

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20700317

研究課題名(和文)

大脳皮質形成の神経細胞の移動と形態変化における膜輸送関連分子群の果たす役割

研究課題名(英文)

Analysis for the roles of endocytosis in neuronal migration and morphological changes during cerebral cortical development

研究代表者

川内 健史 (KAWAUCHI TAKESHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60397544

研究成果の概要(和文): 大脳皮質形成において、脳室近辺にて誕生した神経細胞が表層へと移動することは、哺乳類の大脳皮質に特徴的な 6 層構造の形成に必要であり、この異常は様々な脳疾患を引き起こす。これまでの神経細胞移動の研究は細胞骨格制御因子に着目したものがほとんどであったが、本研究では、Dynamin 依存性のエンドサイトーシスの重要性を示し、細胞骨格系のみならず細胞内膜輸送系の適切な制御も神経細胞移動の制御に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): Neuronal migration has essential roles for cerebral cortical development. Although many studies have focused on the important roles of cytoskeletal proteins, the requirement of membrane trafficking-related proteins has remained unclear. In this study, we revealed that Dynamin, a central regulator for endocytosis, is involved in cortical neuronal migration in vivo.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：神経発生・分化・異常

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質形成過程において、脳室近辺(脳室帯/脳室下帯)で誕生した神経細胞は、中間帯にて複雑な形態変化を示した後に皮質板へと侵入し、皮質板の最も表層までの長い距離を移動する。神経細胞の適切な移動は、哺乳類に特徴的な大脳皮質 6 層構造の形成に必要であり、その異常は、てんかんや精神遅

滞を伴う重篤な脳疾患(脳室周囲異所性灰白質(PVH 病)、滑脳症など)を引き起こすことが知られている。よって、神経細胞移動は、6 層構造の大脳皮質を構築ことに加えて、脳が正しく機能するためにも必須な発生段階であることが示唆される。

我々は、MAP キナーゼファミリーのひとつで

ある c-jun N-terminal kinase (JNK) や G0 期の神経細胞で活性化している特殊なサイクリン依存性キナーゼである cyclin dependent kinase5 (Cdk5) が、微小管およびアクチン細胞骨格系の調節を介して神経細胞移動を制御していることを明らかにしてきた (EMBO J, 2003; BBRC 2005; Nature Cell Biol 2006)。これらの研究より、神経細胞が移動するためには、細胞骨格系の適切な制御が重要な役割を果たすことが明らかとなってきたが、細胞骨格系以外の細胞現象が神経細胞の移動に関与するかどうかについてはほとんど分かっていなかった。近年、PVH 病の原因遺伝子のひとつとして、細胞内の小胞輸送に関与する *ArfGEF2* が同定されたことから、神経細胞移動において細胞内膜輸送系が何らかの働きをしている可能性が示唆されたが、組織・個体レベルにおける細胞内の膜輸送系の生理的役割についてはほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

細胞内の膜輸送経路は、細胞膜を起点とするエンドサイトーシス経路、小胞体およびゴルジ体から続く生合成経路、細胞質で起こるオートファジー経路に大別される。エンドサイトーシス経路は、さらにリソソームへ向かう分解経路、再び細胞膜へと戻るリサイクリング経路などに分類され、細胞膜受容体や接着分子の限局した局在や細胞表面量の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。細胞が移動するためには、外界からの情報を受け取るための細胞膜受容体や移動の足場となる細胞接着分子が適切な場所に局在することが必要であることから、本研究では、エンドサイトーシス経路の起点となる「エンドサイトーシス」の役割に着目し、エンドサイトーシスが脳皮質形成に果たす

役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

神経細胞移動におけるエンドサイトーシスの役割を個体レベルで解析するために、簡便に個体への遺伝子導入を行える「子宮内エレクトロポレーション法」を利用した(図1)。神経細胞移動が活発に起き始める胎生 14 日目のマウス大脳皮質に、エンドサイトーシスを阻害することが知られているドミナントネガティブ型 Dynamin の発現ベクターを導入し、様々な発生ステージで遺伝子導入細胞の挙動を解析した。遺伝子導入細胞は、EGFP 発現ベクターを共導入することにより可視化した。なお、子宮内エレクトロポレーション法を用いて 2 種類のプラスミド DNA を導入した場合、90%以上の確率で 2 つの DNA が 1 つの細胞へと共導入されることはすでに確認済みである。

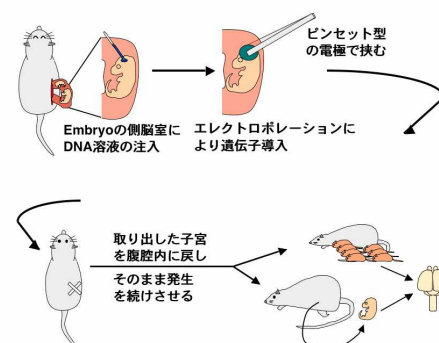


図1. 子宮内エレクトロポレーション法

4. 研究成果

エンドサイトーシスは、クラスリン依存性、カベオリン依存性など、いくつかのタイプに分類されるが、その多くは、GTP 結合蛋白質の Dynamin によって制御されている。そこで、簡便に個体への遺伝子導入を行える「子宮内エレクトロポレーション法」を用いて、胎生

14日目のマウス大脳皮質にDynaminのドミナントネガティブ体 (Dynamin K44A) の発現ベクターを導入し、in vivo でエンドサイトーシスを阻害する実験を行った。この手法では、DNA 溶液を脳室に注入してエレクトロポレーションを行うため、遺伝子は脳室に面した神経前駆細胞へと導入されるため、ここから誕生した移動神経細胞の動態を観察することができる。出生0日目(遺伝子導入の5日後)において、コントロールでは、遺伝子が導入された細胞は大脳皮質の表層近くに存在したことから、これらの神経細胞は、脳室側から表層までの長距離移動をほぼ終えていたと考えられる(図2左)。これに対して、Dynamin K44A を発現させた神経細胞は、表層への移動が大きく阻害されていた。共発現させた EGFP の輝度を指標として、遺伝子導入細胞の配置を定量したところ、Dynamin K44A を発現させた細胞の大半は皮質板に侵入することができず、中間帯にとどまっていることが分かった(図2中央)。

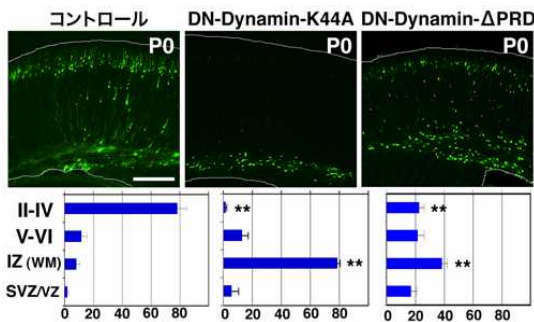


図2 .エンドサイトーシスの阻害により神経細胞の移動が障害された

しかし、Dynamin K44A 発現ベクターを導入した大脳皮質では、コントロールと比較して、EGFP 陽性細胞の数が減少しており、特に EGFP 強陽性の細胞がほとんど確認できなかったことから、遺伝子導入の5日後には多くの細胞が細胞死を起こしてしまっている可能性

が考えられた。そこで、胎生 14 日目に Dynamin K44A 発現ベクターを導入後、1、2、3 日目(それぞれ胎生 15,16,17 日目)に固定をして、遺伝子導入細胞の挙動を観察した。その結果、Dynamin K44A 発現ベクターが導入された細胞は、遺伝子導入の2日後には正常に脳室帯を脱出していたが、その後表層への移動ができず、多くの細胞は(おそらくは細胞死によって)消えてしまうことが示唆された(図3)。実際、Dynamin K44A 発現ベクターを導入した大脳皮質では、アポトーシスのマーカーである活性化カスパーゼ3 陽性の細胞が多くみられた。

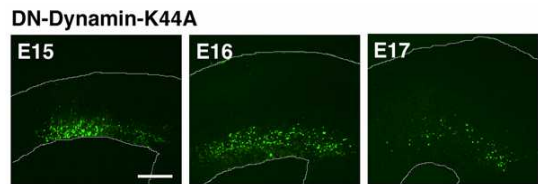


図3 .Dynamin 依存性エンドサイトーシスの阻害による神経細胞死への影響

これらの結果より、Dynamin の機能阻害によって、神経細胞移動が障害され、さらに神経細胞死も増加することが分かった。そこで次に、Dynamin K44A の発現による神経細胞移動の異常が、細胞死を引き起こす経路が活性化したことによる2次的な影響なのかどうかを確認する実験を行った。Dynamin - PRD は内在性の Dynamin に対してドミナントネガティブ効果を示すが、Dynamin K44A と比較してドミナントネガティブ効果が弱いことが知られている。そこで、子宮内エレクトロポレーション法により、ドミナントネガティブ効果が弱い Dynamin - PRD 発現ベクターを胎生 14 日目のマウス大脳皮質に導入し、遺伝子導入の5日後にその影響を観察した。その結果、細胞死は観察されなかったが、神経細胞移動は異常になっていることが分かった(図2

右)

以上の結果より、Dynamitin 依存性のエンドサイトーシスは、神経細胞の生存と、表層への移動に必要であることが示唆された。

また、本研究では、エンドサイトーシスを含む細胞内膜輸送系と細胞骨格系が協調的に働く可能性を検証するために、これら両方の細胞現象に関与することが示唆されている低分子量 G タンパク質 Rac1 およびその下流因子である JNK の役割についても解析を行った(これらは共同研究として関わったもので、筆者が中心となった研究ではない)。以前筆者らのグループは、Rac1 および JNK が神経細胞移動に関与することはすでに報告しているが(EMBO J 2003; J Neurosci 2005, BBRC 2005)、本研究ではこれに加えて、Rac1 が神経前駆細胞でも機能すること、JNK が軸索の伸長に関与することが明らかとなり、それぞれ共同研究の論文として報告した。

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3件)

- (1) Kawauchi T. "Regulation of cell adhesion and migration in cortical neurons: not only Rho but also Rab family small GTPases" **Small GTPases** (2011) Vol.2 (1) in press. 査読有り
- (2) Eto K, Kawauchi T., Osawa M, Tabata H, Nakajima K. "Role of dual leucine zipper bearing kinase (DLK/MUK/ZPK) in axonal growth" **Neurosci. Res.** (2010) Vol.66 (1) 37-45. 査読有り
- (3) Minobe S, Sakakibara A, Ohdachi T, Kanda R, Kimura M, Nakatani S, Tadokoro R, Ochiai W, Nishizawa Y, Mizoguchi A, Kawauchi T., Miyata T. "Rac is involved in the interkinetic nuclear migration of cortical progenitor cells" **Neurosci. Res.** (2009) Vol.63 (4) 294-301. 査読有り

[学会発表](計15件)

- (1) 川内健史、関根克敏、鹿内弥磨、富田憲司、久保健一郎、鍋島陽一、星野幹雄、仲嶋一範 "エンドサイトーシス経路による N-カドヘリンの細胞内輸送を介した神経細胞移動の制御機構" 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(BMB2010) 一般口頭発表「細胞の構造と機能/Cell Biology」、神戸、2010年12月7-10日
- (2) 川内健史 "発生期大脳皮質における神経細胞の移動と成熟の分子機構" 神戸大学大学院医学研究科 大学院講義、神戸、2010年12月3日
- (3) 川内健史 "*In vivo* 細胞生物学による神経細胞移動のメカニズムの解明" 第28回脳科学グローバル COE 若手フォーラム; 東北大学、仙台、2010年9月24日
- (4) Takeshi Kawauchi "Molecular and cellular mechanisms for the radial glial fiber-dependent locomotion mode of cortical neuronal migration" Global COE Liaison Laboratory regular seminar; Kumamoto University, Kumamoto, Japan. September 15, 2010.
- (5) 関根克敏、川内健史、久保健一郎、本田岳夫、仲嶋一範 "大脳皮質形成過程における Rap1 依存的な神経細胞移動の局面" 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経科学学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会(Neuro2010) 神戸、2010年9月2-4日
- (6) Katsutoshi Sekine, Takeshi Kawauchi, Ken-ichiro Kubo, Takao Honda, and Kazunori Nakajima "Molecular mechanisms of Reelin-Dab1 signaling in the mammalian neocortical development" Global COE program Center for Human Metabolomic Systems Biology Workshop, Yokohama, 2010年8月21-22日
- (7) 安達 - 森島亜希, 竹本 - 木村さやか, 鈴木敢三, 上田(石原) 奈津実, 野中美応, 岡村理子, 西村嘉晃, 川内健史, 仲嶋一範, 奥野浩行, 尾藤晴彦 "大脳皮質 2/3 層錐体細胞の放射状移動を制御する新たなカルシウムエフェクター-CaMKI の機能解明", 第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月21-24日
- (8) Takemoto Kimura S., Adachi Morishima A., Ageta-Ishihara N., Suzuki K., Nonaka M., Okamura M., Nishimura Y.V., Kawauchi T., Nakajima K., Okuno H., Bito H. "A pivotal role of a CaMKK-Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I cascade in the radial migration of layer 2/3 cortical pyramidal neurons" Society for Neuroscience, Neuroscience 2009

Meeting (39th Annual Meeting), Chicago, U.S.A., 2009.10.17 -21

- (9) Takeshi Kawauchi “Cdk5-p27^{KIP1} pathway in cortical neuronal migration and morphological changes” 平成21年度 二国間交流事業協同セミナー「Cdk5 International Symposium」; Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan. June 26-27, 2009
- (10) 川内健史 “大脳皮質形成の分子機構の解明に向けた”*in vivo* 細胞生物学”的アプローチ” 名古屋大学大学院医学研究科基礎医学特論; 名古屋大学大学院医学研究科、愛知、2009年6月5日
- (11) 川内健史 “細胞骨格関連分子による神経細胞の移動と形態変化の制御” 2008年度 発達障害研究所 共同セミナー; 愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所、愛知、2009年1月9日
- (12) 西村嘉晃、仲嶋一範、鍋島陽一、星野幹雄、川内健史 “神経細胞特異的な移動様式であるロコモーション移動を制御する分子機構の解析)” 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(BMB2008); 神戸、2008年12月9-12日
- (13) Takeshi Kawauchi “*In vivo* cell biology for cerebral cortical development” RIKEN BSI (Brain Science Institute) Informal Seminar; Tokyo, Japan. October 6, 2008
- (14) Yoshiaki V. Nishimura, Kazunori Nakajima, Yo-ichi Nabeshima, Mikio Hoshino, and Takeshi Kawauchi “Chemical inhibitor screening for molecules regulating morphological changes of locomoting neurons in the developing cerebral cortex” 第50回日本神経化学会大会、Oral Session「軸索輸送、細胞運動、細胞骨格」; 富山、2008年9月11-13日
- (15) Yoshiaki V. Nishimura, Kazunori Nakajima, Mikio Hoshino, Yo-ichi Nabeshima, Takeshi Kawauchi “Search for molecules regulating morphological changes of migrating neurons using real-time imaging of cortical slices” 第31回日本神経科学大会; 東京、2008年7月9-11日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/anatomy/nakajima/page10/page17/page17.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川内 健史 (KAWAUCHI TAKESHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 60397544

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし