

## 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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：21240027

研究課題名（和文）

小脳発生の研究：胎生期のニューロン誕生・移動の機構

研究課題名（英文）

Elucidating mechanisms of embryonic cerebellar development

研究代表者

宮田 卓樹 (Miyata, Takaki)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70311751

研究成果の概要（和文）：

本研究は、従来不明な点が多かった胎生期の小脳の形成過程について理解を深めることをめざした。求める基礎的知見が先天性疾患の病態解明や再生医療にむけた取り組みに役立つ事を念頭に、ニューロンと神経前駆細胞の挙動に焦点をあてて研究が行われた。ヒト小脳形成に重要と知られる細胞外因子「リーリン」が移動中の幼若なプルキンエ細胞に対してどういう働きかけをしているかをスライス培養下のライブ観察などによって明らかにした。また、プルキンエ細胞を産生する神経前駆細胞の細胞周期動態、分裂の様式を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed at elucidating mechanisms of cerebellar development. Special attentions were paid on the behavior of young Purkinje cells and their progenitor cells. Understanding of how Purkinje cells migrate and form a layer in the cerebellar cortex is important for dissecting pathogenesis of human cerebellar malformations. We visualized newly-generated Purkinje cells' morphology and dynamics for the first time and the results were published. Cell cycle parameters and lineage of progenitor cells that give rise to Purkinje cells were also studied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2012年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
総計	30,700,000	9,210,000	39,910,000

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：発生・発達・再生神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

小脳の発生について、パターンニングにあずかる転写因子や液性因子の重要性、また細胞移動の制御因子など、分子レベルでの理解が近年進んできた。しかし、ある分子の重要性が知られながら、その分子がどう具体的に働く

のか知られていないケースが多い。例えば細胞外因子リーリンは、1995年のクローニングにつづき受容体と細胞内シグナル経路も知られるようになったにもかかわらず、それを受けとる細胞のふるまいについては不明な点が多い。この問題はリーリンを受け取る

プルキンエ細胞の移動、配置の様態についてそもそもほとんど動的な情報がないことに起因する。そこで、誕生してからプルキンエ細胞がどういう三次元的挙動をとるのか理解した上でリーリンの役割を問う必要がある。また、プルキンエ細胞の誕生についても謎が多い。神経前駆細胞がどのような形をしており、どう細胞周期を進行させ、いかなる分裂様式をとるのか、分かっていない。これは、大脳皮質の神経前駆細胞に対しての理解が最近著しく進んだのに比べてかなり遅れている。一方で、ES細胞から各種ニューロンを人工的につくるという取り組みの一環として小脳のプルキンエ細胞の産生もできるようになった。そして、そうして得たプルキンエ細胞を移植して層形成へ参加させることも部分的にできるようになったと報じられた。しかし、移動、層形成の人為的コントロールはまだかなり困難であるとも報じられている。したがって、病態理解、再生医療的取り組みの基盤として、小脳発生過程について知見を得る事が求められている。とくにブラックボックスであり続けてきたのが、胎生早期から中期である。じつは哺乳類の小脳は個体の出生後にもニューロンの産生が続くのだが、小脳のサイズ、得られる細胞の数の多さなどにまつわる実験上の扱い易さにもとづいて、出生後についての研究が主に進められてきた。そして、逆にアプローチの困難さのために胎生早期はほとんど手つかずのままであった。したがって、この弱点部分での理解を深める必要があった。

## 2. 研究の目的

小脳発生の過程のうちとくにこれまで解析が手薄であった胎生期の前半から中盤にかけてを対象として、プルキンエ細胞の誕生から移動、配置までの様子を明らかにする。またプルキンエ細胞を生み出す前駆細胞の細胞周期、系譜について明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) プルキンエ細胞の移動、配置に関する研究 (リーリンの役割に関連して) : 誕生直後からプルキンエ細胞の追跡を行なうために、GFP アデノウイルスを胎生 10 日から 12 日のマウス胎仔の第四脳室へ注入した。一定時間 (1 日~10 日) 待ち、小脳の固定標本、凍結切片を作製し、プルキンエ細胞の同定のための抗体染色を施した。この方法を繰り返して、小脳原基のどの位置にどのような形態をした GFP 陽性の幼若プルキンエ細胞が存在するかのマップを作成した。また軸索形成のタイミング、程度、方向について、GFP と軸索特異的タンパク質の免疫組織化学的検出にもとづいて解析した。さらに、細胞移動、突起形成に必要な細胞内制御にかかわる中心体

やゴルジ体の局在についても抗体染色で調べるとともに、オルガネラ特異的標識を施したうえでライブ観察をすることも試みた。こうした一連の解析を正常マウスの小脳原基と、リーラーマウス (常染色体劣性遺伝、リーリン欠損) の小脳原基に対して行ない、両者の状況を比較した。

(2) プルキンエ細胞の前駆細胞に対する研究 : プロモデオキシウリジン (BrdU) の投与、抗体染色と細胞周期マーカー Ki67, M 期細胞マーカー pH3 の抗体検出を組み合わせ、前駆細胞の細胞周期全長、G1, S, G2, M の各局面の長さを推定した。分裂様式を把握する目的でレトロウイルスを第四脳室へ注入し、クローンのなかに占めるプルキンエ細胞

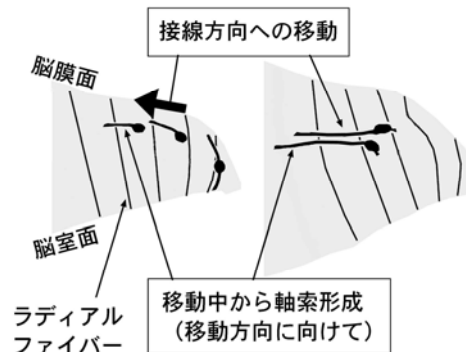
(Lhx1/5 または Cor12 の発現にもとづいて同定) の数を判定し、当該クローンの産生主であった前駆細胞の分裂が非対称分裂か対称分裂かを推定した。

(3) プルキンエ細胞の移動、配置に関する研究 (縞状のコンパートメント形成に関連して) : 誕生日の異なるプルキンエ細胞は遺伝子発現のパターンが異なる (未発表データ)。そして誕生日の違うプルキンエ細胞は小脳の長軸に沿って別々の縞として分布する。この「縞」の形成原理を胎生後期から生後に書けて解析した結果が報告されているが、胎生早期については不明であるので、胎生早期小脳原基のなかで胎生 10 日目生まれのプルキンエ細胞集団と胎生 11 日目生まれのプルキンエ細胞集団とがどのように棲み分けているか、組織切片の三次元的再構成によって明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) プルキンエ細胞の移動、配置に関する研究 (リーリンの役割に関連して) (論文発表した)

① 幼若プルキンエ細胞は従来考えられていた「放射状」移動だけではなく「接線方向」移動を行なうことが分かった。散発的な標識によって完全な形態を可視化したプルキンエ細胞が、脳膜に平行に長く伸びた形態をと



りながら移動する様子をライブ観察できた。

②幼若プルキンエ細胞は、従来考えられていたように移動を終了してから（配置を終えてから）軸索を伸ばすのではなく、移動の最中に軸索を伸ばすことが分かった。しかも、その方向が、従来の想定「脳膜側から脳室側へ」ではなく、反対に「脳膜側に向けて」であった。

③リーリンの発現が始める胎生 13 日目から 14 日目にかけて幼若プルキンエ細胞による層形成が始まるが、移動局面からこの層形成局面への移行時に、プルキンエ細胞が劇的な方向転換をすることがわかった。人間の姿勢変化で例えるなら「リュージュ（そり）」に乗った（前方に足を伸ばした）状態から、腹筋運動をするかのように上半身を起き上がらせるような動きを示した。

この動きは、後ろ側（そりに乗った人の頭の部分）に保有した突起をめまぐるしく方向転換させながら、リーリン分布域に突起を突っ込むこと、そして突起の先端に向けて核をもぐり込ませることによって果たされた（列車の「スイッチバック」風）。そして方向転換に用いられる突起の根元には中心体とゴルジ体が局在していた。

④リーリンを欠くリーラーマウスの小脳原基では、この「胎生 13 日目から 14 日目にかけた起き上がり」がないままプルキンエ細胞が寝そべったように居続け、本来はあるべき小脳原基表面との密接な空間関係性を築くことができなかった。

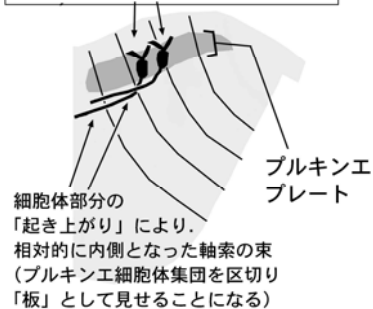
（2）プルキンエ細胞の前駆細胞に対する研究

細胞周期長を胎生 10, 11, 12 日目のそれぞれで推定できた。大脳皮質の前駆細胞に比べてかなり長い事がわかった。また、細胞分裂のモードについて知見を得た。対称分裂と非対称分裂の両方が混在している事が示唆された（学会発表し、投稿準備中）。

（3）プルキンエ細胞の移動、配置に関する研究（縞状のコンパートメント形成に関連して）

胎生 10 日目生まれのプルキンエ細胞と胎

リーリン依存的な「方向転換」・「起き上がり」によって層形成



生 11 日目生まれのプルキンエ細胞が胎生中期から空間的相互関係性をダイナミックに変えていくことが分かった（学会発表し、投稿準備中）。

#### 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）（全て査読有）

1. Sakakibara, A., Sato, T., Ando, R., Noguchi, N., Masaoka, M., Miyata, T. Dynamics of centrosome translocation and microtubule organization in neocortical neurons during distinct modes of polarization. *Cereb. Cortex* 2013 Jan 10. (doi:10.1093/cercor/bhs411)

2. Pérez-Martínez, F.J., Luque-Río, A., Sakakibara, A., Hattori, M., Miyata, T., Luque, J. M. Reelin-dependent ApoER2 downregulation uncouples newborn neurons from progenitor cells. *Biol. Open* 1:1258-1263 (2012)

3. Miyata, T., Ono Y., Okamoto M., Masaoka M., Sakakibara A., Kawaguchi A., Hashimoto M., Ogawa M. Migration, early axonogenesis, and Reelin-dependent layer-forming behavior of early/posterior-born Purkinje cells in the developing mouse lateral cerebellum. *Neural Dev.* 5, 23 (2010)

〔学会発表〕（計 7 件）

1. The 23rd CDB Meeting Building multicellular systems from cellular cross-talk (2013/1/22-23、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター(神戸市)) 「Cohorts of PCs that share the same birthdate communicate each other and form individual compartments in the cerebellum.」M. Hashimoto, T. Miyata

2. 第 35 回日本神経科学大会 Neuro2012 (2012/9/18-21、名古屋国際会議場(名古屋市)) 「小脳プルキンエ細胞を生み出す前駆細胞の挙動についての研究」(宮田卓樹、三輪貴之、榊原明、川口綾乃、橋本光広:ポスター)

3. 第 33 回日本神経科学大会 Neuro2010 (2010/9/2-4、神戸コンベンションセンター(神戸市)) 「マウス小脳原基における細胞周期に関する研究」(三輪貴之、伊藤恵美、太田久美子、榊原明、川口綾乃、宮田卓樹:ポスター)

