

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 25日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300124

研究課題名（和文） 大脳腹側部における新しい神経回路形成機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms of neural circuit formation in the ventral telencephalon

研究代表者

平野 伸二（HIRANO SHINJI）

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：80222248

研究成果の概要（和文）：大脳腹側部における新しい神経回路形成機構を明らかにするために、線条体線維の重要性を検証する研究とこの領域に発現する新しいガイダンス分子の探索を試みた。線条体線維の重要性を検証するための研究は技術的な問題から中止をした。一方、新しいガイダンス分子の探索では、プレキシンA1とセマフォリン6Dが内包形成に重要ではないという結果を得るとともに、プロトカドヘリン9が聴覚系などの神経回路に沿って分布していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To reveal molecular mechanisms of neural circuit formation in the ventral telencephalon, we tried to prove importance of striatal axons and to find novel axon guidance molecules in this region. Due to technical problems, we failed to perform experiments on striatal axons. On the other hand, we could show that PlexinA1 and Semaphorin6D did not play major roles in formation of internal capsule and that distribution of protocadherin 9 protein coincided with certain neural circuits, such as auditory system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

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：神経科学、脳・神経、発生分化、神経回路、細胞接着分子、カドヘリン

1. 研究開始当初の背景

大脳腹側部には皮質脊髄路や視床皮質路などの運動や感覚情報を伝達するいくつかの主要な神経回路が存在する。それらの神経回路形成には、Pax6などのいくつかの転写因子が重要な役割を果たしていることがわかっているが（Lopez-Bendito & Molnar

2003）、転写因子以外ではネトリン1やニューレギュリン1など限られた例しかわかっていない（Lopez-Bendito et al. 2006）。この領域の神経回路形成は非常に複雑な過程をへることから、まだ発見されていない分子や機構が多数存在すると予想される。

申請者は、これまでにOLプロトカドヘリ

ンと名付けた新規のプロトカドヘリンを発見し、その発現パターンの解析からこの分子が大脳辺縁系などの神経回路形成に関わっている可能性を見出した (Hirano et al. 1999, Aoki et al. 2003, Nakao et al. 2005, Muller et al. 2004 など)。そこで、この分子のノックアウトマウスを作製し表現型の解析をしたところ、この変異マウスでは、皮質視床投射経路、視床皮質投射経路、皮質脊髄経路などの主要な神経回路に投射異常が見られた (Uemura et al. 2007)。表現型の解析から、正常なマウスでは線条体線維が大脳腹側部のパターンングをもたらしつつ視床皮質線維の足場を形成することによって、神経線維のガイダンスをするという新しい仮説を提唱するにいたった (Uemura et al. 2007, Hirano 2007)。

一方 OL プロトカドヘリンの線条体線維伸長機構を明らかにするために、その細胞内領域に結合する分子の探索を行ったところ、アクチン骨格系の制御にかかわる WAVE 複合体を構成する Nap1 と CYFIP2 の 2 種類のタンパクを同定した (Nakao et al. 2008)。OL プロトカドヘリンを導入したグリオーマ細胞では、接着した細胞同士の運動性が亢進していることがわかった。これらのことから OL プロトカドヘリンは Nap1 を介して古典的カドヘリンを制御することにより成長円錐の運動の促進をしている可能性が示された。

以上のように、これまでの研究からプロトカドヘリン分子群が神経の軸索ガイダンスに関与していること、また線条体線維の伸長が大脳腹側部の神経回路形成に重要なステップであることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、大脳腹側部における新たな神経回路形成機構を明らかにすることを目的とする。そのために 2 つの方向から研究を行う。1 つ目は、これまでの研究で想定された「線条体線維の正常な伸長が視床皮質投射などの神経投射に必須である」という仮説を証明しようとするものである。2 つ目は、大脳腹側部に存在する神経軸索の走行を制御する新たなガイダンス分子の探索を行うというものである。これらのアプローチにより神経回路形成機構という古典的な問題の解決の端緒を見つけていく。

3. 研究の方法

(1) 視床皮質投射における線条体線維の重要性を証明するために、まず線条体で発現する Rbp1 遺伝子のプロモーターを用いた OL プロトカドヘリンのトランスジェニックマウスを作製する。このマウスの線条体で OL プ

ロトカドヘリンが発現すれば、次にこれを OL プロトカドヘリンノックアウトマウスと交配する。これにより、ノックアウトマウスの線条体での表現型が回復すれば、線条体線維の役割を明らかにすることができる。

(2) 大脳腹側部の神経回路形成に関わる分子を同定するために、まずこの領域で発現する候補分子をアレイ解析によりリストアップする。次に、この中から細胞間相互作用にかかわるような形態形成分子を選び出し、免疫染色法により大脳腹側部の神経回路形成に関与している可能性が高い分子に絞り込む。また、既知の形態形成分子についても、この領域に発現しているかを検討して、解析に加える。最後に、それら候補分子のノックアウトマウスの表現型を解析し、それらの分子が実際に神経回路形成に関わっているかどうかを検討する。

なお、トランスジェニックマウスとノックアウトマウス作製には理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・動物資源開発室の協力を得た。

4. 研究成果

(1) 内包における線条体線維の役割

視床皮質投射における線条体線維の重要性を証明するために、まず Rbp1 遺伝子のプロモーターを用いた OL プロトカドヘリンのトランスジェニックマウスを作製を試みた。その結果、この分子のトランスジェニックマウスを得たが、線条体での OL プロトカドヘリンが過剰発現しているものはなかった。そのためこのアプローチを先に進めることはできなかった。

(2) 軸索ガイダンス分子の探索

① プレキシシン A1 とそのリガンドであるセマフォリン 6 D

マウス脳から大脳皮質、視床、大脳腹側部の組織片を取出し、発現する分子のアレイ解析を行った。その結果いくつかのプレキシシンとセマフォリン分子が大脳腹側部で比較的強く発現していることが分かった。そこで、いくつかについて抗体を用いて分布を調べると、プレキシシン A1 は視床皮質線維などの内包の線維に、セマフォリン 6 D は内包を取り囲むように相補的に分布していた。プレキシシン A1 とセマフォリン 6 D はレセプターとリガンドの関係にあることから、大脳腹側部の内包の束形成にこれらの分子が関与していることが予想された。そこでこの可能性を検証するためにプレキシシン A1 とセマフォリン 6 D のノックアウトマウスを大阪大学の熊ノ郷先生より分与いただき、マウスの表現型の解析を行った。その結果、これらの分

子の単独のノックアウトマウスにおける内包の形成を調べてみると、内包の束形成や内包内での視床皮質線維と線条体線維の分離などについて特に異常は見られなかった。さらに、プレキシシンA1とセマフォリン6Dのダブルノックアウトにしても同じであった。つまり、これらの解析ではプレキシシンA1とセマフォリン6Dが内包形成に関わっているという証拠は得られなかった。

② プロトカドヘリン分子群

アレイ解析の結果、大脳腹側部においてはカドヘリン超分子群に属する様々な分子の発現が見られることがわかった。そこで、それらの中からまだ解析の進んでいないいくつかのプロトカドヘリン分子を選びだし、これらの分子が神経回路形成に関わっているかどうかを検討することにした。

はじめに、神経系全体に比較的発現の多いプロトカドヘリン9について解析を行った。まず、モノクローナル抗体を作製し、これを用いて発生過程のマウスの神経系における分布を詳細に調べた。その結果、この分子は大脳腹側部では視床皮質線維に特異的な分布をしていることが明らかになった(図)。それ以外の領域では、内側縦束、前庭神経核、上オリーブ、網膜などの様々な神経核や神経束で分布していた。この分子を発現している神経核や神経束の多くが、聴覚系や前庭系などの神経回路に属していることがわかった。また、嗅球ではOLプロトカドヘリンとプロトカドヘリン9がそれぞれ異なる糸球体のセットに分布していることが明らかになった。これらのことからプロトカドヘリン9が他のプロトカドヘリンとは差次的に分布して、神経回路形成に関与しているのではないかと予想された。そこで、この分子の機能を明らかにするために、プロトカドヘリン9のノックアウトマウスの作製を行った。現在、このマウスの解析を進めているが、予備的な結果では、大脳腹側部などの神経回路においては大きな異常は見つかっていない。また、歩行や平衡感覚などの行動についても、大きな異常は見られなかった。

プロトカドヘリン9と並行して、大脳腹側部で発現するプロトカドヘリン1とプロトカドヘリン11xについても研究を始めた。プロトカドヘリン11xについてはモノクローナル抗体を作製したが、近縁のプロトカドヘリンにも反応し、特異性がやや低いことが分かった。また、これら2つのプロトカドヘリンについてノックアウトマウスの作製を行った。現在、表現型の解析をするためにもどし交配と繁殖を始めたところである。

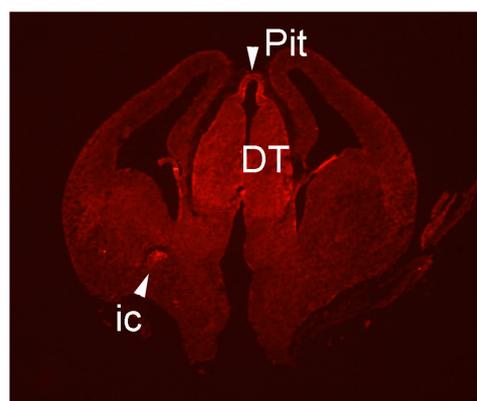


図 プロトカドヘリン9の分布

以上のように、本研究では大脳腹側部における神経回路形成機構に直接かかわる新たな分子を同定するには至らなかった。しかし、この領域においては多くのプロトカドヘリンが発現・分布することが明らかになった。特にプロトカドヘリン9については、その分布が特定の神経回路と相関があることがわかり、この成果については現在論文投稿中である。また、本研究で始めたプロトカドヘリンのノックアウトマウスの解析などは今後も引き続き行っていく予定であり、作製した抗体やマウスは今後の解析に役立つ重要な材料となることが期待される。

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1件)

Hirano S, Takeichi M. (2012) Cadherins in brain morphogenesis and wiring. *Physiol. Rev.* 92(2): 597-634 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- ① 増場亜弥、朝比奈大道、須藤文和、熊ノ郷淳、平野伸二、由利和也、神経回路形成におけるプレキシシンA1とセマフォリン6Dの役割、第33回分子生物学会年会、2010年12月8日、神戸
- ② 朝比奈大道、増場亜弥、竹市雅俊、平野伸二、由利和也、マウス脳におけるプロトカドヘリン9の分布、第33回分子生物学会年会、2010年12月8日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野伸二 (HIRANO SHINJI)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：80222248

(2)研究分担者

由利和也 (YURI KAZUNARI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：10220534

(3)研究協力者

竹市雅俊 (TAKEICHI MASATOSHI)
理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・グループディレクター

増場亜弥 (MASUBA AYA)
高知大学・総合人間自然科学研究科・大学院生
(H21→H22)

朝比奈大道 (ASAHINA HIROMICHI)
高知大学・総合人間自然科学研究科・大学院生
(H22→H23)