

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23700384
研究課題名（和文） マウス大脳皮質形成において皮質深部で発現するリーリン蛋白質の機能解析
研究課題名（英文） Functions of Reelin signal in deep position of developing neocortex
研究代表者
廣田 ゆき (HIROTA YUKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00453548

研究成果の概要（和文）：哺乳類の大脳皮質の発生過程において、リーリンシグナルはニューロンの移動と層形成に重要な機能を有するが、その作用機序には不明な点が多く残されている。本研究では胎生期大脳皮質の深部においてリーリン蛋白質とその受容体 ApoER2 が発現し、新生ニューロンの形態と移動を制御することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：During the development of mammalian neocortex, Reelin signaling control the migratory behavior of immature neurons and layer formation, detailed cellular and mechanisms of Reelin function remains to be elucidated. Here we found that Reelin and its receptor ApoER2 are expressed in deep position of developing cortex and that knockdown of ApoER2 resulted in an abnormal morphology and migratory pattern of newborn neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経発生生物学

科研費の分科・細目：細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳皮質、ニューロン移動、リーリンシグナル

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質のニューロンの 80-90%は興奮性ニューロンに占められる。興奮性ニューロンの多くは胎生期に脳室の側壁に面した脳室帯で誕生し、脳表面の辺縁帯直下まで放射状に移動して停止する。より遅い時期に誕生したニューロンが、先に移動を終えたニューロンを通り越していく過程を繰り返すことにより、早生まれのニューロンほど最終的により深層に配置され、遅生まれのニューロンほどより浅層に配置される。その結果、脳表

面に平行な 6 層から成る精巧な多層構造が形成される。

大脳皮質形成過程におけるニューロン移動と層構造形成の主要な制御因子のひとつがリーリンシグナルである。リーリンは主に脳室表層の辺縁帯においてカハールレチウス細胞によって分泌され、移動中のニューロンに働きかけ、細胞内にシグナルを伝達すると考えられているがその詳細な細胞・分子レベルの作用機構には不明な点が多数残されている。

最近の報告で、リーリンを異所的に皮質内に発現させると、中間帯においてニューロンが凝集することが示された (Kubo et al., 2010)。この凝集塊においては正常の層形成時と同様に、遅生まれのニューロンが早生まれのニューロンを追い越して凝集塊の中心部へと到達していたことから、移動中のニューロンは移動開始直後から、リーリン蛋白質に正常に反応し層構造を形成するために必要な受容体などの分子群セットを有していると推測された。また近年の報告では脳表層に存在するカハールレチウス細胞の大部分を、遺伝子操作を用いて除去しても、ニューロン移動が正常に行われ、層構造が形成されることが報告された (Yoshida et al., 2006)。よって、皮質板浅部に進入する以前にリーリン蛋白質が移動ニューロンに作用する可能性が高い。実際に、胎生期 12 日から 18 日にかけて、皮質板の深部にリーリン mRNA が少量発現する可能性が示唆されている (Yoshida et al., 2006) ことから、この部位において少量のリーリン蛋白質が移動ニューロンに対してなんらかの移動を促進する作用を持っていることが推測されるが、その作用メカニズムは未解明である。

2. 研究の目的

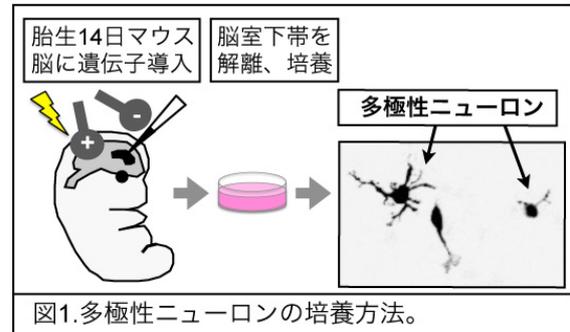
本研究では、皮質形成過程において移動を開始した直後のニューロンに対するリーリン蛋白質の作用機序を明らかにし、層形成初期のニューロン動態の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リーリンシグナル構成因子の皮質深部における発現パターンの解析: リーリンの発現時期、消失時期を明らかにするために、組織切片染色に使用可能な抗体を探索した。また皮質深部で働くリーリン受容体の分布を明らかにするために、ApoER2 および VLDLR に対するモノクローナル抗体を作製した。これらの個体を用いて発生の各段階におけるリーリンシグナル構成因子の大脳皮質における発現を調べた。

(2) 皮質深部におけるリーリンシグナル阻害の移動ニューロンに与える影響の解析: 脳室深部で発現するリーリン受容体の機能阻

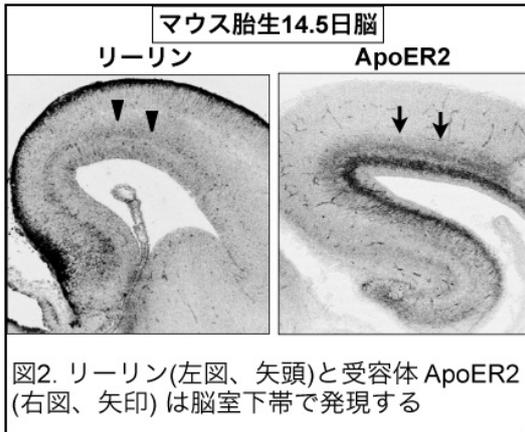
害を行うために、ノックダウン配列を設計し、培養細胞にて効果を検証した。阻害効果が見られた配列を用いて、胎生期 14.5 日脳の脳室帯に子宮内エレクトロポレーションによってノックダウンベクターを導入し、移動ニューロンが中間帯に移動する 48 時間後に解析した。



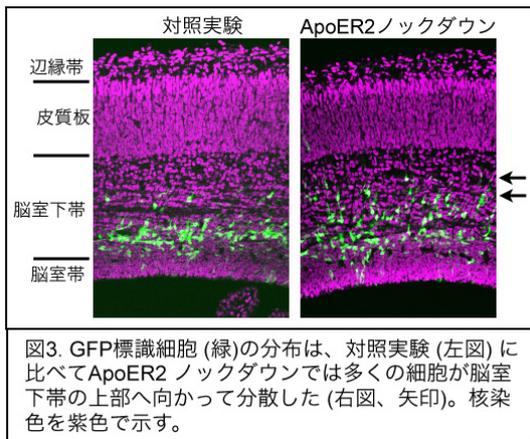
(3) 初代培養を用いた解析: 皮質深部で発現するリーリン蛋白質の機能を *in vitro* で検討するために、初代培養を行った。胎生期 14.5 日に子宮内エレクトロポレーションによって脳室帯の細胞に受容体のノックダウンベクターを導入し、48 時間後に解剖・単離した。これらの細胞をプレート上で培養することにより、多極性の形態を持つニューロンを観察し、受容体ノックダウンの影響を調べた (図1)。

4. 研究成果

(1) リーリン蛋白質の胎生期脳の皮質深部における発現時期・発現領域を抗体染色によって調べた。その結果、胎生期 14.5 日の脳において、リーリンが脳室下帯を移動中の介在ニューロンおよび脳室下帯に低濃度に発現することを見いだした (図2)。次に、リーリンの2つの主要な受容体 ApoER2 および VLDLR に対するモノクローナル抗体を作製し、ノックアウトマウスの切片で発現が消失すること、ウエスタンブロットにより予想される分子量のバンドを検出することを指標に、特異的な染色を示す抗体をスクリーニングした。その結果、ApoER2, VLDLR とも特異的な染色を示す抗体を得て、染色パターンを観察したところ、リーリン受容体 ApoER2 が脳室下帯に発現することを見いだした (図2)。一方、VLDLR は主に脳表層の辺縁部に発現していたことから、皮質深部におけるリーリンは ApoER2 を介してシグナル伝達されることが示唆された。

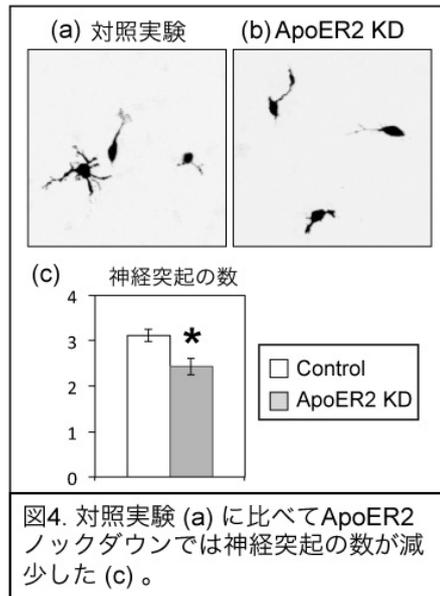


(2) 皮質深部でのリーリンシグナルの機能を調べるために、この部位を移動するニューロンで ApoER2 の機能を、RNA 干渉法を用いた遺伝子ノックダウンによって阻害し、移動ニューロンの分布を調べた。その結果、ApoER2 ノックダウンではニューロンが有意に脳表側へと分布がシフトした(図 3)。



またこの際、ニューロンの極性をゴルジ体マーカーで調べたところ、ゴルジ体の局在が脳表側にある細胞が増加した。脳室下帯で幼若ニューロンは一過性に多数の突起を持った多極性形態をとることが知られている。ApoER2 を阻害したニューロンの突起を調べたところ、数が有意に減少していた。

(3) さらに初代培養系で ApoER2 の阻害を行ったところ、生体内と同様にニューロンの突起数の減少が認められた(図 4)。



これらの結果は、ApoER2 が移動開始直後のニューロンにおいて細胞自律的な機能を持ち、神経突起形成と移動の制御を行うことを示唆している。本研究により、皮質深部においてリーリンシグナルが作用し、その後の最終的な層形成に寄与する可能性が示された。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 廣田ゆき、久保健一郎、仲嶋一範. “神経細胞移動における受容体を介したリーリンシグナルの機能” 第 45 回慶應ニューロサイエンス研究会、2013 年 1 月 26 日. 慶應義塾大学信濃町キャンパス、東京.
- ② 廣田ゆき、久保健一郎、仲嶋一範 “神経細胞移動における受容体を介したリーリンシグナルの機能 (Functions of the Reelin signaling via its receptors in neuronal migration)” 第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日. 名古屋国際会議場、名古屋.

- ③ Kubo K., Sekine, Hirota, Y., Yamakawa M., Noda M., Ishii K., Kitazawa A., Hayashi K., Honda T., Nakajima K. “How does Reelin regulate neuronal layer formation in the developing cortex?” Young Investigator Colloquium 第55回 日本神経化学会大会・第11回アジア太平洋神経化学会 合同大会 (The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry)、神戸コンベンションセンター、神戸 (兵庫県)、2012年9月30日.

[その他]

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~Nakajima/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 ゆき (HIROTA YUKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00453548