皮質の表層に存在する特徴的な細胞

で、Reelin が特異的に発現していることから、以前から皮質層の形成に重要な役割を担っていると考えられ注目されて来た。しかしながらCR細胞自身の発生機序はまだ正確に理解されていない。これら細胞は皮質形成過程の最も初期から大脳皮質原基の表層に広く存在

している事から、古くから皮質領域の脳室帯に広く存在する神経幹細胞から最も早期に生み出され、放射状に移動して直上の皮質表層に供給されると信じられてきた。しかしながら、近年の研究報告から、CR細胞は終脳の限局された複数の領域から産生され、その後、皮質表層を覆う軟膜の直下を接線方向に移動して皮質領域に供給される事が明らかになりつつある。これまでに、皮質/脈絡叢境界領域（コルティカルヘム又はヘム）、中隔領域、皮質/皮質下境界（PSB）の3つの領域がCR細胞の主要な供給源として同定されているが、これら領域から生み出されたCR細胞は今まで仮定されていた放射状移動に比べ著しく長い距離を移動する事になる。

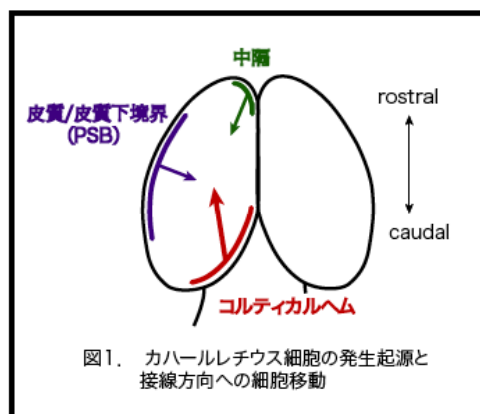


図1. カハールレチウス細胞の発生源と接線方向への細胞移動

申請者はこれまでに Wnt3aCre マウスの作製により、コルティカルヘム領域の細胞系譜解析を行ない、コルティカルヘムがCR細胞の主要サブタイプの主な発生源となっている事を明らかにした。更に、これら細胞の細胞移動について、移動経路、移動の方向性、大脳内での分布パターンの領域特異性において特徴を見出し、この事から、これらCR細胞サブタイプを最終目的地まで正しく導くためのガイダンス機構が存在すると推測した。細胞移動を制御する機構については、これまでに大脳皮質を覆う軟膜組織がケモカインCXCL12とそのレセプターCXCR4を介してヘム由来のCR細胞を誘引し、接線方向への移動の足場となっている事が報告されたものの、ほとんどは未だ明らかになっていない。

一方、中隔およびPSBから生じるCR細胞については特異的な遺伝子マーカーが不足しているため研究が進んでおらず、その細胞移動の全貌は明らかになっていない。これまでにDbx1を発現するPSB領域から生じるCR細胞サブタイプについて解析が行なわれ、その結果、軟膜直下をヘム由来のCR細胞とは異なる方向に接線移動することが報告された。この事はこれらサブタイプの細胞移動はヘム由来のCR細胞サブタイプとは別の分子機

構により制御される事を示唆していると推測される。また、非常に興味深い事に、これらDbx1陽性PSB由来のCR細胞サブタイプはヘム由来のサブタイプの密度の薄い領域により多く分布する様で、この事は大脳皮質形成において、各サブタイプが独自の役割を有している可能性が推測された。

Emx1, Emx2はショウジョウバエ頭部分節の形成にGap遺伝子として働くホメオボックス遺伝子のマウス相同遺伝子である。これまでに行なわれた変異マウスの解析から、これら遺伝子は海馬などの大脳皮質正中部の形成、および大脳皮質の機能領野マップのパターン形成に重要な役割を果たしている事が知られている。それに加えて、Emx2変異マウス、およびEmx1/Emx2二重変異マウスの大脳皮質ではCR細胞に異常が見られる事が報告されている。このCR細胞の異常は、Emx1とEmx2が相補的にコルティカルヘムの形成に関与するために二重変異マウスではヘムが形成されず、ヘム由来のCR細胞が発生出来なかった事によると考えられているが、他の領域から生じるCR細胞サブタイプの異常については明らかにされていない。この事から、Emx1/Emx2二重変異マウスのCR細胞の異常を解析し、更に大脳皮質の異常の詳細を解析する事により、各CR細胞サブタイプの役割について新たな知見が得られる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) それぞれ異なる領域から発生するCR細胞サブタイプについて、その細胞移動の詳細を解析するためのin vitroで観察実験系を確立し、この実験系を用いてCR細胞の細胞移動を制御する分子機構について解析する。

(2) Emx1/Emx2二重変異マウスの大脳の異常を解析する事を通じて、大脳皮質形成における各CR細胞サブタイプのこれまで明らかにされてこなかった役割について検討する。

3. 研究の方法

(1) CR細胞の細胞移動観察のためのin vitro実験系の樹立

CR細胞の細胞移動を詳細に解析するため、in vitroにおけるタイムラップス観察システムの構築を試みた。まず、システム構築のための予備実験として、大脳新皮質領域の神経幹細胞の形態変化および皮質板神経細胞の放射状移動について観察を行なった。神経幹細胞および皮質板神経細胞の蛍光標識にはin uteroエレクトロポレーション法を用いた。EGFPを発現するプラスミドベクター

(pCAGGS-AFP) 溶液を胎児期 12.5-14.5 日目 (E12.5-14.5) のマウス胚終脳の脳室中に微量注入し、ピンセット型電極 (ネッパジン社製、5mm 径) を用いて子宮壁越しに電気パルス (30V、4 回、パルスオン 50msec パルスオフ 950msec) を与え、神経幹細胞にプラスミドを導入した。24 時間母体内で発生させた後、プラスミドを導入した大脳原基を摘出し、4% 低融点アガロースに包埋した後、ピブラトーム (Leica VT-1200S) を用いて 300 μ m の厚さの大脳スライスを作製した。作製したスライスはフィルター (Milipores 社、milicell culture insert CM, 0.4 μ m) 上にコラーゲンゲルで包埋し、D-MEM:F-12=1:1 に 10% ウシ胎児血清、B-27 supplement, N-2 supplement, 10ng/ml human bFGF (いずれも Invitrogen), 10ng/ml EGF (Peprotec) を添加した培地を用い、顕微鏡用 CO₂ インキュベーター (Molecular Devices 社、ChamSlide WP) 内で 37、40% O₂/5% CO₂ の条件下で培養した。蛍光標識された細胞は倒立顕微鏡 (Olympus 社、IX81) を用いて観察し、タイムラプス画像取得は画像解析用ソフトウェア Metamorph (Molecular Devices 社) を用いて解析した。

また、移動中の個々の細胞の形態変化を観察出来るよう、細胞を低密度で標識する方法を検討した。Morin らにより開発された方法を参照し、Cre 組換え酵素の GFP レポータープラスミド (pAcLCL-AFP) と Cre 組換え酵素の発現ベクター (pCX-Cre2) を作製した (Fig1)。

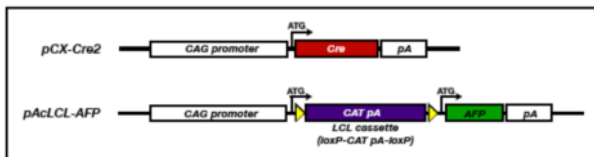


Fig1. 低密度細胞標識法のために作製したプラスミド。(上段) pCX-Cre2、(下段) pAcLCL-AFP。

pAcLCL-AFP は pAcCATZ (熊本大学 荒木喜美博士より供与) の lacZ 遺伝子を GFP 遺伝子に置換する事により作製した。また、pCX-Cre2 は pCreERT2 (Pierre Chambon 博士より供与) の Cre 遺伝子を PCR により増幅し、発現ベクター pCAGGS に挿入する事により作製した。これら 2 種類のプラスミドを pAcLCL-AFP 1 μ g/ μ l、pCX-Cre2 0.01 μ g/ μ l の割合で混合し、上述した in utero エレクトロポレーション法の条件で終脳背側部の神経幹細胞に導入した。

(2) CR 細胞の大脳皮質形成における意義についての解析

Emx1/Emx2 二重変異マウス大脳におけるカールレチウス細胞の異常の解析

Emx1/Emx2 二重変異マウスは相沢慎一博士 (理化学研究所、発生・再生化学総合センター) より供与を受け、熊本大学動物実験施設において飼育を行なった。二重変異マウス胚は Emx1^{-/-};Emx2^{+/-} の雌雄マウス同士の交配により得た。E18.5 及び E12.5 の Emx1/Emx2 二重変異マウス胚より大脳を摘出し、凍結切片を作製後、CR 細胞特異的な遺伝子である Reelin, CXCR4, Dbx1, Ebf2 の発現を in situ hybridization 法により解析した。

Emx1/Emx2 二重変異マウスの大脳皮質形成における異常の解析

層形成の異常については、E18.5 の Emx1/Emx2 二重変異マウス胚より大脳を摘出し、凍結切片を作製後、大脳皮質の各層に特異的な遺伝子マーカーの発現を in situ hybridization 法により解析した。

4. 研究成果

(1) CR 細胞の細胞移動観察のための in vitro 実験系の樹立

in utero エレクトロポレーション法により、CR 細胞を GFP で蛍光標識する手法について検討を行った。E12.5 のマウス胚を用いて上記方法によりエレクトロポレーションを行ったが、その時の電極の位置を調整する事により CR 細胞の発生源である神経上皮細胞にプラスミド DNA が導入出来る事がわかった。(プラス側電極をプラスミドを注入した脳胞の皮質/皮質下境界 (PSB) に置く事により PSB 領域の神経上皮細胞に、逆にプラス電極をプラスミド DNA を注入していない脳胞に置くとコーティカルヘム領域の神経上皮細胞に導入出来る) DNA 導入後 24 時間でヘム領域に導入した場合は CR 細胞に GFP の蛍光が観察されたが、PSB 領域に導入した時には CR 細胞で GFP の蛍光が観察出来なかった。PSB 領域から発生する CR 細胞サブタイプは E12.5 以前に生まれている可能性があり、その場合 E10.5-11.5 胚を用いて exo utero エレクトロポレーションを行なう必要があり、今後この手法を確立する必要がある。

標識された CR 細胞の細胞移動を in vitro で観察するため、大脳スライス培養の諸条件を検討した。これまでに培養方法が確立されている大脳皮質領域の神経幹細胞の形態変化及び皮質板細胞の放射状移動の実験系を用いて条件検討を行った結果、上記条件で 72 時間培養し、皮質板細胞の放射状移動をタイムラプス観察する事が出来た。

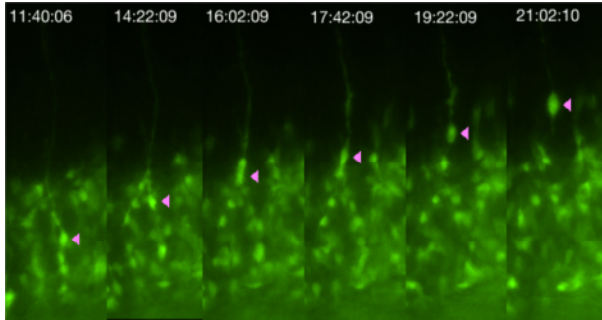


Fig2. 大脳皮質の皮質板神経細胞の放射状移動のタイムラプス観察。脳室帯より出た皮質板神経細胞（矢じり）が表層に向かって放射状移動している様子を示す。

において培養諸条件を確立する事は出来たが、標識された細胞が密集しているため（特に脳室帯において）個々の細胞の形態変化を観察し難い事が問題である。そこで、エレクトロポレーションで低密度に細胞を標識する方法（Low-density labeling）について検討を行った。Morinらが報告した方法では、導入する DNA として Cre 組換え酵素のレポータープラスミドと Cre 発現ベクターを混ぜて使用する事により、両方のプラスミドが導入された細胞でのみ Cre 依存的な組換えが起こりレポーター遺伝子（GFP）が活性化される。更にその時 Cre 発現ベクターの濃度をレポータープラスミドの 1/40 以下に希釈する事により、充分量の Cre を発現する細胞の割合を減少させる。今回作製したベクターの場合、pAcLCL-AFP 1 μ g/ μ l、pCX-Cre2 0.01 μ g/ μ l の濃度で用いた時、低密度で細胞が標識された。この細胞標識法を用いる事により皮質板細胞の放射状細胞移動（Fig.3）や神経幹細胞の interkinetic nuclear migration における細胞の形態変化（Fig.4）等が観察出来るようになった。

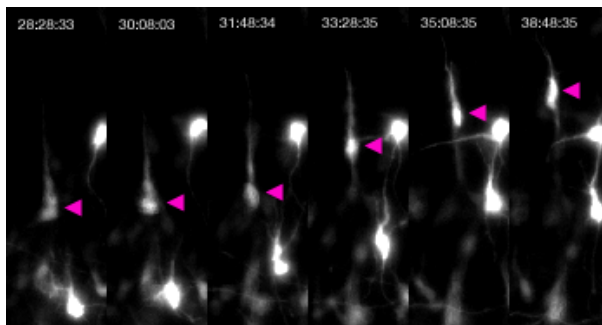


Fig3. 低密度細胞標識法により標識した皮質板神経細胞（矢じり）の放射状移動のタイムラプス観察。

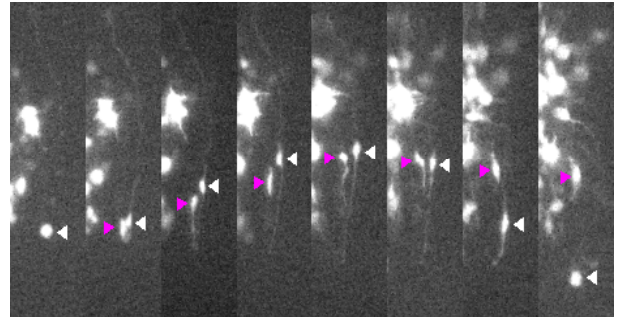


Fig4. 低密度標識法により標識した神経幹細胞（放射状グリア）の interkinetic nuclear migration のタイムラプス観察。脳室周辺部での不等分裂により生じた娘細胞（桃色矢じり）と神経幹細胞（白矢じり）。神経幹細胞の細胞核は表層方向に移動した後、再度脳室に向かって移動し、脳室周辺部で再度細胞分裂を起こした。

上記結果より、の方法を組み合わせる事により、移動中の CR 細胞を詳細に観察する事が出来ると考えられる。今回は CR 細胞の細胞移動を制御する分子機構については解析出来なかったが、今回確立した方法は今後これら細胞移動の解析に大きく寄与すると考えられる。

（2）CR 細胞の大脳皮質形成における意義についての解析

Emx1/Emx2 二重変異マウスの大脳皮質では CR 細胞が認められない事がこれまでに報告されていた。この二重変異マウスではコーティカルヘム領域を含む終脳背側正中部の形成に異常があり、そのためヘム領域から生じる CR 細胞の主要サブタイプが消失していると考えられたが、しかし他の領域から生じる CR 細胞については明らかにされていなかった。そこで in situ hybridization により Emx1/Emx2 二重変異マウス大脳における CR 細胞の異常を再度検討したところ、Reelin 及び CXCR4 陽性の CR 細胞が少数ながら依然として存在する事がわかった（Fig.5）。変異マウスでの CR 細胞は大脳皮質の正中部の辺縁層と脳室帯 / 中間帯に分布しており、新皮質領域の辺縁層には認められない（Fig.5）。PSB 領域の神経上皮細胞で発現する Dbx1、Ebf2 の発現は変異マウスで異常が認められなかった事から、変異マウスで見られた CR 細胞はヘム領域以外の発生源（PSB 領域もしくは中隔領域）に由来する CR 細胞サ

ブタイプである可能性が推測されたが、その詳細は今後の検討課題である。

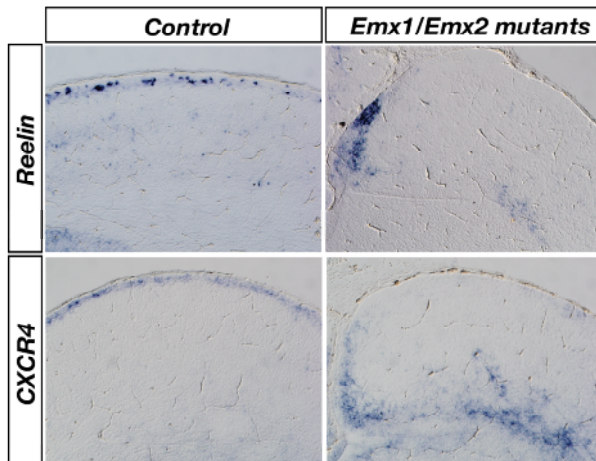


Fig.5 Emx1/Emx2 二重変異マウス的大脑皮質における CR 細胞マーカーである Reelin、CXCR4 の発現。

この結果から Emx1/2 二重変異マウスにおける大脑皮質の異常を解析する事により、大脑皮質形成における各 CR 細胞サブタイプの特異的な役割について検討できる可能性が推測された。そこでまず、Emx1/Emx2 二重変異マウス大脑皮質における層構造の異常について解析を行なった。

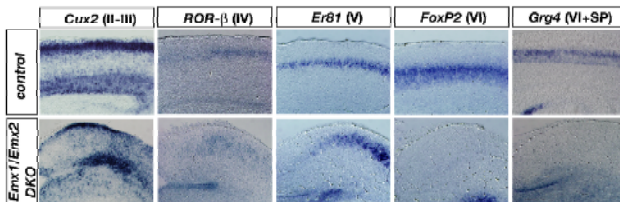


Fig.6 Emx1/Emx2 二重変異マウス大脑皮質における各層特異的マーカー遺伝子の発現の解析。左から Cux2 (第2-3層)、ROR-beta (第4層)、Er81 (第5層)、FoxP2 (第6層)、Grg4 (第6層とsubplate) の発現。上段は control、下段は Emx1/Emx2 二重変異マウス大脑皮質。

Emx1/Emx2 変異大脑皮質における各層特異的なマーカー遺伝子の発現を in situ hybridization により解析したところ以下の結果が得られた。

第6層に特異的な細胞分化に異常
第6層で特異的に発現する FoxP2 の発現が消失する。同じく6層とsubplateで発現する Grg4 の発現も認められない。これまでに BrdU を用いた Birthdating study から第6層の神経板細胞の誕生には異常が認められない事が報告されている。また、第5層特異的な

Citp2、Er81、Fez11 の発現に増加は認められない事から、第6層の神経細胞の細胞運命が第5層の神経細胞に変化したとは考えられない。この事から、第6層の異常は神経細胞の成熟の異常である可能性が推測される。

皮質形成の inside-out パターンについて

正常な大脑皮質では Er81 および ROR-beta の発現はそれぞれ第5層、第4層に特異的で、互いの発現が重なり合わない明確な4/5層境界が認められるが、Emx1/Emx2 二重変異マウス大脑皮質での Er81、ROR-beta の発現は拡散して混じり合っている。この事から4/5層境界は著しく乱れていることが明らかであるが、Er81 の発現はより深層側に、ROR-beta はより表層側に多く認められる。また、第2-3層で発現する Cux2 は脳室帯周辺で強く認められるが、一部は ROR-beta の発現より表層側にも認められる。この事から、Emx1/Emx2 二重変異マウス大脑皮質では3/4/5層の境界は著しく乱れているものの、皮質形成の inside-out パターンは保持されていると考えられる。

2/3 層の皮質板神経細胞の細胞移動の異常

第2-3層で発現する Cux2 の発現は一部は皮質の表層側で認められるが、多くは側方の脳室帯周辺に認められる。この事からこれら細胞の放射状移動に異常がある可能性が推測される。Emx1/Emx2 二重変異マウス的大脑皮質では放射状グリアの放射状突起の走行に乱れがある事が報告されており、Cux2 陽性細胞の移動の異常が放射状グリアの異常によるのか、それとも Cux2 陽性細胞自身の異常によるのかは今後の検討課題である。

これまで大脑辺縁層に存在する CR 細胞は皮質形成の inside-out パターンの形成に深く関与していると考えられて来たが、近年、辺縁層に存在する Reelin 陽性 CR 細胞の大多数を占める、ヘム由来の CR 細胞サブタイプを除去したマウスが作製され、その大脑皮質では各層の境界は不明瞭になるものの、inside-out パターンは保持される事が報告された。今回の Emx1/Emx2 変異マウスの異常はその結果と一致すると考えられる。その一方で、Emx1/Emx2 変異マウスの異常はヘム由来の CR 細胞サブタイプを除去したマウスより重篤である。この事から、Emx1/Emx2 変異マウスにおいて、ヘム以外に由来する CR 細胞サブタイプにも異常がある可能性が推測され、今後、詳細な検討が必要である。他方、皮質形成における Emx1、Emx2 の機能の全貌は未だ明らかにはなっておらず、当然、上記結果が Emx1、Emx2 の皮質板神経細胞あるいは

は神経幹細胞での自律的機能の異常による可能性は残る。この点については、今後、Emx2のコンディショナル Knock-out マウスの作製により皮質板神経細胞あるいは神経幹細胞での機能を解析する事により明らかにして行きたいと考えているが、しかしながら同時に、*Emx1/2* 変異大脳皮質で異常の認められる CR 細胞特異的サブタイプが上記異常に関与する可能性も示唆しており、今後の皮質形成での CR 細胞各サブタイプの意義を明確化する研究に手がかりを与えると期待される。

5 . 主な発表論文等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 道生 (YOSHIDA MICHIO)
熊本大学・発生医学研究センター・助教
研究者番号：80305002

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし