

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20240029

研究課題名（和文） 脊髄と小脳の神経回路網を構築する機構

研究課題名（英文） Mechanisms to form neural circuits of the spinal cord and cerebellum

研究代表者

斎藤 哲一郎 (SAITO TETSUICHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00202078

研究成果の概要（和文）：脊髄と小脳は形態も機能も異なる。脊髄には体の左右の情報を反対側に送る神経として交連神経があり、小脳には神経細胞の中で最も数が多い顆粒細胞がある。この交連神経細胞と顆粒細胞を生み出す遺伝子が共通であることを我々は示してきたが、さらに、本研究により、これらの神経細胞の回路を作る機構には分子レベルで多くの共通点と同時に、違いも存在することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The spinal cord and cerebellum are morphologically and functionally different. Our previous results, however, have suggested that commissural neurons in the spinal cord and granule cells in the cerebellum are generated by the same genes. This research project has revealed novel relationship between the genes in neuronal differentiation and neural circuit formation in the spinal cord and cerebellum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	19,800,000	5,940,000	25,740,000
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2011年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
総計	39,400,000	11,820,000	51,220,000

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

1. 研究開始当初の背景

脊髄と小脳は形態も機能も異なり、異なる機構で構築されると考えられてきた。しかし、研究代表者等の最近の研究により、脊髄と小脳を作るための鍵の因子は共通しており、何らかの普遍的な機構が存在することが示唆された。

(1) 脊髄の交連神経細胞の分化はプロニューラル因子 *Math1* の働きで開始した後、*Math1* で直接的に活性化されるホメオボックス遺伝子 *Mbh1* が交連神経細胞の移動や軸索の伸長方向を制御することが明らかとなった。しかし、この細胞移動や軸索伸長で働いている分子機構は不明であった。

(2)小脳の発生過程でも *Math1* と *Mbh1* が発現し、小脳の顆粒細胞の分化や移動は脊髄の交連神経と類似点があることが示唆されたが、小脳におけるこれらの遺伝子間の関係や機能は不明であった。

2. 研究の目的

脊髄と小脳の共通点を軸に、神経回路網の構築機構を互いに比較しながら解析することにより、神経細胞の誕生から神経回路網の形成までを制御する普遍的プログラムを解明することを目的とする。特に、細胞系譜や分化因子の視点で脊髄神経回路網の構築機構を明らかにするとともに、小脳の初期発生機構を分子レベルで明らかにし、両研究の成果を統合することにより、神経回路網の設計図を解明することを目指す。

3. 研究の方法

研究代表者等が明らかにしてきた *Mbh1* の機能を中心として、研究代表者等が開発した電気穿孔法などの独自の手法を駆使し、以下の解析を進める。

- (1)細胞系譜と分化因子の視点による脊髄神経回路構築機構の解析
- (2)小脳の初期発生機構の解析
- (3)小脳と脊髄の神経回路の比較解析

4. 研究成果

研究代表者が開発した初期のマウス胎児への遺伝子導入法 *exo utero electroporation* 法 (Saito (2010) など) やトランスジェニックマウス等を用い、脊髄の代表的な神経の交連神経回路を構築する機構を遺伝子カスケードのレベルで明らかにし、様々な因子間の制御機構を同定することに成功した (Kawauchi et al. (2010) など)。また、小脳の初期発生を制御する因子間の相互作用と下流因子の機能を解明するとともに、脊髄と小脳の神経回路構築機構を比較することにより、両者の共通性と異なる点を明らかにした (Kawauchi & Saito (2008) など)。具体的には、脊髄に関して (図 1 参照)、

- (1)脊髄交連神経の分化では、Bar 型ホメオボックス遺伝子 *Mbh2* と *Mbh1* の発現がこの順序で *Math1* により独立に誘導され、*Mbh2* と *Mbh1* は交連神経細胞の分化運命を決定する。
- (2)*Mbh2* と *Mbh1* は LIM 型ホメオボックス遺伝子の *Lhx2* と *Lhx9* の発現を一過的に誘導し、*Lhx2* は *Robo* の働きを抑える *Rig1* と交連神経マーカーの *Tag1* を誘導する。この制御を反映し、

Rig1 と *Tag1* の発現も一過的になることが示唆された。

- (3)セマフォリン受容体の *Nrp2* は *Lhx2* や *Lhx9* を介さずに *Mbh1* と *Mbh2* の働きで恒常的に誘導される。このことは、*Nrp2* の発現パターンが *Rig1* や *Tag1* と異なることと合致する。

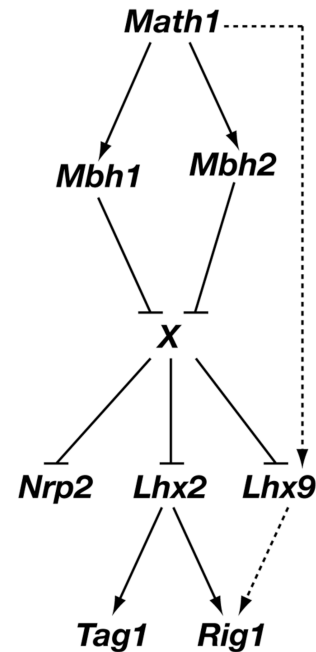


図 1 脊髄交連神経回路構築の遺伝子カスケード

- (4)ネトリン受容体 *Dcc* の量は、*Mbh1* と *Mbh2* を介して転写後制御で調節される。

小脳に関しては (図 2 参照)、

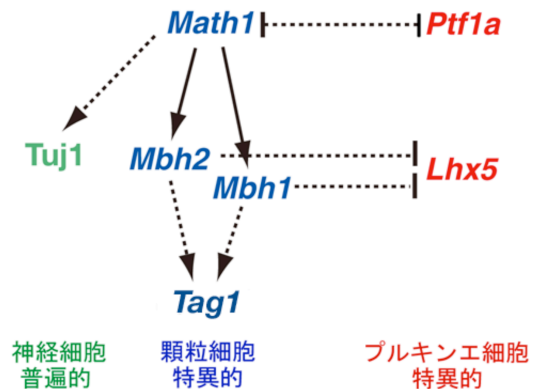


図 2 小脳の神経細胞の分化機構

- (5)小脳形成の初期に、菱脳では HLH 型転写因子の *Math1* と *Ptf1a* が互いに

発現を抑制し合う。この制御機構により、顆粒細胞の分化に必要な *Math1* とプルキンエ細胞の分化に必要な *Ptf1a* が、それぞれ顆粒細胞とプルキンエ細胞を生み出すドメインの広さを決め、その後に生産される両神経細胞の数を調節することが示唆された。

- (6) *Math1* は *Mbh2* と *Mbh1* を別々に直接に誘導し、脊髄と同様に *Mbh2* と *Mbh1* の順で発現する。*Mbh2* と *Mbh1* は顆粒細胞の移動と個性決定を制御する。この時、*Mbh2* や *Mbh1* は脊髄と同様に、*Lhx2* や *Lhx9* の発現を誘導する。

以上の結果により、脊髄の交連神経回路と小脳の神経回路の構築では、*Math1* から *Mbh2* や *Mbh1* を介して *Tag1* に至る経路が保存されていることが初めて明らかとなった。さらに、脊髄の最背部で交連神経細胞が生まれ翼板の基部へ移動する様式と菱脳唇で顆粒細胞が生まれ外顆粒層へ移動する様式を制御する遺伝子カスケードが同一であることを初めて示した。一方、小脳では *Mbh2* と *Mbh1* はプルキンエ細胞の分化に重要な *Lhx5* の発現を抑えるが、同様の抑制は脊髄では働かず、小脳と脊髄で異なる制御があることも明らかとなった。

本研究により、神経回路の構築で中心的な役割を担うガイダンス受容体の遺伝子の *Rigl* や *Nrp2* の発現が遺伝子プログラムにより時間的に巧妙に調節されていることが初めて明らかとなった。この神経回路構築における時間的制御の視点は、これまでの位置情報を中心とした神経回路研究に新展開を与えるものであり、今後の発展が大いに期待される。

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6件)

① Tetsuichiro Saito (2011) *Nepro*: A novel Notch effector for the maintenance of neural progenitor cells in the neocortex. *Adv. Exp. Med. Biol.* **727**, 61-70. 査読無

DOI:10.1007/978-1-4614-0899-4_5

② Daisuke Kawauchi, Yuko Muroyama, Tatsuya Sato and Tetsuichiro Saito (2010) Expression of major guidance receptors is differentially regulated in spinal commissural neurons transfected by mammalian *Barh* genes. *Dev. Biol.* **344**,

1026-1034. 査読有

DOI:10.1016/j.ydbio.2010.06.025

③ Tetsuichiro Saito (2010) Embryonic *in vivo* electroporation in the mouse. in "Guide to Techniques in Mouse Development, Part B" edited by Paul M. Wasserman and Philip M. Soriano. *Methods in Enzymology* **477**, pp37-50. Academic Press. 査読無

DOI:10.1016/S0076-6879(10)77003-8

④ Yuko Muroyama and Tetsuichiro Saito (2009) Identification of *Nepro*, a gene required for the maintenance of neocortex neural progenitor cells downstream of Notch. *Development* **136**, 3889-3893. 査読有

DOI:10.1242/dev.039180

⑤ Daisuke Kawauchi and Tetsuichiro Saito (2008) Transcriptional cascade from *Math1* to *Mbh1* and *Mbh2* is required for cerebellar granule cell differentiation. *Dev. Biol.* **322**, 345-354. 査読有

DOI:10.1016/j.ydbio.2008.08.005

⑥ Satoru Miyagi, Shinji Masui, Hitoshi Niwa, Tetsuichiro Saito, Takuya Shimazaki, Hideyuki Okano, Masazumi Nishimoto, Masami Muramatsu, Atsushi Iwama and Akihiko Okuda (2008) Consequence of the loss of *Sox2* in the developing brain of the mouse. *FEBS Lett* **582**, 2811-2815. 査読有

DOI:10.1016/j.febslet.2008.07.011

[学会発表] (計8件)

① Tetsuichiro Saito: *Nepro* is required for the maintenance of neural progenitor cells in the early neocortex. 1st International Symposium "Neocortex Organization" (2012年3月12日、岡崎)

② 佐藤達也、室山優子、斎藤哲一郎 「大脳皮質神経前駆細胞の維持に必要な遺伝子 *Nepro* の機能解析」第34回日本神経科学大会 (2011年9月16日、横浜)

③ Tetsuichiro Saito: Major guidance receptor genes are differentially regulated downstream of *Barh* genes in commissural neurons. Society for neuroscience 40th annual meeting (2010年11月3日、San Diego, U.S.A.)

④ 斎藤哲一郎 「神経回路の構築を制御する

遺伝子カスケード」 第1回発生システムシンポジウム 「細胞と個体をつなぐメカニズム」 (2010年2月15日、千葉)

⑤ 斎藤哲一郎 「神経ネットワークを構築する機構」 第3回ちば Basic & Clinical Research Conference (2010年2月6日、千葉)

⑥ 室山優子、斎藤哲一郎 「大脳皮質神経前駆細胞の維持における Notch 下流因子 Nepro の機能」 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月10日、横浜)

⑦ 室山優子 「マウス脊髄における部域特異的な細胞分化制御」 第5回 Chiba Neuroresearch Meeting (2009年5月30日、千葉)

⑧ 川内大輔、斎藤哲一郎 「小脳ニューロンの個性決定に関わる転写因子間の相互抑制」 第31回日本神経科学大会 (2008年7月9日、東京)

[図書] (計1件)

① Tetsuichiro Saito (2009)
Transcriptional factor. in “Encyclopedia of Neuroscience” edited by Marc D. Binder, Nobutaka Hirokawa and Uwe Windhorst. pp4096-4099. Springer.

[その他]

ホームページ:

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/dev/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斎藤 哲一郎 (SAITO TETSUICHIRO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 00202078

(2) 研究分担者

室山 優子 (MUROYAMA YUKO)
千葉大学・大学院医学研究院・特任講師
研究者番号: 20422248

川内 大輔 (KAWAUCHI DAISUKE)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 10400996