

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590225

研究課題名(和文) 大脳皮質ニューロンでみられるネトリン-1作用の軸索伸長から分枝新生への転換の解析

研究課題名(英文) Conversion in the role of netrin-1 from axon outgrowth to de novo formation of axon branches in developing cerebral cortical neurons

研究代表者

松本 英子 (Matsumoto, Hideko)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00312257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：軸索ガイダンス因子ネトリン-1は軸索の伸長や反発、分枝新生など多様な役割をもつ。大脳皮質ニューロン軸索での作用は伸長促進とも分枝新生促進ともいわれるため、この不一致の解消を目指しマウス初代培養系で形態学的解析を行った。胎生14日ニューロン軸索の伸長、胎生16日ニューロン軸索シャフトでの糸状仮足生成とこれに続く分枝新生がネトリン-1依存的に認められ、いずれにもネトリン受容体の一つDCC (deleted in colorectal cancer) が必要であった。ネトリン-1が大脳皮質ニューロン軸索で示す作用は発生過程で伸長促進から分枝新生促進に転じ、DCCはこれらの両方を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A multifunctional axon guidance cue netrin-1 elicits axon outgrowth via one of its receptors DCC (deleted in colorectal cancer) in several types of neurons, including cerebral cortical neurons of embryonic mice. However, we and others have observed de novo formation of axon branches induced by netrin-1 in cortical culture of neonatal hamsters. These findings suggested the possibility that netrin-1 function might alter during development, which we here investigated using mouse primary culture. Imaging analysis showed netrin-1-induced outgrowth in embryonic day (E) 14 axons and netrin-1-induced branching in E16 axons, suggesting conversion in the role of netrin-1 in cortical axons during development, from outgrowth to branching. Netrin-1-induced filopodial protrusions preceding branch formation were visualized on the shafts of E16 axons by atmospheric scanning electron microscopy. Function-blocking experiment suggested DCC contribution not only to axon outgrowth but branching.

研究分野：発生神経生物学

キーワード：神経回路形成 大脳皮質ニューロン 軸索ガイダンス 軸索分岐形成 軸索分枝新生 軸索伸長 ネットリン-1

1. 研究開始当初の背景

ネトリン-1 は多機能性の軸索ガイダンス因子であり、種々のニューロンの軸索において伸長、反発、分岐形成などの様々な生理作用を示す。このうち軸索伸長作用については、胎生 13 日 (E13) マウス由来の大脳皮質ニューロンにおける報告を含め、過去に多くの研究がなされてきた。

一方、ネトリン-1 の軸索分岐形成作用については未知の部分が多いが、我々を含むいくつかのグループは、ハムスター新生仔由来の大脳皮質ニューロンでこれを認め追究してきた。軸索分岐形成は一本の軸索が複数の標的に投射する機構として重要であると考えられ、軸索先端の成長円錐が前へと進むにつれ、そこからもう一つの新たな成長円錐とその後ろに連なる分枝が生ずる場合と、成長円錐の関与なしに軸索シャフトから直接に分枝が新生する場合との二つの様式に大別される。ネトリン-1 はこのうち後者を促進することが知られており、この軸索分枝新生 (軸索側枝発芽とも呼ばれる) の際にはまず軸索シャフト上に多数の糸状仮足が生じ、のちにそのうちの一部のみが分枝となって定着することも報告されていた。

一般にニューロン軸索においては、伸長が止まっている間にも分岐の形成が進行することがしばしば観察され、伸長と分岐形成とは独立に制御されているものと考えられている。前述の通り齧歯類の大脳皮質ニューロンにおけるネトリン-1 の生理作用について、軸索伸長促進であるとする報告と軸索分枝新生促進であるとする報告とがこれまでになされていることから、本研究でこの不一致の解消に取り組んだ。ハムスターは胎生期が 16 日間と他の齧歯類と比べて短く、より未熟な状態で出生を迎えることを考慮すると、ネトリン-1 が齧歯類の大脳皮質ニューロン軸索において示す生理作用は、発生の初期には軸索伸長の促進であるが、のちに軸索分枝新

生の促進に転ずるという可能性が考えられた。

2. 研究の目的

ネトリン-1 が齧歯類の大脳皮質ニューロン軸索において示す生理作用が、発生過程初期には軸索伸長の促進であるが、のちに軸索分枝新生の促進へと転換する可能性について検討するとともに、これらを担うネトリン受容体の特定を目指した。

3. 研究の方法

我々が過去の研究でも用いてきたハムスター新生仔大脳皮質由来の初代分散培養に加えて、胎生中期以降の様々な時期にあるマウス胎仔の大脳皮質より同様に初代分散培養を調製し、ニューロンの形態学的な解析に用いた。特にマウス胎生 14 日 (E14) ニューロン、E16 ニューロンについて、培地中にネトリン-1 を加えた際の反応を調べた。また、ネトリン-1 の受容体のうちのひとつである DCC (deleted in colorectal cancer) の機能を阻害する目的で抗 DCC 抗体の培地への添加を行い、その影響について調べた。

まず当初の計画に従い光学顕微鏡を利用して、4 時間のネトリン-1 処理を行った際の軸索伸長と軸索分岐形成に関する定量的画像解析を行った。さらに、研究が進展するにつれ、より高倍での観察が必要となったため、電子顕微鏡観察にも取り組んだ。溶液中での試料観察が可能な新型の電子顕微鏡である大気圧走査電子顕微鏡を用いて、分枝新生に先立ちネトリン-1 依存的に軸索シャフトに生ずる糸状仮足を可視化し観察した。

4. 研究成果

(1) 胎生 14 日 (E14) マウス大脳皮質に由来する培養ニューロンではネトリン-1 依存的な軸索伸長、E16 ニューロンではネトリン-1 依存的な軸索分枝新生がみられることを、定

量的画像解析より明らかにした。

(2) E16 ニューロンにおいて、ネトリン-1 刺激の直後から分枝新生に先立って軸索シャフトに多数生ずる糸状仮足を、大気圧走査電子顕微鏡と呼ばれる新型の顕微鏡を用いて観察した。

(3) ネトリン受容体の一つ DCC (deleted in colorectal cancer) がこれらのニューロンに発現していることを確かめた上で、ネトリン-1 依存的な軸索伸長と、シャフト上の糸状仮足生成に始まる軸索分枝新生の両方で DCC の寄与が大きいことを、抗 DCC 抗体を用いた機能障害実験によって示した。

(4) これらのことから、大脳皮質ニューロンにおけるネトリン-1 作用は発生の過程で軸索伸長促進から軸索分枝新生促進へと転ずること、また、これらがともにネトリン受容体 DCC を介して起こることが示唆された。

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. Hideko Matsumoto, Masabumi Nagashima: "Transition of the role of netrin-1 in cerebral cortical neurons during development" *Mol. Biol. Cell* 24, 3775, abstract #1154 (2013), 査読無

DOI: 10.1091/mbc.E13-10-0584

2. Hideko Matsumoto, Masabumi Nagashima: "Netrin-1-induced axon branching of cerebral cortical neurons requires DCC and lipid raft integrity" *Mol. Biol. Cell* 22, 4705, abstract #2007 (2011), 査読無

DOI: 10.1091/mbc.E11-10-0886

[学会発表](計8件)

1. 松本英子、永島雅文: "大脳皮質ニューロンでみられるネトリン-1/DCC による軸索伸長と軸索分岐形成" 第37回日本分子生物学会年会.(2014年11月27日).パシフィコ横浜(神奈川県)

2. 松本英子、永島雅文: "大脳皮質ニューロン軸索でみられる糸状仮足生成に関する解析" 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会.(2014年3月29日).自治医科大学キャンパス(栃木県)

3. Hideko Matsumoto, Masabumi Nagashima: "Transition of the role of netrin-1 in cerebral cortical neurons during development" The 2013 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. (2013年12月16日). New Orleans, Louisiana (USA)

4. Hideko Matsumoto, Masabumi Nagashima: "Morphological analysis of netrin-1-induced filopodial protrusion and axon branching from cortical axon shafts" Neuro2013 (第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学会大会・第23回日本神経回路学会大会 合同大会).(2013年6月21日). 国立京都国際会館(京都府)

5. 松本英子、永島雅文: "マウス胎生期大脳皮質ニューロンにおけるネトリン-1作用の転換の解析" 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会.(2013年3月28日).サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県)

6. 松本英子、永島雅文: "培養ニューロンを用いた軸索ガイダンス研究における大気圧

走査電子顕微鏡の活用” 第 44 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会（招待講演）.(2012 年 9 月 28 日) . 高知市文化プラザかるぼーと（高知県）

7. 松本英子、永島雅文：“ネトリン-1 依存的な大脳皮質ニューロン軸索分枝新生におけるネトリン受容体 DCC と脂質ラフトの役割” 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 . (2012 年 3 月 26 日) . 山梨大学甲府キャンパス（山梨県）

8. Hideko Matsumoto, Masabumi Nagashima: “Netrin-1-induced axon branching of cerebral cortical neurons requires DCC and lipid raft integrity” The 2011 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. (2011 年 12 月 4 日) . Denver, Colorado (USA)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 英子 (MATSUMOTO, Hideko)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00312257