

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700356

研究課題名(和文) 移動終了後の大脳皮質ニューロンにおける分化・成熟過程の解明

研究課題名(英文) Regulation of differentiation/maturation of neocortical neurons after radial migration

研究代表者

大石 康二 (OISHI KOJI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：80420818

研究成果の概要(和文)：大脳皮質の前駆細胞は、性質の異なる6層のニューロンを産生するが、その分化決定は前駆細胞が最終分裂する際になされると考えられていた。しかしながら我々のグループは近年、大脳皮質第IV層への分化がより後期(ニューロンの移動終了後)にも制御され得るとの結果を得た。そこで本研究では、移動終了後の皮質第IV層のニューロンの分化決定機構の解明を目的とし、視床皮質投射線維が重要な役割を果たしているという知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Neural precursor cells in the neocortex give rise to distinct subtypes of six-layered neurons, which possess different characteristics. It has been thought that subtype specification of these neurons occurs when the precursor cells undergo final mitosis. However, our group recently found that subtype specification of layer IV neurons occurred at later stages, when the neurons already finished their radial migration. In this study, I tried to explore the mechanisms of subtype specification of layer IV neurons after neuronal migration and found that thalamocortical axons played an important role in this process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経発生学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳皮質、層構造、発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

我々の「脳」がその能力を発揮するためには、神経核や層構造といった機能的なニューロンの集団が形成されることが根本にある。進化上ヒトで最も発達した大脳皮質は、異なる性質を持つ6層の細胞層からなる見事な層構造を呈しており、脳の高次機能の発揮に必須であると考えられているが、その形成メカニズムについては未だ完全には解明されていない。

大脳皮質の各層のニューロンはそれぞれ

の層で異なった投射パターンや遺伝子発現を有する。この『層特異的な分化』はどのように決定されているのであろうか？大脳皮質を構成するニューロンは、脳室付近の脳室帯・脳室下帯で前駆細胞から誕生し、脳表面側の辺縁帯直下まで放射状に移動した後に皮質形成に参加する。これまでの研究では、層特異的な分化は前駆細胞が最終分裂する時期に決定されるとの考えが広く受け入れられていた。

## 2. 研究の目的

大脳皮質ニューロンは、脳室帯・脳室下帯で前駆細胞から誕生し、脳表面側の辺縁帯直下まで放射状に移動した後に皮質形成に参加するが、これまでの研究から、層特異的な分化は前駆細胞が最終分裂する時期に決定されるとの考えが広く受け入れられていた。しかしながら我々のグループは近年、この従来の考え方では説明できない、予想外の実験結果を **Protocadherin20 (Pcdh20)** の解析から得ている。すなわち、前駆細胞では発現のほとんど見られない **Pcdh20** を、RNA 干渉法を用いて抑制すると、ニューロンの移動は正常であるが、皮質第 IV 層への分化が起こらないことを見出した。この結果は、皮質第 IV 層への正常な分化決定は、前駆細胞の時期だけではなく、ニューロンが移動を終了した後も制御されることを強く示唆している。そこで本研究では、ニューロンの移動終了後、どのような機構によって皮質第 IV 層へ分化決定されるのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、将来皮質第 IV 層になるニューロンが移動を終了した際に起こる分化過程について、細胞外の環境変化に着目し、以下の点について検討を行った。

### (1) 皮質第 IV 層分化過程における視床皮質投射線維の必要性

将来の第 IV 層ニューロンが移動を終了する時期は、視床皮質投射ニューロンの軸索が皮質板内に侵入してくる時期と符合する。第 IV 層は視床皮質投射ニューロンの軸索が主に終末する部位である。従って、機能的にも密接な関係にある視床からの軸索によって、第 IV 層の分化が調節される可能性が考えられた。この仮説に基づき、視床皮質投射線維の減少した遺伝子改変マウスでの大脳皮質層形成を検討した。また、分子生物学的なアプローチから、この現象を担う分子基盤についても検討を行った。

### (2) 視床皮質投射線維による皮質第 IV 層の誘導

上記の遺伝子改変マウスを用いた解析では、視床皮質投射線維以外の影響を排除することが難しいと考えられた。そこで、未成熟な大脳皮質と視床（そこから生じる視床皮質投射線維）とを共培養し、皮質第 IV 層の形成について観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 皮質第 IV 層分化過程における視床皮質投射線維の必要性

皮質第 IV 層のニューロンは視床からの投射を受ける細胞集団であるため、視床皮質投射線維と皮質第 IV 層ニューロンの分化の関係について検討を行った。視床皮質投射線維の欠損・低形成が報告されている **OL-pc** 遺伝子欠損マウス、**Netrin1** 遺伝子欠損マウスの解析を行った。まず、視床皮質投射線維の減少を、この線維のマーカーである **NetrinG1** を用いて行った。その結果、この線維は **OL-pc** 遺伝子欠損マウスで非常に減少していることが確認された (図 1, A,B)。次に、皮質第 IV 層ニューロンのマーカー分子である

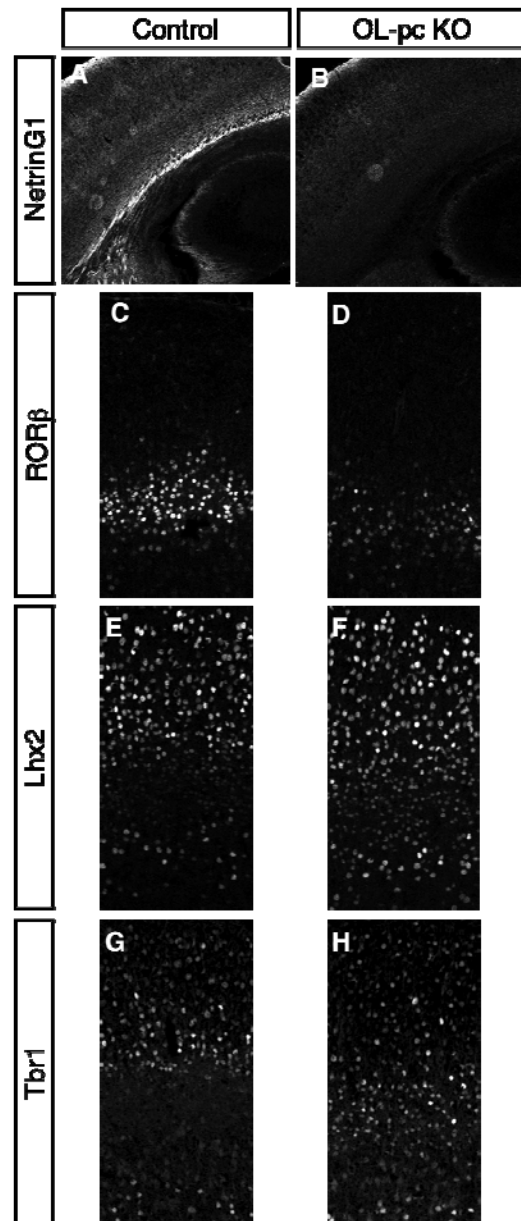


図 1 OL-pc 遺伝子欠損マウスの大脳皮質の解析  
各段に示した抗体を用いて野生型、OL-pc 遺伝子欠損マウスの大脳皮質に対して免疫組織化学染色を行った。

RORbeta の発現解析を行い、この分子の発現が低下するという知見を得た (図 1, C,D)。従って、視床皮質投射線維が皮質第 IV 層ニューロンの分化・成熟を制御する可能性が示唆された。次に、皮質第 II/III 層のマーカー分子についても検討を行った。第 II/III 層のマーカー (Lhx2, Tbr1) は逆に OL-pc 遺伝子欠損マウスで発現が上昇していることが見出された (図 1, E-H)。

以上の結果から、視床皮質投射線維は皮質第 IV 層ニューロンの分化・成熟を制御すること、またこのプロセスに異常があり、第 IV 層へ分化誘導されない場合、第 IV 層になるべき細胞が第 II/III 層の性質を持つようになることが示唆された。

次に、視床皮質投射線維による大脳皮質の分化制御に関与する分子の検討を行った。一般に公開されているデータベースを用いて、視床皮質投射線維にリガンド、大脳皮質にその受容体が発現する組み合わせについて調べた。その結果、いくつかの候補分子の組み合わせを見出すことができた。これらの分子がこの過程に関与する可能性が考えられた。

#### (2) 視床との共培養による皮質第 IV 層形成の再現

視床皮質投射線維による第 IV 層の分化誘導を直接に明らかにするため、*in vitro* の培養系を用いて検討を行った。視床と大脳皮質の共培養によって、視床から皮質への軸索の投射が再現されることが報告されており、この系を用いて検討を行った。その結果、視床と大脳皮質の共培養において、皮質第 IV 層のマーカー分子の発現変化は観察されなかった。大脳皮質の培養片に侵入する視床の軸索量を調べたところ、少数の軸索しか観察されなかった。従って、視床の軸索量の少なさに起因してその効果が見えなかった可能性が考えられ、培養条件の改善が必須であると考えられた。

本研究から、視床皮質投射線維が皮質第 IV 層の正常な分化に必須であることが示唆された。この結果は同時に皮質第 IV 層の分化決定はニューロンが移動を終了した後に起こるという仮説を支持している。本研究の知見は、大脳皮質のニューロンの多様性を生み出す仕組みの理解に、重要な示唆を与えるものと考えられる。

#### 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 2 件)

① Segregation and pathfinding of callosal axons through EphA3 signaling. Mitsuaki Nishikimi, Koji Oishi, Hidenori Tabata, Kenichi Torii, and Kazunori Nakajima. *J. Neurosci.*, 31(45), 16251-16260 (2011). 査読有

② Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. Koji Oishi, Kenji Watatani, Yasuhiro Itoh, Hideyuki Okano, Francois Guillemot, Kazunori Nakajima, and Yukiko Gotoh. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106 (31), 13064-13069 (2009). 査読有

[学会発表] (計 8 件)

① 大石康二、荒巻道彦、仲嶋一範“ニューロン移動後の大脳皮質層の分化・特異化機構の解析”第 42 回慶應ニューロサイエンス研究会、東京、2011 年 6 月 11 日

② 鳥居健一、大石康二、仲嶋一範“The function of chromatin remodeling factor BAF57 in callosal axon development”第 42 回慶應ニューロサイエンス研究会、東京、2011 年 6 月 11 日

③ 大石康二、刀川夏詩子、佐々木慎二、仲嶋一範“大脳皮質第 IV 層形成における Protocadherin20 の機能解析 (Specification of neocortical layer IV fate by Protocadherin20 through regulation of neuronal positioning)”第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・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

④ 鳥居健一、大石康二、仲嶋一範“脳梁交連軸索形成におけるクロマチンリモデリング因子の役割 (The function of chromatin remodeling factors in callosal axon development)”第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会、盛岡、2010 年 3 月 28-30 日

⑤ 大石康二、刀川夏詩子、佐々木慎二、仲嶋一範“Protocadherin20 is essential for positioning and laminar fate specification of neocortical layer IV neurons”第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 9-12 日

⑥ 錦見満暁、大石康二、田畑秀典、仲嶋一範 “Role of EphA3 in the Projection of Mediolaterally Arranged Callosal Neurons (脳梁交連線維系ニューロンの領域依存的

な走行の違いにおける EphA3 の役割) ”  
(poster) 第 39 回慶應ニューロサイエンス  
研究会、東京、2009 年 10 月 31 日

⑦ Koji Oishi, Kashiko Tachikawa, Shinji  
Sasaki, Kazunori Nakajima “Regulation of  
cortical laminar formation by cadherin  
family proteins” Society for Neuroscience,  
Neuroscience 2009 Meeting (39th Annual  
Meeting), Chicago, U.S.A., 2009.10.17-21

⑧ Koji Oishi, Kashiko Tachikawa, Shinji  
Sasaki, and Kazunori  
Nakajima “Regulation of positioning and  
laminar fate specification of layer IV  
neurons by Protocadherin20” International  
Symposium “Construction and  
Reconstruction of the Brain”, Awaji, 2009  
年 10 月 8-10 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大石 康二 (OISHI KOJI)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号：80420818

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし