

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06909

研究課題名（和文）介在神経が前駆細胞から移動能を有した成熟細胞へと分化する機序の解明

研究課題名（英文）How do interneuron progenitors differentiate into mature neurons with migratory competency?

研究代表者

片山 圭一（Katayama, Kei-ichi）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20391914

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）：介在神経の前駆細胞が移動能を有した成熟神経細胞へ分化する過程の分子機構を解明するために、内側基底核原基の脳室帯の神経前駆細胞からRhoファミリー低分子量Gタンパク質を欠損させ、発現が変化する遺伝子の探索を行った。Rac1を欠損させるとMid1が、Cdc42を欠損させるとRgccの発現がそれぞれ特異的に減少していたため、これら遺伝子のノックアウトマウスを作製した。Mid1の欠損では介在神経の移動は障害されなかったが、Rgccの欠損では介在神経の移動が障害された。従って、RgccはCdc42の下流で介在神経の前駆細胞が移動能を有する成熟細胞に分化する過程で重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rhoファミリー低分子量Gタンパク質は介在神経の移動そのものには関与していないが、介在神経の前駆細胞が移動能を有した成熟介在神経へと分化するために必須であることが明らかにされてから10年以上が経っているが、そのメカニズムは不明のままであった。本研究では、Cdc42の下流で介在神経の前駆細胞が移動能を有する成熟細胞に分化する過程で重要な役割を果たしている遺伝子としてRgccを同定した。本研究の成果により、介在神経の分化と移動のメカニズムを解明する研究が加速することが期待され、介在神経の異常によって生じる神経・精神疾患の発症機序の解明と治療法の開発に繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：I explored the roles of small Rho GTPases in the acquisition of migratory competency in interneuron progenitors. I deleted small Rho GTPases in the ventricular zone of the medial ganglionic eminence and performed RNA-seq analysis. The expression of Mid1 and Rgcc was decreased in the Rac1 and Cdc42-deleted ventricular zone of the medial ganglionic eminence, respectively. Then I developed Mid1 and Rgcc-knockout mice by genome editing and examined the migration of interneurons in these mice. Mid1-knockout mice did not show any obvious abnormalities in the migration of interneurons, but Rgcc-knockout mice displayed mild defects in the interneuron migration. These results suggest that Rgcc play an important role in the acquisition of migratory competency in interneuron progenitors under Cdc42.

研究分野：神経科学

キーワード：介在神経 Rhoファミリー低分子量Gタンパク質 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

介在神経は大脳皮質の約 30%を構成する抑制性の神経細胞であり、胎児期に大脳腹側部の内側および尾側の基底核原基で誕生し、接線方向に移動して大脳皮質全体に分布していく(図1)。抑制性の介在神経は興奮性の投射神経と比べるとその割合は小さいが、神経組織が正常に機能するためには介在神経が正しい位置に配置され、興奮性の神経細胞と相互にネットワークを形成し、興奮性と抑制性の神経細胞が協調して働く必要がある。実際に介在神経の異常はてんかん、自閉症、統合失調症などの神経・精神疾患の原因となっているとされているため、介在神経が移動能を有した成熟神経細胞へと分化する過程の分子機構を解明することは神経・精神疾患の発症機序を理解する上で欠かすことが出来ないと考えられる。

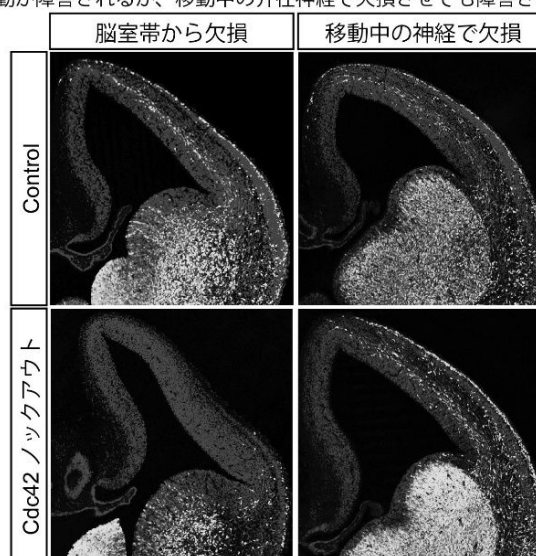
図1. 介在神経は大脳腹側で誕生し、大脳皮質へと分布していく。



我々は、内側基底核原基の中でも最も未分化な前駆細胞が存在

する脳室帯から Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (RhoA, Cdc42, Rac1) を欠損させると、介在神経の移動が障害されるが、移動中の介在神経で欠損させても移動は障害されないことを発見した(図2; Katayama et al., Development, 2013; Chen et al., J Neurosci, 2007)。この研究成果は、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は介在神経の移動そのものには関与していないが、介在神経の前駆細胞が移動能を有した成熟介在神経へと分化するために必須のイベントが内側基底核原基の脳室帯に存在し、そのイベントには Rho ファミリー低分子量 G タンパク質が必須であることを示している。その分子メカニズムを理解することは介在神経の発生・発達を理解する上で必要不可欠な重要課題であると考えられる。

図2. Cdc42 を内側基底核原基の脳室帯から欠損させると介在神経の移動が障害されるが、移動中の介在神経で欠損させても障害されない。



2. 研究の目的

本研究の目的は内側基底核原基の脳室帯において介在神経の前駆細胞が移動能を有した成熟神経細胞へと分化する過程の分子機構、およびその過程において Rho ファミリー低分子量 G タンパク質が果たす役割を解明することである。

Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は細胞骨格を制御することで、介在神経の移動に重要な役割を果たしている信じられてきた。しかしながら、我々による先行研究によって Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は介在神経の移動そのものには関与していないが、前駆細胞から移動能を有した成熟介在神経へと分化する過程に必須であることが示された。この結果はこれまでの定説を覆す重大な発見である。この発見をもとに、これまで知られていなかった、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の新規機能を明らかにしようとしているところに本研究の独自性があり、基礎生物学的な側面での大きな貢献が期待される。

成体における介在神経の機能不全はてんかんなどの神経疾患の発症に関与していることが知られていたが、それに加えて、発生期の介在神経の異常は神経発達障害(自閉症、統合失調症等)の原因となることも明らかになってきた。従って、本研究の成果は、神経・精神疾患の発症機序の解明や治療法の開発に繋がる重要な知見を提供してくれることが期待される。さらには生後の脳が傷害を受けた際に、新たに誕生した神経細胞を適切な場所に移動させ生着させることにより神経再生を促進する技術の確立にも寄与できるものと考えている。

3. 研究の方法

内側基底核原基の脳室帯で Cre recombinase 遺伝子を発現する Nkx2.1-Cre マウスと Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (RhoA, Cdc42 および Rac1) の flox マウスを交配し、内側基底核原基の脳室帯の神経前駆細胞から欠損させる。Rho ファミリー低分子量 G タンパク質を欠損した内側基底核原基の脳室帯から RNA を採取して RNA-seq 解析を行い、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の欠損によって発現が変化する遺伝子を同定する。同定した遺伝子の中から介在神経の移動能獲得過程に関わっている可能性の高い遺伝子をピックアップしてゲノム編集によりノックアウトマウスを作製する。作製したノックアウトマウスは介在神経で蛍光色素を発現する

レポーターマウス (Nkx2.1-Cre マウスと R26R-EYFP マウス) と交配し、神経細胞の移動の動態の解析を行う。

4. 研究成果

Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の下流で介在神経の移動する能力の獲得に重要な役割を果たしている遺伝子を検索するため、Nkx2.1-Cre マウスを用いて Rac1 と Cdc42 を内側基底核原基の脳室帯から欠損させ、そこから RNA を抽出して RNA-Seq 解析を行った。その結果、Rac1 と Cdc42 のノックアウトマウスに共通して、成熟した介在神経に発現する Sst, Maf, Mafb, Erbb4 などの遺伝子の発現が増加しており、これらノックアウトマウスでは、移動ができるようにはならないものの、遺伝子発現をみる限りは前駆細胞から介在神経への分化が亢進していると考えられた。この結果は、前駆細胞から成熟介在神経への分化が亢進していることを示しており、一見すると介在神経がほとんど移動することができないという表現型とは矛盾する結果であるが、介在神経の前駆細胞が移動する能力を有した成熟介在神経へと分化する機構を解明する上で重要な知見であると考えている。また、Rac1 ノックアウトマウスでは Mid1 が、Cdc42 ノックアウトマウスでは Rgcc の発現がそれぞれ特異的に減少していた。そこで、ゲノム編集技術を用いて Mid1 と Rgcc のノックアウトマウスを作製した。作製したノックアウトマウスを介在神経で蛍光色素を発現するレポーターマウス (Nkx2.1-Cre マウスと R26R-EYFP マウス) と交配し、神経細胞の移動の動態の解析を行った。Rgcc ノックアウトマウスでは辺縁帯を通過する介在神経の移動が軽度障害される傾向が認められたが(図 3) Mid1 ノックアウトマウスでは介在神経の移動はコントロールマウスと比べてほとんど違いはなかった(図 4)。

図 3. Rgcc ノックアウトマウスでは介在神経の移動が軽度障害される。

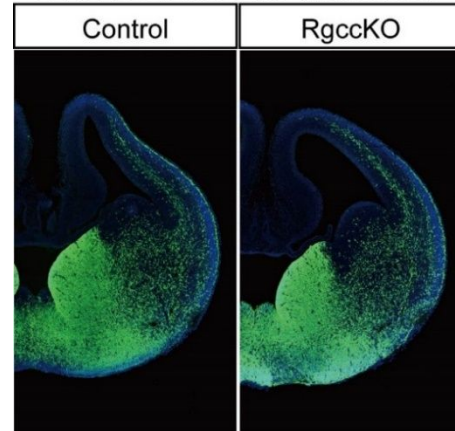
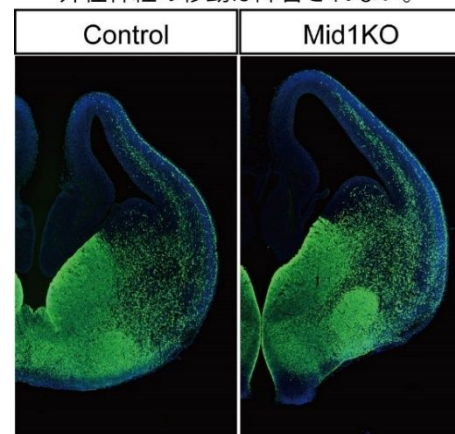
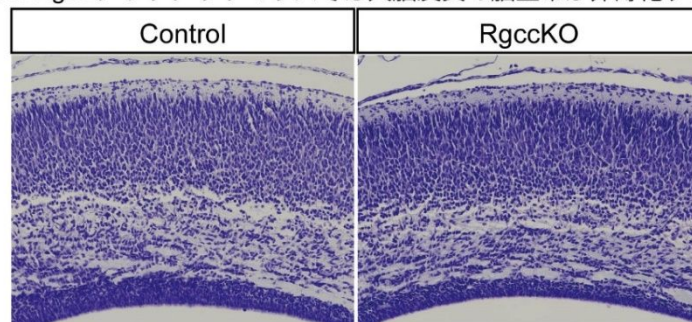


図 4. Mid1 ノックアウトマウスでは介在神経の移動は障害されない。



以上の結果より、Rgcc は Cdc42 の下流で介在神経の前駆細胞が移動能力を有した成熟神経細胞に分化する過程において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。Mid1 の欠損は介在神経細胞の移動には影響がないようであった。しかしながら、大脳皮質神経細胞で Mid1 を欠損させると、細胞の移動には影響がないものの、軸索の伸展と分岐が促進されるという報告もある (Lu et al., PNAS, 2013)。

図 5. Rgcc ノックアウトマウスでは大脳皮質の脳室帯が非薄化する。



従って Rgcc は Cdc42 の下流で介在神経の移動能力獲得過程には関与するものの、接着結合の形成と維持には関与しないものと考えられた。また、Rgcc のノックアウトマウスでは大脳皮質において神経前駆細胞が存在する脳室帯が非薄化していた(図 5)。Cdc42 を欠損した胎児大脳皮質では脳室帯の前駆細胞が減少し、中間前駆細胞が増加するという報告があるが (Cappello et al., Nat Neurosci, 2006) 大脳皮質の神経前駆細胞の増殖・分化にも Rgcc が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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			
米国	Cincinnati Children's Hospital			