

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成21年度～平成22年度

課題番号：21770230

研究課題名（和文）

大脳新皮質発生におけるニューロン分化と移動開始を結ぶメカニズムの解析

研究課題名（英文）

Regulation of the onset of neuronal migration in the developing mouse neocortex

研究代表者

伊藤 靖浩（ITOHI YASUHIRO）

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：50508108

研究成果の概要（和文）：発生期の哺乳類大脳新皮質において、未分化な神経系前駆細胞は脳室帯と呼ばれる脳の内側の領域で増殖し、やがてニューロンに分化すると脳の表層へ向かって移動する。正常なニューロン移動が大脳新皮質の正確な神経回路形成に必須の過程であることは良く知られている。一方、神経系前駆細胞がニューロンに分化すると必ず移動を開始するが、これまでニューロンの分化と移動の“開始”を結ぶメカニズムは全くわかっていなかった。本研究ではその制御メカニズムの一端を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要（英文）：During the neocortical development, neural precursor cells are located in the ventricular zone by attaching their apical process to the ventricular surface through cadherin-based adherens junctions and form a pseudostratified epithelial structure. Once these cells commit to become neurons or intermediate neuronal progenitors, they delaminate and start migration toward the pial surface. However, it has remained unclear how the detachment from the neuroepithelium, the first step of radial migration, is coordinated with neuronal fate commitment. This study revealed a mechanism that links these two processes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,800,000	540,000	2,340,000
22年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞分化

1. 研究開始当初の背景

発生期の哺乳類大脳新皮質において、未分化な神経系前駆細胞は脳室帯と呼ばれる脳の内側の領域で増殖し、やがてニューロンに分化すると脳の表層へ向かって移動する（図1、ニューロン移動）。正常なニューロン移動

が大脳新皮質の正確な神経回路形成に必須の過程であることは良く知られている。一方、神経系前駆細胞がニューロンに分化すると必ず移動を開始するが、これまでニューロンの分化と移動の“開始”を結ぶメカニズムは全くわかっていなかった。

神経系前駆細胞は神経上皮細胞とも呼ばれ、apical側では脳室面と、basal側では脳表層と細胞体が接し、カラム状の伸びた形態をしている。特に脳室面において、神経系前駆細胞は上皮細胞に特徴的な接着構造 (Adherens Junction; AJ) を有している。ニューロンに分化した細胞は脳室面との接着が外れることにより上皮構造より離脱し、脳表層へと移動を開始する。このニューロン移動の開始はいわゆる「上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition; EMT)」による細胞形態・運動能の劇的な変化と類似しており、申請者はニューロン移動の開始を EMT と捉えられるのではないかと考えた。EMT とは、原腸陥入や神経冠発生など個体発生の多種多様な場面において、互いに接着が強固な上皮細胞がその細胞層から離脱して浸潤性や運動能が高い間葉系細胞へと転換する現象のことである。上皮ガンの悪性化においても EMT が関与することが知られている。しかしながら、ニューロン移動の開始と EMT の関わりはこれまで知られていない。EMT は様々な分泌因子や細胞内分子によって制御されているが、その中でも特に Snail family に属する転写因子 Snail あるいは Slug が細胞間接着を弱めることにより中心的な役割を果たすことが知られている。しかしながら、Snail family 分子の中樞神経発生における機能は全く知られていなかった。

2. 研究の目的

ニューロン移動の開始を制御する分子はニューロン分化に伴って発現が上昇することが考えられる。そこで、ニューロン分化に伴い発現が変化する分子を調べ、その中で申請者は Snail family に属する Scratch1 が分化に伴い発現誘導されることを見出していた。更に、Scratch1 がニューロンの移動開始に必須の役割を果たすことを示唆する結果を以前の研究で得ていた。そこで本研究において、(1)ニューロン分化運命決定の下流で Scratch1 が誘導されるメカニズムならびに (2)Scratch1 が移動開始を誘導するメカニズムについて検討することによって、ニューロン分化と移動開始を結ぶメカニズムを明らかにすることを目的とした。これらの研究を通してニューロン移動の開始という現象が EMT の一つとして捉えられるという仮説を検証した。

3. 研究の方法

(1) 申請者はこれまでに、in vitro 初代培養系において未分化維持に働く bFGF2 を除去

することによりニューロン分化を誘導すると Scratch1 の転写が上昇すること、in situ hybridization あるいは大脳新皮質組織染色により分化直後のニューロンが Scratch1 を発現することを見出していた。しかしながら、ニューロンへの運命決定の下流で Scratch1 の発現が誘導されるメカニズムの詳細は不明であった。大脳新皮質でのニューロン分化誘導に必須の役割を果たす分子としてプロニューラル転写因子 Neurogenin (Ngn) 1/2 が良く知られている。そこで、Ngn1/2 が Scratch1 の転写を制御するかを調べることにより、ニューロン分化と Scratch1 発現誘導を繋ぐメカニズムを検討した。

(2) 申請者は以前に、胎児脳への子宮内遺伝子導入実験により Scratch1 を過剰発現すると神経上皮細胞の移動開始が促進され、Scratch1 をノックダウンすると移動開始が阻害されることを見出していた。しかし Scratch1 がどのようなメカニズムで移動開始を制御するのかは未解明であった。

Snail あるいは Slug は様々な分子の発現を正または負に制御することにより EMT を引き起こす。中でも AJ の重要な構成因子である膜貫通型タンパク質 E-cadherin の転写抑制が Snail あるいは Slug による EMT 誘導に重要であることが広く知られている。Snail あるいは Slug は E-cadherin の転写を直接抑制することにより上皮細胞間の細胞接着を弱め、脱上皮化を促す。

一方、発生期の脳新皮質において、未分化な神経系前駆細胞が E-cadherin を脳室面に限局して発現していることが知られていた。即ち、神経系前駆細胞は E-cadherin を介した細胞間接着により脳室面での接着を維持し、ニューロン分化に伴い発現した Scratch1 が E-cadherin の発現を抑制することにより移動開始を誘導する可能性が考えられた。そこで、ニューロン移動の開始を E-cadherin が制御しているか、そして、Scratch1 によるニューロン移動開始の制御における E-cadherin の役割について検討した。

4. 研究成果

(1) Scratch1 の発現制御に関して

Scratch1 がニューロン分化に伴ってプロニューラル転写因子 Ngn1、Ngn2 の下流で発現するかを検討するため、in vitro 初代培養系において未分化維持に働く bFGF2 存在下で Ngn1 あるいは Ngn2 を過剰発現し、Scratch1 の発現を調べた。コントロール細胞ではニューロンマーカーの発現レベルが低く未分化状態が維持されているのに対し、Ngn1 あるいは Ngn2 を発現するとニューロンマーカーの

発現が大きく増加していた。この条件において、Ngn1 あるいは Ngn2 の過剰発現により Scratch1 の発現が大きく増加していた。従って、Scratch1 は Ngn1、Ngn2 の下流で発現が誘導されることが明らかになった。

(2) Scratch1 のターゲットに関して

Scratch1 がどのような遺伝子の発現を変化させることによりニューロン移動の開始を制御しているのか、あるいは Scratch1 によるニューロン移動を EMT として定義できるかは不明である。

Snail family に属する Snail あるいは Slug が EMT を誘導する際の重要なターゲットとして E-cadherin が良く知られている。そこで、Scratch1 が E-cadherin の発現を制御するかを検討した。in vitro 初代培養系において Scratch1 を過剰発現し、ウェスタンブロッティング、定量 PCR を行なったところ、E-cadherin mRNA またはタンパク質の発現が減少していた。一方、Scratch1 をノックダウンすると E-cadherin mRNA あるいはタンパク質の発現が増加しており、内在の Scratch1 が E-cadherin の発現抑制に必要であることが示唆された。また、Luciferase 遺伝子の upstream に E-cadherin 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだコンストラクトを用いてプロモーターアッセイを行ない、Scratch1 による E-cadherin の転写制御が直接であることを見出した。従って、Scratch1 は E-cadherin の転写を直接抑制していることが示唆された。

発生期大脳新皮質における E-cadherin タンパク質の発現を組織染色により検討したところ、E-cadherin は脳室面に限局して発現していた。従って、E-cadherin は未分化な神経系前駆細胞を脳深部に繋ぎ留めている可能性が考えられる。そこで、子宮内で大脳新皮質の神経系前駆細胞に E-cadherin を過剰発現あるいはノックダウンし、ニューロン移動の開始に与える影響を検討した。すると、E-cadherin の発現が低下することにより、細胞が脳室面から離脱して脳の外側に向かって移動することが明らかになった。

そこで、E-cadherin が Scratch1 の下流でニューロン移動の開始を制御しているかについて検討した。子宮内エレクトロポレーション法により Scratch1 の過剰発現はニューロン移動の開始を促進することを見出しているが、E-cadherin が Scratch1 の重要なターゲットであれば Scratch1 とともに E-cadherin を過剰発現することによりニューロン移動の開始が抑制されることが予想される。そこで、子宮内において Scratch1 と E-cadherin を同時に過剰発現した。すると、

ニューロン移動の開始は有意に抑制されていた。従って、Scratch1 は E-cadherin の発現抑制を介してニューロン移動の開始を誘導することが示唆された。

本研究で明らかになった Scratch1 によるニューロン移動の開始誘導メカニズムは、様々な系において Snail/slug が EMT を誘導する際に用いるメカニズムと非常に類似している。更に、Scratch1 は Snail superfamily に属す分子である。従って、Scratch1 によるニューロン移動開始の制御を EMT の 1 つとして捉えることができる、という新しい概念を本研究から提唱できると考えている。

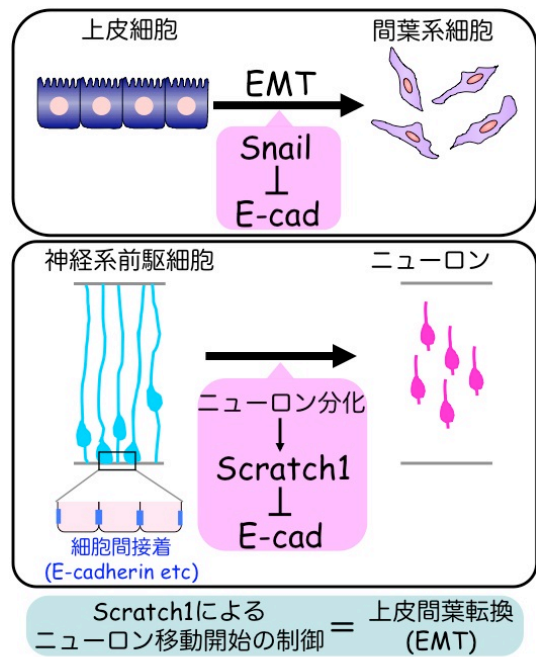


図: Scratch1によるニューロン移動開始の制御

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)

- ① 大石康二, 綿谷健治, 伊藤靖浩, 岡野栄之, Francois Guillemot, 仲嶋一範, 後藤由季子

Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. PNAS (査読有り) 2009, 106, 13064-9

[学会発表] (計2件)

- ① 伊藤靖浩, 後藤由季子: 発生期マウス大脳皮質におけるリン酸化ペプチドの解析、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 ランチョンセミナ
ー、平成22年12月8日、神戸国際会議場
(神戸市)

② 伊藤靖造、後藤由季子：Regulation of
the onset of neuronal migration during
mouse neocortical development、第32回
日本分子生物学会年会 ワークショップ・ポ
スターセッション、平成21年12月12日
、パシフィコ横浜 (横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 靖造 (ITOHI YASUHIRO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：50508108