

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06670

研究課題名（和文）ニューロン反発因子を介した大脳皮質形成機構

研究課題名（英文）Mechanisms of cortical formation mediated by neuronal repulsive signals

研究代表者

廣田 ゆき（HIROTA, Yuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：00453548

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：神経回路網が適切に機能するためには神経細胞の正確な配置が必要不可欠である。大脳皮質形成過程における神経細胞移動停止は特徴的な層形成パターンに貢献する重要なステップである。本研究では大脳皮質形成過程において、移動を終了する時期の神経細胞にリーリン受容体VLDLRが豊富に発現することに着目し、リーリンシグナルが神経細胞移動停止に必要なことを見出した。さらに、移動を停止する時期の神経細胞において神経反発因子およびリーリンシグナルの作用により、細胞接着分子が神経突起に局在することが明らかになり、移動を停止するプロセスにおいて重要な機能を有するシグナルの発見に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質形成において、神経細胞移動停止は後続の神経細胞を最表層に送り込むことによって層形成パターンを完成させる重要なプロセスであり、本研究ではこのプロセスにおけるリーリンシグナルと神経反発因子による協調的な制御機構を明らかにした。また、大脳皮質層構造に異常が生じると統合失調症や自閉症スペクトラム障害等の精神神経疾患の発症リスクが高まることが知られていることから、本研究で得られた成果は将来的にはこれらの疾患の病態解明にも寄与できるものである。

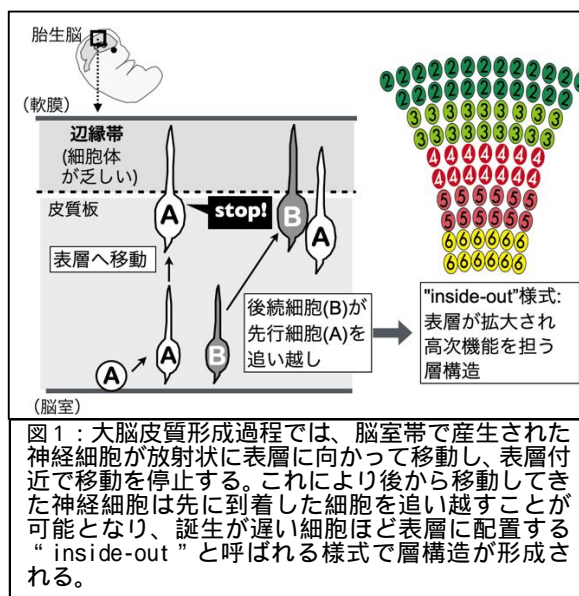
研究成果の概要（英文）：Accurate neuronal positioning is essential for proper functioning of the neural network. The cessation of neuronal migration during cortical formation is an important step that contributes to the characteristic pattern of layer formation. In this study, we focused on the abundant expression of the Reelin receptor VLDLR in neurons at the time of migration termination during cortical formation and found that Reelin signaling is required for neuronal migration arrest. Furthermore, we found that cell adhesion molecules are localized to neurites by the action of neural repulsive factor and Reelin signaling in neurons at the time of migration arrest, leading to the discovery of a signal that has an important function in the process of migration arrest.

研究分野：発生生物学

キーワード：大脳皮質 神経細胞移動 リーリンシグナル ニューロン反発因子

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類大脳皮質形成過程では、脳室帯で誕生した興奮性神経細胞は脳表層に向けて放射状に移動する。脳の最表層には、樹状突起が豊富な一方で細胞体が乏しい層（辺縁帯、生後は第1層と呼ばれる）が存在するが、移動してきた神経細胞はこの辺縁帯の直下で停止する。これにより後から移動してきた神経細胞は先に到着した細胞を追い越して最表層に到達することが可能となり、誕生が遅い細胞ほど表層に配置する“inside-out”と呼ばれる様式で層構造が形成される。この配置パターンは進化過程において獲得され、その結果霊長類型の多種サブタイプを持つニューロンが整然と大脳皮質層構造を実現したと考えられる。



また、大脳皮質層構造に異常が生じると統合失調症や自閉症スペクトラム障害等の精神神経疾患の発症リスクが高まることが知られている。従って神経回路網が安全・適切に機能するためには神経細胞の正確な配置が必要不可欠であり、神経細胞移動停止はこの特徴的な層形成パターンに貢献する重要なステップであるが、その制御機構には不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

細胞外糖タンパク質であるリーリンに端を発するリーリンシグナルは、大脳皮質層構造形成において重要な機能を有する。私たちは以前、リーリン受容体 K0 マウスの解析により、リーリンシグナルが神経細胞移動停止を介して層形成を制御することを報告した。しかしリーリン受容体 K0 マウスで辺縁帯に進入する細胞は少数に留まったことから、神経細胞移動停止は従来のリーリンシグナル以外のシグナルによっても制御されると推定された。この推定に基づき、辺縁帯へのニューロンの進入を制御する分子の候補の探索を行った結果、辺縁帯に局在するニューロン反発因子の関与が推定された。よって本研究では、ニューロン反発因子によるニューロン移動停止制御機構の詳細を明らかにし、大脳皮質層形成メカニズムの新たな側面を理解することを目的とする。

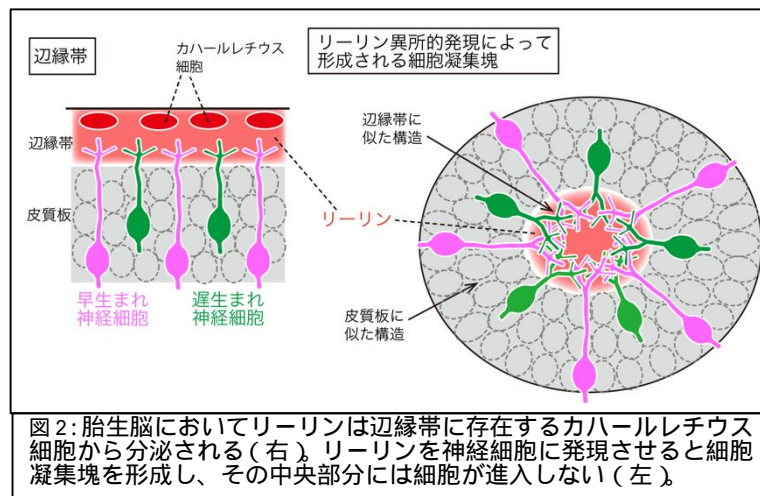
### 3. 研究の方法

大脳皮質形成過程において、移動を終了する時期の神経細胞にリーリン受容体VLDLRが豊富に発現することに着目し、VLDLR K0マウスを解析した結果、VLDLRがニューロン移動停止に必要であることが明らかになった (Hirota et al., Development, 2020)。このことはリーリンシグナルがニューロン移動停止を介して層形成を制御することを示している。しかしながらVLDLR K0マウスで辺縁帯に進入する細胞は全体の5%以内と少数に留まったことから、ニューロン移動停止は従来のリーリンシグナル以外の未知のシグナルによっても制御されると推定された。この推定に基づき、辺縁帯直下でのニューロン移動停止を制御する分子の候補として辺縁帯に豊富に存在するニューロン反発因子に着目した。

#### (1) FLRT2を介した作用

FLRT2によるニューロン反発作用にリーリン受容体ApoER2が関与することを見出した。この結果はリーリンシグナルが現在まで別個に考えられているFLRT2シグナル経路とクロストークして

ニューロン移動停止を制御する可能性を示唆する。FLRT2は受容体Unc5を介してカドヘリンのエンドサイトを促進し細胞接着性を制御する。細胞移動停止時に発現するカドヘリンをscRNA-seqデータベースより探索し、複数のカドヘリンの発現を見出した。さらにこれらのうち複数、リーリンによる細胞凝集に必要



であることを見出した。カドヘリンはホモフィリックおよびヘテロフィリックな結合を介して細胞の接着と選別を制御することが知られているが、辺縁帯直下に到達した神経細胞において発現するカドヘリンの組み合わせは互いに選別される組み合わせが複数みられたことから、細胞体と樹状突起に異なるカドヘリンが局在し、両者を選別している可能性が示唆された。この可能性を検証するため、EGFPタグを付けたカドヘリンを発現するプラスミドを作成し、低濃度でマウス胎生脳に導入し、形成中の大脳皮質内を移動している神経細胞内での局在を調べた。その結果、タイプIIクラシックカドヘリンであるCdh8およびCdh6において、脳表層付近に到達した神経細胞の先端突起(将来樹状突起へと成熟する)へ局在することを認めた。これらのカドヘリンはホモフィリックな接着を制御することが報告されているため、辺縁帯内で神経突起同士を接着させ、細胞体を排除することで細胞体/神経突起の選別に寄与する可能性が考えられた。次にこの可能性をリーリンの異所的発現による細胞凝集塊形成により検証した。リーリンは胎生脳において主に辺縁帯に存在するカハールレチウス細胞から分泌される(図2)。胎生期の脳室帯の神経幹細胞にリーリンを発現させると、そこから産生された神経細胞は脳室帯付近で凝集塊を形成し、細胞体はその周縁に並び皮質板に類似した構造を作り、中心部には樹状突起が集合し細胞体が排除された辺縁帯に類似した構造ができる(図2)。このシステムを利用してCdh8およびCdh6の辺縁帯形成における機能を調べるために、リーリンと同時にCdh8およびCdh6のノックダウンベクターを導入した。その結果、Cdh8またはCdh6ノックダウンされた神経細胞は細胞凝集塊の中央部分へと進入し、空ベクターを導入した対照群に比べて細胞凝集塊の細胞密度が増加した。これらの結果は、Cdh8およびCdh6が辺縁帯形成時に、神経細胞の突起同士を接着させることで細胞体と突起を適切に辺縁帯の直下と内部にそれぞれ配置させ、層形成を制御していることを示唆している。これらの結果は、これらのカドヘリンが辺縁帯形成に必要であることを示唆している。

## (2) CSPGを介した作用

これまでのリーリン受容体KOマウスを用いた結果から、神経細胞は細胞接着分子の神経突起への局在に伴い、接着能を変化させると予想された。接着能の変化を培養下で測定・操作する系として、辺縁帯を模倣したストライプアッセイシステムを開発した。辺縁帯と似た細胞配置を培養下で再現するために、胎生期大脳皮質の辺縁帯に豊富に存在する神経細胞反発因子を探索し、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG)に着目した。CSPGを100ミクロンの幅で縞状にカバーガラス上に塗布し、胎生期の脳室帯の神経細胞をまくと神経細胞はCSPGから反発された。また、神経細胞がCSPGから反発される際にリーリンを添加すると、神経細胞の突起が有意にCSPGストライプ上に分布し、リーリン受容体VLDLRが突起に局在することを見出した。この結果から、神経細胞は辺縁帯付近において、リーリンシグナルに反応して突起と細胞体を選別される機構があることが示唆された。またCSPGの神経細胞に対する反発作用がCSPGのコアタンパク質またはコンドロイチン硫酸鎖のどちらに起因するかを調べるために、コンドロイチン硫酸鎖分解酵素によってCSPGストライプを前処理した。

その結果、コンドロイチン硫酸鎖分解酵素処理によって神経細胞の反発作用は減弱することを新規に見出した。これらの結果は、コンドロイチン硫酸鎖が神経細胞の反発に関与することを示している。

#### 4．研究成果

inside-out 様式での神経細胞配置は、脳の成長に伴って急速に拡大していく脳表面に満遍なく神経細胞を分布させる上で有利と考えられる。ところがなぜかその最表層には細胞体が乏しい層・辺縁帯が存在する。この層が形成されるメカニズムは従来注目されてこなかったが、本研究ではリーリン過剰発現系を用いて神経細胞移動停止に細胞接着分子が関与することを明らかにした。リーリン過剰発現系では、リーリンが単独でこの細胞体排除領域を形成できるとともに、inside-out 様式での層形成を引き起こせるため、「細胞体が入らない領域ができること」と、「層形成」は密接な関係を有し、そのプロセスに細胞接着分子が関与することを示すことが可能になった。また、リーリンシグナルを含めて層形成に重要なシグナル経路は、神経細胞の移動促進にも機能するケースが非常に多く、単純な機能阻害実験では神経細胞の移動過程そのものが損なわれるため、その後にかかる移動停止のプロセスへの2次的影響を排除することは困難を伴う。本研究においてはこの問題を、「リーリン過剰発現系」に加えて「ストライプアッセイを用いた辺縁帯の再現系」を利用することにより克服し、脳室帯から移動して間もない神経細胞たちに生体内および培養下で擬似的な辺縁帯を作らせ、移動を停止するプロセスにおいて重要な機能を有するシグナルの発見に至った。

本研究では、移動を停止する時期の神経細胞においてリーリン受容体と細胞接着分子が神経突起に局在することが明らかになった。これまでに各種神経細胞の移動を正常に停止させる仕組みに着目した研究は数少なく、細胞骨格の制御を伴う樹状突起の形成等を介した神経細胞の成熟過程が関与するという報告が複数あるが、細胞接着分子および神経反発因子による制御、すなわち細胞外因子との相互作用を介した制御は報告されていない。特に、細胞接着因子は同じ種類の細胞同士を集合させることで異なる細胞を選別する機能がよく知られ、神経系ではカドヘリンにより脳の領域区分化、シナプス形成や軸索収束が制御されることが知られているが、本研究では単一の神経細胞内で複数のカドヘリンが異なる細胞内局在をすることにより、細胞体と樹状突起の分布する領域を分けるといった新しい可能性を見出している。今後、これらの分子がどのような機序で同時期に誕生した神経細胞を配置させ、後続の神経細胞を最表層に送り込むことによって整然とした層構造を形成するのかを明らかにすることが次の課題である。そのためには本研究で確立した培養系を用いて、細胞体と突起の選別に必要な細胞密度・細胞接着分子・神経反発因子についてさらなる解析を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ito N, Riyadh MA, Ahmad SAI, Hattori S, Kanemura Y, Kiyonari H, Abe T, Furuta Y, Shinmyo Y, Kaneko N, Hirota Y, Lupo G, Hatakeyama J, Abdulhaleem M FA, Anam MB, Yamaguchi M, Takeo T, Takebayashi H, Takebayashi M, Oike Y, Nakagata N, Shimamura K, Holtzman MJ, Takahashi Y, Guillemot F, Miyakawa T, Sawamoto K, Ohta K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Dysfunction of the proteoglycan Tsukushi causes hydrocephalus through altered neurogenesis in the subventricular zone in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aay7896	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Hirota, Y. and Nakajima, K.	4. 巻 dev189936
2. 論文標題 VLDLR is not essential for Reelin-induced neuronal aggregation but suppresses neuronal invasion into the marginal zone.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.189936	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Kohno, T., Ishii, K., Hirota, Y., Honda, T., Makino, M., Kawasaki, T., Nakajima, K., Hattori, M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Reelin-Nrp1 interaction regulates neocortical dendrite development in a context-specific manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 8248-8261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1907-20.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirota, Y., Ohtaka-Maruyama, C., Borrell V.	4. 巻 9:673825
2. 論文標題 Editorial: The Extracellular Environment in Controlling Neuronal Migration During Neocortical Development.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.673825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Honda T, Hirota Y, Nakajima K.	4. 巻 10(4)
2. 論文標題 Heterozygous Dab1 null mutation disrupts neocortical and hippocampal development.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 0433-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0433-22.2023.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tabata H, Sasaki M, Agetsuma M, Sano H, Hirota Y, Miyajima M, Hayashi K, Honda T, Nishikawa M, Inaguma Y, Ito H, Takebayashi H, Ema M, Ikenaka K, Nabekura J, Nagata KI, Nakajima K.	4. 巻 13(1):6571.
2. 論文標題 Erratic and blood vessel-guided migration of astrocyte progenitors in the cerebral cortex.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 6571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34184-x.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Oshima K, Yoshinaga S, Kitazawa A, Hirota Y, Nakajima K, Kubo KI.	4. 巻 43(5)
2. 論文標題 A Unique "Reversed" Migration of Neurons in the Developing Claustrum.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 693-708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0704-22.2022	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10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 齋藤里香穂、野崎恵太、佐野ひとみ、廣田ゆき、仲嶋一範
2. 発表標題 マウスの大脳新皮質神経細胞移動に関するカドヘリンの検索
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣田ゆき
2. 発表標題 解剖学教育と大脳皮質発生研究
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣田ゆき, 仲嶋一範.
2. 発表標題 VLDLR controls the positioning of pyramidal neurons by suppressing neuronal invasion into the marginal zone, rather than by promoting neuronal aggregation, during neocortical development.
3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣田ゆき, 齋藤里香穂, 佐野ひとみ, 仲嶋一範.
2. 発表標題 Mechanisms of the suppression of neuronal invasion into the marginal zone during layer formation of the mouse neocortex.
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 廣田ゆき, 齋藤里香穂, 佐野ひとみ, 廣田ゆき, 仲嶋一範.
2. 発表標題 Cadherin-6 regulates neuronal migration during neocortical development.
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会・第64回日本神経化学会大会・第32回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠井拓登、本田岳夫、廣田ゆき、仲嶋一範.
2. 発表標題 Dab1はプルキンエ細胞に発現し生後小脳の細胞配置と葉形成を制御する
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会・第64回日本神経化学学会大会・第32回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田岳夫、廣田ゆき、仲嶋一範
2. 発表標題 Dab1のハプロ不全は大脳新皮質Layer1厚減少と尾側海馬CA1錐体細胞層の分離を引き起こす
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会・第64回日本神経化学学会大会・第32回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Hirota, Rikaho Saito, Takao Honda, Hitomi Sano, and Kazunori Nakajima.
2. 発表標題 Cadherin-6 controls radial migration of neurons during neocortical development.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本佑紀奈、徳光綾子、曾根岳史、廣田ゆき、田村亮太、坂本鮎菜、仲嶋一範、戸田正博、河上裕、岡野栄之、大多茂樹.
2. 発表標題 MIFにより制御されるTPT1は神経前駆・幹細胞および脳腫瘍幹細胞の増殖を促進する.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Oshima K, Yoshinaga S, Kitazawa A, Hirota Y, Nakajima K, Kubo K.
2. 発表標題 Elucidation of migration profiles of claustral neurons during brain development.
3. 学会等名 Society for Neuroscience, Neuroscience 2022 meeting (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究協力者	仲嶋 一範  (NAKAJIMA Kazunori)		

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
---------	---------