

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 1 日現在

機関番号: 24303

研究種目: 基盤研究 (B)

研究期間: 2010~2012

課題番号: 22390214

研究課題名 (和文)

shRNA導入によるL1, TAG-1蛋白発現制御に基づく胎児性水頭症発症機序解明

研究課題名 (英文)

Analyses on the pathogenesis of L1-associated hydrocephalus by knocking down L1 and TAG-1

研究代表者

伊東 恭子 (ITO KYOKO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 80243301

研究成果の概要 (和文):

大脳皮質形成過程の神経細胞移動における L1cam (以下 L1 と呼ぶ) の機能を明らかにする目的で、胎生 13 日のマウス胎仔終脳脳室層に、子宮内電気穿孔法を用いて、RNA 干渉法による L1 ノックダウン(L1-KD)を惹起した。L1-KD 細胞は、放射状神経細胞移動の遅延、皮質板に侵入するリーディングプロセスの角度に大きなばらつきを示した。さらに、大脳皮質層マーカーの転写因子 Satb2、Ctip2、Tbr1 の発現異常がみられた。今後、L1-KD 細胞における神経細胞移動異常の分子メカニズムを解明する予定である。

研究成果の概要 (英文):

L1 is a cell adhesion molecule associated with a spectrum of human neurological diseases, however; the function of L1 in neuronal migration during cortical histogenesis remains to be clarified. We therefore investigated the corticogenesis of mice embryos where L1 molecules were knocked down (L1-KD) in selected neurons, employing in utero electroporation with shRNAs targeting L1 (L1-shRNA). The radial migration of L1-KD neurons was significantly delayed and the directions of the leading process of L1-KD neurons became more dispersed, compared with the control neurons. In addition, two transcription factors expressed in the neurons, Satb2 and Tbr1, were shown to be reduced or aberrantly expressed in L1-KD neurons. These observations suggest that L1 plays an important role in regulating the locomotion and orientation of migrating neurons and the expression of transcription factors during neocortical development.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2011 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2013 年度	0	0	0
2014 年度	0	0	0
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード: 先天異常学・胎児性水頭症・L1CAM

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経細胞接着分子 L1CAM(以後 L1)はイ

ムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型蛋白で、神経発生において重要な

役割を担っている。L1 遺伝子変異による先天性水頭症の発生メカニズムは不明である。

(2) L1 細胞外領域の 6 番目のイムノグロブリンドメインは、L1 同士のホモフィリック結合および GPI 結合型接着分子 (Axonin1/TAG-1) とのヘテロフィリック結合に必須な領域である。我々は、6 番目のイムノグロブリンドメインのみを欠損する L1 ノックインマウス (L1-6D) を作製し、このドメインが水頭症の発症病因として重要であることを示した。(J Cell Biol :2004, Mol Cell Neurosci:2005)。

(3) 平成 15 年度～16 年度の基盤研究 C(2) で、L1-6D マウスを用いて、胎生早期における中枢神経形成過程を詳細に検索することを企図したが、世代継代とともに胎生致死となったため、水頭症発生メカニズム解明に至らなかった。

(4) 神経細胞接着分子 TAG-1 は発生期の中中枢神経系では早期から間脳に発現し、皮質視床路の形成においては L1 発現軸索と相補的に投射することが知られている。

(5) 本研究では、水頭症発症のメカニズムを追求するために、胎生中期の胎仔脳室層神経前駆細胞に対し、RNA 干渉法を用いて、L1 および L1 の 6 番目のイムノグロブリンドメインのリガンドとして重要な TAG-1 のダブルノックダウンを惹起することで、表現型を増幅するという着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、マウス胎仔脳に子宮内電気穿孔法により、L1 およびそのリガンドの一つである TAG-1 に対する shRNA の共導入を行い、L1、TAG-1 のダブルノックダウンを惹起する。

(2) ダブルノックダウン神経細胞の移動と定着、軸索や樹状突起の発達、皮質視床路に注目した神経回路の形成過程、L1、TAG-1 関連遺伝子発現を解析する。

(3) *in vivo* での L1 ノックダウンの短期効果ならびに長期効果を TAG-1 とのダブルノックダウンにより増強することで、L1 遺伝子異常に伴う水頭症発症メカニズムを解明することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) GFP-L1-shRNA 設計と抑制効果判定

L1 を標的とした MGFP 発現 shRNA プラスミド : L1-shRNA (pGeneClim™hMGFP Vector、Promega) を設計した。胎齢 13 日 (E13) の胎仔終脳から分散培養した皮質神経細胞に電気穿孔法 (Amaxa Nucleofector) によりプラスミドを導入後、RNA を回収し、定量 RT-PCR による L1 遺伝子発現の低下を確認した。また導入細胞をラミニンもしくは抗-Fc 抗体+L1-Fc でコーティングした 24 ウェルプレートにて培養し、導入後 48 時間または 96 時間で共焦点顕微鏡にて MGFP を発現している神経細胞の突起形態を観察し、L1 ノックダウン(L1-KD)効果の表現型を確認した。

(2) マウス胎仔脳への GFP-L1-shRNA 導入と神経細胞移動解析

E13 のマウス胎仔(C57BL/6 系統)の側脳室脳室層に子宮内電気穿孔法を用いて L1 を標的とした shRNA プラスミド(以後、shRNA2 と呼ぶ)、スクランブル配列を組み込んだ MGFP 発現 shRNA プラスミド(以後、shNC と呼ぶ) および MGFP のみのプラスミド(以後、MGFP only と呼ぶ) を経子宮的電気穿孔法により導入した(図 1A,B)。E13 にプラスミド導入後、3 日後 (E16) もしくは 4 日後 (E17) に胎仔脳を摘出(図 1C)、凍結切片を作製し Doublecortin を一次抗体とした免疫染色を施行後、共焦点顕微鏡下で観察した(図 1D,E)。背側終脳壁を 6 層に分割し、MGFP を発現する導入細胞を計測し、各層に存在する細胞の割合を 3 群間で比較検討した(図 4D)。遊走細胞のリーディングプロセスの方向は、脳表面接線方向に対する角度として測定し統計学的解析を行った(ImageJ, 図 5A,B)。

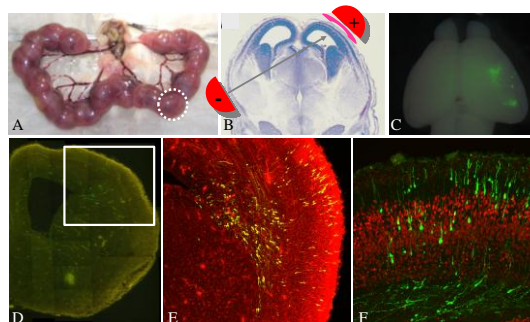


図 1. マウス胎仔脳への GFP-L1-shRNA 導入

(3) 大脳皮質層マーカーの転写因子発現解析

L1-KD により神経細胞の分化過程がどのような影響を受けるかを調べるために、(2)と同様に MGFP only または shRNA2 を導入した胎仔脳切片を用いて、大脳皮質層構造マーカー

一である転写因子の発現パターンを解析した。1次抗体として、Satb2やCtip2、Tbr1を用いて免疫染色を施行し形態学的に評価した。

(4) タイムラプスによる経時的神経細胞移動解析

(2)の要領で胎仔脳にプラスミド導入1-2日後(E14-15)に胎仔を摘出、胎仔終脳壁前1/3から、脳脊髄膜をつけた状態で組織切片(200 μ m厚)を作成し、コラーゲンゲルに包埋して組織培養を開始した。共焦点レーザー顕微鏡に設置したCO₂細胞培養チャンバーに移し、タイムラプスで、L1-KD細胞の移動、突起伸長を24時間~48時間観察した。

4. 研究成果

(1) shRNAによるL1-KD効果

pGeneClipTM hMGFP vectorにL1を標的としたshRNAを組み込んだものを4種類、hMGFP-labeled mock plasmid (MGFP only plasmid)とネガティブコントロールshRNA (shNC)を作製した。shRNA2が4つのプラスミドのうちで*in vitro*におけるL1-KDがもっとも高効率であったため、本研究ではshRNA2を用いた(図2)。

shRNA2:

tctcgAGCCTTACCAGAAGGGAAAGTcttcctgcaACTTCCCTTCTGGTAAGGCTct

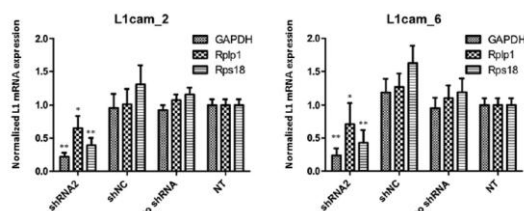


図2. shRNA2のL1cam発現抑制

(2) shRNAによる初代培養皮質神経細胞の機能低下

プラスミドを導入後48時間で、神経細胞の最長の神経突起の長さに関して、80 μ m未満のもの、80 μ mから220 μ m未満のもの、220 μ m以上のものをそれぞれタイプ1、タイプ2、タイプ3のサブタイプに分類した(図3A)。ラミニン基質上で培養すると、shRNA2、shNC、MGFP onlyの各プラスミドを導入した細胞において、タイプ1、タイプ2、タイプ3の割合に有意な差異はみられなかった。一方、L1-Fc基質上で培養した場合、shRNA2

をトランスフェクションした神経細胞では、MGFP onlyに比較し、タイプ1の有意な増加、タイプ3の有意な減少を認めた。さらに、shRNA2導入細胞において、ラミニン上で培養したそれと比べてタイプ1の割合が有意に増加していた(図3B)。これは、shRNA2によるL1-KDによって、L1-L1のホモフィリックな結合が障害されていることを示唆する。

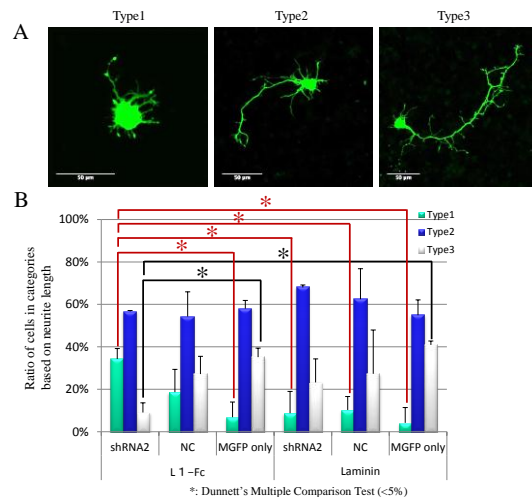


図3. shRNA2導入神経細胞の形態観察

(3) L1-KDによる皮質神経細胞放射状遊走の障害

MGFP onlyプラスミドを導入した神経細胞は、E16では中間層で皮質板に向けて垂直に伸長した束状のリーディングプロセスを有し、E17ではおよそ70%が皮質板に達していた。一方、shRNA2導入神経細胞(L1-KD細胞)では、E16の中間層ではリーディングプロセスは短く方向は多彩で、E17では多極性の神経細胞が中間層に残存し小集団を形成していた。形態計測を行ったところ、E16において、MGFP onlyプラスミド導入細胞の51%が皮質板に到達していたが、L1-KD細胞では27%しか皮質板に到達していなかった(図4A)。さらに、MGFPプラスミド導入細胞の25%は上部皮質板に到達していたが、L1-KD細胞ではわずか5%しか上部皮質板に到達していなかった(図4B)。E17では、MGFP onlyプラスミド導入細胞の22%が中間層に存在したが、L1-KD細胞では34%が中間層にとどまっていた(図4C)。これらから、shRNAによるL1-KDが皮質神経細胞の遊走速度を遅延させることが示唆された。

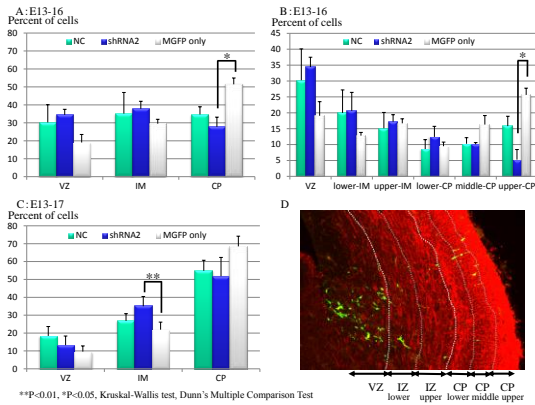


図 4. shRNA2 導入細胞の分布解析

(4) L1-KD による皮質神経細胞リーディングプロセス伸長の攪乱

shRNA2 導入神経細胞(L1-KD 細胞)では放射状遊走の際のリーディングプロセスの方向に高度なばらつきがみられた。そこで、リーディングプロセスの方向を辺縁層の接線に対する角度として計測したところ、L1-KD 細胞では、MGFP only プラスミド導入細胞に比し、統計学的に有意なばらつきを示した(図 5C)。このことから L1-KD により、皮質神経細胞の放射状移動を決定するリーディングプロセスの形成方向が攪乱されることが示唆された。

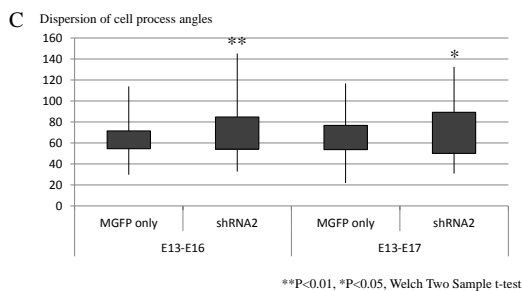
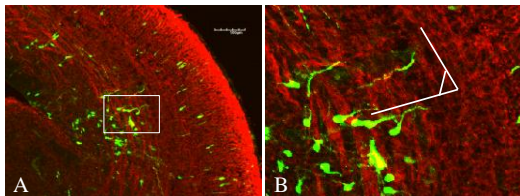


図 5. リーディングプロセスの方向の解析

(5) 皮質層構造マーカーである転写因子発現の変動

Satb2 は皮質表層に強く中間層に弱発現、Ctip2 は皮質深層に、Tbr1 は皮質深層からサブプレートに発現する転写因子である。E16.5 において、MGFP only プラスミド導入細胞では皮質表層近傍まで遊走した神経細胞に Satb2 の発現がみられたが、Ctip2、Tbr1

の発現はみられなかった。しかし、shRNA2 導入細胞(L1-KD 細胞)では、サブプレートで Satb2 の発現が高頻度に見られるとともに、皮質深層において Ctip2 の発現が一部の細胞で見られた。また、Tbr1 発現は、皮質板深層でごく一部の細胞にみられるのみならず、中間層深層で異所性に発現していた(図 6)。このことは、L1-KD によって細胞遊走遅延が引き起こされたのみならず、皮質神経細胞の分化の方向までを変えた可能性を示唆する。

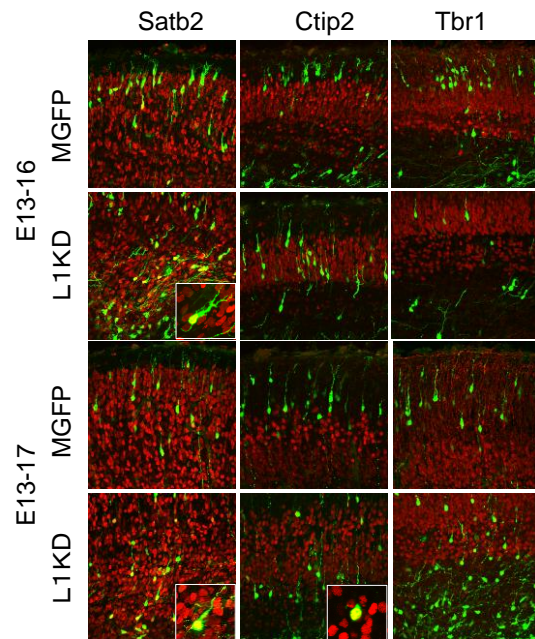


図 6. L1-KD による 転写因子の発現かく乱

(6) タイムラプスによる経時的神経細胞移動解析

L1-KD 細胞では、中間層での神経細胞移動速度の有意な低下、サブプレートから皮質板への細胞侵入の遅延を示すとともに、皮質板での terminal translocation に異常がみられた。off-target 効果を除外するために、今後、複数の L1 を標的とした shRNA を用いて確認を行う予定である。

(7) 今後の展望

本研究は、胎生期の一時期に、将来の大脳皮質を形成する神経細胞において特異的に L1 をノックダウンする手法を用いて、皮質形成過程における L1 の新たな機能を提示することができた。しかし、当初の計画が遅延し、L1、TAG-1 のダブルノックダウンによる機能解析に至らなかった。今後も当該研究を続行し、L1-KD による神経細胞移動障害の分子メカニズムを解析し、L1cam が大脳皮質形成過程において果たす役割を解明する。

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)

1. Kishimoto T, Itoh K, Umekage M, Tonosaki M, Yaoi T, Fukui K, Fushiki S. Downregulation of L1 perturbs neuronal migration and alters the expression of transcription factors in murine neocortex. J. Neurosci. Res. 査読有. 91, 201, 42-50. DOI: 10.1002/jnr.23141

[学会発表] (計 3 件)

1. 伊東恭子. 胎児水頭症の分子病理学的検討-L1cam の機能分析-

第 9 回小児病理セミナー「発育期神経疾患の臨床と病理」(招待講演).

2012.9.8. 大阪市

2. 岸本智数、伊東恭子、伏木信次 他

マウス大脳皮質における L1 ノックダウンは神経細胞遊走と転写因子の発現を攪乱する.

第 55 回日本小児神経学会総会.2013.5.30-6.1, 大分市

3. 伊東恭子. 脳形成障害の発生病理解明-遺伝要因と環境要因に着目して.

第 59 回日本病理学会秋期特別総会 A 演説. 2013.11.21-22. 甲府市

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊東 恭子 (ITO KYOKO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80243301

(2)研究分担者

伏木 信次 (FUSHIKI SHINJI)

京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：80150572

矢追 毅 (YAOI TAKESHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：40311914