

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590218

研究課題名(和文) リーリンシグナルと神経栄養因子が関与する疑核ニューロンの腹方移動制御機構の解析

研究課題名(英文) Studies on controlling ventral migration of nucleus ambiguus motoneurons associated with Reelin-signaling and neurotrophic factors

研究代表者

薛 富義 (Setsu, Tomiyoshi)

神戸大学・大学院医学研究科・技術専門員

研究者番号：30403231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳幹の鰓弓運動ニューロンの腹方移動に関与するリーリンシグナル系の機能を明らかにするため、リーラーマウスおよびDab1変異ヨタリマウスの顔面神経核と疑核ニューロンの分布を比較した。その結果、両変異マウスで同じ表現型を示すと思われた顔面神経核ニューロンの移動は、ヨタリマウスでより顕著に障害されていることが判明した。一方、疑核ニューロンは両者とも延髄背側で異所性に分布しており、同じ表現型を示したことから、疑核ニューロンはリーリン依存性に移動するが、顔面神経核ニューロンの移動はリーリンシグナル伝達系の他、Dab1を介する別のシグナル経路によって時期特異的に調節・修飾を受けている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the functional role of the Reelin-signaling pathway on the ventral migration of branchiogenic motoneurons, we compared the distribution of facial and ambiguus motoneurons between reeler and Dab1-deficient yotari mice using ChAT-immunohistochemistry and retrograde labeling technique. The migration of the facial nucleus neurons is affected severely in yotari but slightly in reeler, whereas the ambiguus nucleus is equally affected in these two mutants. The present study suggests that ventral migration of the nucleus ambiguus motoneurons is Reelin-dependent, whereas the migration of facial motoneurons is time controlled by some other signaling components (e.g. some neurotrophic factors expressed by migrating motoneurons) through dab1 during development. In conclusion, Reelin and Dab1 play some different roles during migration and/or post-migration rearrangements of facial and ambiguus motoneurons.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含解剖学・発生学)

キーワード：リーリン Dab1 顔面神経核 疑核 マウス 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

リーリンは皮質ニューロンの位置決めに重要な役割を果たす細胞外分泌性タンパクである。リーラーマウスや *Shaking rat Kawasaki (SRK)* など、リーリン変異動物ではカハル・レチウス細胞が分泌するリーリンがないために、大脳皮質のインサイド-アウト構造が破綻する。一方、層構造を持たない脳幹の鰓弓性脳神経核、特に発生過程で長い距離を移動する顔面神経核ニューロンは、胎生期のロンボマ (r) 4で生まれ、発生が進むにつれて r6 まで後方 (尾側) 移動した後、細胞体が突起を伸ばし、この突起に沿って軟膜側に向け腹方に移動する【図1】。

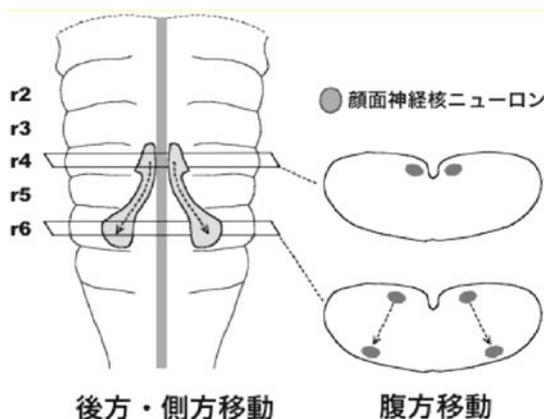


図1 顔面神経核ニューロンの移動様式

また、疑核ニューロンは r7 で生まれ、後方移動せず腹方に長い距離を移動するが、リーリン変異動物におけるこれらニューロンの移動や位置決定はどうなっているだろうか？ われわれはリーリン変異動物の鰓弓性脳神経核に注目し、これまで主に古典的なHRP法によりその細胞構築異常を明らかとしてきた。また、*Dab1*変異動物における鰓弓性運動ニューロンの移動障害について言及した報告はあるが、亜核等を構成する一定の細胞集団ごとの細胞分布様式はどうなっているだろうか？ これまで不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究では、(1)リーリンおよび*Dab1*を変異するリーラーおよびヨタリマウスの顔面神経核および疑核ニューロンの分布パターンについて、鰓弓性運動ニューロンマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 免疫組織化学法、および高感度逆行性トレーサであるコレラトキシン・サブユニットB (CTB) を用いた逆行性標識法により調べた後、これらニューロンの腹方移動制御機構の相違点を検索するため、(2)胎生期におけるニューロン移動様式を一般染色法およびBrdUパルスラベリング法等により時系列的に追跡し、さらに、(3)これらニューロンとその近傍におけるリーリンシグナル分子 (リーリン/*Dab-1*) の発現や、皮質ニューロンの移動に影響を与える神経栄養因子の発現様式を調べる。以上により、これら鰓弓

性脳神経核ニューロンの腹方移動機構を包括的に解析することを目的とする。

3. 研究の方法

リーラー、またはヨタリマウスのヘテロ動物同士を型通り交配し、得られたホモおよび正常マウスを用いた。ホモ個体は生後2週齢において振戦や小脳性運動失調を示すことで判別可能となるが、離乳に伴って次第に致死となるため、生後18-20日齢の個体を実験に用いた。また、胎生期の解析には、交配翌日の膣栓確認日をE0.5日齢として、E12.5からE15.5までの胎仔を用いた。本研究に関わるすべての実験は神戸大学動物実験実施規則に基づいて実施した。

(1) 顔面神経核と疑核ニューロンのChAT免疫染色および逆行性標識 生後20日齢の動物を4% PFAで灌流固定し、作成した40 μm厚の脳幹浮遊切片に対し、抗ChATウサギポリクローナル抗体 (都神経研 故市川博士恵与) を用い、ABC-DAB法によりChAT免疫陽性細胞を検出した。また、逆行性標識には1% CTB (LBL社) を顔面筋 (鼻唇筋・オトガイ筋・後耳介筋・顎二腹筋後腹) および横隔膜直下の食道腹部の筋層に1 μl注入し、24-48時間の生存期間後に4% PFAで灌流固定し、作成した40 μmの浮遊切片に対し、抗CTB抗体 (LBL社) を用いた免疫組織化学法 (ABC-DAB法) により検出した。

(2) 胎生期顔面神経核と疑核ニューロン移動の時系列解析 E12.5から15.5の妊娠動物にBrdU (100 mg/kg) を腹腔投与し、2時間後の胎仔を浸漬固定後、パラフィン切片を作成し、抗BrdU抗体による免疫染色を行った。また、隣接切片に対してHE染色を行い、胎生日齢毎に神経細胞集団を追跡した。

(3) 顔面神経核と疑核ニューロンにおけるリーリンシグナルの発現分布解析 リーリン/*Dab1* mRNAに対する *in situ* ハイブリダイゼーションおよび隣接切片シリーズに対して、抗リーリン抗体 (G10) に対する免疫染色を行った。また、腹部食道にCTBを注入し、逆行性に疑核ニューロンのcompact formation (AmC) を標識するとともに、G10との蛍光二重免疫組織化学を行った。

4. 研究成果

(1) 顔面神経核と疑核ニューロンのChAT免疫陽性細胞およびCTBにより逆行性標識されたニューロンの分布 リーラーマウスのChAT陽性顔面神経核は、正常マウスに比べやや広範に分布しており、亜核の境界も不明瞭であった。また、顔面神経核近傍では少数の異所性ニューロンも認められた。一方、ヨタリマウスでは、神経核全体が背側に偏位するのに加え、尾側断面では移動経路に沿った陽性ニューロンが背腹方向に長く分布しており、顔面神経

膝近傍にとどまる異所性ニューロンはリーラーより著者に多かった【図2】. また, CTBにより逆行性標識された鼻唇筋を支配する外側垂核のニューロンはリーラーと異なり, 移動経路に沿って背方により広く分布していた【図3】. さらに, 後耳介筋を支配する内側垂核ニューロンは顔面神経膝の近傍にとどまる異所性細胞集団がヨタリでより多く認められた. また, これら異所性ニューロン数は吻側より尾側でより顕著であった. 逆行性標識した顔面神経核の各亜核ニューロンの分布をまとめた【図4】.

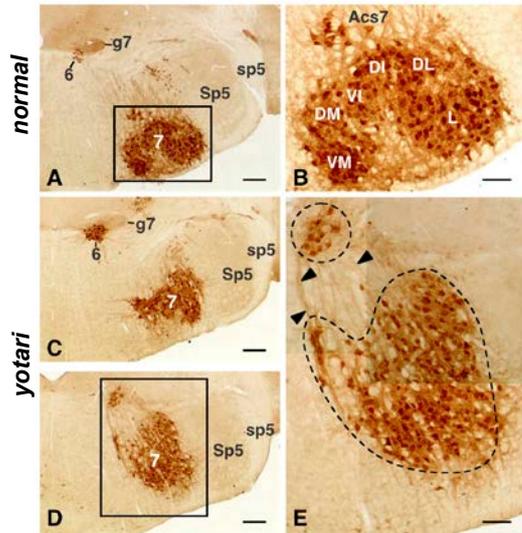


図2 Dab1変異ヨタリマウスにおけるChAT陽性顔面神経核ニューロンの分布

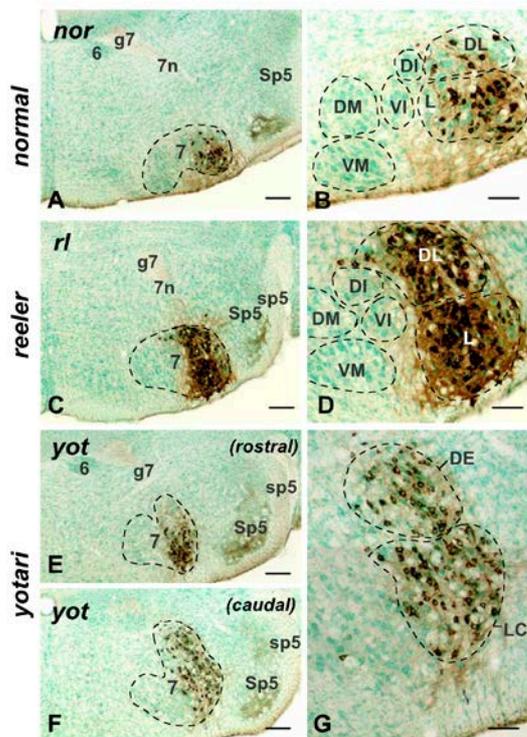


図3 鼻唇筋にCTBを注入し逆行性標識された顔面神経核外側亜核ニューロン

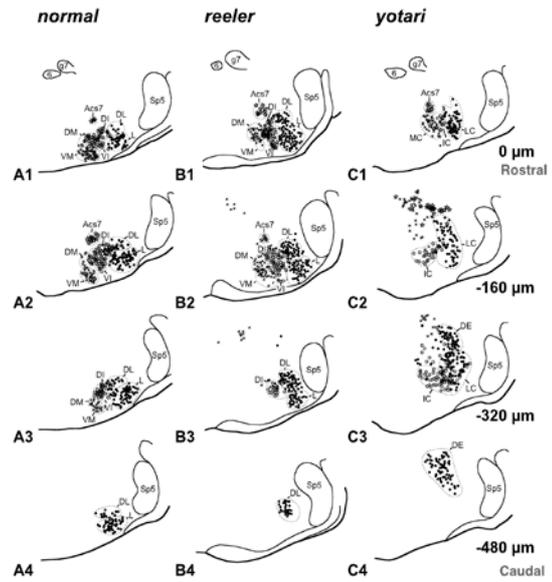


図4 CTBにより逆行性標識された顔面神経核の各亜核と顔面筋との対応関係

一方, 食道腹部を支配する疑核のコンパクトフォーメーション (AmC) のニューロンは, リーラーおよびヨタリマウスともにごく一部のニューロンが延髄腹側の正常位置に分布していたが, 孤束の近傍で異所性に連鎖状に分布する陽性細胞が数多く見られ, 両ミュータント間で明らかな違いはなく, 同じ表現型を示した【図5】.

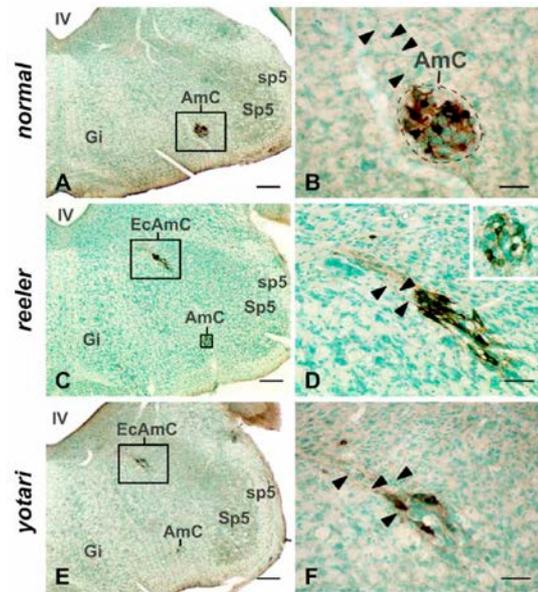


図5 食道筋層にCTBを注入し逆行性標識された疑核コンパクトフォーメーション (AmC)

(2) 胎生期顔面神経核と疑核ニューロンの時系列解析 顔面神経核ではDab1変異ヨタリマウスにおいてより顕著な移動障害を示したため, 胎生期顔面神経核ニューロンの移動様式を追跡した. その結果, 正常マウスの顔面神経核は, 吻側レベルではE13.5で, 尾側レベルではE15.5までにはすべて移動を終えて,

軟膜側の辺縁部で定住していた。一方、ヨタリマウスでは、吻側レベルの細胞はE15.5に至るまで軟膜側へ移動して神経核を形成するものの、辺縁部まで移動できず背方に偏位していた。特に外側部のニューロンは背腹方向に広範に分布しており、軟膜側まで移動できなかった細胞集団がいずれの断面でも認められ、尾側レベルほど脳室側に分布しており、生後の表現型と一致した。また、顔面神経核が本来定住すべき軟膜側の領域に、正常では見られない、細胞成分に極めて乏しい領域があり、それを乗り越えてより腹方に移動できないことが示された【図6】。

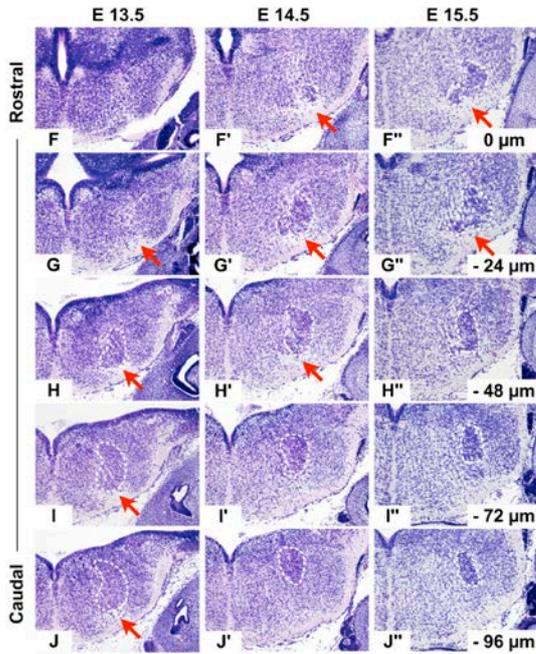


図6 Dab1変異ヨタリマウス顔面神経核の腹方移動様式

(3) 顔面神経核と疑核ニューロンにおけるリーリングナルの発現 顔面神経核はリーリンを発現せずDab1を発現することが知られるが、疑核ニューロンのリーリン発現については不明である。そこで、*in situ*ハイブリダイゼーション法により延髄から橋にかけてのリーリンmRNAの発現パターンを調べたところ、顔面神経核ではリーリンを発現していなかった。一方、顔面神経核より尾側の切片で、疑核ニューロンが存在すると思われる延髄の腹側領域でリーリンの強い発現が認められた【図7】。さらに、リーリン蛋白を認識するG10抗体により、この領域のリーリン蛋白の局在を調べたところ、疑核ニューロンと思われるG10免疫陽性の多極性細胞が多数検出された【図8】。このリーリン陽性細胞が疑核ニューロンであることを確認するため、CTBを食道腹部に注入し、逆行性にAmCニューロンを標識するとともに、G10との蛍光二重免疫組織化学を行ったところ、CTB陽性のAmCニューロンのほとんどがG10陽性であったことから、疑核ニューロンはリーリンを発現す

ることが明らかとなった【図9】。

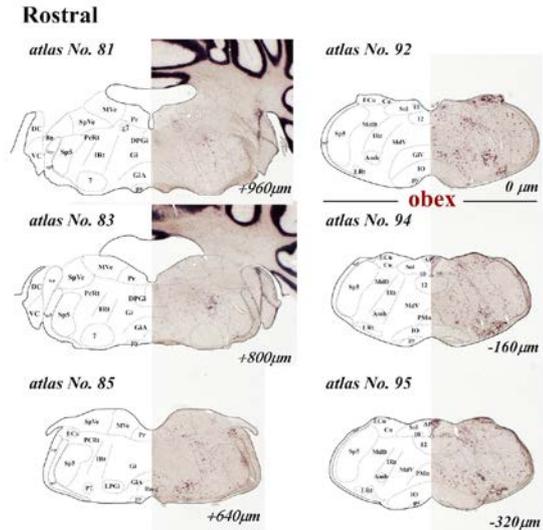


図7 顔面神経核(左半)および疑核領域(右半)におけるリーリンmRNAの発現

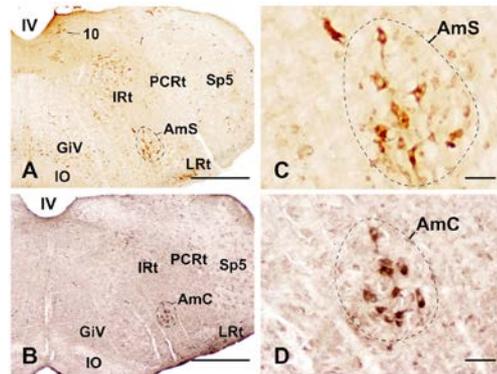


図8 疑核領域におけるリーリン蛋白の局在

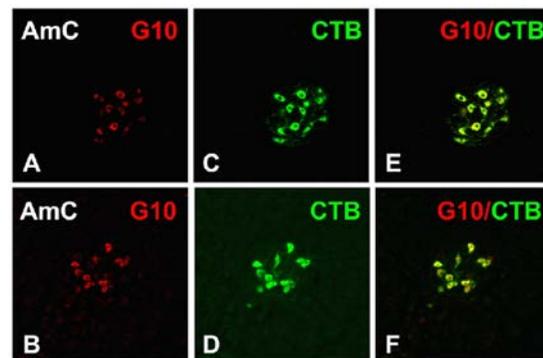


図9 逆行性に標識された疑核AmCニューロンにおけるリーリン蛋白の局在

以上の結果をまとめると、リーラーマウス顔面神経核の細胞移動・神経核構築障害はごく軽微であるのに対し、リーリンを受ける側の細胞内アダプター分子であるDab1を変異するヨタリマウスでは、外側亜核を構成するニューロンが移動経路のほぼ全長に沿って異所性に分布するなど、リーラーマウスより強い

腹方移動障害を示したことから、疑核ニューロンはリーリン依存性に移動するが、顔面神経核ニューロンの移動は、リーリンシグナル伝達系の他にDab1を介する別のシグナル経路によって調節・修飾を受けていることが示唆された。また、顔面神経核ニューロンはリーリンを発現せずDab1を発現するが、疑核ニューロンはリーリンを発現することから、両者は異なるロンボメアから発生し、おのおの異なるシグナル系および時期特異的に発現する細胞接着・反発因子との細胞間相互作用により精緻に腹方移動制御されることが示唆された。また、腹方移動時期に一致して、胎生期Dab1変異ヨタリマウス顔面神経核の軟膜側には、正常マウスで認めることができない、細胞が極めて乏しいバリアスペースと思われる領域が一過性に存在していた。Dab1を変異するヨタリマウスでは、この領域におけるリーリンがリクルートせずに蓄積した結果、ストップシグナルとして機能したため、腹方移動ができなかった可能性がある。

現在、リーリンシグナル系変異動物の胎生期における顔面神経核・疑核の腹方移動障害の機序をさらに明らかとするため、今回新たに見出されたセル・フリーな領域にも注目し、これらニューロンの細胞移動に関わる接着・反発因子等の時期特異的な発現分布についても解析を進めている。また、他にリーリンシグナル系に対して影響を与える液性因子として、種々の神経栄養因子やそれらの受容体にも注目して現在解析を進めている。特に、脳由来神経栄養因子(BDNF)は、リーリンの発現を下方制御することが知られている。BDNFの過剰発現トランスジェニックマウスでは、カハール・レチウス(CR)細胞から分泌されるリーリンが減少するために皮質の層構造が乱れることから、BDNFとその受容体TrkBはリーリンと協働して皮質ニューロンの移動を制御することが示されている。さらに、BDNFを胎生期に脳室内へ一過性に投与すると、CR細胞のリーリン発現は抑制されないにも関わらず、早生まれのIV-V層ニューロンのみがより深層に位置することから、時期特異的なリーリン非依存性の移動制御機構の存在が示されている。興味あることに、われわれの研究室が行った最近の実験において、胎生期マウス脳の初代培養細胞に対するBDNF添加がDab1のリン酸化を誘導し、フィロポディア形成が促進されることが観察された。これらのことから、BDNF/TrkBはリーリンシグナル系とともにDab1をリン酸化し、大脳皮質ニューロンの突起伸長や細胞移動に寄与すると考えられるが、鰓弓性運動ニューロン移動に対する作用はこれまでのところ示されておらず、今後の研究課題である。

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)

[学会発表] (計1件)

① 薛 富義, 寺島 俊雄, リーリンシグナル伝達系の変異マウス *reeler* および *yotari* の顔面神経核と疑核の細胞構築異常, 第119回日本解剖学会総会, 2014年3月27日~29日 (下野市)

[その他]

ホームページ等

http://www.med.kobe-u.ac.jp/anatol1/Anat1_home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

薛 富義 (SETSU, Tomiyoshi)
神戸大学・大学院医学研究科・技術専門員
研究者番号: 30403231

(2) 連携研究者

寺島 俊雄 (TERASHIMA, Toshio)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 20101892